BT

07-108813

Organizacion CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DVN
NOV

INVENTARIO ✓

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 07-108813

54. **TITULO** "MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO Y LA PREVENCIÓN DE FIBROSIS"

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07K 14/715

71. **SOLICITANTE** WYETH; THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMEN OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Y PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

74. **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 12 - OCTUBRE - 2007.

PETITORIO

00091

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-108813- -00000-0000
Fecha: 2007-10-17 09:53:42 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 389

ión

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

14 Nov. 2007

(1) SOLICITUD DE :

[X]	Patente de Invención	[ ]	Patente de Modelo de Utilidad
[X]	Capítulo I.	[ ]	Capítulo II.

(2) SOLICITANTE

(71)

Nombre: WYETH;
Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América
Nombre: THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
Dirección: National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, Maryland 20852-3804, Estados Unidos de América
Nombre: PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE
Dirección Holyoke Center, Suite 727, 1350 Massachusetts Ave., Cambridge, Massachusetts 02138, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio:
Lugar de Constitución:
Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION
C.C. NIT
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6
Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211
E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: YOUNG, Deborah A.; WYNN, Thomas A.; COLLINS, Mary y GRUSBY, Michael
Dirección: 39 Nelson Road, Melrose, Massachusetts 02176, Estados Unidos de América; 1822 Tilton Drive, Silver Spring, Maryland 20902, Estados Unidos de América; 54 Rathbun Road, Natick, Massachusetts 01760, Estados Unidos de América y 5 Nightingale Path, Newton, Massachusetts 02459, Estados Unidos de América, respectivamente.
Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

(5) PCT (85)
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/013829 / Fecha 13-ABR-2006
Publicación Internacional No. WO/2006/113331 Fecha 26-OCT-2006

(6) Título (54) MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO Y LA PREVENCIÓN DE FIBROSIS

(7) Clasificación Internacional (51) C07K 14/715, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 17/02, C07K 16/24, C07K 16/28

(8) Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI [X] NO [ ]	US	14-ABRI-2005	60/671,374

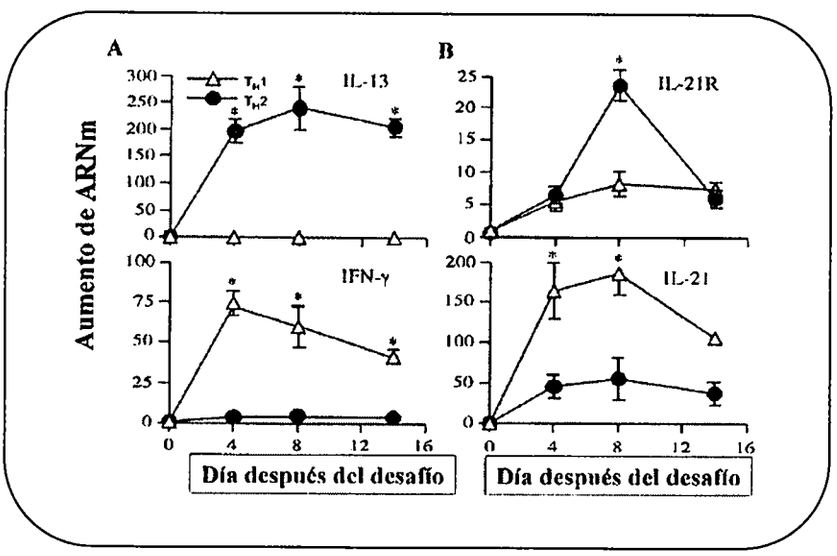
(9) Comprobante de pago No. 07-76772 **Fecha 21-SEP-07**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

X	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
	Poderes, si fuere el caso
X	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
	Declaraciones
X	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
X	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
	Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
	Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
	De ser el caso, copia del contrato de acceso
	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
	Arte final 12 x 12
	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
	De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
X	Otros: Extractos, Reporte de búsqueda y opinión escrita, notificación de presentación de documento de prioridad y modificación de solicitantes

(11) **FIGURA CARATERISTICA**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-108813- -00000-0000

Fecha: 2007-10-17 09:53:42 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 389

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 76,773
FECHA : SEPTIEMBRE 21 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	69421918	21/09/2007	46,018,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN		482,000.00
		TOTAL :	$	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

① SOLICITUD DE

[X] Corrección de Error Material [ ] Modificación de una solicitud

② SOLICITANTE

Nombre: WYETH

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

Nombre: THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Dirección: National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, Maryland 20852-3804, Estados Unidos de América

Nombre: PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

Dirección: Holyoke Center, Suite 727, 1350 Massachusetts Ave., Cambridge, Massachusetts 02138, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono: Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número

③ REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o.

Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211

E-Mail: patents.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número 79.143.366 TP 20.281

④ Numero de expediente

⑤ Descripción de la corrección o modificación solicitada El propietario presenta corrección voluntaria de los solicitantes por cuanto fueron mal escritos en la publicación Internacional.

⑥ Comprobante de Pago No. 07-66602 **Fecha** 16-AGO-07

⑦ Anexos

[X] Comprobante de pago de la tasa.

[ ] Poderes, si fuere el caso.

[ ] Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas juridicas.

⑧

NOMBRE ALVARO CORREA ORDOÑEZ FIRMA

C.C. ~~79.143.366~~ T.P. 20.281

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2000-F03

00005

00000017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 66,602
FECHA : AGOSTO 16 DE 2007

No. 07-108813- -00000-0000
Fecha: 2007-10-17 09:53:42 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 389

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48717720	16/08/2007	73,144,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL : $	99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
26 October 2006 (26.10.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/113331 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/715 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/013829

(22) International Filing Date: 13 April 2006 (13.04.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/671,374 14 April 2005 (14.04.2005) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **WYETH** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US). **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES** [US/US]; National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, Maryland 20852-3804 (US). **THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE** [US/US]; Holyoke Center, Suite 727, 1350 Massachusetts Ave., Cambridge, Massachusetts 02138 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **YOUNG, Deborah, A.** [US/US]; 39 Nelson Road, Melrose, Massachusetts 02176 (US). **WYNN, Thomas, A.** [US/US]; 1822 Tilton Drive, Silver Spring, Maryland 20902 (US). **COLLINS, Mary** [US/US]; 54 Rathbun Road, Natick, Massachusetts 01760 (US). **GRUSBY, Michael** [US/US]; 5 Nightingale Path, Newton, Massachusetts 02459 (US).

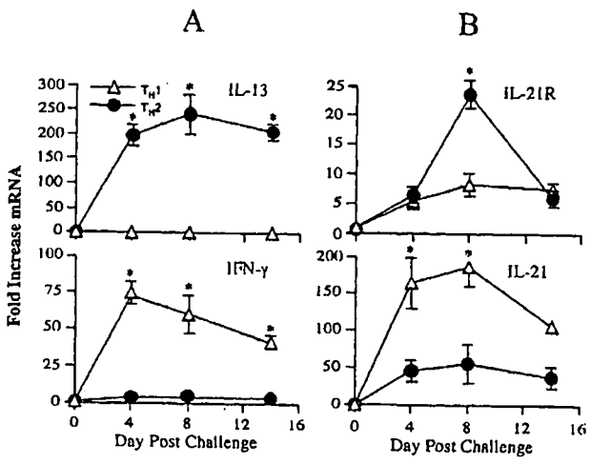
(74) Agents: **MANDRA, Raymond, R.** et al.; Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York, New York 10112-3801 (US).

(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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS BY IL-21 / IL-21R ANTAGONISTS



(57) Abstract: The present invention provides methods of screening for compositions useful for treating, ameliorating, or preventing fibrosis and/or fibrosis-associated conditions by measuring changes in the level(s) of IL-21 and/or IL-21 receptor (IL-21R) (e.g., the level of expression of IL-21 and/or IL-21 R protein and/or mRNA, the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of interaction of IL-21 with IL-21R). The invention further provides antagonists of IL-21 or IL-21R for the treatment of fibrosis and/or fibrosis-associated conditions. Further provided herein are methods of diagnosing, prognosing, and monitoring the progress (e.g., the course of treatment) of fibrosis and/or fibrosis-associated conditions by measuring the level of IL-21 and/or IL-21R (i.e., the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of expression of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21 R gene products), and/or the level of interaction of IL-21 with IL-21R).

WO 2006/113331 A1

TITLE

METHODS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS

Related Applications

[0001] This application claims the benefit of priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/671,374, filed April 14, 2005, which is hereby incorporated by reference herein in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[0002] The present invention relates to methods for treating and preventing fibrosis and fibrosis-associated conditions.

Related Background Art

[0003] Injury to any organ typically leads to a physiological response involving platelet-induced hemostasis, followed by an influx of inflammatory cells and activated fibroblasts. Cytokines produced by these cell types drive the formation of new extracellular matrix and blood vessels, which collectively form granulation tissue. The formation of fibrous tissue is part of the normal beneficial process of healing following injury; fibrosis, however, is a condition characterized by an abnormal accumulation of a collagen matrix following injury or inflammation that alters the structure and function of various tissues.

00093

Progressive fibrosis in the kidney, liver, lung, heart, bone, bone marrow, and skin is a major cause of, or contributor to, death.

[0004] Many of the diseases associated with the proliferation of fibrous tissue are chronic and often debilitating and include, for example, skin diseases such as scleroderma. Some, including pulmonary fibrosis, may be fatal, due in part to the fact that the current treatments have significant side effects and are generally not effective in slowing or halting the progression of fibrosis. There is, accordingly, a continuing need for new anti-fibrotic agents.

[0005] The IL-21 receptor (IL-21R) is a newly discovered member of the class I cytokine receptor family (Parrish-Novak et al. (2000) *Nature* 408:57-63; Ozaki et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11439-44). The IL-21 receptor shows significant sequence and structural homology with the IL-4 receptor alpha (IL-4Rα) chain and is adjacent to the IL-4Rα in the human and mouse genomes, while its ligand, IL-21, shares significant homology with the cytokines IL-2, IL-4, and IL-15 (Sivakumar et al. (2004) *Immunology* 112:177-82; Habib et al. (2003) *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:1033-45). IL-21 and IL-21R are thus newly described members of the gamma chain (γc)-dependent cytokine network because of their homology with cytokines and receptors that require the γc for functional signaling (Vosshenrich and Di Santo (2001) *Curr. Biol.* 11:R175-77). Because all members of the γc network exhibit important and unique roles in host immunity, there has been growing interest in dissecting the novel functions of the IL-21R during antigen-triggered immune responses *in vivo*.

[0006] Initial studies examining the function of IL-21 showed that NK cell expansion is antagonized, whereas antigen-specific T cell immunity is promoted by IL-21, including anti-tumor immunity (Ma et al. (2003) *J. Immunol.* 171:608-15; Kishida et al. (2003) *Mol. Ther.* 8:552-58; Di Carlo et al. (2004) *J. Immunol.* 172:1540-47), findings that suggest that IL-21 serves as a bridge between innate and adaptive immune responses (Collins et al. (2003) *Immunol. Res.* 28:131-40). IL-21 also regulates B cell and $CD8^+$ T cell function *in vivo* (Ozaki et al. (2002) *Science* 298:1630-34; Suto et al. (2002) *Blood* 100:4565-73; Mehta et al. (2003) *J. Immunol.* 170:4111-18; Pene et al. (2004) *J. Immunol.* 172:5154-57; Jin et al. (2004) *J. Immunol.*173:657-65; Zeng et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201:139-48). Additional studies suggest that IL-21 is a T_H2 cytokine that can inhibit the

differentiation of naïve T_H cells into IFN-γ-secreting T_H1 cells (Wurster et al. (2002) *J. Exp. Med.* 196:969-77). Indeed, exogenous treatment with IL-21 potently inhibited IFN-γ production without affecting other T_H1/T_H2-associated cytokines, suggesting that the repression of IFN-γ by IL-21 is highly specific. Thus, by virtue of its ability to suppress the development of T_H1 cells, it was hypothesized that IL-21 might promote T_H2 responses (Wurster et al., *supra*). Nevertheless, the involvement of the IL-21R signaling pathway in T_H2 response development was not previously investigated in any T_H2-dependent disorder.

[0007] In schistosomiasis, T_H2 cytokines play an indispensable role in the pathogenesis of the disease (Wynn (2004) *Nat. Rev. Immunol.* 4:583-594; Pearce and MacDonald (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 2:499-511). Indeed, IL-4/IL-13-, IL-4Rα-, and Stat6-deficient mice all show significantly impaired granuloma formation and liver fibrosis following infection with *S. mansoni* (Chiaramonte et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104:777-85; Kaplan et al. (1998) *J. Immunol.* 160:1850-56; Jankovic et al. (1999) *J. Immunol.* 163:337-42; Fallon et al. (2000) *J. Immunol.* 164:2585-91). Given the recent classification of IL-21 as a T_H2 cytokine (Wurster et al. (2002), *supra*; Mehta et al. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:2016-21), the striking similarities between the IL-4 and IL-21 receptors (Sivakumar et al., *supra*; Habib et al., *supra*), and the critical role of the related IL-4Rα/Stat6-signaling pathway in this disease as well as in other T_H2 cytokine-driven inflammatory disorders (Wynn (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:425-56), an important question evolving from these studies was whether IL-21R signaling plays a significant role in the initiation and/or maintenance of T_H2 immunity.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] The present invention provides methods of treating, ameliorating or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder, as well as methods of screening for compounds and compositions useful in those methods. The invention also provides methods of diagnosing, prognosing, and monitoring the progress (e.g., the course of treatment) of fibrosis and/or fibrosis-associated conditions. These methods are related to measuring and/or modulating the level of IL-21 and/or IL-21R (i.e., the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the

level of expression of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21R gene products), and/or the level of interaction of IL-21 with IL-21R). The invention further provides antagonists of IL-21 or IL-21R for the treatment of fibrosis and/or fibrosis-associated conditions.

[0009] In one embodiment, the invention provides a method for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject (e.g., a human) comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent that reduces the level of IL-21 and/or IL-21R in the subject. In a further embodiment, the agent is an IL-21/IL-21R antagonist selected from the group consisting of an anti-IL-21R antibody, an anti-IL-21 antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL-21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL-21 antibody, and a soluble fragment of an IL-21R. In another further embodiment, the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and the soluble fragment of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 1-538 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-538 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-236 of SEQ ID NO: 2, amino acids 20-236 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-529 of SEQ ID NO:5, amino acids 20-529 of SEQ ID NO:5, amino acids 1-236 of SEQ ID NO:5, and amino acid 20-236 of SEQ ID NO:5. In another embodiment, the soluble fragment of the IL-21R binds to an IL-21 polypeptide.

[0010] In another embodiment, the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and the soluble fragment of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, or SEQ ID NO:27. In another embodiment, the amino acid sequence of the soluble fragment of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:13. In another embodiment, the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and the soluble fragment of the IL-21R is encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, or SEQ ID NO:26. In another embodiment, the soluble fragment of

the IL-21R is encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:12 or SEQ ID NO:16.

[0011] In another embodiment, the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and the soluble fragment of the IL-21R comprises an extracellular domain of IL-21R and an immunoglobulin Fc fragment. In a further embodiment, the amino acid sequence of the extracellular domain of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2 or amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2. In another embodiment, the immunoglobulin Fc fragment has an altered function. In another further embodiment, the immunoglobulin Fc fragment has the amino acid sequence of amino acids 244-467 of SEQ ID NO:17.

[0012] In another embodiment, the fibrosis or fibrosis-associated disorder affects the liver, epidermis, endodermis, muscle, tendon, cartilage, heart, pancreas, lung, uterus, nervous system, testis, ovary, adrenal gland, artery, vein, colon, small intestine, biliary tract, or stomach. In a further embodiment, the fibrosis or fibrosis-associated disorder is interstitial lung fibrosis. In another embodiment, the fibrosis or fibrosis-associated disorder is the result of an infection with schistosoma. In another embodiment, the fibrosis or fibrosis-associated disorder is the result of wound healing. In a further embodiment, the wound healing results from a surgical incision.

[0013] In another embodiment, the invention further comprises administering to the subject at least one additional therapeutic agent. In another embodiment, the at least one additional therapeutic agent is selected from the group consisting of cytokine inhibitors, growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, cytotoxic agents, and cytostatic agents. In a further embodiment, the at least one additional therapeutic agent is selected from the group consisting of TNF antagonists, anti-TNF agents, IL-12 antagonists, IL-15 antagonists, IL-17 antagonists, IL-18 antagonists, IL-22 antagonists, T cell-depleting agents, B cell-depleting agents, cyclosporin, FK506, CCI-779, etanercept, infliximab, rituximab, adalimumab, prednisolone, azathioprine, gold, sulphasalazine, hydroxychloroquine, minocycline, anakinra, abatacept, methotrexate, leflunomide, rapamycin, rapamycin analogs, Cox-2 inhibitors, cPLA2 inhibitors, NSAIDs, p38 inhibitors, antagonists of B7.1, B7.2, ICOSL, ICOS and/or CD28, and agonists of CTLA4.

[0014] In another embodiment, the invention provides a method for identifying a compound for treating, ameliorating or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest; (b) contacting the cell or sample of interest with a compound; and (c) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest following contact with the compound, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the contacted cell or sample of interest, in comparison to the level of IL-21 and/or IL-21R in a noncontacted cell or sample of interest, identifies the compound as a compound useful for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject.

[0015] In another embodiment, the invention provides a method for identifying a compound for treating, ameliorating or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest; (b) contacting the cell or sample of interest with a compound; (c) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest following contact with the compound; and (d) comparing the level of IL-21 and/or IL-21R in the contacted cell or sample of interest with a reference level of IL-21 and/or IL-21R, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the contacted cell or sample of interest, in comparison to the reference level of IL-21 and/or IL-21R, identifies the compound as a compound useful for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject.

[0016] In another embodiment, the invention provides a method for monitoring the progress of fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a first time point; and (b) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a second time point, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the second time point, in comparison to the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the first time point, provides an indication that the fibrosis or fibrosis-associated condition has decreased in severity.

[0017] In another embodiment, the invention provides a method for prognosing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring

00213

the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a first time point; and (b) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a second time point, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the second time point, in comparison to the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the first time point, indicates a decreased likelihood that the subject will develop fibrosis or the fibrosis-associated condition or a decreased likelihood that the fibrosis or fibrosis-associate condition will worsen in the subject.

[0018] In another embodiment, the invention provides a method for prognosing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject; and (b) comparing the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject to a reference level of IL-21 and/or IL-21R, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject, in comparison to the reference level of IL-21 and/or IL-21R, indicates a decreased likelihood that the subject will develop fibrosis or the fibrosis-associated condition or a decreased likelihood that the fibrosis or fibrosis-associate condition will worsen in the subject.

[0019] In another embodiment, the invention provides a method for diagnosing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject, and (b) comparing the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject with a reference level of IL-21 and/or IL-21R, wherein a higher level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject, in comparison to the reference level of IL-21 and/or IL-21R, indicates the presence of fibrosis or the fibrosis-associated condition in the subject.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0020] FIG. 1 depicts the full-length cDNA sequence of murine IL-21R/MU-1. The nucleotide sequence corresponds to nucleotides 1-2628 of SEQ ID NO:4.

[0021] FIGS. 2A and 2B depict the amino acid sequences of murine and human IL-21R/MU-1. FIG. 2A depicts the amino acid sequence of murine

IL-21R/MU-1 (corresponding to the amino acids 1-529 of SEQ ID NO:5). There is a leader sequence (predicted by SPScan with a score of 10.1) at amino acids 1-19 (boldface type). A predicted transmembrane domain (underlined) is found at amino acids 237-253 of SEQ ID NO:5. Predicted signaling motifs include the "Box 1" motif at amino acids 265-274 and the "Box 2" motif at amino acids 311-324 (bold and underlined). Six tyrosines are located at amino acid positions 281, 319, 361, 368, 397, and 510, of SEQ ID NO:5. The WSXWS motif (SEQ ID NO:3) is located at amino acid residues 214-218 (in large, boldface type). Potential Stat docking sites include amino acids 393-398 and amino acids 510-513 of SEQ ID NO:5. FIG. 2B depicts the amino acid sequence of human IL-21R/MU-1 (corresponding to SEQ ID NO:2). The location of the predicted signal sequence (about amino acids 1-19 of SEQ ID NO:2); WSXWS motif (about amino acids 213-217 of SEQ ID NO:2); and transmembrane domain (about amino acids 236-252 (or 236-253, or 236-254) of SEQ ID NO:2 (underlined)) are indicated. Potential JAK binding sites, Box 1 and 2 signaling motifs, and Stat docking sites are indicated by labeled arrows.

[0022] FIG. 3 depicts the GAP comparison of human and murine IL-21R/MU-1 cDNA sequences (corresponding to nucleic acids 1-2665 of SEQ ID NO:1 and nucleic acids 1-2628 of SEQ ID NO:4, respectively). huMU-1=human IL-21R/MU-1, murMU-1=murine IL-21R/MU-1. Gap Parameters: Gap Weight=50; Average Match=10.000; Length Weight=3; Average Mismatch=0.000; Percent Identity=66.116.

[0023] FIG. 4 depicts a GAP comparison of human IL-21R/MU-1 protein (corresponding to amino acids of SEQ ID NO:2) and murine IL-21R/MU-1 protein (corresponding to amino acids of SEQ ID NO:5). The alignment was generated by BLOSUM62 amino acid substitution matrix (Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915-19). Gap parameters=Gap Weight: 8; Average Match=2.912; Length Weight=2; Average Mismatch=-2.003; Percent Identity=65.267.

[0024] FIG. 5 depicts a multiple sequence alignment of the amino acids of human IL-21R/MU-1 (corresponding to SEQ ID NO:2), murine IL-21R/MU-1 (corresponding to SEQ ID NO:5), and human IL-2 beta chain (GENBANK® Accession No. M26062). Leader and transmembrane domains are underlined.

Conserved cytokine receptor module motifs are indicated by boldface type. Potential signaling regions are indicated by underlining and boldface type.

[0025] FIG. 6 depicts signaling through IL-21R/MU-1. IL-21R/MU-1 phosphorylates Stat 5 in Clone E7 EPO IL-21R/MU-1 chimera expressing cells stimulated with EPO. Treatment of controls or chimeric BAF-3 cells with IL-3 resulted in phosphorylation of Stat 3, but not Stat 1 or 5.

[0026] FIGS. 7A-7B depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of mature human IL-21R fused at the amino terminal to a honeybee leader sequence and His_6 and Flag tags. The nucleotide and amino acid sequences of the fusion protein depicted in FIGS. 7A-7B are set forth in SEQ ID NO:10 and SEQ ID NO:11, respectively. The amino acid sequences of the mature human IL-21R fragment and the honeybee leader / His tags fragment of the fusion protein correspond to amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2 and amino acids 1-44 of SEQ ID NO:11, respectively.

[0027] FIGS. 8A-8C depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of human IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus via a linker to human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc sequence. The nucleotide and amino acid sequences of the fusion protein depicted in FIGS. 8A-8C are set forth in SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13, respectively. The amino acid sequences of the human IL-21R extracellular domain, the linker, and the human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc sequence correspond to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 236-243 of SEQ ID NO:13, and amino acids 244-467 of SEQ ID NO:13, respectively.

[0028] FIGS. 9A-9C depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of human IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus via a linker to human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc sequence and His_6 sequence tag. The nucleotide and amino acid sequences of the fusion protein depicted in FIGS. 9A-9C are set forth in SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15, respectively. The amino acid sequences of the human IL-21R extracellular domain, the linker, the human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc sequence, and the His_6 sequence tag correspond to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 236-243 of SEQ ID NO:15, amino acids 244-467 of SEQ ID NO:15, and amino acids 468-492 of SEQ ID NO:15, respectively.

00010

[0029] FIGS. 10A-10C depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of human IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus via a linker to human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc-mutated sequence. The human Fc sequence has been mutated at residues 254 and 257 from the wild-type sequence to reduce Fc-receptor binding. The nucleotide and amino acid sequences of the fusion protein depicted in FIGS. 10A-10C are set forth in SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:17, respectively. The amino acid sequences of the human IL-21R extracellular domain, the linker, and the human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc-mutated sequence correspond to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 236-243 of SEQ ID NO:17, and amino acids 244-467 of SEQ ID NO:17, respectively.

[0030] FIGS. 11A-11B depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of human IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus to a rhodopsin sequence tag. The nucleotide and amino acid sequences of the fusion protein are set forth in SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:19, respectively. The amino acid sequence of the human IL-21R extracellular domain corresponds to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2.

[0031] FIGS. 12A-12C depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of human IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus to an EK cleavage site and mutated IgG1 Fc region. The nucleotide and amino acid sequences of the fusion protein depicted in FIGS. 12A-12C are set forth in SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:21, respectively. The amino acid sequences of the human IL-21R extracellular domain, and the EK cleavage site/mutated IgG1 Fc region correspond to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2 and amino acids 236-470 of SEQ ID NO:21, respectively.

[0032] FIGS. 13A-13B depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of murine IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus to mouse immunoglobulin G2a (IgG2a). The nucleotide and amino acid sequences are set forth in SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23, respectively.

[0033] FIGS. 14A-14B depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of murine IL-21R extracellular domain fused at the C-terminus to Flag and His_6 sequence tags. The nucleotide and amino acid sequences are set forth in SEQ ID NO:24 and SEQ ID NO:25, respectively.

[0034] FIGS. 15A-15B depict an alignment of the nucleotide and amino acid sequences of (honeybee leader) murine IL-21R extracellular domain fused at the N-terminus to Flag and His_6 sequence tags. The nucleotide and amino acid sequences are set forth in SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27, respectively.

[0035] FIG. 16 shows IL-21 and IL-21R expression profiles during highly polarized type-1 and type-2 immune responses. Groups of five IL-10/IL-4 KO (TH1, Δ) and IL-10/IL-12 KO (TH2, •) mice were sensitized i.p. with *S. mansoni* eggs and challenged i.v. 14 days later. Lung RNA specimens were prepared individually for real-time RT-PCR analysis of IL-13 and IFN-γ (FIG. 16A) and IL-21R and IL-21 (FIG. 16B). The means ± SEM in gene expression were expressed as fold-increases over unchallenged WT controls after normalization to HPRT. Asterisks denote significant differences between groups at the given time point, * $p<0.05$.

[0036] FIG. 17 shows that type-2 cytokine production is reduced in the lungs of schistosome egg-challenged IL-21R$^{-/-}$ mice. Groups of naïve WT (open bars) and IL-21R$^{-/-}$ mice (filled bars) were i.v. challenged with live *S. mansoni* eggs and sacrificed on days 4, 7, and 14 post-challenge. (A) RNA was prepared from lung tissues and analyzed individually (N=5 per group/time point) by real-time RT-PCR. Results are shown as box-and-whisker plots with five-number summary bars showing the median, the quartiles, and the smallest and greatest percentiles in the distribution; bars (from bottom to top) indicate the 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th percentiles, respectively, of the tested samples. The asterisks denote significant differences from wild-type values at the given time point, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (B) Spleens (Spl) and lung-associated lymph nodes (LN) were each pooled (2 separate groups, 3-4 mice per group) and single cell suspensions were assayed for IL-5, IL-10, IL-13, and IFN-γ after a 72-h incubation in the presence of Con A (CON, 1 μg/ml) or soluble egg antigen (SEA, 20 μg/ml). Cytokines were below the level of detection in unstimulated cultures. (C) Granuloma size (volume, $mm^3 \times 10^{-3}$) and the percentage of eosinophils in granulomas were quantified microscopically. (D) Real-time PCR analysis of T_H2-regulated inflammatory genes in granulomatous lung tissue. All data are representative of at least 2 separate experiments.

[0037] FIG. 18 shows that the type-2 response is impaired in *N. brasiliensis*-infected IL-21R$^{-/-}$ mice. Lungs (A) and lung-associated lymph nodes (LALN) (B) were removed on day 7 from individual *N. brasiliensis*-infected and untreated C57BL/6 or IL-21R$^{-/-}$ mice (5/treatment group). RNA was isolated and cDNA was generated as described in the legend to FIG. 17. mRNA was analyzed individually for IL-13, IL-4, AMCase, Ym1, and FIZZ1 by real-time quantitative PCR. Fold changes are based on comparisons of infected mice to naive animals.

[0038] FIG. 19 shows that type-2 cytokine-driven inflammation is reduced in IL-21R$^{-/-}$ mice. WT (open bars) and IL-21R$^{-/-}$ mice (filled bars) were sensitized i.p. with eggs, challenged i.v. two weeks later with live *S. mansoni* eggs and then sacrificed on days 4 and 7 post-challenge. (A) RNA was prepared from lung tissues and analyzed individually (N=5 per group/time point) by real-time RT-PCR as described above in the legend to FIG. 17. (B) Spleens (Spl) and lung-associated lymph nodes (LN) were assayed for IL-5, IL-10, IL-13, and IFN-γ following antigen (SEA) or mitogen stimulation (CON). (C) Granuloma size (mm^3 X 10^{-3}) and the percentage of eosinophils in granulomas were quantified microscopically in WT (mice per group: N=10, day 4; N=15, day 7) and IL-21R$^{-/-}$ mice (N=11, day 4; N=16, day 7). (D) Real-time PCR analysis of T_H2 inflammatory genes in granulomatous lung tissue (N=5 per group/time point). The asterisks denote significant differences from wild-type values at the given time point, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Data shown are the combined results of 3 separate experiments.

[0039] FIG. 20 shows that chronic liver disease following percutaneous *S. mansoni* infection is reduced in the absence of IL-21R. WT (open bars) and IL-21R$^{-/-}$ mice (filled bars) were infected with 25-30 *S. mansoni* cercariae. All animals were sacrificed at week 9 (acute) or week 12 (chronic) post-infection. (A) RNA was isolated from liver tissues and analyzed individually (N=8-10 per group/time point) by real-time RT-PCR as described above in the legend to FIG. 17. (B) Spleens (Spl) and mesenteric lymph nodes (LN) were pooled in groups of 2-4 mice and single cell suspensions were assayed for IL-5, IL-10, and IFN-γ. The data shown are the averages of three separate pooled groups. (C) Granuloma size (mm^3 X 10^{-3}) and the percentage of eosinophils in granulomas were evaluated microscopically in WT mice (mice per group: N=30 for week 9,

N=17 for week 12) and IL-21R$^{-/-}$ mice (mice per group: N=27 for week 9, N=19 for week 12). (D) Real-time PCR analysis of Th2 inflammatory genes in granulomatous liver tissue (N=8-10 per group/time point). Data shown are the combined results of 3 separate experiments conducted on week 9 and two performed on week 12. The asterisks denote significant differences from wild-type values at the given time point, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

[0040] FIG. 21 shows that the cellular composition of granulomas is unchanged by IL-21R deficiency. (A) The cellular composition of granulomas was evaluated in the livers of 9 week infected WT (N=10) and IL-21R$^{-/-}$ (N=9) mice. The average ± SEM of small lymphocytes (Sm Lym), large lymphocytes (Lg Lym), macrophages (Mac), Fibroblasts (Fibro), Eosinophils (Eos), and Mast Cells (Mc) are shown. (B) Lymphocytes were isolated from the perfused lungs of naïve WT and IL-21R$^{-/-}$ mice (top panels) and on day 7 following i.v. challenge with 5000 *S. mansoni* eggs (bottom panels). The numbers in the histograms indicate the percentages of CD4$^-$ and CD4$^+$ T cells among total lung lymphocytes.

[0041] FIG. 22 shows that IL-21R-deficiency significantly slows the progression of T_H2 cytokine-dependent fibrosis. WT (open bars) and IL-21R$^{-/-}$ mice (filled bars) were infected with *S. mansoni* cercariae. Animals were sacrificed at 9 (acute), 12 (chronic) (panels A-D) or 29 weeks (late chronic) (panel E) post-infection. (A) The average worm pairs, total worms and eggs/worm pair in thousands ± SE are shown for each group. No difference in infection intensity was noted in any experiment (*n*=number of mice). (B) Mice were bled at the time of sacrifice and SEA isotype-specific Ab titers were determined by ELISA. (C) Total serum IgE values in μg/ml. (D-F) Fibrosis was assessed by the amount of hydroxyproline in micromoles detected in the liver per 10,000 eggs (panel D) or in total liver (panels E and F). In panel F, infected WT C57BL/6 mice were treated with either an IgG2a control antibody (cIg – open bar) or with sIL-21R-Fc (filled bar) for 6 weeks. The asterisks denote significant differences from wild-type values at the given time point, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

[0042] FIG. 23 shows that IL-21 signaling promotes alternative macrophage activation by modulating IL-13 receptor expression. Bone marrow-derived macrophages were treated with various combinations of IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), and IL-21 (20 ng/ml) overnight. Macrophages treated with IL-4,

IL-13, and IL-21 were pretreated with IL-21 for 6 hours prior to administration of IL-4 and IL-13. Cells were lysed 20 hr later and RNA was analyzed individually by real-time RT-PCR. (A) The ability of IL-21 to promote alternative macrophage activation was assessed by measuring Arg-1 and FIZZ1 gene expression. (B) Arginase activity was quantified in cell lysates by measuring the conversion of L-arginine to urea (mg/dL ± SEM, triplicate measurements) (C) Expression of IL-4Rα and IL-13Rα1 mRNA was evaluated by real-time PCR. IL-13Rα2 mRNA was nearly undetectable in all conditions (not shown). The data shown in panels A, B, and C are representative of 3 separate experiments. (D) Naïve C57BL/6 mice were challenged intravenously with 5000 live *S. mansoni* eggs and treated with PBS or rIL-21 (2 μg/dose) every other day from day 1 through day 6. Animals (5 per group) were sacrificed on day 7 and lung IL-13Rα2 mRNA levels were assayed by real-time PCR and expressed as fold-increase over untreated controls (open bar). Mice were also bled at the time of sacrifice and the amount of sIL-13Rα2 in individual serum samples was assayed by ELISA. The asterisks denote significant differences, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

[0043] FIG. 24 shows that alternatively activated macrophages do not produce significant quantities of active TGF-β1. The right panel shows active TGF-β1 following macrophage activation, while the left panel shows total TGF-β1 levels following macrophage activation. Bone marrow-derived macrophages were treated with various combinations of IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), and IL-21 (20 ng/ml) overnight. Macrophages treated with IL-4, IL-13, and IL-21 were pretreated with IL-21 for 6 hours prior to administration of IL-4 and IL-13. 20 hours post-activation, supernatants were assayed for total and active TGF-β1 by ELISA. High levels of total TGF-β1 were detected in all groups (e.g., compare left panel "IL-4" with "Untreated") except for cells treated with IL-21 alone (compare left panel "IL-21" with "Untreated"). Although total TGF-β1 expression was high, active TGF-β1 was minimal in all groups (right panel). The data shown are representative of 3 separate experiments producing similar results.

DETAILED DISCRIPTION OF THE INVENTION

[0044] To examine the role of the IL-21/IL-21R signaling pathway in the pathogenesis of fibrosis, immune responses were compared in mice lacking a functional IL-21R (IL-21R$^{-/-}$) and in wild type mice using various models of lung and liver inflammation. In one model, live schistosome eggs were injected intravenously into naïve or antigen-sensitized animals to study primary and secondary granulomatous inflammation in the lung. In another model, mice were infected percutaneously with *S. mansoni* cercariae and the development of egg-induced inflammation and fibrosis was observed in the liver. In another model, mice were infected with *N. brasiliensis*. Using these models, the influence of the IL-21R on type-2 cytokine-driven pathology in acute and chronic disease settings was studied. The results demonstrate an important role for the IL-21R in the generation of polarized type-2 responses *in vivo*, particularly in type-2 cytokine-mediated inflammation and fibrosis.

[0045] The present invention therefore provides methods for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or fibrosis-associated disorders in a subject (e.g., a human, e.g., a human patient) using an agent(s) that reduces the level of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of expression of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21R gene products (i.e., protein and/or mRNA)), the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of interaction of IL-21 with IL-21R, etc.) relative to an untreated control (e.g., a control subject afflicted with fibrosis or a fibrosis-associated condition, a control subject not afflicted with fibrosis or a fibrosis-associated condition) or relative to an appropriate reference level. In relation to identifying an agent(s) that reduces the level of IL-21 and/or IL-21R, measuring "the level of IL-21 and/or IL-21R" includes, but is not limited to, (1) measuring the level of expression of IL-21 and/or IL-21R (e.g., measuring the level of IL-21 and/or IL-21R gene products (e.g., protein and/or its corresponding mRNA)); (2) measuring the level of activity of IL-21 and/or IL-21R; and (3) measuring the level of interaction of IL-21 with IL-21R (e.g., in a cell or sample of interest, e.g., from a subject (e.g., a human patient, a control subject)). As described in further detail herein, exemplary agents useful to treat, ameliorate, and/or prevent fibrosis or fibrosis-associated conditions or disorders include anti-IL-21R antibodies, antigen-binding fragments of anti-IL-21R antibodies, anti-IL-21 antibodies, antigen-binding fragments of anti-IL-21

antibodies, and soluble fragments of IL-21R polypeptides. The invention further provides methods for monitoring the course of treatment of fibrosis or a fibrosis-associated disorder, diagnosing and prognosing the same, and screening for compounds useful to treat fibrosis or a fibrosis-associated disorder.

[0046] As used herein, "IL-21" or "IL-21R" means any polypeptide that is substantially identical to the naturally occurring IL-21 or IL-21 receptor protein, respectively. The nucleotide and amino acid sequences encoding human interleukin-21 (IL-21) and its receptor (IL-21R) are described, for example, in WO 00/53761, WO 01/85792, Parrish-Novak et al. (2000) *Nature* 408:57-63, and Ozaki et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11439-44. Desirably, the IL-21 polypeptide binds IL-21R or the IL-21R polypeptide binds IL-21, and upon interaction there is an increase in the signaling activity of the IL-21/IL-21R pathway by at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or more than 100% above control levels, as measured by any standard method. IL-21R is also known as "MU-1," "NILR," and "zalpha11."

[0047] An agent that decreases the level of IL-21 and/or IL-21R encompasses any agent that decreases the signaling activity of the IL-21/IL-21R pathway, the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of expression of IL-21 and/or IL-21R, and/or the level of interaction of IL-21 and IL-21R by at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%. Optionally, the decrease in levels of IL-21 and/or IL-21R is assessed by measuring the level of reduction in fibrosis. An agent that decreases the level of interaction of IL-21 with IL-21R encompasses any agent that decreases the interaction of IL-21 with IL-21R by at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%. These aforementioned agents that decrease the level of activity or expression of IL-21 and/or IL-21R and/or decrease the level of interaction of IL-21 with IL-21R (i.e., agents that decrease the level of IL-21 and/or IL-21R) may be referred to herein as "antagonists" of IL-21 and/or IL-21R.

[0048] An "IL-21 gene" or "IL-21R gene" is defined as a nucleic acid that encodes an IL-21 or IL-21R polypeptide, respectively.

[0049] "Fibrosis" is defined as any pathological condition resulting from an overproduction or aberrant production of fibrous tissue. Fibrosis may occur in any organ including, for example, kidney, lung, liver, skin, central nervous system, bone, bone marrow, cardiovascular system, an endocrine organ or the

gastrointestinal system. By "fibrosis-associated condition" is meant any condition that is related to fibrosis. Thus, fibrosis-associated conditions may be caused by, be concomitant with, or cause fibrosis.

[0050] Decreasing the level of activity of IL-21 and/or IL-21R may refer to a reduction in the level or biological activity of IL-21 relative to the level or biological activity of IL-21 and/or IL-21R in an untreated control or reference sample (e.g., a reference level). Such level or activity may be decreased by at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%. A decrease in the activity of IL-21 and/or IL-21R may also be associated with a reduction in type-2 ("Th2") cytokine expression and/or function, which may include a modulation in, e.g., IL-4, IL-13, AMCase, Ym1, and Fizz1/RELMα-levels and activity.

[0051] Decreasing the level of interaction of IL-21 with IL-21R may refer to a decrease in the interaction in a treated cell or sample relative to the level of interaction of IL-21 with IL-21R in an untreated control or reference sample. Such level of interaction may be decreased by at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%. The level of interaction may be assessed by several well-known molecular biology techniques, e.g., ELISA and Western blotting.

[0052] Decreasing the level IL-21 and/or IL-21R gene products refers to a decrease in the mRNA and/or protein expression level in a treated cell or sample relative to the gene or protein expression level of IL-21 and/or IL-21R in an untreated control or reference sample. Such expression may be decreased by at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100%. The level of expression may be assessed by a number of well-known molecular biology techniques, e.g., Northern blotting or Western blotting.

[0053] By "treating or ameliorating fibrosis" is meant decreasing the level of fibrosis relative to an untreated control, as measured by any standard method. A reduction in fibrosis may also be measured by a reduction in any symptom associated with fibrosis or a fibrosis-associated condition. The examples disclosed herein provide exemplary methods of determining whether the level of fibrosis is decreased relative to a control.

[0054] By "treating or ameliorating a fibrosis-associated condition (or disorder)" is meant decreasing such condition before or after it has occurred. As compared with an equivalent untreated control, such reduction or degree of prevention is at least 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, or 100% as measured by any standard technique. A subject who is being treated for a fibrosis-associated condition is one who a medical practitioner has diagnosed as having such a condition. Diagnosis may be by any suitable means. A subject in whom the development of a fibrosis-associated condition is being prevented may or may not have received such a diagnosis. One in the art will understand that these subjects (e.g., patients) may have been subjected to standard tests for diagnosing fibrosis-associated conditions or may have been identified, without examination, as one at high risk due to the presence of one or more risk factors. The examples disclosed herein provide exemplary methods of determining whether the level of a fibrosis-associated disorder is decreased relative to a control.

[0055] "Preventing" refers to delaying the onset of a fibrosis or a fibrosis-associated condition, or prohibiting the onset of fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject likely to develop such a condition.

[0056] By "an effective amount" is meant an amount of a compound, alone or in a combination, required to treat, ameliorate, reduce or prevent fibrosis or a fibrosis-associated condition in a mammal. The effective amount of active compound(s) varies depending upon the route of administration, age, body weight, and general health of the subject. Ultimately, the attending physician or veterinarian will decide the appropriate amount and dosage regimen.

[0057] By "substantially identical," when referring to a protein or polypeptide, is meant a protein or polypeptide exhibiting at least 75%, but preferably 85%, more preferably 90%, most preferably 95%, or even 99% identity to a reference amino acid sequence, e.g., SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, and fusion proteins such as those set forth in SEQ ID NOs:11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 and 27. For proteins or polypeptides, the length of comparison sequences will generally be at least 20 amino acids, preferably at least 30 amino acids, more preferably at least 40 amino acids, and most preferably 50 amino acids or the full-length protein or polypeptide. Nucleic acids that encode such "substantially identical" proteins or polypeptides constitute examples of "substantially identical" nucleic acids. It is recognized that, due to the redundancy of the genetic code, several nucleic acids

00225

may encode a given protein or polypeptide; such nucleic acids are within the scope of the invention if they encode a polypeptide that is "substantially identical" to a reference polypeptide.

[0058] The nucleic acids related to the present invention may comprise DNA or RNA and may be wholly or partially synthetic. Reference to a nucleotide sequence as set forth herein encompasses a DNA molecule with the specified sequence (or a complement thereof), and encompasses an RNA molecule with the specified sequence in which U is substituted for T, unless context requires otherwise.

[0059] The isolated polynucleotides related to the present invention may be used as hybridization probes and primers to identify and isolate nucleic acids having sequences identical to or similar to those encoding the disclosed polynucleotides. Hybridization methods for identifying and isolating nucleic acids include polymerase chain reaction (PCR), Southern hybridization, *in situ* hybridization and Northern hybridization, and are well known to those skilled in the art.

[0060] Hybridization reactions may be performed under conditions of different stringency. The stringency of a hybridization reaction includes the difficulty with which any two nucleic acid molecules will hybridize to one another. Preferably, each hybridizing polynucleotide hybridizes to its corresponding polynucleotide under reduced stringency conditions, more preferably stringent conditions, and most preferably highly stringent conditions. Examples of stringency conditions are shown in Table 1 below: highly stringent conditions are those that are at least as stringent as, for example, conditions A-F; stringent conditions are at least as stringent as, for example, conditions G-L; and reduced stringency conditions are at least as stringent as, for example, conditions M-R.

Table 1: Stringency Conditions

Stringency Condition	Poly-nucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp)[1]	Hybridization Temperature and Buffer[2]	Wash Temperature and Buffer[2]
A	DNA:DNA	>50	65°C; 1xSSC -or- 42°C; 1xSSC, 50% formamide	65°C; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	<50	T_B*; 1xSSC	T_B*; 1xSSC
C	DNA:RNA	>50	67°C; 1xSSC -or- 45°C; 1xSSC, 50% formamide	67°C; 0.3xSSC

Stringency Condition	Poly-nucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp)[1]	Hybridization Temperature and Buffer[2]	Wash Temperature and Buffer[2]
D	DNA:RNA	<50	T_D*; 1xSSC	T_D*; 1xSSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1xSSC -or- 50°C; 1xSSC, 50% formamide	70°C; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	<50	T_F*; 1xSSC	T_F*; 1xSSC
G	DNA:DNA	>50	65°C; 4xSSC -or- 42°C; 4xSSC, 50% formamide	65°C; 1xSSC
H	DNA:DNA	<50	T_H*; 4xSSC	T_H*; 4xSSC
I	DNA:RNA	>50	67°C; 4xSSC -or- 45°C; 4xSSC, 50% formamide	67°C; 1xSSC
J	DNA:RNA	<50	T_J*; 4xSSC	T_J*; 4xSSC
K	RNA:RNA	>50	70°C; 4xSSC -or- 50°C; 4xSSC, 50% formamide	67°C; 1xSSC
L	RNA:RNA	<50	T_L*; 2xSSC	T_L*; 2xSSC
M	DNA:DNA	>50	50°C; 4xSSC -or- 40°C; 6xSSC, 50% formamide	50°C; 2xSSC
N	DNA:DNA	<50	T_N*; 6xSSC	T_N*; 6xSSC
O	DNA:RNA	>50	55°C; 4xSSC -or- 42°C; 6xSSC, 50% formamide	55°C; 2xSSC
P	DNA:RNA	<50	T_P*; 6xSSC	T_P*; 6xSSC
Q	RNA:RNA	>50	60°C; 4xSSC -or- 45°C; 6xSSC, 50% formamide	60°C; 2xSSC
R	RNA:RNA	<50	T_R*; 4xSSC	T_R*; 4xSSC

1: The hybrid length is that anticipated for the hybridized region(s) of the hybridizing polynucleotides. When hybridizing a polynucleotide to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing polynucleotide. When polynucleotides of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the polynucleotides and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity.

2: SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH_2PO_4, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete.

T_B* - T_R*: The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m(°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, T_m(°C) = 81.5 + 16.6($\log_{10}Na^+$) + 0.41(%G+C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and Na^+ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer (Na^+ for 1xSSC = 0.165M).

Additional examples of stringency conditions for polynucleotide hybridization are provided in Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11, and Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, incorporated herein by reference.

[0061] The isolated polynucleotides related to the present invention may be used as hybridization probes and primers to identify and isolate DNA having sequences encoding allelic variants of the disclosed polynucleotides. Allelic variants are naturally occurring alternative forms of the disclosed polynucleotides that encode polypeptides that are identical to or have significant similarity to the

polypeptides encoded by the disclosed polynucleotides. Preferably, allelic variants have at least 90% sequence identity (more preferably, at least 95% identity; most preferably, at least 99% identity) with the disclosed polynucleotides. Alternatively, significant similarity exists when the nucleic acid segments will hybridize under selective hybridization conditions (e.g., highly stringent hybridization conditions) to the disclosed polynucleotides.

[0062] The isolated polynucleotides related to the present invention may also be used as hybridization probes and primers to identify and isolate DNAs having sequences encoding polypeptides homologous to the disclosed polynucleotides. These homologs are polynucleotides and polypeptides isolated from a different species than that of the disclosed polypeptides and polynucleotides, or within the same species, but with significant sequence similarity to the disclosed polynucleotides and polypeptides. Preferably, polynucleotide homologs have at least 50% sequence identity (more preferably, at least 75% identity; most preferably, at least 90% identity) with the disclosed polynucleotides, whereas polypeptide homologs have at least 30% sequence identity (more preferably, at least 45% identity; most preferably, at least 60% identity) with the disclosed polypeptides. Preferably, homologs of the disclosed polynucleotides and polypeptides are those isolated from mammalian species.

[0063] Calculations of "homology" or "sequence identity" between two sequences are performed by means well known to those of skill in the art. For example, one general means for calculating sequence identity is described 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 nonhomologous 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. The percent identity between the two sequences is a

00228

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.

[0064] The comparison of sequences and determination of percent sequence identity between two sequences may be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-53) algorithm, which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available at www.gcg.com), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. One preferred set of parameters is a Blossum 62 scoring matrix with a gap penalty of 12, a gap extend penalty of 4, and a frameshift gap penalty of 5. The percent identity between two amino acid or nucleotide sequences can also be determined using the algorithm of Meyers and Miller ((1989) *CABIOS* 4:11-17), which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

[0065] "Substantially pure" is defined as a nucleic acid, polypeptide, or other molecule that has been separated from the components that naturally accompany it, e.g., genetic material, associated proteins, membranes, and cell debris. Typically, a polypeptide is substantially pure if it is at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, or even 99%, by weight, free from the proteins and naturally occurring organic molecules with which it naturally associates. For example, a substantially pure polypeptide may be obtained by extraction from a natural source, by expression of a recombinant nucleic acid in a cell that does not normally express that protein, or by chemical synthesis.

[0066] The term "isolated DNA" is defined as DNA that is relatively or substantially free of the genes and other DNA sequences that flank the DNA in the naturally occurring genome of the organism from which the given DNA is

derived. Thus, the term "isolated DNA" encompasses, for example, cDNA, cloned genomic DNA, and synthetic DNA.

[0067] "IL-21 fusion" polypeptide or protein, or "IL-21R fusion" polypeptide or protein is defined as all or part of an IL-21 or IL-21R amino acid sequence, e.g., the IL-21R extracellular fragment from amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, linked to a second, heterologous amino acid sequence. In one embodiment, the second, heterologous amino acid sequence is a tag sequence. Common tag sequences include myc tags, his tags, flag tags, etc. In another embodiment of the invention, the second, heterologous amino acid sequence is an immunoglobulin sequence, e.g., an Fc fragment. Such fusion proteins and polypeptides, which are described in greater detail herein, are encoded by nucleic acid sequences referred to as "IL-21 fusion genes" or "IL-21R fusion genes."

[0068] In the screening methods a "compound" refers to a chemical, whether naturally occurring or artificially derived. Such compounds may include, for example, peptides, polypeptides, synthetic organic molecules, naturally occurring organic molecules, nucleic acid molecules, peptide nucleic acid molecules, and components and derivatives thereof. For example, a useful compound according to the present invention reduces binding of IL-21 to IL-21R.

[0069] Antagonists of IL-21 and IL-21R for use in treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition may also consist of small molecules. The term "small molecule" refers to compounds that are not macromolecules (see, e.g., Karp (2000) *Bioinformatics Ontology* 16:269-85; Verkman (2004) *AJP-Cell Physiol.* 286:465-74). Thus, small molecules are often considered those compounds that are, e.g., less than one thousand daltons (e.g., Voet and Voet, *Biochemistry, 2nd ed.*, ed. N. Rose, Wiley and Sons, New York, 14 (1995)). For example, Davis et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5981-86, use the phrase small molecule to indicate folates, methotrexate, and neuropeptides, while Halpin and Harbury (2004) *PLos Biology* 2:1022-30, use the phrase to indicate small molecule gene products, e.g., DNAs, RNAs and peptides. Examples of natural and synthesized small molecules include, but are not limited to, cholesterols, neurotransmitters, siRNAs, and various chemicals listed in numerous commercially available small molecule databases, e.g., FCD (Fine Chemicals Database), SMID (Small Molecule Interaction Database), ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest), and CSD (Cambridge

Structural Database) (see, e.g., Alfarano et al. (2005) *Nuc. Acids Res. Database Issue* 33:D416-24).

[0070] The term "pharmaceutical composition" means any composition that contains at least one therapeutically or biologically active agent and is suitable for administration to a subject. Any of these formulations can be prepared by well-known and accepted methods of the art. See, for example, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., (ed. A.R. Gennaro), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD (2005).

[0071] The present invention provides significant advantages over standard therapies for treatment and prevention of fibrosis-associated conditions. As described herein, administration of a therapeutic agent that reduces the level of activity or expression of IL-21 and/or IL-21R or decreases the interactions between IL-21 and IL-21R (i.e., reduces the level of IL-21 and/or IL-21R activity) results in amelioration, reduction or prevention of fibrosis and fibrosis-associated conditions. In addition, the compound screening methods, provided by this invention, allow one to identify novel therapeutics that modify the injury process, rather than merely mitigating the symptoms.

Fibrotic Disorders

[0072] The generation of granulation tissue is a carefully orchestrated process in which the expression of protease inhibitors and extracellular matrix proteins is upregulated and the expression of proteases is reduced, leading to the accumulation of extracellular matrix. Abnormal accumulation of fibrous materials, however, may ultimately lead to organ failure (e.g., Border et al. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:1286-92). The development of fibrotic conditions, whether induced or spontaneous, is caused at least in part by the stimulation of fibroblast activity. The influx of inflammatory cells and activated fibroblasts into the injured organ depends on the ability of these cell types to interact with the interstitial matrix, which contains primarily collagens. Exemplary tissues that may be affected by fibrosis include the kidney, lung, liver, skin, central nervous system, bone, bone marrow, tissues of the cardiovascular system, endocrine organs, and tissues of the gastrointestinal system.

[0073] The methods and compositions of the present invention are useful for any fibrosis or fibrosis-associated condition affecting any tissue including, for

example, fibrosis of an internal organ, a cutaneous or dermal fibrosing disorder, and fibrotic conditions of the eye. Fibrosis of internal organs (e.g., liver, lung, kidney, heart blood vessels, gastrointestinal tract) occurs in disorders such as pulmonary fibrosis, idiopathic fibrosis, autoimmune fibrosis, myelofibrosis, liver cirrhosis, veno-occlusive disease, mesangial proliferative glomerulonephritis, crescentic glomerulonephritis, diabetic nephropathy, renal interstitial fibrosis, renal fibrosis in subjects receiving cyclosporin, allograft rejection, HIV associated nephropathy. Other fibrosis-associated disorders include systemic sclerosis, eosinophilia-myalgia syndrome, and fibrosis-associated CNS disorders such as intraocular fibrosis. Dermal fibrosing disorders include, for example, scleroderma, morphea, keloids, hypertrophic scars, familial cutaneous collagenoma, and connective tissue nevi of the collagen type. Fibrotic conditions of the eye include conditions such as diabetic retinopathy, post-surgical scarring (for example, after glaucoma filtering surgery and after crossed-eyes (strabismus) surgery), and proliferative vitreoretinopathy. Additional fibrotic conditions that may be treated by the methods of the present invention may result, for example, from rheumatoid arthritis, diseases associated with prolonged joint pain and deteriorated joints; progressive systemic sclerosis, polymyositis, dermatomyositis, eosinophilic fascitis, morphea, Raynaud's syndrome, and nasal polyposis. As described herein, an IL-21/IL-21R pathway antagonist may be administered to treat or prevent fibrosis and fibrosis-associated disorders, or to ameliorate one or more of the symptoms associated with these disorders.

IL-21 or IL-21R Antagonists (IL-21/IL-21R Antagonists)

[0074] The IL-21 antagonists or IL-21R antagonists of the invention interact with IL-21 or IL-21R (e.g., mammalian IL-21 or IL-21R such as human, bovine, rat, mouse, horse, or dog), respectively, and reduce the level of IL-21 and/or IL-21R, e.g., reduce one or more biological activities associated with IL-21 and/or IL-21R. When this interaction involves direct binding, antagonists 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).

[0075] The level of IL-21 and/or IL-21R is desirably reduced by 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or even 100%. An antagonist may, for

example, reduce the activity of IL-21R by neutralizing IL-21. An antagonist may be a fusion protein that includes a fragment of an IL-21R fused to a non-IL-21R fragment such as an immunoglobulin Fc region, e.g., the fusion proteins set forth in SEQ ID NOs:11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 and 27. Other exemplary antagonists are anti-IL-21R or anti-IL-21 antibodies or antigen-binding fragments thereof, soluble forms of IL-21R, peptides, inhibitory polynucleotides (e.g., siRNAs, SNPs, and aptamers) and small molecules.

[0076] In one embodiment, the IL-21/IL-21R antagonist is an anti-IL-21R or anti-IL-21 antibody, or an antigen-binding fragment thereof. In a further embodiment, the antibody is a neutralizing antibody. If desired, the antibody may be a monoclonal or single-specificity antibody that binds to IL-21 or IL-21R or an antigen-binding fragment thereof (e.g., an Fab, $F(ab')_2$, Fv or a single chain Fv fragment). The antibody may be human, humanized, chimeric, or *in vitro*-generated antibody to IL-21 or IL-21R polypeptide.

[0077] Alternatively, the IL-21 antagonist or IL-21R antagonist may be a full length (e.g., a mutated sequence) or a fragment of an IL-21 polypeptide or an IL-21R polypeptide (e.g., human). Exemplary antagonists include, for example, an inhibitory IL-21 receptor-binding domain of an IL-21 polypeptide (e.g., human) or the extracellular domain of murine or human IL-21R. The IL-21 antagonist may have an amino acid sequence that is substantially identical to (e.g., having at least 85%, 90%, 95%, 98%, 99% sequence identity with) the naturally occurring IL-21R (e.g., SEQ ID NO:2 (human) or SEQ ID NO:5 (murine)) or a fragment thereof (see Table 2). Alternatively, the antagonist may have an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to the naturally occurring mammalian IL-21R or a fragment thereof (e.g., SEQ ID NO:1 (human) or SEQ ID NO:4 (murine)) or by a nucleotide sequence that hybridizes to one of the foregoing nucleotide sequences under stringent conditions, e.g., highly stringent conditions (see Table 1).

Table 2: Summary of Sequences

Designation	Description
SEQ ID NO:1	Nucleic acid sequence of human IL-21R cDNA
SEQ ID NO:2	Amino acid sequence of human IL-21R
SEQ ID NO:3	Amino acid sequence of conserved WSXWS motif
SEQ ID NO:4	Nucleic acid sequence of mouse IL-21R cDNA
SEQ ID NO:5	Amino acid sequence of mouse IL-21R
SEQ ID NO:6	Amino acid sequence of Fc fragment
SEQ ID NO:7	Nucleic acid (cDNA) sequence of human IL-21
SEQ ID NO:8	Amino acid sequence of human IL-21
SEQ ID NO:9	Peptide signal sequence
SEQ ID NO:10	Nucleic acid (cDNA) sequences of human IL-21R monomer fused to a honeybee leader sequence and amino terminal His_6 and Flag tags
SEQ ID NO:11	Amino acid sequence of human IL-21R monomer (20-235) fused to a honeybee leader sequence and amino terminal His_6 and Flag tags
SEQ ID NO:12	Nucleic acid (cDNA) sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to an IgG fragment
SEQ ID NO:13	Amino acid sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to an IgG fragment
SEQ ID NO:14	Nucleic acid (cDNA) sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to an IgG fragment and a His_6 tag
SEQ ID NO:15	Amino acid sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to an IgG fragment and a His_6 tag
SEQ ID NO:16	Nucleic acid (cDNA) sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to an IgG fragment mutated at residues 254 and 257
SEQ ID NO:17	Amino acid sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to an IgG fragment mutated at residues 254 and 257
SEQ ID NO:18	Nucleic acid (cDNA) sequence of human IL-21R monomer fused to a Rhodopsin tag
SEQ ID NO:19	Amino acid sequence of human IL-21R monomer (20-235) fused to a Rhodopsin tag
SEQ ID NO:20	Nucleic acid (cDNA) sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to EK cleavage sites and an IgG1 fragment with a mutated Fc region
SEQ ID NO:21	Amino acid sequence of human IL-21R extracellular domain (1-235) fused to EK cleavage sites and an IgG1 fragment with a mutated Fc region
SEQ ID NO:22	Nucleic acid sequence of mouse IL-21R extracellular domain fused to a mouse genomic IgG2a fragment

Designation	Description
SEQ ID NO:23	Amino acid sequence of mouse IL-21R extracellular domain fused to a mouse genomic IgG2a fragment
SEQ ID NO:24	Nucleic acid (genomic) sequence of mouse IL-21R extracellular domain fused to Flag and His_6 tags
SEQ ID NO:25	Amino acid sequence of mouse IL-21R extracellular domain fused to fused to Flag and His_6 tags
SEQ ID NO:26	Nucleic acid sequence of mouse IL-21R extracellular domain fused to a honeybee leader sequence and amino terminal Flag and His_6 tags
SEQ ID NO:27	Amino acid sequence of mouse IL-21R extracellular domain fused to a honeybee leader sequence and amino terminal Flag and His_6 tags
SEQ ID NO:28	Sense primer for mouse IL-21
SEQ ID NO:29	Antisense primer for mouse IL-21
SEQ ID NO:30	Sense primer for mouse IL-21R
SEQ ID NO:31	Antisense primer for mouse IL-21R
SEQ ID NO:32	Sense primer for mouse IFN-γ
SEQ ID NO:33	Antisense primer for mouse IFN-γ

[0078] Optionally, the IL-21R polypeptide may be a soluble polypeptide incapable of membrane anchoring. Such soluble polypeptides include, for example, IL-21R polypeptides that lack a sufficient portion of their membrane spanning domain or are modified such that the membrane spanning domain is nonfunctional. For example, the IL-21R polypeptide may be a soluble fragment of an IL-21R (e.g., a fragment of an IL-21R containing the extracellular domain of murine or human IL-21R, including an amino acid sequence from about amino acids 1-235, 1-236, 20-235, or 20-236 of SEQ ID NO:2 (human), or from about amino acids 1-236, or 20-236 of SEQ ID NO:5 (murine)). Exemplary IL-21 antagonists may have an amino acid sequence that is substantially identical to amino acids 20-538 of SEQ ID NO:2 (mature human IL-21R), amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2 (extracellular domain of human IL-21R), amino acids 1-236 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-236 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-236 of SEQ ID NO:5, or amino acids 20-236 of SEQ ID NO:5.

[0079] An IL-21 antagonist of the invention may also be encoded by nucleic acids that hybridize to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, SEQ

ID NO:4, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, or SEQ ID NO:26, under highly stringent conditions, e.g., as set forth in Table 1. Isolated polynucleotides which encode IL-21R proteins or fusion proteins, but which differ from the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOs:1, 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, or 26, by virtue of the degeneracy of the genetic code, are also encompassed by the present invention. Variations in the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NOs:1, 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, or 26, which are caused by point mutations or by induced modifications, are also included in the invention.

[0080] If desired, a soluble IL-21R polypeptide may include, or be fused to, a second moiety such as a polypeptide (e.g., an immunoglobulin chain, a GST, Lex-A or MBP polypeptide sequence). For example, a fusion protein may include a fragment of an IL-21R polypeptide, which is capable of binding IL-21, such as a soluble fragment of an IL-21R (e.g., a fragment containing the extracellular domain of murine or human IL-21R such as amino acids 1-235, 1-236, 20-235 or 20-236 of SEQ ID NO:2 (human), or amino acids 1-236 or 20-236 of SEQ ID NO:5 (murine)) fused to a second moiety (e.g., an immunoglobulin chain, an Fc fragment, a heavy chain constant regions of various immunoglobulin isotypes, including IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE).

[0081] Desirably, the IL-21 antagonist of the invention reduces at least one biological activity associated with the naturally occurring IL-21R, including, for example, the ability to interact with or bind to an IL-21 polypeptide, the ability to associate with signal transduction molecules such as γc or JAK1, the ability to stimulate phosphorylation and/or activation of stat proteins (e.g., Stat 5 and/or Stat 3), and the ability to modulate (e.g., stimulate or decrease) proliferation, differentiation, effector cell function, cytolytic activity, cytokine secretion, and/or survival of immune cells such as T cells (CD8+ and CD4+ T cells, including Th1 and Th2 cells), NK cells, B cells, macrophages, and megakaryocytes.

[0082] According to the present invention, an IL-21 polypeptide is a cytokine showing 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, cytokines share a common secondary motif, i.e., a "four-helix-bundle"

structure that is representative of the family. IL-21 is expressed primarily in activated CD4+ T cells, and has been reported to have effects on NK, B and T cells (Parrish-Novak et al. (2000) *supra*; Kasaian et al. (2002) *Immunity* 16:559-69). IL-21 binds to IL-21R (also referred to as "MU-1," "NILR," and "zalpha11"). Upon IL-21 binding, activation of IL-21R leads to Stat5 and/or Stat3 signaling (Ozaki et al. (2000) *supra*).

[0083] The amino acid sequences of IL-21 polypeptides are publicly known. For example, the nucleotide sequence and amino acid sequence of a human IL-21 is available at GenBank Acc. No. NM_021803. The disclosed human IL-21 nucleotide sequence is presented below:

```
1   gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc
61  tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcatc ttcttgggga cactggtcca
121 caaatcaagc tcccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatg
421 tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
541 taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg
601 tattccaagt ggaggag (SEQ ID NO:7)
```

[0084] The amino acid sequence of the disclosed human IL-21 polypeptide is presented below:

```
MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVND
LVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPST
NAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
(SEQ ID NO:8)
```

[0085] Thus, an IL-21 polypeptide refers to a protein that is capable of interacting with or binding to IL-21R and having one of the following features: (i) an amino acid sequence substantially identical to a naturally occurring mammalian IL-21 or a fragment thereof (e.g., SEQ ID NO:8 (human)); (ii) an amino acid sequence which is encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to a naturally occurring mammalian IL-21 nucleotide sequence or a fragment thereof (e.g., SEQ ID NO:7 (human) or a fragment thereof); (iii) 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:7 (human) or a fragment thereof; or (iv) a nucleotide

sequence that hybridizes to one of the foregoing nucleotide sequence sequences under stringent conditions.

[0086] In all foregoing aspects of the invention, the IL-21 or IL-21R polypeptides may be provided as a variant polypeptide having a mutation in the naturally occurring IL-21 or IL-21R sequence (wild type) that results in higher affinity (relative to the nonmutated sequence) binding to IL-21R or IL-21, respectively. Such mutations may be useful, for example, to increase resistance to proteolysis (relative to the nonmutated sequence). Some amino acid sequences in the disclosed sequences can be varied without significantly modifying IL-21 or IL-21R structure or function. In general, it is possible to replace residues that form IL-21 or IL-21R protein tertiary structure, provided that residues that perform a similar function are used. In other instances, the type of residue may be completely irrelevant if an alteration occurs in a noncritical area. Thus, the invention further includes IL-21 and IL-21R variants that show substantial IL-21-type biological activity. Such variants include deletions, insertions, inversions, repeats, and type substitutions (for example, substituting one hydrophilic residue for another, but not a strongly hydrophilic residue for a strongly hydrophobic residue). Small changes or "neutral" amino acid substitutions will often have little impact on protein function. (Taylor (1986) *J. Theor. Biol.* 119:205-18). Conservative substitutions may include, but are not limited to, replacements among the aliphatic amino acids, substitutions between amide residues, exchanges of basic residues, and replacements among the aromatic residues. Further guidance concerning which amino acid change is likely to be phenotypically silent (i.e., is unlikely to significantly affect function) can be found in Bowie et al. (1990) *Science* 247:1306-10 and Zvelebil et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 195:957-61.

[0087] Optionally, the IL-21 or IL-21R antagonist is a fusion protein containing the IL-21 or IL-21R polypeptides or fragments thereof described herein fused to a second moiety such as an immunoglobulin chain, e.g., an Fc fragment, an epitope (tag) sequence, e.g., GST or myc, and additional well-known sequences such as Lex-A, or MBP polypeptide sequence. If desired, the fusion protein may include a fragment of an IL-21R polypeptide that is capable of binding IL-21, such as a soluble fragment of an IL-21R (e.g., a fragment of an IL-21R containing the extracellular domain of murine or human IL-21R from about amino acids 1-235,

1-236, 20-235, or 20-236 of SEQ ID NO:2 (human), or from about amino acids 1-236, or 20-236 of SEQ ID NO:5 (murine) or a fragment identical to, or substantially identical to, a polypeptide encoded by SEQ ID NOs:1 or 4) fused to a second moiety (e.g., an immunoglobulin chain, an Fc fragment, a heavy chain constant region(s) of the various isotypes, including: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE). Alternatively, the human Fc sequence has been mutated at one or more amino acids (e.g., mutated at residues 254 and 257 of SEQ ID NO:16) in the naturally occurring sequence to reduce Fc receptor binding. In other embodiments, the fusion protein may include the extracellular domain of murine IL-21R (from about amino acids 1-236, or 20-235 of SEQ ID NO:5 (murine)) fused to a murine immunoglobulin Fc chain (including, but not limited to, murine IgG, e.g., murine IgG2a or a mutated form of murine IgG2a).

[0088] Examples of antagonistic fusion proteins that may be used in the methods of the invention are shown in FIGS. 7-15. The fusion protein may include an amino acid sequence substantially identical to SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, or SEQ ID NO:27 or an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to SEQ ID NOs:10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, or 26. One exemplary fusion protein contains the human IL-21R extracellular domain (e.g., amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2) fused at the C-terminus via a linker (corresponding to amino acids 236-243 of SEQ ID NO:17) to human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc mutated sequence (corresponding to amino acids 244-467 of SEQ ID NO:17). The human Fc sequence has been mutated at residues 254 and 257 from the wild type sequence to reduce Fc receptor binding. The nucleotide and amino acid sequences are shown as SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:17, respectively.

[0089] The second polypeptide is preferably soluble. Optionally, the second polypeptide enhances the half-life, (e.g., the serum half-life) of the linked polypeptide. If desired, the second polypeptide includes a sequence that facilitates association of the fusion polypeptide with a second IL-21R or IL-21 polypeptide. The second polypeptide may include at least a region of an immunoglobulin polypeptide. Immunoglobulin fusions polypeptides are known in the art and are described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; and 5,455,165.

[0090] Optionally, the second polypeptide is a full-length immunoglobulin polypeptide or a fragment thereof (e.g., a heavy chain, light chain, Fab, Fab_2, Fv, or Fc).

[0091] In one example, the second polypeptide has less effector function that 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, U.S. 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.

[0092] A preferred second polypeptide sequence includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:6. This sequence includes an Fc region. Underlined amino acids are those that differ from the amino acids found in the corresponding positions of the wild-type immunoglobulin sequence:

HTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

[0093] Fusion proteins may additionally include a linker sequence(s) joining the first moiety to the second moiety. For example, the fusion protein may include a peptide linker of about 4 to 20 amino acids, more preferably 5 to 10 amino acids in length, and most preferably about 8 amino acids in length. The amino acids in the peptide linker may include, e.g., Gly, Ser, Asn, Thr and Ala. Thus, a peptide linker may consist of a Gly-Ser element. In other embodiments, the fusion protein includes a peptide linker having the formula $(Ser\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly)_y$, wherein "y" is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8.

[0094] 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, an IL-21/IL-21R fusion protein may be linked to one or more additional moieties, e.g., GST (i.e., glutathione S-transferase), His, FLAG, or myc tags. For example, the fusion protein may additionally include a GST peptide in which the fusion protein sequences are

fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins facilitate the purification or identification of the IL-21R/MU-1 fusion protein. In other embodiments, additional amino acid sequences may be added to the N- or C-terminus of the fusion protein to facilitate expression, steric flexibility, detection, and/or isolation or purification.

[0095] The fusion protein may also include a heterologous signal sequence at its N-terminus. For example, the native IL-21R signal sequence may 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-21R may be increased using a heterologous signal sequence. A signal peptide that can be included in the fusion protein is MPLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:9). If desired, one or more amino acids can additionally be inserted between the first polypeptide moiety comprising the IL-21R/MU-1 moiety and the second polypeptide moiety.

[0096] The IL-21/IL-21R antagonists described herein may 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, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as an antibody (e.g., a bispecific or a multispecific antibody), toxins, radioisotopes, cytotoxic or cytostatic agents, among others.

[0097] A chimeric or fusion protein of the invention may 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 sticky-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to create appropriate termini, filling-in of sticky ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable ligation, 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., *supra*). Moreover, many expression vectors that encode a fusion moiety (e.g., an Fc

region of an immunoglobulin heavy chain) are commercially available. An IL-21R/MU-1 or IL-21 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, IL-21R/MU-1 or IL-21 fusion polypeptides exist as oligomers, such as dimers or trimers. An IL-21R/MU-1 or IL-21 monomer, and/or nucleic acids encoding an IL-21R/MU-1 or IL-21, can be constructed using methods known in the art.

Production of Nucleic Acids

[0098] The isolated polynucleotides of the invention may be operably linked to an expression control sequence, such as the pMT2 or pED expression vectors disclosed in Kaufman et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4485-90, in order to produce the IL-21R or IL-21 polypeptides (including fragments and fusions thereof) recombinantly. Many suitable expression control sequences are known in the art. General methods of expressing recombinant proteins are also known and are exemplified in Kaufman (1990) *Meth. Enzym.* 185:537-66. As defined herein "operably linked" means enzymatically or chemically ligated to form a covalent bond between the isolated polynucleotide of the invention and the expression control sequence in such a way that the IL-21R or IL-21 polypeptide is expressed by a host cell that has been transformed (transfected) with the ligated polynucleotide/expression control sequence.

[0099] The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting 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., nonepisomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon 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 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.

[0100] The recombinant expression constructs of the invention may carry additional sequences, such as regulatory sequences (i.e., sequences that regulate either vector replication, e.g., origins of replication, transcription of the nucleic acid sequence encoding the polypeptide (or peptide) of interest, or expression of the encoded polypeptide), tag sequences such as histidine, and selectable marker genes. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and any other expression control elements (e.g., polyadenylation signals, transcription splice sites) that control transcription, replication or translation. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, will depend on various factors, including choice of the host cell and the level of protein expression desired. Preferred regulatory sequences for expression of proteins in mammalian host cells include viral elements that direct high levels of protein expression, such as promoters and/or enhancers derived from the FF-1a promoter and BGH poly A, cytomegalovirus (CMV) (e.g., the CMV promoter/enhancer), Simian virus 40 (SV40) (e.g., the SV40 promoter/enhancer), adenovirus (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)), and polyoma. Viral regulatory elements, and sequences thereof, are described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,168,062; 4,510,245; and 4,968,615.

[0101] The recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of replication and terminator sequences) 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 of the host cell transfected or

transformed with the selectable marker to compounds such as G418 (geneticin), hygromycin or methotrexate. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr⁻ host cells with methotrexate selection/amplification), the *neo* gene (for G418 selection), and genes conferring tetracycline and/or ampicillin resistance to bacteria.

[0102] Suitable vectors, containing appropriate regulatory sequences, including promoter sequences, terminator sequences, polyadenylation sequences, enhancer sequences, marker genes and other sequences as appropriate, may be either chosen or constructed. Inducible expression of proteins, achieved by using vectors with inducible promoter sequences, such as tetracycline-inducible vectors, e.g., pTet-On™ and pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA), may also be used in the disclosed method. For further details regarding expression vectors, see, for example, Sambrook et al., *supra*. Many known techniques and protocols for manipulation of nucleic acids, for example, in preparation of nucleic acid constructs, mutagenesis, sequencing, introduction of DNA into cells, gene expression, and analysis of proteins, are also described in detail in Sambrook et al., *supra*.

[0103] A number of types of cells may act as suitable host cells for expression of the IL-21R/MU-1 or IL-21 or fusion protein thereof. Any cell type capable of expressing functional IL-21R/MU-1 or IL-21 protein or fusion thereof 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, C3H10T1/2, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x or C2C12 cells.

[0104] The IL-21R or IL-21 polypeptide or fusion protein thereof may also be produced by operably linking the isolated polynucleotide of the invention to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, and employing an insect expression system. Materials and methods for baculovirus/Sf9 expression systems are commercially available in kit form (e.g., the MAXBAC® kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Soluble forms of the

polypeptides described herein may also be produced in insect cells using appropriate isolated polynucleotides as described above.

[0105] Alternatively, the IL-21R or IL-21 polypeptide 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. Expression in 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 denaturing the protein completely using a chaotropic agent. When cysteine residues are present in the primary amino acid sequence of the protein, it is often necessary to accomplish the refolding in an environment that allows correct formation of disulfide bonds (a redox system). General methods of refolding are disclosed in Kohno (1990) *Meth. Enzym.* 185:187-95, EP 0433225, and U.S. Patent No. 5,399,677.

[0106] A protein of the invention (or a fragment or fusion 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, e.g., encoding the IL-21R or IL-21 or fusion protein thereof. Accordingly, the protein 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 protein may be purified from conditioned media. Membrane-bound forms of IL-21R protein of the invention can be purified by preparing a total membrane fraction from the expressing cell and extracting the membranes with a nonionic detergent such as TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA).

[0107] The polypeptides described herein may be purified using methods known to those skilled in the art. For example, the protein of the invention may be

concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, by using an AMICON® or PELLICON® ultrafiltration unit (Millipore, Billerica, MA). Following the concentration step, the concentrate may be applied to a purification matrix such as a gel filtration medium. Alternatively, an anion exchange resin may be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) or polyethyleneimine (PEI) groups. The matrices may be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step may be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. Sulfopropyl groups are preferred (e.g., S-SEPHAROSE® columns, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The purification of the IL-21R/MU-1 protein or fusion protein from culture supernatant may also include one or more column steps over such affinity resins such as concanavalin A-agarose, AF-HEPARIN650, heparin-TOYOPEARL® or Cibacron blue 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); 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 further purify the IL-21R/MU-1 or IL-21 protein. Affinity columns including antibodies to the protein of the invention may 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, may also be employed to provide a substantially purified isolated recombinant protein. Preferably, the isolated protein is purified so that it is substantially free of other mammalian proteins.

Production of Antibodies

[0108] The IL-21 or IL-21R polypeptides of the invention may be used to immunize animals to obtain polyclonal and monoclonal antibodies that specifically react with the IL-21 or IL-21R and regulate the expression or activity of IL-21 and/or IL-21R, or regulate the level of interaction of IL-21 with IL-21R. Such antibodies may be obtained, for example, using the entire IL-21R or fragments thereof as immunogens. The peptide immunogens may additionally

contain a cysteine residue at the carboxyl terminus and be conjugated to a hapten such as keyhole limpet 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 Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-54 and Krstenansky and Mao (1987) *FEBS Lett.* 211:10-16.

[0109] Human monoclonal antibodies (mAbs) directed against IL-21 or IL-21R may be 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 et al. (1994) *Nature* 368:856-59, Green et al. (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21, Morrison et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55, and Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3720-24).

[0110] Monoclonal antibodies may also be generated by other methods known to those skilled in the art of recombinant DNA technology. One exemplary method, referred to 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) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5728-32; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-81; and Orlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833-37). After immunizing an animal with an immunogen as described above, the antibody repertoire of the resulting B cell pool is cloned. The DNA sequence of the variable regions of a diverse population of immunoglobulin molecules may be obtained 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 primer to a conserved 3' constant region primer may be used for PCR amplification of the heavy and light chain variable regions from a number of murine antibodies (Larrick et al. (1991) *BioTechniques* 11:152-56). A similar strategy may also been used to amplify human heavy and light chain variable regions from human antibodies (Larrick et al. (1991) *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2:106-10).

00047

[0111] Chimeric antibodies, including chimeric immunoglobulin chains, may also be produced by recombinant DNA techniques known in the art. For example, a gene 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 PCT/US86/02269; EP 184,187; EP 171,496; EP 173,494; WO 86/01533; U.S. Patent No. 4,816,567; EP 125,023; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-43; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:3439-43; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-26; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:214-18; Nishimura et al. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-49; and Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59).

[0112] If desired, an antibody or an immunoglobulin chain may be humanized by methods known in the art. Humanized antibodies, including humanized immunoglobulin chains, may be generated by replacing sequences of the Fv variable region that are not directly involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable regions. General methods for generating humanized antibodies are provided by Morrison (1985) *Science* 229:1202-07; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214-21; and U.S. Patent Nos. 5,585,089, 5,693,761 and 5,693,762, all of which are hereby incorporated by reference in their entireties. Those methods include isolating, manipulating, and 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, may then be cloned into an appropriate expression vector.

[0113] Humanized or CDR-grafted antibody molecules or immunoglobulins may be produced by CDR grafting or CDR substitution, wherein one, two, or all CDRs of an immunoglobulin chain can be replaced. See e.g., U.S. Patent No. 5,225,539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-25; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534-36; and Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-60, all of which are hereby incorporated by reference in their entireties. U.S. Patent No. 5,225,539 describes a CDR-grafting method that may be used to prepare

humanized antibodies of the present invention (see also, GB 2188638A). All of the CDRs of a particular human antibody may be replaced with at least a portion of a nonhuman CDR, or only some of the CDRs may be replaced with nonhuman CDRs. It is only necessary to replace the number of CDRs required for binding of the humanized antibody to a predetermined antigen.

[0114] Monoclonal, chimeric and humanized antibodies, which have been modified by, e.g., deleting, adding, or substituting other portions of the antibody, e.g., the constant region, are also within the scope of the invention. For example, an antibody may 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.

[0115] 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) may 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, U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260, all of which are hereby incorporated by reference in their entireties). Similar types of alterations may also be applied to murine immunoglobulins and immunoglobulins from other species. 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 nonpolar residue such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan or alanine (see, e.g., U.S. Patent No. 5,624,821).

[0116] Human antibodies to IL-21 and/or IL-21R may additionally be produced using transgenic nonhuman animals that are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. See, e.g., PCT publication WO 94/02602. The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the

nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. One embodiment of such a nonhuman animal is a mouse, and is termed the XENOMOUSE™ as disclosed in PCT publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells that secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with an immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the antibodies directly, or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv molecules.

[0117] Other protein-binding molecules may also be employed to modulate the activity of IL-21 and/or IL-21R. Such protein-binding molecules include small modular immunopharmaceutical (SMIP™) drugs (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). SMIPs are single-chain polypeptides composed of a binding domain for a cognate structure such as an antigen, a counterreceptor or the like, a hinge-region polypeptide having either one or no cysteine residues, and immunoglobulin CH2 and CH3 domains (see also www.trubion.com). SMIPs and their uses and applications are disclosed in, e.g., U.S. Published Patent Appln. Nos. 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534, and 2005/0238646, and related patent family members thereof, all of which are hereby incorporated by reference herein in their entireties.

[0118] As discussed herein, neutralizing or nonneutralizing antibodies (preferably monoclonal antibodies) binding to IL-21R or IL-21 or a fusion protein thereof may be useful in the treatment of immune conditions such as fibrosis and fibrosis-associated conditions.

[0119] Accordingly, the present invention further provides for compositions comprising an antibody that specifically reacts with an IL-21 or IL-21R or a fusion protein thereof.

Screening Assays

[0120] The IL-21R or IL-21 polypeptides or fusion proteins of the invention may also be used to screen for agents that are capable of binding to IL-21 or IL-21R, and regulating the level of IL-21 and/or IL-21R, e.g., the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of expression of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21R gene products), and/or the level of interaction between IL-21 and IL-21R. Binding assays using a protein of the invention, or a binding partner thereof, which may be free or immobilized to a support, are well known in the art. Purified cell-based or protein-based (cell-free) screening assays may be used to identify binding partners and/or ligands (natural or synthetic, e.g., test compounds) to IL-21R or IL-21 polypeptides or fusion proteins of the invention. For example, IL-21R may be immobilized in purified form on a carrier and binding of potential ligands to IL-21R may be measured.

Methods for Diagnosing, Prognosing, and Monitoring the Progress of Fibrosis and Fibrosis-Associated Disorders, Related to IL-21

[0121] The present invention provides methods for diagnosing, prognosing, and monitoring the progress (e.g., monitoring the course of treatment) of disorders, i.e., fibrosis or fibrosis-associated conditions or disorders, related to IL-21 and/or IL-21R by, e.g., detecting and/or measuring the level of IL-21 and/or IL-21R, wherein the phrase "level of IL-21 and/or IL-21R" and equivalents thereof includes, but is not limited to, (1) the level of expression of IL-21 and/or IL-21R gene products (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21R protein and/or mRNA in a cell or sample of interest); (2) the level of activity of IL-21 protein and/or IL-21R protein (e.g., Th2 cytokine expression and/or function in a cell or sample of interest); and (3) the level of interaction of IL-21 with IL-21R (e.g., in a cell or sample of interest). For example, the invention provides methods of diagnosing, prognosing and monitoring, e.g., by detecting the upregulation or downregulation of IL-21 and/or IL-21R gene products and/or activity, and/or by measuring the interaction of IL-21 with IL-21R, etc. (including but not limited to the use of such

methods in human subjects). IL-21 and/or IL-21R levels may also be measured in a reference cell or sample of interest to produce or obtain a reference level of IL-21 and/or IL-21R, or such reference level may be obtained through other methods, or may be generally known, by one of skill in the art. These methods may be performed by, e.g., utilizing prepackaged diagnostic kits comprising at least one of the group comprising an IL-21 or IL-21R polynucleotide (or fragments thereof); an IL-21 or IL-21R polypeptide (or fragments and/or fusion proteins thereof); an antibody to an IL-21 or IL-21R polypeptide (or derivatives thereof, or antigen-binding fragments thereof); or modulators of IL-21 or IL-21R polynucleotides and/or polypeptides as described herein, which may be conveniently used, for example, in a clinical setting.

[0122] "Diagnostic" or "diagnosing" means identifying the presence or absence of a pathologic condition. Diagnostic methods include, but are not limited to, detecting upregulation of the level of IL-21 and/or IL-21R by determining a test amount of the gene products (e.g., RNA, cDNA, or polypeptide, including fragments thereof) of IL-21 and/or IL-21R, by measuring the activity of IL-21 and/or IL-21R, and/or by measuring the level of interaction of IL-21 with IL-21R, in a biological sample from a subject (human or nonhuman mammal), and comparing the test amount with, e.g., a normal amount or range (e.g., an amount or range from an individual(s) known not to suffer from disorders related to IL-21, or from an individual known not to suffer from fibrosis or a fibrosis-associated condition). Although a particular diagnostic method may not provide a definitive diagnosis of disorders related to IL-21, it suffices if the method provides a positive indication that aids in diagnosis.

[0123] The present invention also provides methods for prognosing such disorders by detecting, for example, the upregulation of levels of IL-21 and/or IL-21R, e.g., by detecting upregulation of IL-21 and/or IL-21R gene products and/or activity, and/or by measuring the level of interaction of IL-21 with IL-21R, etc. "Prognostic" or "prognosing" means predicting the probable development and/or severity of a pathologic condition. Prognostic methods include determining the test amount of a gene product of IL-21 and/or IL-21R in a biological sample from a subject, and comparing the test amount to a prognostic amount or range (i.e., an amount or range from individuals with varying severities of disorders, i.e., fibrosis and/or a fibrosis-associated condition, e.g., related to IL-21) for the level

of IL-21 and/or IL-21R. Various amounts related to the level of IL-21 and/or IL-21R in a test sample are consistent with certain prognoses for disorders, e.g., fibrosis or fibrosis-associated conditions or disorders, related to IL-21 and/or IL-21R. The detection of an amount of IL-21 and/or IL-21R level at a particular prognostic level provides a prognosis for the subject.

[0124] The present invention also provides methods for monitoring the progress or course of such disorders related to IL-21 by detecting, for example, the upregulation of IL-21 and/or IL-21R levels, e.g., by detecting upregulation of IL-21 and/or IL-21R gene products, activity, and/or the interaction of IL-21 with IL-21R. Monitoring methods include determining the test amounts of a gene product of IL-21 in biological samples taken from a subject at a first and second time, and comparing the amounts. A change in amount of an IL-21 and/or IL-21R gene product between the first and second times indicates a change in the course of an IL-21-related disorder, with a decrease in amount indicating remission of such disorders, and an increase in amount indicating progression of such disorders. Such monitoring assays are also useful for evaluating the efficacy of a particular therapeutic intervention in patients being treated for fibrosis or a fibrosis-associated disorder.

Measuring the Level of IL-21 and/or IL-21R

[0125] The level of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21 gene products, activity, and/or interaction) in methods of the invention (e.g., methods for screening for and/or identifying a compound for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition, methods of diagnosing, prognosing, and/or monitoring the progress of fibrosis or a fibrosis-associated condition, and methods of treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition) outlined herein may be measured in a variety of biological samples, including bodily fluids (e.g., whole blood, plasma, and urine), cells (e.g., whole cells, cell fractions, and cell extracts), and other tissues. Biological samples also include sections of tissue, such as biopsies and frozen sections taken for histological purposes. Preferred biological samples include blood, plasma, lymph, tissue biopsies, urine, CSF (cerebrospinal fluid), synovial fluid, and BAL (bronchoalveolar lavage). It will be appreciated that analysis of a biological sample need not necessarily require removal of cells or tissue from the

subject. For example, appropriately labeled agents that bind IL-21 and/or IL-21R gene products (e.g., antibodies, nucleic acids) may be administered to a subject and visualized (when bound to the target) using standard imaging technology (e.g., CAT, NMR (MRI), and PET).

[0126] In the methods of treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder, in the methods for identifying a compound for treating, ameliorating or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject, and in the diagnostic, prognostic, and monitoring assays and methods of the present invention, the level of IL-21 and/or IL-21R is detected and measured to yield a test amount. The test amount is then compared with, e.g., a normal amount or range. For example, an amount above (e.g., a higher level) the normal amount or range is a positive sign in the diagnosis of disorders related to IL-21.

[0127] Normal amounts or baseline levels of IL-21 and/or IL-21R may be determined for any particular sample type and population. Generally, baseline (normal) levels of IL-21 and/or IL-21R are determined by measuring respective levels of IL-21 and/or IL-21R in a biological sample type from normal (i.e., healthy) subjects. Alternatively, normal levels of IL-21 and/or IL-21R may be determined by measuring the amount in healthy cells or tissues taken from the same subject from which the diseased (or possibly diseased) test cells or tissues were taken. The level of IL-21 and/or IL-21R (either the normal amount or the test amount) may be determined or expressed on a per cell, per total protein, or per volume basis. To determine the cell amount of a sample, one can measure the level of a constitutively expressed gene product or other gene product expressed at known levels in cells of the type from which the biological sample was taken.

[0128] It will be appreciated that the assay methods of the present invention do not necessarily require measurement of absolute values for the level of IL-21 and/or IL-21R because relative values are sufficient for many applications of these methods. It will also be appreciated that in addition to the quantity or abundance of IL-21 and/or IL-21R levels, variant or abnormal IL-21 and/or IL-21R levels or their expression patterns (e.g., mutated transcripts, truncated polypeptides) may be identified by comparison to normal levels and expression patterns.

[0129] Whether the level of a particular gene or protein in two samples is increased (i.e., higher) or reduced (i.e., lower), e.g., significantly above or

significantly below a given level, respectively, depends on the gene itself and, *inter alia*, its variability in expression, activity, and/or interaction with a ligand between different individuals or different samples. It is within the skill in the art to determine whether IL-21 and/or IL-21R levels are significantly similar or different among samples. Factors such as genetic variation between individuals, species, organs, tissues, or cells may be taken into consideration (when and where necessary) for determining whether the level of IL-21 and/or IL-21R between two samples is increased or reduced. As a result of the natural heterogeneity in IL-21 and/or IL-21R levels between individuals, species, organs, tissues, or cells, phrases such as "significantly above" or "significantly below" cannot be defined as a precise percentage or value, but rather can be ascertained by one skilled in the art upon practicing the invention. Particular methods of detection and measurement of IL-21 and/or IL-21R gene products, activity, and interaction are described herein.

Assays for Measuring IL-21 and/or IL-21R Gene Products

[0130] The methods of the present invention involve detecting and quantifying the level of IL-21 and/or IL-21R, e.g., the level of the gene products of IL-21 and/or IL-21R, the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, and/or the level of interaction of IL-21 with IL-21R, in biological samples. IL-21 and IL-21R gene products include mRNAs and polypeptides, and both can be measured using methods well known to those skilled in the art.

[0131] For example, mRNA can be directly detected and quantified using hybridization-based assays, such as Northern hybridization, *in situ* hybridization, dot and slot blots, and oligonucleotide arrays. Hybridization-based assays refer to assays in which a probe nucleic acid is hybridized to a target nucleic acid. In some formats, the target, the probe, or both are immobilized. The immobilized nucleic acid may be DNA, RNA, or another oligonucleotide or polynucleotide, and may comprise naturally or nonnaturally occurring nucleotides, nucleotide analogs, or backbones. Methods of selecting nucleic acid probe sequences for use in the present invention (e.g., based on the nucleic acid sequence of IL-21) are well known in the art.

[0132] Alternatively, mRNA may be amplified before detection and quantitation. Such amplification-based assays are well known in the art and include

polymerase chain reaction (PCR), reverse-transcription-PCR (RT-PCR), PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA), and ligase chain reaction (LCR). Primers and probes for producing and detecting amplified IL-21 gene products (e.g., mRNA or cDNA) may be readily designed and produced without undue experimentation by those of skill in the art based on the nucleic acid sequences of IL-21 and/or IL-21R. Amplified IL-21 and/or IL-21R gene products may be directly analyzed, for example, by gel electrophoresis; by hybridization to a probe nucleic acid; by sequencing; by detection of a fluorescent, phosphorescent, or radioactive signal; or by any of a variety of well-known methods. In addition, methods are known to those of skill in the art for increasing the signal produced by amplification of target nucleic acid sequences. One of skill in the art will recognize that, whichever amplification method is used, a variety of quantitative methods known in the art (e.g., quantitative PCR) may be used if quantitation of gene products is desired.

[0133] An IL-21 and/or IL-21R polypeptide (or fragments thereof) may be detected using various well-known immunological assays employing the respective anti-IL-21 and/or IL-21R antibodies that may be generated as described herein. Immunological assays refer to assays that utilize an antibody (e.g., polyclonal, monoclonal, chimeric, humanized, scFv, and/or fragments thereof) that specifically binds to, e.g., an IL-21 polypeptide (or a fragment thereof). Such well-known immunological assays suitable for the practice of the present invention include ELISA, radioimmunoassay (RIA), immunoprecipitation, immunofluorescence, fluorescence-activated cell sorting (FACS), and Western blotting. The ordinarily skilled artisan will also recognize that an IL-21 polypeptide may also be detected using a labeled IL-21R polypeptide(s). One of skill in the art will understand that the aforementioned methods may be applied to disorders related to IL-21, especially fibrosis or a fibrosis-associated condition.

Assays for Measuring the Activity of IL-21 and/or IL-21R

[0134] The activity of IL-21/IL-21R (e.g., in response to IL-21/IL-21R antagonists as modulators 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, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e and CMK.

[0135] Assays for T cell or thymocyte proliferation are described, for example, in *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds.) Greene Pub. Assoc. & Wiley-Interscience, NY, NY (1991) (Chapter 3, "In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function" and Chapter 7, "Immunologic studies in Humans"); Takai et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3494-500; Bertagnolli et al. (1990) *J. Immunol.* 145:1706-12; Bertagnolli et al. (1991) *Cell. Immunol.* 133:327-41; Bertagnolli et al. (1992) *J. Immunol.* 149:3778-83; Bowman et al. (1994) *J. Immunol.* 152:1756-61. Assays for cytokine production and/or proliferation of spleen cells, lymph node cells or thymocytes are described, for example, in "Polyclonal T cell stimulation" Kruisbeek and Shevach in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) pp. 3.12.1-14, John Wiley and Sons, Toronto (1994); and "Measurement of mouse and human Interferon gamma" Schreiber, R.D. in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) pp. 6.8.1-8, John Wiley and Sons, Toronto (1994).

[0136] Assays for proliferation and differentiation of hematopoietic and lymphopoietic cells are described in, for example, "Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4" Bottomly et al. in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) pp. 6.3.1-12, John Wiley and Sons, Toronto (1991); deVries et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173:1205-11; Moreau et al. (1988) *Nature* 336:690-92; Greenberger et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2931-38; "Measurement of mouse and human interleukin 6" Nordan, R. in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) pp. 6.6.1-5, John Wiley and Sons, Toronto (1991); Smith et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 83:1857-61; "Measurement of human Interleukin 11" Bennett et al. in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) p. 6.15.1, John Wiley and Sons, Toronto (1991); "Measurement of mouse and human Interleukin 9" Ciarletta et al. in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1. Coligan et al. (eds.) p. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto (1991).

[0137] 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, for example, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds.) Greene Pub.

Assoc. and Wiley-Interscience, NY, NY (1991) (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. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6091-95; Weinberger et al. (1981) *Eur. J. Immunol.* 11:405-11; Takai et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3494-500; Takai et al. (1988) *J. Immunol.* 140:508-12.

Assays for Measuring the Interaction of IL-21 with IL-21R

[0138] Methods for detecting and/or measuring the level of interaction of IL-21 with IL-21R are well known in the art. For example, such interactions between a cytokine and its receptor may be detected and/or measured with, but not limited to, such techniques as ELISA, Western blotting, immunoprecipitation, Biacore analysis, etc.

Pharmaceutical Compositions

[0139] In one aspect, the invention features a method of treating, ameliorating, or preventing an IL-21-related disorder, i.e., fibrosis or a fibrosis-associated condition. The method may comprise contacting a population of cells with (e.g., by administering to a subject suffering from or at risk for fibrosis or a fibrosis-associated disorder) an agent that reduces the level of IL 21 and/or IL 21R activity in the subject, e.g., an IL-21/IL-21R antagonist (e.g., an anti-IL-21R antibody, an anti-IL-21 antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL-21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL-21 antibody, and a soluble fragment of an IL-21R (e.g., an amino acid sequence that is at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 1-538 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-538 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-236 of SEQ ID NO: 2, amino acids 20-236 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-529 of SEQ ID NO:5, amino acids 20-529 of SEQ ID NO:5, amino acids 1-236 of SEQ ID NO:5, and amino acid 20-236 of SEQ ID NO:5)) in an amount sufficient to inhibit the activity of IL-21 in the cell or population.

[0140] IL-21/IL-21R antagonists for treating fibrosis or a fibrosis-associated condition 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-antagonists and carrier, various diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The term "pharmaceutically acceptable" means a nontoxic 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, and are generally well known in the art.

[0141] The pharmaceutical composition of the invention may be in the form of a liposome in which an IL-21/IL-21R-antagonist(s) is combined with, in addition to other pharmaceutically acceptable carriers, amphipathic agents such as lipids which exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers which exist in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, e.g., in U.S. Patent Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, and 4,737,323, all of which are incorporated herein by reference in their entireties.

[0142] As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful subject benefit, e.g., amelioration or reduction of symptoms of, prevention 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 ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously.

[0143] In practicing the method of treatment or use of the present invention, a therapeutically effective amount of an IL-21/IL-21R antagonist is administered to a subject, e.g., a mammal (e.g., a human). An IL-21/IL-21R antagonist(s) may be administered in accordance with the method of the invention either alone or in combination with other therapies as described in more detail herein. When coadministered with one or more agents, an IL-21 and/or IL-21R antagonist may be administered either simultaneously with the second agent, or sequentially. If administered sequentially, the attending physician will decide on the appropriate

sequence of administering an IL-21/IL-21R antagonist in combination with other agents.

[0144] Administration of an IL-21/IL-21R antagonist used in a pharmaceutical composition of the present invention or to practice a method of the present invention may be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, inhalation, or cutaneous, subcutaneous, or intravenous injection. Intravenous administration to the subject is sometimes preferred. When a therapeutically effective amount of an IL-21/IL-21R agonist or antagonist 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 of the invention 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 (albeit keeping in mind the frequency of peanut allergies in the population), 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% of the binding agent.

[0145] When a therapeutically effective amount of an IL-21/IL-21R antagonist is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, the 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 a 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.

[0146] The amount of an IL-21/IL-21R antagonist in the pharmaceutical composition of the present invention will depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments that the subject has undergone. Ultimately, the attending physician will decide the amount of binding agent with which to treat each individual subject. Initially, the attending physician will administer low doses of binding agent and observe the subject's response. Larger doses of binding agent may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the subject, and at that point the dosage is not generally increased further. It is contemplated that the various pharmaceutical compositions used to practice the method of the present invention should contain about 0.1 μg to about 100 mg IL-21/IL-21R antagonist per kg body weight.

[0147] The duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention will vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential idiosyncratic response of each individual subject. It is contemplated that the duration of each application of an IL-21/IL-21R antagonist may be in the range of 12 to 24 hours of continuous i.v. administration. Also contemplated is subcutaneous (s.c.) therapy using a pharmaceutical composition of the present invention. These therapies can be administered daily, weekly, or, more preferably, biweekly, or monthly. It is also contemplated that where the IL-21/IL-21R antagonist is a small molecule (e.g., for oral delivery), the therapies may be administered daily, twice a day, three times a day, etc. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of i.v. or s.c. therapy, or therapy with a small molecule, and the timing of administration of the therapy using the pharmaceutical composition of the present invention.

[0148] The polynucleotide and proteins of the present invention are expected to exhibit one or more of the uses or biological activities (including those associated with assays cited herein) identified below. Uses or activities described for proteins, antibodies, or polynucleotides of the present invention may be provided by administration or use of such proteins, or antibodies, or by administration or use of polynucleotides encoding such proteins or antibodies (such as, for example, in gene therapies or vectors suitable for introduction of DNA).

Combination Therapy

[0149] In one embodiment, a pharmaceutical composition comprising at least one IL-21R/IL-21 antagonist, e.g., an IL-21R/IL-21 antibody, and at least one therapeutic agent is administered in combination therapy. Such therapy is useful for treating pathological conditions or disorders, such as immune and/or inflammatory disorders. The term "in combination" in this context means that the antagonist composition and the therapeutic agent 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 may still be detectable at effective concentrations at the site of treatment.

[0150] For example, the combination therapy can include at least one IL-21R/IL-21 antagonist coformulated with, and/or coadministered with, at least one additional therapeutic agent. Additional agents may include at least one cytokine inhibitor, growth factor inhibitor, immunosuppressant, anti-inflammatory agent, metabolic inhibitor, enzyme inhibitor, cytotoxic agent, or cytostatic agent, as described in more detail below. Such 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 pathway, and thus are expected to enhance and/or synergize with the effects of the IL-21R/IL-21 antagonists.

[0151] Therapeutic agents used in combination with IL-21R/IL-21 antagonists may be those agents that interfere at different stages in the autoimmune and subsequent inflammatory response. In one embodiment, at least one IL-21R/IL-21 antagonist described herein may be coformulated with, and/or coadministered with, at least one cytokine and/or growth factor antagonist. The cytokine and/or growth factor antagonists may include soluble receptors, peptide inhibitors, small molecules, ligand fusions, antibodies (that bind cytokines or growth factors or their receptors or other cell surface molecules), and "anti-inflammatory cytokines" and agonists thereof.

[0152] Nonlimiting examples of the agents that can be used in combination with the IL-21R/IL-21 antagonists described herein, include, but are not limited to, antagonists of at least one interleukin (e.g., IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12,

IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, and IL-22); cytokine (e.g., TNFα, LT, EMAP-II, and GM-CSF); or growth factor (e.g., FGF and PDGF). The agents may also include, but are not limited to, antagonists of at least one receptor for an interleukin, cytokine, and growth factor. IL-21R/IL-21 antagonists can also be combined with inhibitors of, e.g., antibodies to, cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 (e.g., the CD20 inhibitor rituximab (RITUXAN®)), CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, or their ligands, including CD154 (gp39 or CD40L), or LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al. (2002) *Med. Res. Rev.* 22:146-67). Other compounds that can be used in combination with IL-21R/IL-21 antagonists described herein may include antagonists of the receptors for IL-1, IL-12, TNFα, IL-15, IL-17, IL-18 and IL-22.

[0153] Examples of agents useful in combination therapies with an IL-21R/IL-21 antagonist include IL-12 antagonists (such as antibodies that bind IL-12 (see e.g., WO 00/56772); IL-12 receptor inhibitors (such as antibodies to the IL-12 receptor); and soluble IL-12 receptor and fragments thereof. Examples of IL-15 antagonists include antibodies against IL-15 or its receptor, soluble fragments of the IL-15 receptor, and IL-15-binding proteins. Examples of IL-18 antagonists include antibodies to IL-18, soluble fragments of the IL-18 receptor, and IL-18 binding proteins (IL-18BP, Mallat et al. (2001) *Circ. Res.* 89:E41-45). Examples of IL-1 antagonists include interleukin-1-converting enzyme (ICE) inhibitors (such as Vx740), IL-1 antagonists (e.g., IL-1RA (anakinra (KINERET™), Amgen)), sIL-1RII (Immunex), and anti-IL-1 receptor antibodies.

[0154] Examples of TNF antagonists include antibodies to TNF (e.g., human TNFα), such as D2E7 (human anti-TNFα antibody, U.S. Patent No. 6,258,562, HUMIRA™, Abbott Labs); CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (humanized anti-TNFα antibodies, Celltech/Pharmacia); cA2 (chimeric anti-TNFα antibody, REMICADE™, Centocor); and anti-TNF antibody fragments (e.g., CPD870). Other examples include soluble TNF receptor (e.g., human p55 or p75) fragments and derivatives, such as p55 kdTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fusion protein, LENERCEPT™) and 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™ (etanercept - Immunex)). See, e.g., van der Poll et al. (1997) *Blood.* 89:3727-34; Mori et al. (1996) *J. Immunol.* 157:3178-82. Further

examples include enzyme antagonists (e.g., TNFα converting enzyme inhibitors (TACE) such as alpha-sulfonyl hydroxamic acid derivative (WO 01/55112) or N-hydroxyformamide inhibitors (GW 3333, -005, or –022, GlaxoSmithKline) and TNF-bp/s-TNFR (soluble TNF binding protein, see, e.g., Lantz et al. (1991) *J Clin Invest.* 88:2026-31; Kapadia et al. (1995) *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Phys.* 268:H517-25). TNF antagonists may be soluble TNF receptor (e.g., human p55 or p75) fragments and derivatives, such as 75 kdTNFR-IgG; and TNFα converting enzyme (TACE) inhibitors.

[0155] In other embodiments, the IL-21R/IL-21 antagonists described herein can be administered in combination with at least one of the following: IL-13 antagonists, such as soluble IL-13 receptors and/or anti-IL-13 antibodies; and IL-2 antagonists, such as IL-2 fusion proteins (e.g., DAB 486-IL-2 and/or DAB 389-IL-2 made by Seragen, see e.g., Sewell et al. (1993) *Arthritis Rheum.* 36:1223-33) and anti-IL-2R antibodies (e.g., anti-Tac (humanized antibody, Protein Design Labs, see Junghans et al. (1990) *Cancer Res.* 50:1495-502). Another combination includes IL-21R/IL-21 antagonists in combination with nondepleting anti-CD4 inhibitors such as IDEC-CE9.1/SB 210396 (anti-CD4 antibody, GlaxoSmithKline). Yet other combinations include IL-21R/IL-21 antagonists with CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) costimulatory pathway antagonists (such as antibodies, soluble receptors, or antagonistic ligands); P-selectin glycoprotein ligand (PSGL) and PSGL-1 inhibitors (such as antibodies to PSGL and/or PSGL-1 and small molecule inhibitors); T cell- and B cell-depleting agents (such as anti-CD4 or anti-CD22 antibodies), and anti-inflammatory cytokines and agonists thereof (e.g., antibodies). The anti-inflammatory cytokines may include IL-4 (e.g., Schering-Plough Biopharma); IL-10 (e.g., SCH 52000, recombinant IL-10, Schering-Plough Biopharma); IL-11; IL-13; and TGFβ or agonists thereof (e.g., agonist antibodies).

[0156] In other embodiments, at least one IL-21R/IL-21 antagonist can be coformulated with, and/or coadministered with, at least one anti-inflammatory drug, immunosuppressant, metabolic inhibitor, and enzymatic inhibitor. Nonlimiting examples of the drugs or inhibitors that can be used in combination with the IL-21R/IL-21 antagonists described herein, include, but are not limited to, at least one of: nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) (including,

but not limited to, aspirin, salsalate, diflunisal, ibuprofen, ketoprofen, nabumetone, piroxicam, naproxen, diclofenac, indomethacin, sulindac, tolmetin, etodolac, ketorolac, oxaprozin, tenidap, meloxicam, piroxicam, aceclofenac, tolmetin, tiaprofenic acid, nimesulide, etc.); sulfasalazine; corticosteroids (such as prednisolone); cytokine suppressive anti-inflammatory drugs (CSAID); inhibitors of nucleotide biosynthesis (such as inhibitors of purine biosynthesis (e.g., folate antagonist such as methotrexate)); and inhibitors of pyrimidine biosynthesis, e.g., a dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor such as leflunomide (see, e.g., Kraan et al. (2004) *Ann. Rheum. Dis.* 63:1056-61). Therapeutic agents for use in combination with IL-21/IL-21R antagonists may include one or more NSAIDs, CSAIDs, DHODH inhibitors (such as leflunomide), and folate antagonists (such as methotrexate).

[0157] Examples of additional agents that may be used in combination with IL-21/IL-21R antagonists include at least one of: corticosteroid (oral, inhaled and local injection); immunosuppressant (such as cyclosporin and tacrolimus (FK-506)); an mTOR inhibitor (such as sirolimus (rapamycin) or a rapamycin analog and/or derivative, e.g., ester rapamycin derivative such as CCI-779 (see, e.g., Elit (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1249-53; Huang et al. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:295-304)); an agent which interferes with the signaling of proinflammatory cytokines such as TNFα and IL-1 (e.g., an IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitor); TPL-2, Mk-2 and NFκb inhibitors; COX-2 inhibitors (e.g., celecoxib, rofecoxib, etc., and variants thereof); phosphodiesterase inhibitors (such as Rolipram); phospholipase inhibitors (e.g., an inhibitor of cytosolic phospholipase 2 (cPLA2) such as trifluoromethyl ketone analogs (U.S. Patent No. 6,350,892)); inhibitors of vascular endothelial cell growth factor (VEGF); inhibitors of the VEGF receptor; inhibitors of angiogenesis; RAGE and soluble RAGE; estrogen receptor beta (ERB) agonists, ERB-NFκb antagonists; interferon-β (for example, IFNβ-1a and IFNβ-1b); copaxone; and corticosteroids.

[0158] Other useful therapeutic agents that may be combined with an IL-21R/IL-21 antagonist include: budenoside; epidermal growth factor; aminosalicylates; 6-mercaptopurine; azathioprine; metronidazole; lipoxygenase inhibitors; mesalamine; olsalazine; balsalazide; antioxidants; thromboxane

inhibitors; growth factors; elastase inhibitors; pyridinyl-imidazole compounds; glucuronide- or dextran-conjugated prodrugs of prednisolone; dexamethasone or budesonide; ICAM-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); soluble complement receptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); slow-release mesalazine; antagonists of platelet activating factor (PAF); ciprofloxacin; lignocaine; cyclosporin A; hydroxychloroquine (PLAQUENIL™); minocycline (MINOCIN™); and anakinra (KINERET™).

[0159] Choosing a particular therapeutic agent for administration in combination with an IL-21/IL-21R antagonist of the invention will largely depend on factors such as the particular subject, the desired target, and chosen length of treatment. Such decisions are well within the skill and knowledge of one skilled in the art.

[0160] Additional examples of therapeutic agents that can be combined with an IL-21R/IL-21 antagonist include one or more of: 6-mercaptopurines (6-MP); azathioprine; sulphasalazine; mesalazine; olsalazine; chloroquine, hydroxychloroquine (PLAQUENIL®); pencillamine; aurothiomalate (intramuscular and oral); azathioprine; colchicine; 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.

[0161] In one embodiment, an IL-21R/IL-21 antagonist can be used in combination with one or more antibodies directed at other targets involved in regulating immune responses. Nonlimiting examples of agents for treating or preventing immune responses with which an IL-21R/IL-21 antagonist of the invention can be combined include the following: antibodies against other cell surface molecules, including but not limited to CD25 (interleukin-2 receptor-a), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28, CTLA4, ICOSL, ICOS, CD80 (B7.1), and/or CD86 (B7.2). In yet another embodiment, an IL-21R/IL-21 antagonist is used in combination with one or more general immunosuppressive agents, such as cyclosporine A or FK506. In another embodiment, an IL-21/IL-21R antagonist is used in combination with a CTLA4 agonist, e.g., (e.g., CTLA4 Ig – abatacept (ORENCIA®)).

[0162] The entire contents of all references, patents, and published patent applications cited throughout this application are hereby incorporated by reference herein.

EXAMPLES

[0163] The following Examples provide illustrative embodiments of the invention and do not in any way limit the invention. One of ordinary skill in the art will recognize that numerous other embodiments are encompassed within the scope of the invention.

Example 1: Materials and Methods

Example 1.1: Mice, Parasite Infections and Antigen Preparation

[0164] Female or male C57BL/6, C57BL/6/Ai-IL-10KO/IL-4KO mice and C57BL/6Ai-IL-10KO/IL-12KO were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY) (Hoffmann et al. (1999) *J. Immunol.* 163:927-938). Breeding pairs of IL-21R$^{-/-}$ mice on a C57BL/6 background were obtained from a breeding colony housed at Harvard School of Public Health (Boston, MA) (Kasaian et al. (2002) *Immunity* 16:559-69). All mice were housed under specific pathogen-free conditions at the National Institutes of Health in an American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care-approved facility. The NIAID animal care and use committee approved all experimental procedures. *S. mansoni* eggs were extracted from the livers of infected mice (Biomedical Research Institute, Rockville, MD) as previously described (Wynn et al. (1995) *Nature* 376:594-96). For the induction of synchronous primary pulmonary granulomas, mice were given 5,000 eggs intravenously (i.v.). For the induction of secondary granulomas, mice were sensitized intraperitoneally (i.p.) with 5000 live eggs, and then challenged with 5,000 live eggs i.v. (Wynn et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:551-61). In the infection experiments, mice were infected percutaneously via the tail with 25-30 cercariae of a Puerto-Rican Strain of *S. mansoni* (NMRI) that were obtained from infected *Biomphalaria glabrata* snails (Biomedical Research Institute, Rockville, MD). Soluble egg antigen (SEA) and soluble worm antigenic preparations (SWAP) were from purified and homogenized from *S. mansoni* eggs and adult parasites as previously described (Cheever et al. (1994) *J. Immunol.* 153:753-59). All animals underwent perfusion at the time of

sacrifice so that worm and tissue egg burdens could be determined, as described elsewhere (*id.*). *Nippostrongylus brasiliensis* larvae (L3) were prepared as previously described (Katona et al. (1983) *J. Immunol.* 130:350-56). Mice were inoculated through s.c. injection of 500 L3. On day seven post-inoculation, lung tissue and mediastinal lymph nodes were collected for cytokine analysis.

Example 1.2: Histopathology and Fibrosis

[0165] The sizes of pulmonary and hepatic granulomas were determined on histological sections that were stained with Wright's Giemsa stain (Histopath of America, Clinton, MD). Around 30 granulomas per mouse were included in all analyses. A skilled pathologist evaluated the percentages of eosinophils, mast cells and other types of cells in the same sections. The number of schistosome eggs in the liver and the gut and the collagen content of the liver, as measured by hydroxyproline levels, were determined as previously described (Cheever et al., *supra*). Specifically, hepatic collagen was measured as hydroxyproline by the technique of Bergman and Loxley (Bergman and Loxley (1963) *Analytical Biochem.* 35:1961-65) after hydrolysis of a 200-mg portion of liver in 5 ml of 6N HCl at 110°C for 18 h. The increase in hepatic hydroxyproline was positively related to egg numbers in all experiments and hepatic collagen is reported as the increase above normal liver collagen in micromoles per 10,000 eggs; (infected liver collagen – normal liver collagen)/liver eggs X 10^{-4} or micromoles per worm pair. At late chronic time points, fibrosis is reported as total liver collagen per liver. The same individual scored all histological features and had no knowledge of the experimental design.

Example 1.3: FACS Analysis

[0166] Whole lungs were harvested and placed in RPMI. Tissues were disrupted by straining through a 70-micron nylon mesh (BD Falcon, San Diego, CA). The single cell suspensions were washed and RBCs were lysed by incubation with ACK lysis solution for 3 min. Lung lymphocytes were labeled with PE-Cy5 labeled anti-CD4 along with Fc Block (both antibodies from BD Pharmingen, San Diego, CA) in FACS buffer for 15 min at 4°C. After washing, the cells were analyzed on a FACS Calibur using FLOWJO™ software (Treestar, Inc., Ashland, OR).

Example 1.4: IL-21 Blocking Experiments with sIL-21R-Fc

[0167] C57BL/6 (10/group) mice were infected percutaneously via the tail with 30-35 *S. mansoni* cercariae. Beginning on week 6 post-infection, mice were treated with either mIL-21R-Fc (Wyeth Research) or Anti-*E. tenella* murine IgG2a control antibody (Wyeth Research). Each mouse received one 200 μg dose via i.p. injection 3X/week for a total of 5 weeks. Mice were sacrificed 12 weeks post-infection and hepatic fibrosis was measured by hydroxyproline assay.

Example 1.5: Lymphocyte Culture and Cytokine Detection Using the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

[0168] Spleen and mesenteric lymph nodes (infection model) or lung-associated lymph nodes (pulmonary model) were removed aseptically and single cell suspensions were prepared as previously described (Hesse et al. (2000) *Am. J. Pathol.* 157:945-55). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. Cells were stimulated with SEA (20 μg/ml), SWAP (50 μg/ml), concanavalin A (Con A; 1 μg/ml), or medium alone. Supernatant fluids were harvested at 72 hours and assayed for cytokine production. IFN-γ, IL-5 and IL-10 were measured by sandwich ELISA using paired antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA) as previously described (*id.*). Cytokine levels were calculated with standard curves constructed using recombinant murine cytokines (BD Pharmingen, San Diego, CA). IL-13 levels were measured using murine IL-13 ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's protocol. TGF-β1 levels were quantified using mouse TGF-β1 DUOSET® ELISA development system (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacture's protocol. To avoid bovine-derived TGF-β1 contamination, cells were washed 3X in PBS and cultured in media containing 0.5% mouse serum.

Example 1.6: RNA Isolation and Purification and Real-Time Polymerase Chain Reaction

[0169] Total RNA was extracted from lung and liver tissue samples placed individually in 1 ml TRIZOL™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The sample was homogenized using a tissue polytron (Omni International Inc., Marietta, GA) and total RNA was extracted according to the recommendations of the

manufacturer and further purified using RNEASY™ Mini Kit from Qiagen (Qiagen Sciences, Germantown, MD). Individual sample RNA (1 μg) was reverse-transcribed using SUPERSCRIPT II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) and a mixture of oligo (dT) and random primers. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on an ABI PRISM™ 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative quantities of mRNA for several genes was determined using SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and by the comparative threshold cycle method as described by Applied Biosystems for the ABI PRISM™ 7700/7900 sequence detection systems (Applied Biosystems, Foster City, CA). In this method, mRNA levels for each sample were normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase mRNA levels and then expressed as a relative increase or decrease compared with levels in uninfected controls. Primers were designed using PRIMER EXPRESS™ software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for IL-13, IL-4, IL-10, HPRT (Hesse et al. (2001) *J. Immunol.* 167:6533-44), IL-13Rα2 (Chiaramonte et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:687-701), Ym1, FIZZ1 and acidic chitinase (AMCase) (Sandler et al., *supra*) were published previously, and include:

[0170] IL-21
5' GCCAG ATCGC CTCCT GATTA 3' (sense) (SEQ ID NO:28);
5' CATGC TCACA GTGCC CCTTT 3' (antisense) (SEQ ID NO:29);

[0171] IL-21R
5' CTCCC CCCTT GAACG TGACT 3' (sense) (SEQ ID NO:30);
5' TTGCC CCTCA GCACG TAGTT 3' (antisense) (SEQ ID NO:31);

[0172] IFN-γ
5' AGAGC CAGAT TATCT CTTTC TACCT CAG 3' (sense) (SEQ ID NO:32);
5' CCTTT TTCGC CTTGC TGTTG 3' (antisense) (SEQ ID NO:33).

Example 1.7: Serum Antibody Isotype Analysis and Bone Marrow-Derived Macrophages

[0173] Total IgE was measured using the BD OPTEIA™ mouse IgE ELISA Set (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol. SEA-specific IgG1 and IgG2b isotype-specific antibody (Ab) titers were evaluated by indirect ELISA. IMMULON™ 4 plates (Thermo Labsystems Inc., Beverly MA) were coated with 10 μg/ml SEA (100 μl/well) diluted in PBS, and serum samples were analyzed using serial two-fold dilutions. Biotin-Rabbit Anti-mouse IgG1 (Zymed, San Francisco, CA) was used at a 1:1000 dilution. This was followed by peroxidase-labeled streptavidin (KPL, Gaithersburg, MD) substrate enzyme at a 1:1000 dilution. Second-step horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG2b (Zymed, San Francisco, CA) Ab was used at a 1:1000 dilution. The absorbance in the wells was read at 405 nm using a VMAX™ Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices) after adding 100 μl one-component ABTS Peroxidase Substrate (KPL, Gaithersburg, MD).

[0174] Bone marrow was recovered from female C57BL/6 mice and cultured in Petri dishes (100 X 15 mm) containing supplemented DMEM media (L929-conditioned medium) for a period of 6 days. After six days, cells were harvested and seeded at a concentration of 0.5×10^6 cells/well in 24 well plates containing supplemented DMEM media (10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin). Cells were stimulated with IL-4, IL-13, and IL-21 (R&D, Minneapolis, MN) for a period of 20 hours. In some assays, cells were pretreated with IL-21. Cells were lysed and RNA was purified using the RNA Cleanup procedure with the RNEASY™ kits (Qiagen Sciences, Germantown, MD).

Example 1.8: Arginase Activity Assay

[0175] Bone marrow-derived macrophages were plated at 6×10^5 per well in 96 well tissue culture plates and stimulated with combinations of IL-4, IL-13, and IL-21. IL-21 was added 6 hours prior to IL-4 or IL-13 stimulation. Following stimulation, cells were washed with PBS and lysed with 0.1% Triton X-100 containing protease inhibitor (Roche, Nutley, NJ). Lysates were transferred into a 96 well PCR plate and incubated with 10 mM $MnCl_2$ and 50mM Tris HCl (pH 7.5) to activate enzyme for 10min at 55°C. After enzyme activation, 25 μl of

lysate was removed and added to 25 μl 1M arginine (pH 9.7) in a new PCR plate and incubated for 20 hours at 37°C. 5 μl of each sample was added in duplicate to a 96 well ELISA plate along with 5 μl of each standard, diluted in the same assay conditions, starting at 100 mg/dL. The urea determination reagent from QUANTICHROM™ Urea Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA) was used according to the manufacture's protocol.

Example 1.9: Statistics

[0176] Hepatic fibrosis (adjusted for egg number) decreases with increasing intensity of infection (worm pairs). Therefore, these variables were compared by analysis of covariance, using the logarithm of total liver eggs as the covariate and the logarithm of hydroxyproline content per egg. Variables that did not change with infection intensity were compared by one-way ANOVA or Student's *t* test (Cheever et al., *supra*). Changes in cytokine mRNA expression and granuloma size were evaluated using ANOVA. Differences were considered significant when $p<0.05$*, $p<0.01$**, or $p<0.001$***.

Example 2: Regulation of IL-21 and IL-21R during Type-1- and Type-2-Polarized Responses

[0177] To investigate the regulation and function of the IL-21 receptor *in vivo*, several different experimental systems of T_H2-dependent inflammation were examined, including models of pulmonary and hepatic inflammation, as well as an experimental model of nematode infection (Pearce et al., *supra*; Wynn et al. (1994), *supra*). In each case, the immune responses of wild type (WT) animals were compared with IL-21R-deficient mice (Hoffman et al., *supra*; Kasaian et al. (2002), *supra*).

[0178] In comparison to IL-21 (Wurster et al. (2002), *supra*; Mehta et al. (2004) *Immunol. Rev.* 202:84-95), little is known about the regulation and function of the IL-21 receptor. To determine whether IL-21 and its receptor are regulated during a pathological T_H2 response *in vivo*, the *S. mansoni* model of granuloma formation was used. In this model, T_H2 cytokines are known to play a prominent role in lesion formation (Pearce and MacDonald, *supra*). Initial studies were designed to determine whether IL-21 and IL-21R mRNA expression were linked with polarized T_H2 cytokine responses *in vivo*. This was achieved by using mice

that develop highly exaggerated T_H1 (IL-$4^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$) or T_H2 (IL-$12^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$) cytokine responses following exposure to *S. mansoni* eggs. In IL-$4^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$ "T_H1" mice, IFN-γ mRNA expression increased in the lung 75-fold over baseline by day 4 post-challenge and remained approximately 50-fold above background through day 14 (FIG. 16A). IL-13 mRNA was not detectable in these mice at any time point, confirming the establishment of a highly polarized T_H1 inflammatory response. In contrast, the IL-$12^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$ "T_H2" mice displayed a 200 to 250-fold increase in IL-13 mRNA at all time points post-challenge, with little to no change in IFN-γ. In contrast to the T_H1/ T_H2 cytokines, which displayed a highly polarized pattern of expression, IL-21 was not associated with a polarized phenotype (FIG. 16B). In both groups, IL-21 mRNA levels increased at least 50-fold over baseline following challenge with schistosome eggs, although the increase observed in the T_H1-polarized mice was on average 3- to 4-fold greater than the T_H2 polarized animals (FIG. 16B; lower panel). IL-21R was also not specifically associated with a T_H1 or T_H2 immune response. However, in contrast to IL-21, which was more pronounced in T_H1 skewed animals, the maximal response for the IL-21R was observed in the T_H2-polarized mice (FIG. 16B; upper panel).

Example 3: Type-2 Cytokine Production is Reduced in the Lungs of IL-21R-deficient Mice During a Primary Response to Schistosome Eggs

[0179] Given the significant elevation in IL-21R expression in mice challenged with schistosome eggs (FIG. 16), the next series of experiments examined whether IL-21R signaling was influencing the development of the T_H2 response. In these experiments, naïve WT and IL-$21R^{-/-}$ mice were injected intravenously with live schistosome eggs and the production of T_H2 cytokines and T_H2-regulated genes were monitored in the lung, spleen, and draining lymph nodes over the following 14 days. In WT mice, IL-21R mRNA expression increased rapidly following egg exposure and remained elevated through day 14 (FIG. 17A). IL-21 showed a similar profile with peak expression occurring on day 7 and then declining slightly thereafter. Notably, there was a consistent and highly significant decrease in IL-21 expression on days 7 and 14 in the IL-$21R^{-/-}$ mice, suggesting that IL-21R was positively influencing the expression of its own ligand. Consistent with previous observations (Wynn et al. (1993) *J. Immunol.*

151:1430-40; Vella and Pearce (1992) *J. Immunol.* 148:2283-88), expression of the T_H2-associated cytokines IL-4 and IL-13 rose gradually in the granulomatous tissues of WT mice, with 5- to 15-fold increases detectable by day 14. In contrast, there was a marked and significant decrease in IL-4 and IL-13 mRNA expression in the IL-21R$^{-/-}$ tissues. Although little change in IFN-γ and IL-10 mRNA was detected in WT mice between day 4 and 14 post-challenge, production of IFN-γ and IL-10 also decreased slightly in the IL-21R$^{-/-}$ animals. Thus, the reduced T_H2 response observed in the IL-21R$^{-/-}$ mice was not associated with increased T_H1 cytokine production. The decrease in T_H2 cytokines was also specific to the granulomatous tissues, since significant T_H2 cytokine production was observed in lymph node and splenocyte cultures following *in vitro* stimulation with soluble egg antigen (SEA) or mitogen (FIG. 17B). In fact, SEA consistently stimulated stronger IL-5, IL-10, and IL-13 responses in the lymph node cultures prepared from IL-21R$^{-/-}$ mice. Nevertheless, consistent with the reduced T_H2 response in the lung, a more rapid resolution of granuloma formation was observed in the IL-21R$^{-/-}$ animals (FIG. 17C). In addition, there was a marked decrease in several genes associated with Stat6-activation or "alternatively-activated macrophages" (AAMø) (Nair et al. (2005) *Infect. Immun.* 73:385-94; Zhu et al. (2004) *Science* 304:1678-82; Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Gordon, S. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:23-35), providing further evidence of an overall reduction in the T_H2 effector response in IL-21R$^{-/-}$ mice (FIG. 17D).

Example 4: TH2 Response is Reduced in IL-21R$^{-/-}$ Mice Following *N. brasiliensis* Infection

[0180] To determine if the reduced T_H2 effector response was specific to *S. mansoni* pulmonary granuloma formation, WT and IL-21R$^{-/-}$ mice were infected with the intestinal nematode *N. brasiliensis*. Infection is established by inoculating third stage larvae (L3) under the skin. As the parasites mature, they migrate from the site of inoculation and enter the lungs via the circulatory system. Once inside the lungs, the parasites trigger a vigorous and highly polarized T_H2 response (Urban et al. (1993) *J. Immunol.* 151:7086-94), which was confirmed by analyzing the expression of several T_H2-associated genes in the lung (FIG. 18A) and lung-associated lymph nodes (FIG. 18B). The lungs and

lymph nodes of WT mice displayed marked increases in IL-4, IL-13, AMCase, FIZZ1/RELM1α, and Ym1 mRNA expression following *N. brasiliensis* infection (FIG. 18A and 18B). However, in agreement with the pulmonary granuloma model, significantly reduced levels of IL-4, IL-13, and AMCase were observed, as well as slightly reduced levels of Ym1 and FIZZ1 mRNA in the lungs of the IL-21R$^{-/-}$ mice (FIG. 18A). The draining lymph nodes displayed a similar reduction, although the decreases in Ym1 and FIZZ1 were more significant in the lymph nodes (FIG. 18B). The only other major difference between the two tissues was the AMCase mRNA response, which appeared to be restricted to the lung. Together, these data confirm an important role for the IL-21R in T_H2 response development *in vivo*. Notably however, despite developing a markedly attenuated T_H2 response, the *N. brasiliensis* infected IL-21R$^{-/-}$ mice displayed no significant delay in adult worm expulsion (not shown).

Example 5: Type-2 Cytokine-driven Inflammation is Diminished in the Lungs of IL-21R$^{-/-}$ Mice

[0181] The next series of experiments were designed to determine whether the IL-21R modulates the development of secondary T_H2 responses. For these experiments, WT and IL-21R$^{-/-}$ mice were sensitized with *S. mansoni* eggs and challenged intravenously 2 weeks later. As expected, the sensitized mice developed a robust granulomatous response that was 4- to 5-times greater (FIG. 19C) than the primary challenge animals (FIG. 17C). As observed in the primary model, there was a significant increase in IL-21 and IL-21R mRNA in the lungs following egg exposure, although the IL-21 response peaked much earlier during the secondary challenge. IL-21R was only modestly increased when compared with IL-21 although it remained significantly elevated at both time points, while IL-21 mRNA levels declined after reaching a peak on day 4 (FIG. 19A). Thus, there was evidence of tighter regulation of the ligand in the tissues. There was also a remarkable decrease in IL-21 expression in the IL-21R$^{-/-}$ mice, confirming a potent feedback mechanism between the receptor and its ligand. Among the T_H2-associated cytokines, IL-13 was the most robust response, displaying a 50- to 100-fold increase over baseline in WT mice. However, it was reduced to 10- to 20-fold above background in the IL-21R$^{-/-}$ mice, demonstrating that the IL-21R is required for maximum development of the secondary T_H2 response. Again, the

reduction in T_H2 cytokine expression in IL-21R$^{-/-}$ mice was not accompanied by a significant increase in IFN-γ. In fact, IFN-γ mRNA expression decreased in the lungs of the IL-21R$^{-/-}$ mice. Nevertheless, the knockouts displayed a modest but consistent increase in IFN-γ production in the lymph nodes and spleen, suggesting a greater inhibition of the T_H2 cytokines overall (FIG. 19B). Consistent with the primary egg challenge model, the reduction in T_H2 and T_H1 cytokine production was more pronounced in the granulomatous tissues (FIG. 19A), although the SEA-induced T_H2 response was also partially reduced in the spleen (FIG. 19B). The significant reduction in secondary granulomatous inflammation was consistent with the development of a weaker T_H2 response in the lung (FIG. 19C). In addition, there was a marked decrease in FIZZ1, Ym1, and AMCase expression (FIG. 19D), further confirming a significant impairment of secondary T_H2 effector responses in the IL-21R$^{-/-}$ mice.

Example 6: IgG Antibodies, Granuloma Formation, and Type-2 Cytokines Are Substantially Reduced in Infected IL-21R-deficient Mice

[0182] Next, to determine if IL-21 signaling is required for the maintenance of a chronic T_H2-dominated response, animals were exposed percutaneously to *S. mansoni* cercariae, and their pathological reactions and immune responses at both acute and chronic time points post-infection were analyzed. As observed in the pulmonary granuloma studies, there was a marked upregulation in IL-21R and IL-21 mRNA expression in the livers of infected WT mice. In contrast, IL-21 mRNA was almost undetectable in the IL-21R$^{-/-}$ mice even after chronic infection (FIG. 20A). At the acute stage post-infection, the IL-21R$^{-/-}$ mice also manifested a marked reduction in T_H2 cytokine mRNA expression (FIG. 20A). However, the changes were again restricted to the granulomatous tissues because the lymph node and splenocyte responses of both groups were similar following *in vitro* stimulation with parasite antigens (FIG. 20B). The only consistent difference noted in the *in vitro* assays was a 2- to 3-fold decrease in IL-5 and IL-10 production in the splenocyte cultures. The IL-21R$^{-/-}$ mice also developed significantly smaller granulomas at the acute stage post-infection (FIG. 20C), which was consistent with the reduced IL-4 and IL-13 mRNA responses in the liver (FIG. 20A). However, this was not accompanied by any obvious change in the percentage of eosinophils in the granulomas (FIG. 20C). A more detailed

microscopic analysis of the lesions confirmed that there was no detectable change in the overall composition of the granulomas (FIG. 21A). Experiments were also undertaken to determine whether IL-21R-deficiency was specifically affecting the recruitment of $CD4^+$ T cells to the granulomatous tissues. To address this issue, the pulmonary granuloma model was used in order to synchronize the recruitment of inflammatory cells. However, consistent with the microscopic evaluations of liver granulomas (FIG. 21A), the percentage of $CD4^+$ T cells in the lungs was similar in WT and IL-$21R^{-/-}$ mice both before and after egg exposure (FIG. 21B). Thus, changes in $CD4^+$ T cell recruitment or expansion are unlikely to explain the decreased Th1/Th2 cytokine responses observed in the tissues. Instead, they appear to result from a more general reduction in the overall inflammatory response. Importantly, both groups effectively downmodulated their granulomatous responses by week 12 post-infection (Pearce and MacDonald, *supra*). Consequently, there was no significant difference in granuloma size at the chronic time point (FIG. 20C). Minimal impairment in the T_H2 cytokine response was observed in the chronically infected knockout mice (FIG. 20A). The marked reduction in FIZZ1 and Ym1 observed at the acute stage had also diminished in the chronically infected IL-$21R^{-/-}$ animals (FIG. 20D). Nevertheless, expression of AMCase remained remarkably low on week 12, suggesting a sustained diminution of at least a subset of the T_H2-driven responses in chronically infected IL-$21R^{-/-}$ mice.

[0183] The IL-$21R^{-/-}$ mice were also examined for changes in serum antibody levels (FIG. 22). Consistent with their suppressed cytokine responses (FIG. 20A), the IL-$21R^{-/-}$ mice displayed a marked reduction in parasite specific IgG_1 (T_H2-associated antibody) and IgG_{2b} (T_H1-associated antibody) titers, which was maintained at the chronic time point (FIG. 22B). Interestingly however, this was not accompanied by any significant change in IgE (FIG. 22C), suggesting a selective impairment in only a subset of serum antibody isotypes. Exogenous IL-21 has been shown to inhibit IgE production (Suto et al. (2002) *Blood* 100:4565-73), which may explain the slight elevation of IgE in the chronically infected IL-$21R^{-/-}$ mice. Importantly, the overall reduction in type-2 responsiveness in the IL-$21R^{-/-}$ mice was not attributed to differences in parasite burden since similar numbers of eggs and paired adult parasites were found in the tissues of both groups at all time points (FIG. 22A).

Example 7: IL-21R-deficiency Slows the Progression of Hepatic Fibrosis

[0184] Because T_H2 cytokines are believed to play a major role in tissue fibrogenesis (Wynn (2004), *supra*), the development and progression of hepatic fibrosis in *S. mansoni*-infected IL-21R$^{-/-}$ mice was next examined. Liver hydroxyproline levels were assayed at various time points post-infection as a direct measure of tissue collagen content. As expected, marked hepatic fibrosis was observed in the infected WT mice (FIG. 22D). In contrast, the IL-21R$^{-/-}$ displayed significantly less fibrosis at both the acute and chronic time points. Notably, by week 29 post-infection the IL-21R$^{-/-}$ mice exhibited more than a 50% decrease in total liver collagen content compared to WT mice (FIG. 22E), thus confirming an important and indispensable role for the IL-21R in the progression of T_H2-dependent fibrosis.

[0185] Experiments were undertaken to examine whether an IL-21 inhibitor could slow the progression of fibrosis in infected WT mice. For these experiments, groups of C57BL/6 mice were treated with sIL-21R-Fc or control protein for a total of 5 weeks, starting on week 6 post-infection, around the time when eggs are first detected in the liver. Although both groups had similar worm and tissue egg burdens (data not shown), mice receiving the IL-21 blocker displayed over a 50% reduction in hepatic fibrosis at the termination of the experiment (FIG. 22F). IL-4 and IL-13 mRNA expression also decreased in the liver, and granuloma size was reduced approximately 15% (data not shown). Thus, these data compliment the experiments performed with IL-21R$^{-/-}$ mice.

Example 8: IL-21 Signaling Promotes the Development of Alternatively Activated Macrophages

[0186] Because Arg-1, FIZZ1, and TGF-β1 have been linked with the development of fibrosis, and the expression of several T_H2/Stat6-regulated genes were reduced in the diseased tissues of IL-21R$^{-/-}$ mice (FIGS. 17-20) (see also, Gordon, *supra*; Nair et al., *supra*), experiments were undertaken to determine whether Arg-1, FIZZ1, and TGF-β1 were directly modulated in macrophages following stimulation with IL-21. Arg-1 and FIZZ1 are also well-known markers of alternatively activated macrophages (AAMø) (Gordon, *supra*). For these studies, bone marrow-derived macrophage cultures (BMMø) were generated and then stimulated with various combinations of IL-4, IL-13, and IL-21. As

expected, IL-4 and IL-13 both increased Arg-1 and FIZZ1 mRNA expression, with an additive effect observed when the two stimuli were used in combination (FIG. 23A). Notably however, although IL-21 had no effect on either gene when used alone, cultures that were pretreated with IL-21 displayed highly significant increases in Arg-1 and FIZZ1 mRNA expression when subsequently stimulated with IL-4 and IL-13 (FIG. 23A). The same combination also significantly increased the function of arginase in the cells (FIG. 23B). In contrast, IL-21 had no effect on the levels of total or active TGF-β1 in the culture supernatants (FIG. 24). Unexpectedly, IL-21 treatment alone significantly increased the expression IL-4Rα and IL-13Rα1 (FIG. 23C). In contrast, IL-4 and IL-13 had no effect when used alone (FIG. 23C) and there was no additional effect when the three stimuli were used in combination (not shown).

[0187] Because the IL-13Rα2 can also influence IL-13-dependent signaling (Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Mentink-Kane et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:586-90; Wood et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:703-09), experiments were undertaken to examine whether IL-21 was regulating the production of the IL-13Rα2. Not surprisingly, because the IL-13Rα2 is primarily produced by nonhematopoietic cells like fibroblasts and smooth muscle (Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Jakubzick et al. (2003) *Am. J. Pathol.* 162:1475-86; Zheng et al. (2003) *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:720-28; Morimoto et al. (2006) *J. Immunol.* 176:342-48), there was no evidence of decoy receptor regulation in the BMMø cultures (data not shown). However, when the regulation of the decoy receptor *in vivo* was examined, IL-21 downregulated IL-13Rα2 mRNA expression in the lungs of i.v. egg-challenged mice and significantly decreased the levels of the soluble IL-13Rα2 in their serum (FIG. 23D). When viewed together, these data suggest that IL-21 contributes to the development of alternatively activated macrophages by upregulating the type-2 IL-4 receptor (signaling receptor) in macrophages and by simultaneously decreasing the levels of the soluble IL-13Rα2 (decoy receptor) in the serum. Both mechanisms likely contributed to the increased activation of Arg-1 and FIZZ1 in the IL-4/IL-13-stimulated macrophages. As such, they provide an additional mechanistic explanation for the impaired T_H2 responses and T_H2-dependent fibrosis in the helminth-infected IL-21R$^{-/-}$ mice.

Example 9: Discussion

[0188] IL-21 was recently characterized as a T_H2 cytokine that can inhibit the differentiation of naïve T_H cells into IFN-γ-producing T_H1 cells (Wurster et al. (2002), *supra*). Because the immune response in schistosomiasis evolves from an early IFN-γ to a sustained and dominant T_H2 response (Pearce and MacDonald, *supra*), the influence of IL-21R signaling on the development of helminth-induced T_H2 responses was examined. Infection of WT mice with *S. mansoni* increased IL-21 and IL-21R expression in the liver, confirming an association of IL-21 signaling with helminth-induced type-2 immunity. However, in the lung, schistosome eggs induced significant IL-21 expression during both T_H1 and T_H2 polarized responses. In fact, IL-21 expression increased most when mice were polarized to a T_H1 response. These data suggested that IL-21 exhibits a less restricted pattern of expression than that of the other T_H2-associated cytokines. The receptor for IL-21 also failed to display a T_H1/T_H2-specific pattern. However, the IL-21 receptor was induced nearly 4-fold more in the lungs of T_H2 versus T_H1 polarized mice, which provided one of the first indications that IL-21R signaling might be involved in the regulation of T_H2-mediated inflammation.

[0189] To determine whether type-2 effector responses were compromised in the absence of the IL-21R, the expression of several genes that are induced preferentially under T_H2-polarizing conditions was examined. These genes included AMCase, Ym1, and FIZZ1, all of which are thought to play important and nonredundant roles in the regulation of T_H2-mediated inflammation (Zhu et al., *supra*; Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Nair et al., *supra*; Mentink-Kane et al., *supra*; Guo et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:8032-37). Although some variation was observed during a primary, secondary, or chronic immune response, in each case the IL-21R$^{-/-}$ mice displayed highly significant decreases in these T_H2-associated genes. Ym1 and AMCase are members of a family of proteins that share homology with chitinases of lower organisms (Nair et al., *supra*). Although their exact function in host immune reactions remains uncertain, they are thought to play important roles in eosinophil chemotaxis, tissue remodeling and fibrosis. Indeed, a recent study showed that AMCase neutralization could ameliorate allergen-driven inflammation and airway

hyperresponsiveness, thus confirming the participation of mammalian chitinases in T_H2 immunity (Zhu et al, *supra*). FIZZ1 is also associated with tissue fibrogenesis (Mentink-Kane et al., *supra*; Liu et al. (2004) *J. Immunol.* 173:3425-31). Consequently, a major function of the IL-21R may be to regulate the mechanisms of wound healing and fibrosis. Therefore, in addition to its participation in helminth-induced immune responses, the IL-21R may be involved in the regulation of a variety of T_H2-mediated inflammatory disorders.

[0190] In schistosomiasis, IL-21R-deficiency had a profound effect on the progression of the disease. Although infection intensities were the same in WT and IL-21R$^{-/-}$ mice, the egg-induced inflammatory response decreased significantly in the absence of the IL-21R. There was also a marked reduction in secondary granuloma formation and a faster resolution of primary granulomas in the lung. Together, these data illustrate an indispensable role for the IL-21R in granulomatous inflammation. Previous studies showed that IL-4 and IL-13 are essential for lesion formation (Pearce and MacDonald; *supra*), thus the IL-21R is believed to be either directly or indirectly affecting the activity of these cytokines. These studies suggested that IL-21 was not acting alone since extremely high levels of IL-21 were observed in IL-4/IL-10 double knockout mice, yet granuloma formation was almost completely ablated in these T_H2-deficient animals (Hoffmann et al. (2000) *J. Immunol.* 164:6406-16; Sandler et al. (2003) *J. Immunol.* 171:3655-67). Thus, IL-21 appears to collaborate with IL-4 and IL-13 to induce a maximal response. The data disclosed herein show there is no detectable change in the cellular composition of the granulomas in IL-21R$^{-/-}$ mice and no specific impairment in CD4$^+$ T cell recruitment. Together, these findings suggested that the IL-21R regulates the development of parasite-induced pathology by modulating the overall intensity of the T_H2 effector response.

[0191] IL-21 is not thought to regulate IL-4-induced T_H2 cell differentiation directly (Suto et al., *supra*; Wurster et al. (2002), *supra*). Instead, it was hypothesized in a recent paper that IL-21 might amplify T_H2-driven responses by downregulating the expansion of IFN-γ-producing T_H1 cells (Wurster et al. (2002), *supra*). As such, it is theorized that the IFN-γ response in schistosome-infected mice might increase in the absence of the IL-21 receptor. Although a small increase was observed in lung-associated lymph nodes *in vitro*, IFN-γ

production was consistently reduced in the granulomatous tissues. Thus, the studies did not show that endogenous IL-21R played a substantial role in the inhibition of IFN-γ production during helminth infection. However, the IL-21R$^{-/-}$ mice simultaneously generated weaker T_H1 and T_H2 cytokine responses in the tissues. The significant reduction in IgG_{2b} (T_H1-associated) and IgG_1 (T_H2-associated) antibody titers at all times post-infection supports this conclusion. Th2 cytokines were also decreased at the mRNA level in both the lungs and lymph nodes following *N. brasiliensis* infection. Indeed, all of the direct *ex vivo* data confirmed a marked reduction in T_H2 cytokine expression and function within the affected tissues. Nevertheless, there was no consistent reduction in T_H2 cytokine production by isolated lymphocytes following antigen restimulation, which suggests the IL-21R$^{-/-}$ mice are capable of generating significant T_H2 responses, at least *in vitro*. Thus, the data disclosed herein suggest the IL-21R is selectively augmenting T_H2 responses in the tissues. In addition to promoting the T_H2 response, the IL-21R also increased IL-21 production. Thus, the IL-21R appears to operate in an autocrine fashion to drive T_H2 cytokine expression and type-2 effector functions *in vivo*.

[0192] To further elucidate the mechanisms involved, experiments were undertaken to determine whether IL-21 was directly modulating macrophage function, because the *in vivo* data showed a marked reduction in several genes that have been associated with the "alternatively-activated" phenotype (Gordon, *supra*; Mantovani et al. (2005) *Immunity* 23:344-46). Macrophages and fibroblasts exhibiting an alternatively activated phenotype are major cellular constituents of schistosome granulomas and functional studies suggested they are critically involved in the progression of the disease (Hesse et al.(2001), *supra*). Indeed, an important study by Brombacher et al. showed that mice that are completely deficient in alternatively activated macrophages develop lethal egg-induced pathology following infection with *S. mansoni* (Herbert et al. (2004) *Immunity* 20:623-35). In addition, because macrophage-derived TGF-β1 has been implicated in the mechanism of IL-13-mediated fibrosis (Lee et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:809-21; Fichtner-Feigl et al. (2006) *Nat. Med.* 12:99-106), experiments were undertaken to determine whether IL-21 was modulating TGF-β1 production in macrophages. To investigate these issues, Arg-1 and

FIZZ1 mRNA, arginase activity, and TGF-β1 protein responses were measured in bone marrow-derived macrophages following stimulation with various combinations of IL-21, IL-4, and IL-13. Arg-1 and FIZZ1 are IL-4Rα/Stat6-dependent genes (Liu et al., *supra*; Hesse et al. (2001), *supra*; Munder et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5347-54); therefore, they serve as functional markers of alternative macrophage activation. Importantly, the findings suggested that when macrophages were exposed to IL-21, they became much more sensitive to the Arg-1- and FIZZ1-inducing activities of IL-4 and IL-13. Arginase activity assessed by the production of urea also increased significantly, confirming IL-21 as an important stimulus for the development of highly functional alternatively activated macrophages. In contrast, IL-21 had no effect on the production of TGF-β1 by macrophages. Thus, the pro-fibrotic cytokine TGF-β1 does appear to be involved, which is consistent with previous studies that have investigated the role of TGF-β1 in schistosomiasis (Kaviratne et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4020-29). Instead, IL-21 significantly increased IL-4Rα and IL-13Rα1 expression in BMMøs and decreased the production of the soluble IL-13 decoy receptor *in vivo*, which likely explains their heightened sensitivity to IL-4 and IL-13. As such, these data compliment the *in vivo* studies with IL-21R$^{-/-}$ mice and suggest that an important function of IL-21R signaling is to enhance the development of AAMø, which have been implicated in the mechanism of fibrosis (Hesse et al. (2001), *supra*; Hesse et al. (2000), *supra*). Moreover, because AAMø have been shown to amplify CD4^{+} T_H2 cell differentiation (Bonecchi et al. (1998) *Blood* 92:2668-71), these data may also explain the overall reduction in helminth-induced T_H2 activity in the IL-21R$^{-/-}$ mice.

[0193] In human schistosomiasis, the development of fibrotic liver pathology is the principle cause of chronic morbidity and mortality (Pearce and MacDonald, *supra*; Wynn et al. (2004) *Immunol. Rev.* 201:156-67). Because the T_H2 cytokine response is known to play an important role in collagen deposition (Wynn et al. (2004), *supra*), a final series of experiments examined the influence of the IL-21R on the progression of hepatic fibrosis. Notably, development of fibrosis decreased significantly in the IL-21R$^{-/-}$ mice, with the knockout animals displaying over a 50% reduction in hepatic fibrosis by week 29 post-infection. Importantly, similar findings were also generated when infected WT mice were

treated with sIL-21R-Fc. Thus, the IL-21 receptor was revealed as a potential new target for anti-fibrotic therapy. In conclusion, these studies illustrate an essential role for the IL-21R in the progression of T_H2 cytokine-mediated disease. As such, the IL-21R should be added to list of important receptors that regulate type-2 immunity and macrophage polarization.

Example 10: Prophetic Treatments

[0194] A nonlimiting set of prophetic treatment examples follows.

[0195] A subject diagnosed with liver cirrhosis is administered an IL-21R fusion protein to reduce the accumulation of fibrotic tissue in the liver. The IL-21R fusion protein includes amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2 fused at its C-terminus via a linker (corresponding to amino acids 236-243 of SEQ ID NO:17) to a human immunoglobulin G1 (IgG1) Fc-mutated sequence (corresponding to amino acids 244-467 of SEQ ID NO:17).

[0196] A subject diagnosed with an infection with schistosoma is administered a soluble IL-21R fragment to reduce the accumulation of fibrotic tissue. The fragment contains amino acids 20-538 of SEQ ID NO:2.

[0197] Following surgery, a subject is administered an IL-21R antibody to reduce the accumulation of fibrosis due to surgical incision during the wound healing process.

[0198] A subject diagnosed with liver cirrhosis is administered an IL-21 antibody to reduce the accumulation of fibrotic tissue in the liver.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent that reduces the level of IL-21 and/or IL-21R in the subject.

2. The method of claim 1, wherein the agent is an IL-21/IL-21R antagonist selected from the group consisting of an anti-IL-21R antibody, an anti-IL-21 antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL-21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL-21 antibody, and a soluble fragment of an IL-21R.

3. The method of claim 2, wherein the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and wherein the soluble fragment of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 1-538 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-538 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-236 of SEQ ID NO: 2, amino acids 20-236 of SEQ ID NO:2, amino acids 1-529 of SEQ ID NO:5, amino acids 20-529 of SEQ ID NO:5, amino acids 1-236 of SEQ ID NO:5, and amino acid 20-236 of SEQ ID NO:5.

4. The method of claim 3, wherein the soluble fragment of the IL-21R binds to an IL-21 polypeptide.

5. The method of claim 1, wherein the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and wherein the soluble fragment of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, or SEQ ID NO:27.

6. The method of claim 5, wherein the amino acid sequence of the soluble fragment of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:13.

7. The method of claim 1, wherein the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and wherein the soluble fragment of the IL-21R is encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, or SEQ ID NO:26.

8. The method of claim 7, wherein the soluble fragment of the IL-21R is encoded by a nucleotide sequence that is substantially identical to the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:12 or SEQ ID NO:16.

9. The method of claim 2, wherein the agent is a soluble fragment of an IL-21R, and wherein the soluble fragment of the IL-21R comprises an extracellular domain of IL-21R and an immunoglobulin Fc fragment.

10. The method of claim 9, wherein the amino acid sequence of the extracellular domain of the IL-21R comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to amino acids 1-235 of SEQ ID NO:2 or amino acids 20-235 of SEQ ID NO:2.

11. The method of claim 9, wherein the immunoglobulin Fc fragment has an altered function.

12. The method of claim 11, wherein the immunoglobulin Fc fragment has the amino acid sequence of amino acids 244-467 of SEQ ID NO:17.

13. The method of claim 1, wherein the fibrosis or fibrosis-associated disorder affects the liver, epidermis, endodermis, muscle, tendon, cartilage, heart, pancreas, lung, uterus, nervous system, testis, ovary, adrenal gland, artery, vein, colon, small intestine, biliary tract, or stomach.

14. The method of claim 13, wherein the fibrosis or fibrosis-associated disorder affects the liver, epidermis, endodermis, or lung.

15. The method of claim 14, wherein the fibrosis or fibrosis-associated disorder is interstitial lung fibrosis.

16. The method of claim 13, wherein the fibrosis or fibrosis-associated disorder is the result of an infection with schistosoma.

17. The method of claim 1, wherein the fibrosis or fibrosis-associated disorder is the result of wound healing.

18. The method of claim 17, wherein the wound healing results from a surgical incision.

19. The method of claim 1, further comprising administering to the subject at least one additional therapeutic agent.

20. The method of claim 19, wherein the at least one additional therapeutic agent is selected from the group consisting of cytokine inhibitors, growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, cytotoxic agents, and cytostatic agents.

21. The method of claim 19, wherein the at least one additional therapeutic agent is selected from the group consisting of TNF antagonists, anti-TNF agents, IL-12 antagonists, IL-15 antagonists, IL-17 antagonists, IL-18 antagonists, IL-22 antagonists, T cell-depleting agents, B cell-depleting agents, cyclosporin, FK506, CCI-779, etanercept, infliximab, rituximab, adalimumab, prednisolone, azathioprine, gold, sulphasalazine, hydroxychloroquine, minocycline, anakinra, abatacept, methotrexate, leflunomide, rapamycin, rapamycin analogs, Cox-2 inhibitors, cPLA2 inhibitors, NSAIDs, p38 inhibitors, antagonists of B7.1, B7.2, ICOSL, ICOS and/or CD28, and agonists of CTLA4.

22. The method of claim 1, wherein the subject is a human.

23. A method for identifying a compound for treating, ameliorating or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest; (b) contacting the cell or sample of interest with a compound; and (c) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest following contact with the compound,

wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the contacted cell or sample of interest, in comparison to the level of IL-21 and/or IL-21R in a noncontacted cell or sample of interest, identifies the compound as a compound useful for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject.

24. A method for identifying a compound for treating, ameliorating or preventing fibrosis or a fibrosis-associated disorder in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest; (b) contacting the cell or sample of interest with a compound; (c) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest following contact with the compound; and (d) comparing the level of IL-21 and/or IL-21R in the contacted cell or sample of interest with a reference level of IL-21 and/or IL-21R, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the contacted cell or sample of interest, in comparison to the reference level of IL-21 and/or IL-21R, identifies the compound as a compound useful for treating, ameliorating, or preventing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject.

25. A method for monitoring the progress of fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a first time point; and (b) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a second time point, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the second time point, in comparison to the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the first time point, provides an indication that the fibrosis or fibrosis-associated condition has decreased in severity.

26. A method for prognosing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a first time point; and (b) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject at a second time point, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the second time point, in comparison to the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject at the first

time point, indicates a decreased likelihood that the subject will develop fibrosis or the fibrosis-associated condition or a decreased likelihood that the fibrosis or fibrosis-associate condition will worsen in the subject.

27. A method for prognosing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject; and (b) comparing the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject to a reference level of IL-21 and/or IL-21R, wherein a lower level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject, in comparison to the reference level of IL-21 and/or IL-21R, indicates a decreased likelihood that the subject will develop fibrosis or the fibrosis-associated condition or a decreased likelihood that the fibrosis or fibrosis-associate condition will worsen in the subject.

28. A method for diagnosing fibrosis or a fibrosis-associated condition in a subject, comprising: (a) measuring the level of IL-21 and/or IL-21R in a cell or sample of interest from the subject, and (b) comparing the level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject with a reference level of IL-21 and/or IL-21R, wherein a higher level of IL-21 and/or IL-21R in the cell or sample of interest from the subject, in comparison to the reference level of IL-21 and/or IL-21R, indicates the presence of fibrosis or the fibrosis-associated condition in the subject.

ABSTRACT

The present invention provides methods of screening for compositions useful for treating, ameliorating, or preventing fibrosis and/or fibrosis-associated conditions by measuring changes in the level(s) of IL-21 and/or IL-21 receptor (IL-21R) (e.g., the level of expression of IL-21 and/or IL-21R protein and/or mRNA, the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of interaction of IL-21 with IL-21R). The invention further provides antagonists of IL-21 or IL-21R for the treatment of fibrosis and/or fibrosis-associated conditions. Further provided herein are methods of diagnosing, prognosing, and monitoring the progress (e.g., the course of treatment) of fibrosis and/or fibrosis-associated conditions by measuring the level of IL-21 and/or IL-21R (i.e., the level of activity of IL-21 and/or IL-21R, the level of expression of IL-21 and/or IL-21R (e.g., the level of IL-21 and/or IL-21R gene products), and/or the level of interaction of IL-21 with IL-21R).

Fig. 1

```
   1 GTCGACGCGG CGGTACCAGC TGTCTGCCCA CTTCTCCTGT GGTGTGCCTC
  51 ACGGTCACTT GCTTGTCTGA CCGCAAGTCT GCCCATCCCT GGGGCAGCCA
 101 ACTGGCCTCA GCCCGTGCCC CAGGCGTGCC CTGTCTCTGT CTGGCTGCCC
 151 CAGCCCTACT GTCTTCCTCT GTGTAGGCTC TGCCCAGATG CCCGGCTGGT
 201 CCTCAGCCTC AGGACTATCT CAGCAGTGAC TCCCCTGATT CTGGACTTGC
 251 ACCTGACTGA ACTCCTGCCC ACCTCAAACC TTCACCTCCC ACCACCACCA
 301 CTCCGAGTCC CGCTGTGACT CCCACGCCCA GGAGACCACC CAAGTGCCCC
 351 AGCCTAAAGA ATGGCTTTCT GAGAAAGACC CTGAAGGAGT AGGTCTGGGA
 401 CACAGCATGC CCCGGGGCCC AGTGGCTGCC TTACTCCTGC TGATTCTCCA
 451 TGGAGCTTGG AGCTGCCTGG ACCTCACTTG CTACACTGAC TACCTCTGGA
 501 CCATCACCTG TGTCCTGGAG ACACGGAGCC CCAACCCCAG CATACTCAGT
 551 CTCACCTGGC AAGATGAATA TGAGGAACTT CAGGACCAAG AGACCTTCTG
 601 CAGCCTACAC AGGTCTGGCC ACAACACCAC ACATATATGG TACACGTGCC
 651 ATATGCGCTT GTCTCAATTC CTGTCCGATG AAGTTTTCAT TGTCAATGTG
 701 ACGGACCAGT CTGGCAACAA CTCCCAAGAG TGTGGCAGCT TTGTCCTGGC
 751 TGAGAGCATC AAACCAGCTC CCCCCTTGAA CGTGACTGTG GCCTTCTCAG
 801 GACGCTATGA TATCTCCTGG GACTCAGCTT ATGACGAACC CTCCAACTAC
 851 GTGCTGAGGG GCAAGCTACA ATATGAGCTG CAGTATCGGA ACCTCAGAGA
 901 CCCCTATGCT GTGAGGCCGG TGACCAAGCT GATCTCAGTG GACTCAAGAA
 951 ACGTCTCTCT TCTCCCTGAA GAGTTCCACA AAGATTCTAG CTACCAGCTG
1001 CAGGTGCGGG CAGCGCCTCA GCCAGGCACT TCATTCAGGG GGACCTGGAG
1051 TGAGTGGAGT GACCCCGTCA TCTTTCAGAC CCAGGCTGGG GAGCCCGAGG
1101 CAGGCTGGGA CCCTCACATG CTGCTGCTCC TGGCTGTCTT GATCATTGTC
1151 CTGGTTTTCA TGGGTCTGAA GATCCACCTG CCTTGGAGGC TATGGAAAAA
1201 GATATGGGCA CCAGTGCCCA CCCCTGAGAG TTTCTTCCAG CCCCTGTACA
1251 GGGAGCACAG CGGGAACTTC AAGAAATGGG TTAATACCCC TTTCACGGCC
1301 TCCAGCATAG AGTTGGTGCC ACAGAGTTCC ACAACAACAT CAGCCTTACA
1351 TCTGTCATTG TATCCAGCCA AGGAGAAGAA GTTCCCGGGG CTGCCGGGTC
1401 TGGAAGAGCA ACTGGAGTGT GATGGAATGT CTGAGCCTGG TCACTGGTGC
```

Fig. 1 (continued)

1451 ATAATCCCCT TGGCAGCTGG CCAAGCGGTC TCAGCCTACA GTGAGGAGAG

1501 AGACCGGCCA TATGGTCTGG TGTCCATTGA CACAGTGACT GTGGGAGATG

1551 CAGAGGGCCT GTGTGTCTGG CCCTGTAGCT GTGAGGATGA TGGCTATCCA

1601 GCCATGAACC TGGATGCTGG CCGAGAGTCT GGCCCTAATT CAGAGGATCT

1651 GCTCTTGGTC ACAGACCCTG CTTTTCTGTC TTGCGGCTGT GTCTCAGGTA

1701 GTGGTCTCAG GCTTGGAGGC TCCCCAGGCA GCCTACTGGA CAGGTTGAGG

1751 CTGTCATTTG CAAAGGAAGG GGACTGGACA GCAGACCCAA CCTGGAGAAC

1801 TGGGTCCCCA GGAGGGGGCT CTGAGAGTGA AGCAGGTTCC CCCCCTGGTC

1851 TGGACATGGA CACATTTGAC AGTGGCTTTG CAGGTTCAGA CTGTGGCAGC

1901 CCCGTGGAGA CTGATGAAGG ACCCCCTCGA AGCTATCTCC GCCAGTGGGT

1951 GGTCAGGACC CCTCCACCTG TGGACAGTGG AGCCCAGAGC AGCTAGCATA

2001 TAATAACCAG CTATAGTGAG AAGAGGCCTC TGAGCCTGGC ATTTACAGTG

2051 TGAACATGTA GGGGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG

2101 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTCTTGGGT TGTGTGTTAG CACATCCATG

2151 TTGGGATTTG GTCTGTTGCT ATGTATTGTA ATGCTAAATT CTCTACCCAA

2201 AGTTCTAGGC CTACGAGTGA ATTCTCATGT TTACAAACTT GCTGTGTAAA

2251 CCTTGTTCCT TAATTTAATA CCATTGGTTA AATAAAATTG GCTGCAACCA

2301 ATTACTGGAG GGATTAGAGG TAGGGGGCTT TTGAGTTACC TGTTTGGAGA

2351 TGGAGAAGGA GAGAGGAGAG ACCAAGAGGA GAAGGAGGAA GGAGAGGAGA

2401 GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA

2451 GGCTGCCGTG AGGGGAGAGG GACCATGAGC CTGTGGCCAG GAGAAACAGC

2501 AAGTATCTGG GGTACACTGG TGAGGAGGTG GCCAGGCCAG CAGTTAGAAG

2551 AGTAGATTAG GGGTGACCTC CAGTATTTGT CAAAGCCAAT TAAAATAACA

2601 AAAAAAAAAA AAAAGCGGCC GCTCTAGA

Fig. 2A

1 **MPRGPVAALL LLILHGAWSC** LDLTCYTDYL WTITCVLETR SPNPSILSLT

51 WQDEYEELQD QETFCSLHRS GHNTTHIWYT CHMRLSQFLS DEVFIVNVTD

101 QSGNNSQECG SFVLAESIKP APPLNVTVAF SGRYDISWDS AYDEPSNYVL

151 RGKLQYELQY RNLRDPYAVR PVTKLISVDS RNVSLLPEEF HKDSSYQLQV

201 RAAPQPGTSF RGT**WSEWS**DP VIFQTQAGEP EAGWDPHMLL LLAVLIIVLV

251 FMGLKIHLPW RLWKKIWAPV PTPESFFQPL YREHSGNFKK WVNTPFTASS

301 IELVPQSSTT TSALHLSLYP AKEKKFPGLP GLEEQLECDG MSEPGHWCII

351 PLAAGQAVSA YSEERDRPYG LVSIDTVTVG DAEGLCVWPC SCEDDGYPAM

401 NLDAGRESGP NSEDLLLVTD PAFLSCGCVS GSGLRLGGSP GSLLDRLRLS

451 FAKEGDWTAD PTWRTGSPGG GSESEAGSPP GLDMDTFDSG FAGSDCGSPV

501 ETDEGPPRSY LRQWVVRTPP PVDSGAQSS

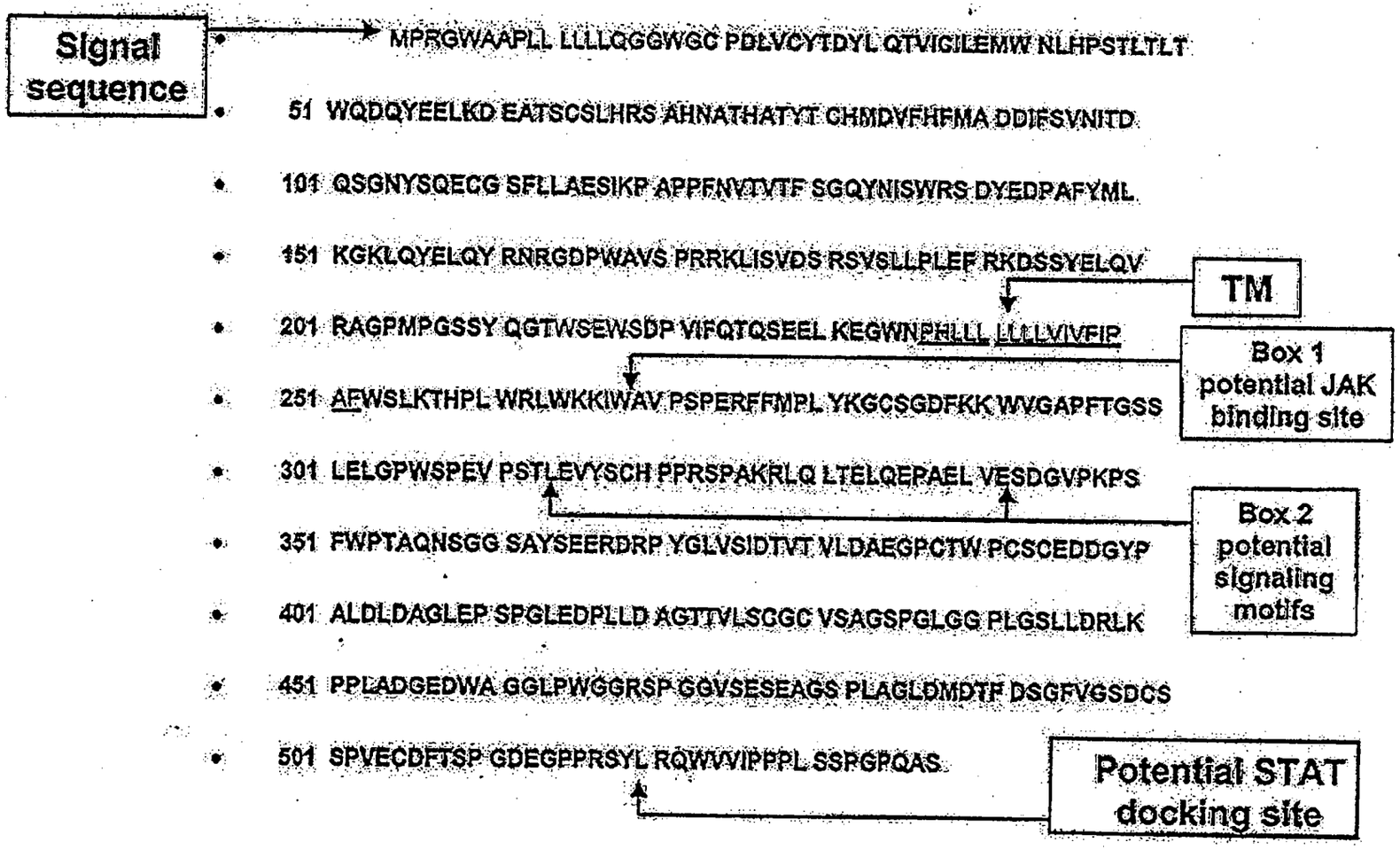

Signal sequence
MPRGWAAPLL LLLLQGGWGC PDLVCYTDYL QTVICILEMW NLHPSTLTLT
51 WQDQYEELKD EATSCSLHRS AHNATHATYT CHMDVFHFMA DDIFSVNITD
101 QSGNYSQECG SFLLAESIKP APPFNVTVTF SGQYNISWRS DYEDPAFYML
151 KGKLQYELQY RNRGDPWAVS PRRKLISVDS RSVSLLPLEF RKDSSYELQV
TM
201 RAGPMPGSSY QGTWSEWSDP VIFQTQSEEL KEGWNPHLLL LLLLVIVFIP
Box 1 potential JAK binding site
251 AFWSLKTHPL WRLWKKIWAV PSPERFFMPL YKGCSGDFKK WVGAPFTGSS
301 LELGPWSPEV PSTLEVYSCH PPRSPAKRLQ LTELQEPAEL VESDGVPKPS
Box 2 potential signaling motifs
351 FWPTAQNSGG SAYSEERDRP YGLVSIDTVT VLDAEGPCTW PCSCEDDGYP
401 ALDLDAGLEP SPGLEDPLLD AGTTVLSCGC VSAGSPGLGG PLGSLLDRLK
451 PPLADGEDWA GGLPWGGRSP GGVSESEAGS PLAGLDMDTF DSGFVGSDCS
501 SPVECDFTSP GDEGPPRSYL RQWVVIPPPL SSPGPQAS
Potential STAT docking site

Figure 2B

Fig. 3

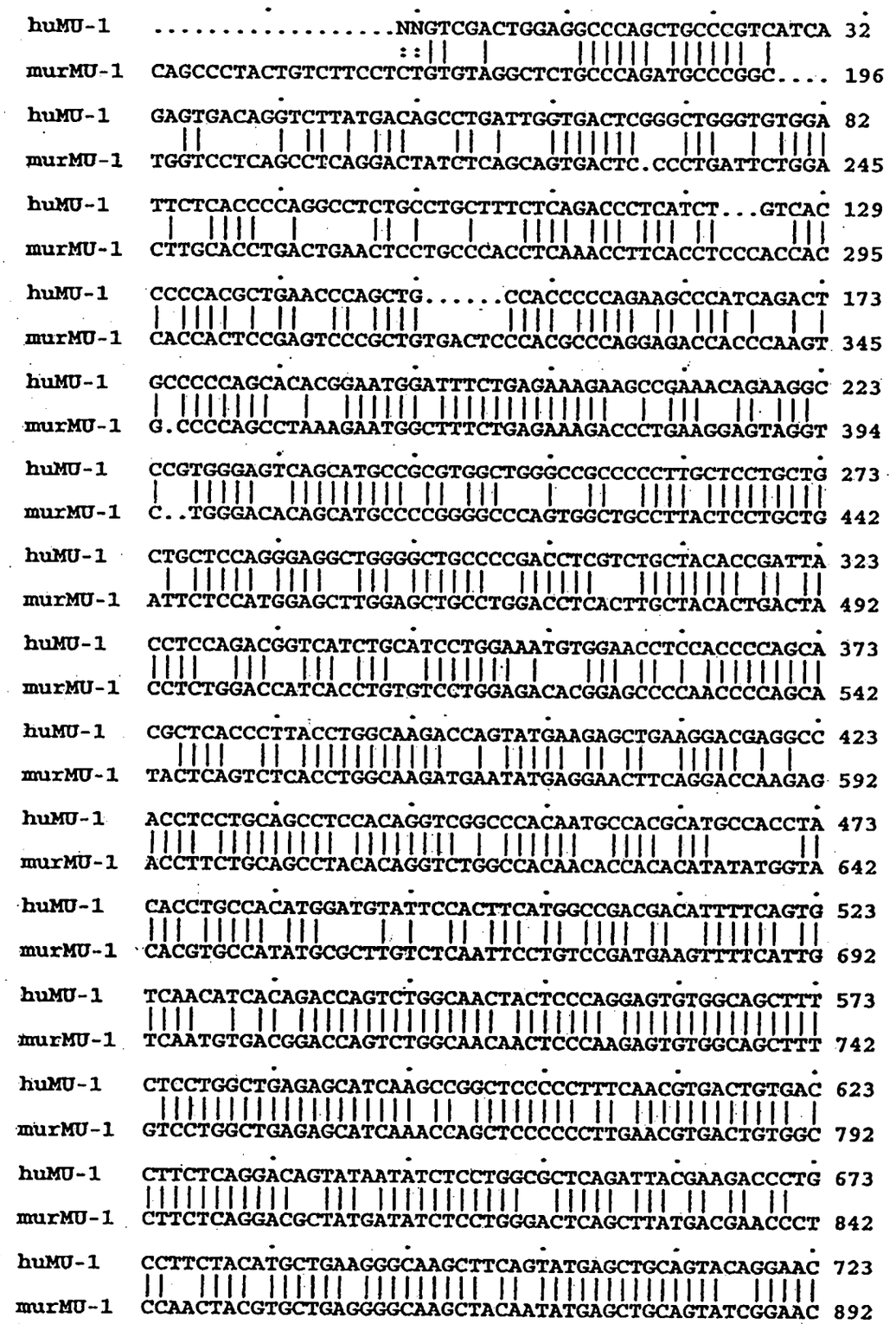

huMU-1 .....NNGTCGACTGGAGGCCCAGCTGCCCGTCATCA 32
murMU-1 CAGCCCTACTGTCTTCCTCTGTGTAGGCTCTGCCCAGATGCCCGGC.... 196
huMU-1 GAGTGACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGA 82
murMU-1 TGGTCCTCAGCCTCAGGACTATCTCAGCAGTGACTC.CCCTGATTCTGGA 245
huMU-1 TTCTCACCCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACCCTCATCT...GTCAC 129
murMU-1 CTTGCACCTGACTGAACTCCTGCCCACCTCAAACCTTCACCTCCCACCAC 295
huMU-1 CCCCACGCTGAACCCAGCTG.....CCACCCCCAGAAGCCCATCAGACT 173
murMU-1 CACCACTCCGAGTCCCGCTGTGACTCCCACGCCCAGGAGACCACCCAAGT 345
huMU-1 GCCCCCAGCACACGGAATGGATTTCTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGC 223
murMU-1 G.CCCCAGCCTAAAGAATGGCTTTCTGAGAAAGACCCTGAAGGAGTAGGT 394
huMU-1 CCGTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCCCTTGCTCCTGCTG 273
murMU-1 C..TGGGACACAGCATGCCCCGGGGCCCAGTGGCTGCCTTACTCCTGCTG 442
huMU-1 CTGCTCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTA 323
murMU-1 ATTCTCCATGGAGCTTGGAGCTGCCTGGACCTCACTTGCTACACTGACTA 492
huMU-1 CCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGGAACCTCCACCCCAGCA 373
murMU-1 CCTCTGGACCATCACCTGTGTCCTGGAGACACGGAGCCCCAACCCCAGCA 542
huMU-1 CGCTCACCCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCC 423
murMU-1 TACTCAGTCTCACCTGGCAAGATGAATATGAGGAACTTCAGGACCAAGAG 592
huMU-1 ACCTCCTGCAGCCTCCACAGGTCGGCCCACAATGCCACGCATGCCACCTA 473
murMU-1 ACCTTCTGCAGCCTACACAGGTCTGGCCACAACACCACACATATATGGTA 642
huMU-1 CACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATTTTCAGTG 523
murMU-1 CACGTGCCATATGCGCTTGTCTCAATTCCTGTCCGATGAAGTTTTCATTG 692
huMU-1 TCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCCAGGAGTGTGGCAGCTTT 573
murMU-1 TCAATGTGACGGACCAGTCTGGCAACAACTCCCAAGAGTGTGGCAGCTTT 742
huMU-1 CTCCTGGCTGAGAGCATCAAGCCGGCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGAC 623
murMU-1 GTCCTGGCTGAGAGCATCAAACCAGCTCCCCCCTTGAACGTGACTGTGGC 792
huMU-1 CTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTG 673
murMU-1 CTTCTCAGGACGCTATGATATCTCCTGGGACTCAGCTTATGACGAACCCT 842
huMU-1 CCTTCTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAAC 723
murMU-1 CCAACTACGTGCTGAGGGGCAAGCTACAATATGAGCTGCAGTATCGGAAC 892

Fig. 3 (continued)

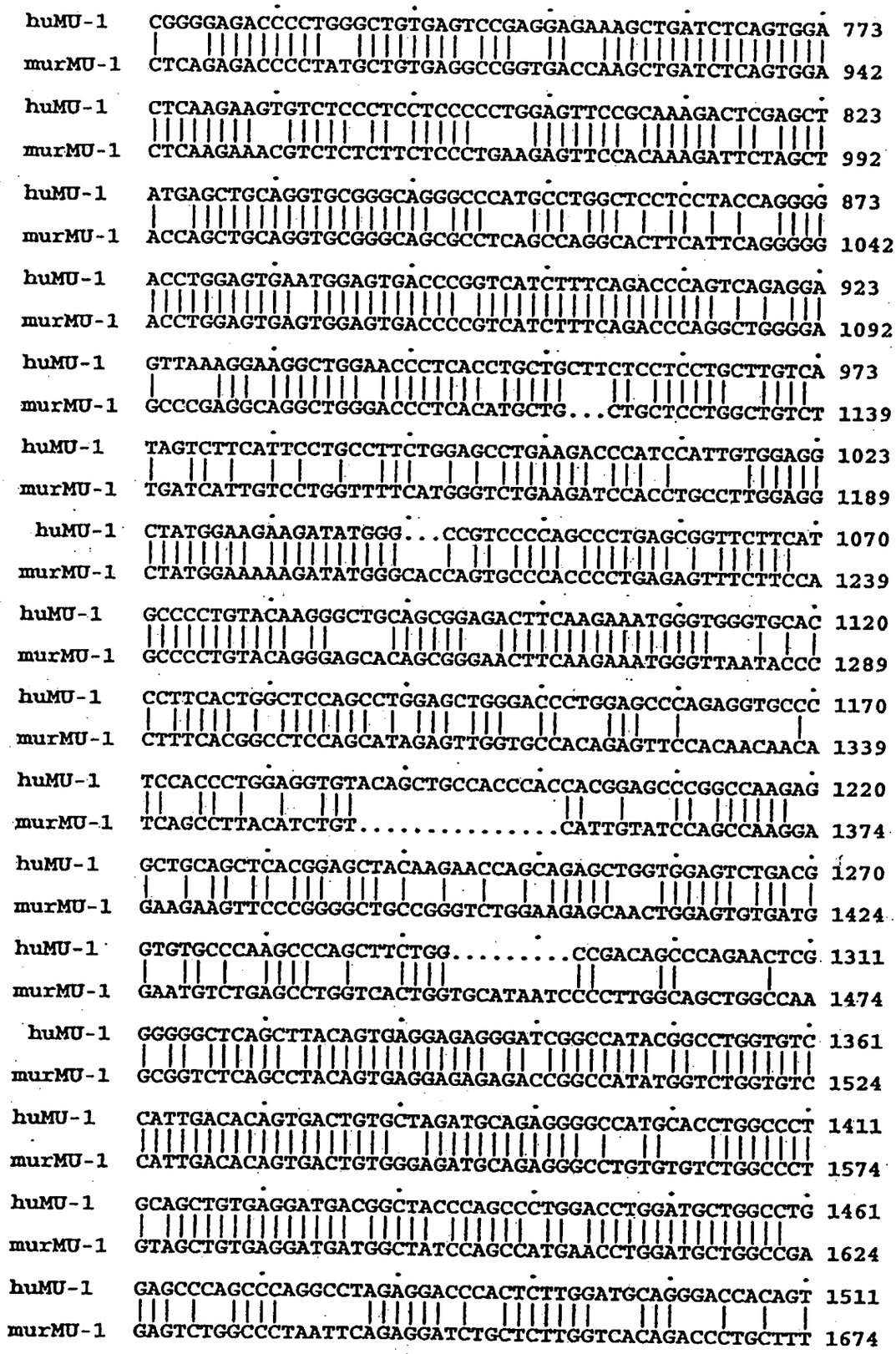


Fig. 3 (continued)

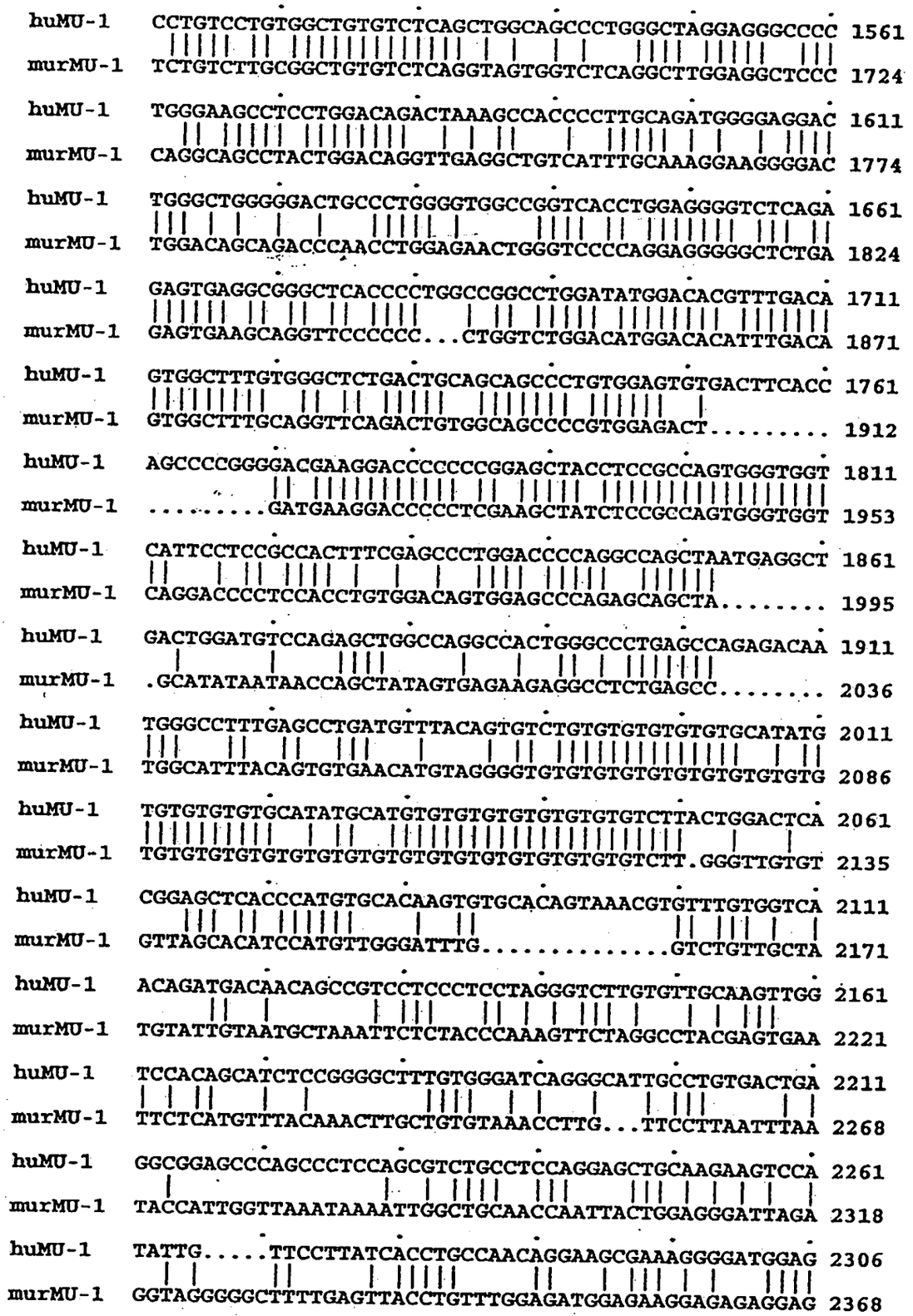


Fig. 3 (continued)

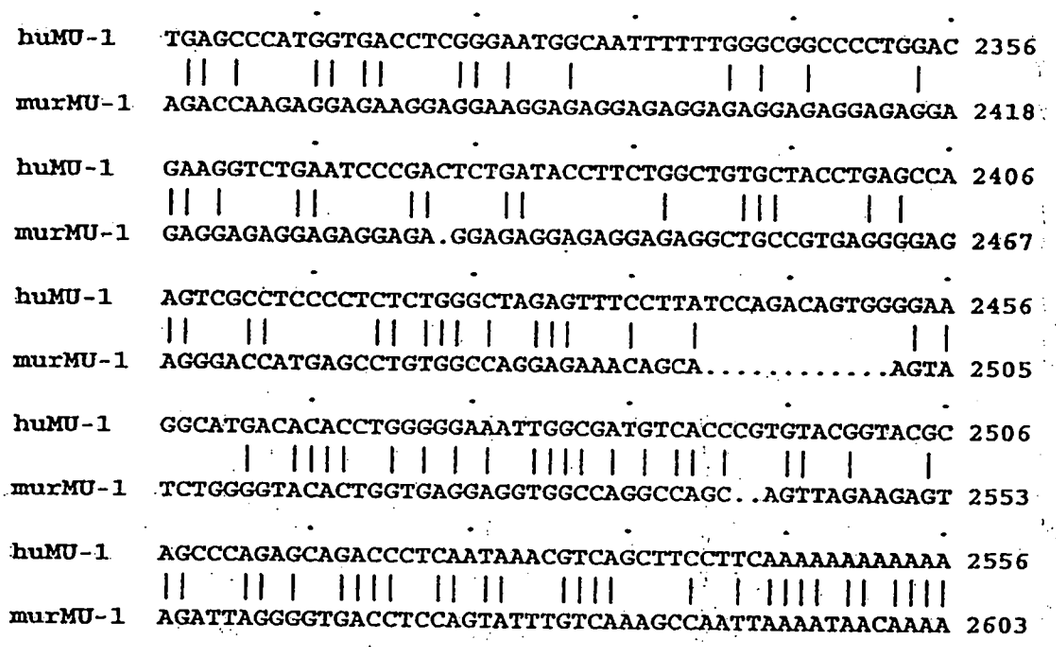


Fig. 4

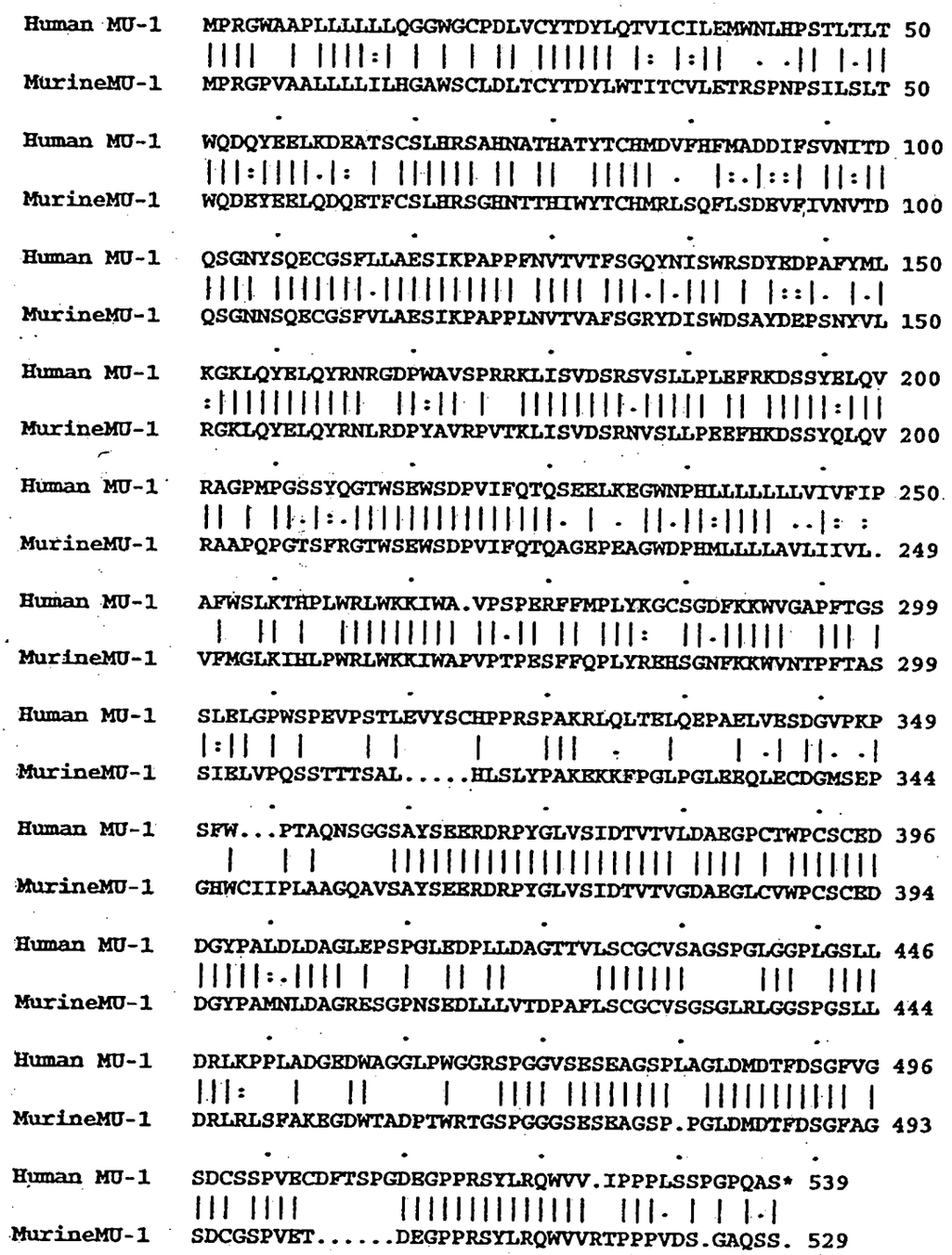

Human MU-1 MPRGWAAPLLLLLLLQGGWGCPDLVCYTDYLQTVICILEMWNLHPSTLTLT 50
MurineMU-1 MPRGPVAALLLLLILHGAWSCLDLTCYTDYLWTITCVLETRSPNPSILSLT 50
Human MU-1 WQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFHFMADDIFSVNITD 100
MurineMU-1 WQDEYEELQDQETFCSLHRSGHNTTHIWYTCHMRLSQFLSDEVFIVNVTD 100
Human MU-1 QSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRSDYEDPAFYML 150
MurineMU-1 QSGNNSQECGSFVLAESIKPAPPLNVTVAFSGRYDISWDSAYDEPSNYVL 150
Human MU-1 KGKLQYELQYRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLLPLEFRKDSSYELQV 200
MurineMU-1 RGKLQYELQYRNLRDPYAVRPVTKLISVDSRNVSLLPEEFHKDSSYQLQV 200
Human MU-1 RAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEELKEGWNPHLLLLLLLVIVFIP 250
MurineMU-1 RAAPQPGTSFRGTWSEWSDPVIFQTQAGEPEAGWDPHMLLLLAVLIIVL. 249
Human MU-1 AFWSLKTHPLWRLWKKIWA.VPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGS 299
MurineMU-1 VFMGLKIHLPWRLWKKIWAPVPTPESFFQPLYREHSGNFKKWVNTPFTAS 299
Human MU-1 SLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKP 349
MurineMU-1 SIELVPQSSTTTSAL.....HLSLYPAKEKKFPGLPGLEEQLECDGMSEP 344
Human MU-1 SFW...PTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCED 396
MurineMU-1 GHWCIIPLAAGQAVSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVGDAEGLCVWPCSCED 394
Human MU-1 DGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLL 446
MurineMU-1 DGYPAMNLDAGRESGPNSEDLLLVTDPAFLSCGCVSGSGLRLGGSPGSLL 444
Human MU-1 DRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVG 496
MurineMU-1 DRLRLSFAKEGDWTADPTWRTGSPGGGSESEAGSP.PGLDMDTFDSGFAG 493
Human MU-1 SDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVV.IPPPLSSPGPQAS* 539
MurineMU-1 SDCGSPVET......DEGPPRSYLRQWVVRTPPPVDS.GAQSS. 529

Fig. 5

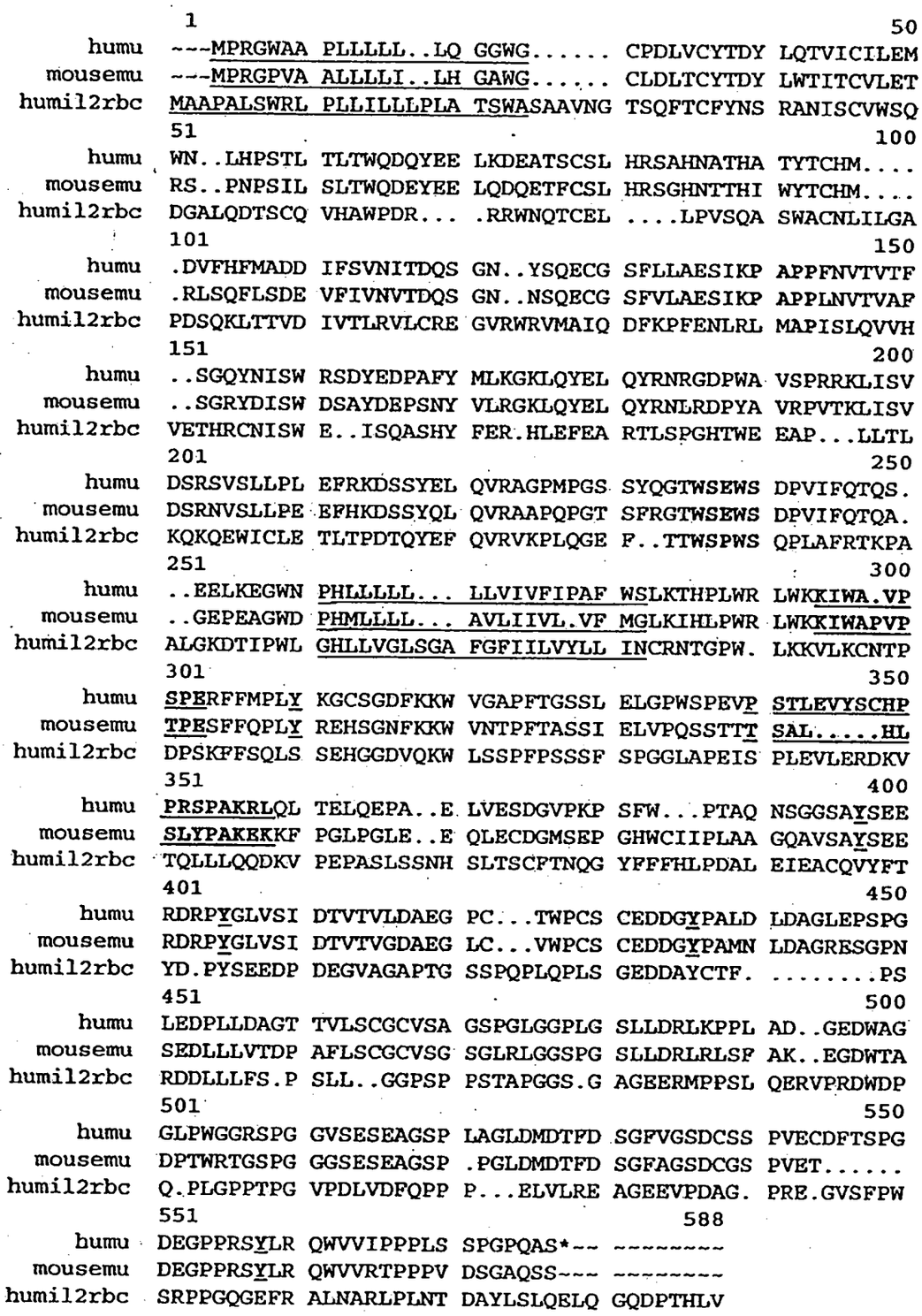

1 50
humu ---MPRGWAA PLLLLL..LQ GGWG..... CPDLVCYTDY LQTVICILEM
mousemu ---MPRGPVA ALLLLI..LH GAWG..... CLDLTCYTDY LWTITCVLET
humil2rbc MAAPALSWRL PLLILLLPLA TSWASAAVNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ
51 100
humu WN..LHPSTL TLTWQDQYEE LKDEATSCSL HRSAHNATHA TYTCHM....
mousemu RS..PNPSIL SLTWQDEYEE LQDQETFCSL HRSGHNTTHI WYTCHM....
humil2rbc DGALQDTSCQ VHAWPDR... .RRWNQTCEL ....LPVSQA SWACNLILGA
101 150
humu .DVFHFMADD IFSVNITDQS GN..YSQECG SFLLAESIKP APPFNVTVTF
mousemu .RLSQFLSDE VFIVNVTDQS GN..NSQECG SFVLAESIKP APPLNVTVAF
humil2rbc PDSQKLTTVD IVTLRVLCRE GVRWRVMAIQ DFKPFENLRL MAPISLQVVH
151 200
humu ..SGQYNISW RSDYEDPAFY MLKGKLQYEL QYRNRGDPWA VSPRRKLISV
mousemu ..SGRYDISW DSAYDEPSNY VLRGKLQYEL QYRNLRDPYA VRPVTKLISV
humil2rbc VETHRCNISW E..ISQASHY FER.HLEFEA RTLSPGHTWE EAP...LLTL
201 250
humu DSRSVSLLPL EFRKDSSYEL QVRAGPMPGS SYQGTWSEWS DPVIFQTQS.
mousemu DSRNVSLLPE EFHKDSSYQL QVRAAPQPGT SFRGTWSEWS DPVIFQTQA.
humil2rbc KQKQEWICLE TLTPDTQYEF QVRVKPLQGE F..TTWSPWS QPLAFRTKPA
251 300
humu ..EELKEGWN PHLLLLL... LLVIVFIPAF WSLKTHPLWR LWKKIWA.VP
mousemu ..GEPEAGWD PHMLLLL... AVLIIVL.VF MGLKIHLPWR LWKKIWAPVP
humil2rbc ALGKDTIPWL GHLLVGLSGA FGFIILVYLL INCRNTGPW. LKKVLKCNTP
301 350
humu SPERFFMPLY KGCSGDFKKW VGAPFTGSSL ELGPWSPEVP STLEVYSCHP
mousemu TPESFFQPLY REHSGNFKKW VNTPFTASSI ELVPQSSTTT SAL.....HL
humil2rbc DPSKFFSQLS SEHGGDVQKW LSSPFPSSSF SPGGLAPEIS PLEVLERDKV
351 400
humu PRSPAKRLQL TELQEPA..E LVESDGVPKP SFW...PTAQ NSGGSAYSEE
mousemu SLYPAKEKKF PGLPGLE..E QLECDGMSEP GHWCIIPLAA GQAVSAYSEE
humil2rbc TQLLLQQDKV PEPASLSSNH SLTSCFTNQG YFFFHLPDAL EIEACQVYFT
401 450
humu RDRPYGLVSI DTVTVLDAEG PC...TWPCS CEDDGYPALD LDAGLEPSPG
mousemu RDRPYGLVSI DTVTVGDAEG LC...VWPCS CEDDGYPAMN LDAGRESGPN
humil2rbc YD.PYSEEDP DEGVAGAPTG SSPQPLQPLS GEDDAYCTF. .....PS
451 500
humu LEDPLLDAGT TVLSCGCVSA GSPGLGGPLG SLLDRLKPPL AD..GEDWAG
mousemu SEDLLLVTDP AFLSCGCVSG SGLRLGGSPG SLLDRLRLSF AK..EGDWTA
humil2rbc RDDLLLFS.P SLL..GGPSP PSTAPGGS.G AGEERMPPSL QERVPRDWDP
501 550
humu GLPWGGRSPG GVSESEAGSP LAGLDMDTFD SGFVGSDCSS PVECDFTSPG
mousemu DPTWRTGSPG GGSESEAGSP .PGLDMDTFD SGFAGSDCGS PVET.....
humil2rbc Q.PLGPPTPG VPDLVDFQPP P...ELVLRE AGEEVPDAG. PRE.GVSFPW
551 588
humu DEGPPRSYLR QWVVIPPPLS SPGPQAS*~~ ~~~~~~~~~
mousemu DEGPPRSYLR QWVVRTPPPV DSGAQSS~~~ ~~~~~~~~~
humil2rbc SRPPGQGEFR ALNARLPLNT DAYLSLQELQ GQDPTHLV

Fig. 6

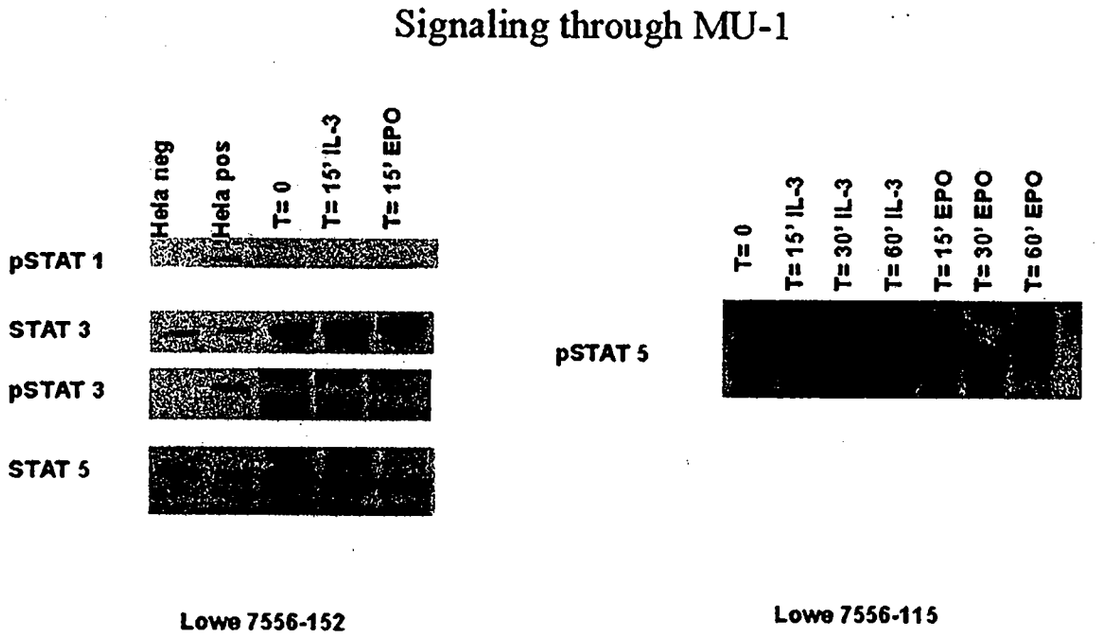

Signaling through MU-1
Hela neg
Hela pos
T= 0
T= 15' IL-3
T= 15' EPO
pSTAT 1
STAT 3
pSTAT 3
STAT 5
Lowe 7556-152
T= 0
T= 15' IL-3
T= 30' IL-3
T= 60' IL-3
T= 15' EPO
T= 30' EPO
T= 60' EPO
pSTAT 5
Lowe 7556-115

Fig. 7A

```
atg aaa ttc tta gtc aac gtt gcc ctt gtt ttt atg gtc gtg tac att      48
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                  10                  15

tct tac atc tat gcc ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc      96
Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

ggc gac tat aaa gac gat gac gat aag ggt tcc gga tgc ccc gac ctc     144
Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Pro Asp Leu
        35                  40                  45

gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg     192
Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met
    50                  55                  60

tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat     240
Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr
65                  70                  75                  80

gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc     288
Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala
                85                  90                  95

cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac     336
His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His
            100                 105                 110

ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc     384
Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag     432
Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat     480
Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn
145                 150                 155                 160

atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag     528
Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys
                165                 170                 175

ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg     576
Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp
            180                 185                 190

gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc     624
Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val
        195                 200                 205

tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag     672
Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 7B

```
gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt        720
Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag        768
Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys
                245                 250                 255

gaa ggc tgg aac taa tga                                               786
Glu Gly Trp Asn
            260
```

Fig. 8A

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg          50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                   10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat          98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc         146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac         194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat         242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac         290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag         338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc         386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca         434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat         482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg         530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg         578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc         626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg         674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220
```

Fig. 8B

```
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gtc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440
```

Fig. 8C

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tgagtgaatt c                          1426
Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                465
```

Fig. 9A

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg        50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                   10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat        98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc       146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac       194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat       242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac       290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag       338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc       386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca       434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat       482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg       530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg       578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc       626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg       674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220
```

Fig. 9B

```
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gtc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440
```

Fig. 9C

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tca gga atg gca tca atg aca gga ggt      1442
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly
                465                 470                 475

caa caa atg ggt tct gga tct cat cat cat cat cat cat tct gga ggt      1490
Gln Gln Met Gly Ser Gly Ser His His His His His His Ser Gly Gly
            480                 485                 490

tgagaattc                                                           1499
```

Fig. 10A

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg        50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                   10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat        98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc       146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac       194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat       242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac       290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag       338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc       386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca       434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat       482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg       530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg       578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc       626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg       674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220
```

Fig. 10B

```
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440
```

Fig. 10C

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc     1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tgagtgaatt c                        1426
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                465
```

Fig. 11A

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac     480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc     528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc     624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag     672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 11B

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

cag gtt gct ccg gca taa tga                                      741
Gln Val Ala Pro Ala
                245
```

Fig. 12A

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac     480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc     528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc     624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag     672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 12B

```
acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac gat gac gat gac aag
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Asp Asp Asp Asp Lys
225                 230                 235                 240

ggc tcc ggc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa
Gly Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac
Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445
```

Fig. 12C

```
tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga                                       1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

Fig. 13A

```
atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg ctg att ctc cat gga      48
Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
1               5                  10                  15

gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac act gac tac ctc tgg acc      96
Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
            20                  25                  30

atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt     144
Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
        35                  40                  45

ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
    50                  55                  60

tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca cat ata tgg tac acg     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc     288
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
                85                  90                  95

aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg     384
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa     432
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
    130                 135                 140

ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat     480
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc     528
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
            180                 185                 190

gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act     624
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
        195                 200                 205

tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag     672
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 13B

```
acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac ggc tcc ggc tct aga      720
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly Ser Arg
225                 230                 235                 240

gagccccgcg gaccgacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagg taagtcacta    780

gaccagagct ccactcccgg gagaatggta agtgctataa acatccctgc actagaggat    840

aagccatgta cagatccatt tccatctctc ctcatcagca cctaacctcg agggtggacc    900

atccgtcttc atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat    960

agtcacatgt gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt   1020

tgtgaacaac gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag   1080

tactctccgg gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaaggc   1140

tttcgcatgc gccgtcaaca acaaagacct cccagcgccc atcgagagaa ccatctcaaa   1200

acccaaaggt gagagctgca gcctgactgc atgggggctg ggatgggcat aaggataaag   1260

gtctgtgtgg acagccttct gcttcagcca tgacctttgt gtatgtttct accctcacag   1320

ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag atgactaaga   1380

aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt   1440

ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg   1500

atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa   1560

atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct   1620

tctcccggac tccgggtaaa tgagctcagc acccacaaaa ctctcaggtc caaagagaca   1680

cccacactca tctccatgct tcccttgtat aaataaagca cccagcaatg cctgggacca   1740

tgtaatagga attc                                                     1754
```

Fig. 14A

```
ctgcaggtcg acaccacc atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg        51
                      Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu
                      1               5                   10

ctg att ctc cat gga gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac act        99
Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr
            15                  20                  25

gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac       147
Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn
        30                  35                  40

ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag       195
Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln
    45                  50                  55

gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca       243
Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr
60                  65                  70                  75

cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat       291
His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp
                80                  85                  90

gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa       339
Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln
            95                  100                 105

gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc       387
Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro
        110                 115                 120

ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac       435
Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp
    125                 130                 135

tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa       483
Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln
140                 145                 150                 155

tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg       531
Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro
                160                 165                 170

gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct       579
Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro
            175                 180                 185

gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg       627
Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala
        190                 195                 200

cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac       675
Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp
    205                 210                 215
```

Fig. 14B

```
ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac      723
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp
220                 225                 230                 235

ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc ggc gac tat aaa gac      771
Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp
                240                 245                 250

gat gac gat aag tagtgagaat tc                                        795
Asp Asp Asp Lys
            255
```

Fig. 15A

```
atg aaa ttc tta gtc aac gtt gcc ctt gtt ttt atg gtc gtg tac att      48
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                  10                  15

tct tac atc tat gcc ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc      96
Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

ggc gac tat aaa gac gat gac gat aag ggt tcc gga tgc ctg gac ctc     144
Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Leu Asp Leu
        35                  40                  45

act tgc tac act gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca     192
Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr
    50                  55                  60

cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat     240
Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr
65                  70                  75                  80

gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc     288
Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly
                85                  90                  95

cac aac acc aca cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa     336
His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln
            100                 105                 110

ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc     384
Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa     432
Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat     480
Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp
145                 150                 155                 160

atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg     528
Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg
                165                 170                 175

ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat     576
Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr
            180                 185                 190

gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc     624
Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val
        195                 200                 205

tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag     672
Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 15B

```
gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt      720
Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag      768
Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu
                245                 250                 255

gca ggc tgg gac tagtgagaat tc                                        792
Ala Gly Trp Asp
            260
```

Figure 16

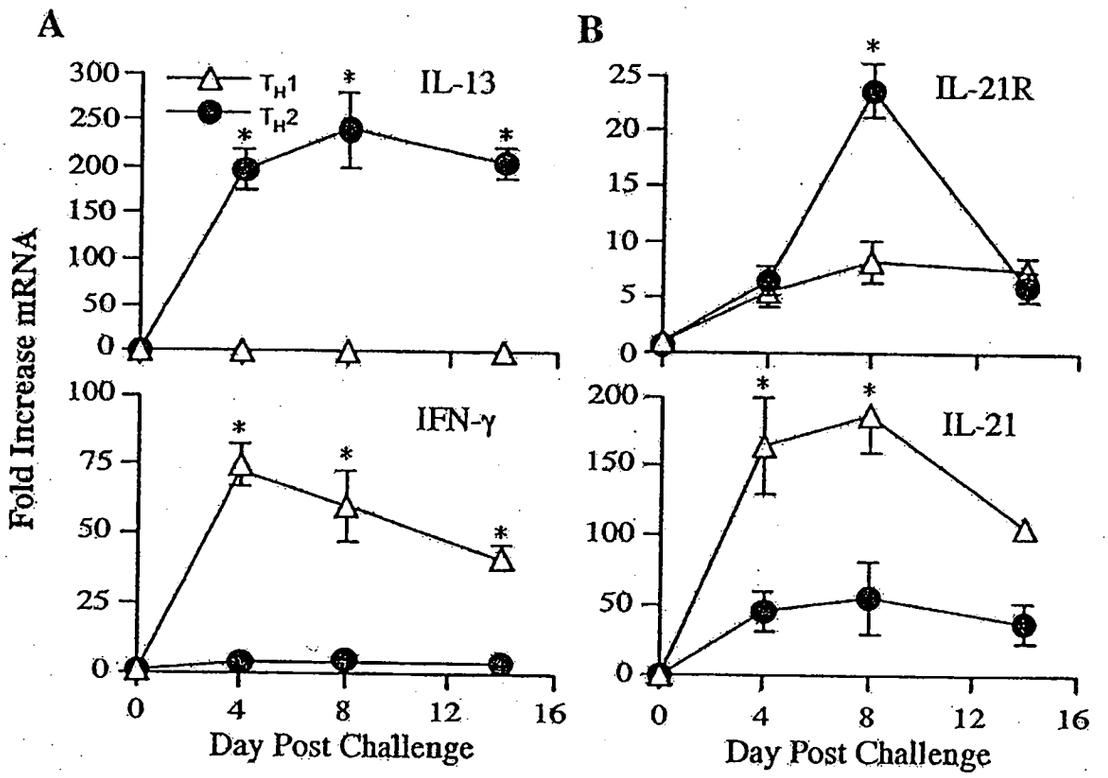

A
B
Fold Increase mRNA
T_H1
T_H2
IL-13
IFN-γ
IL-21R
IL-21
Day Post Challenge
Day Post Challenge

Figure 17

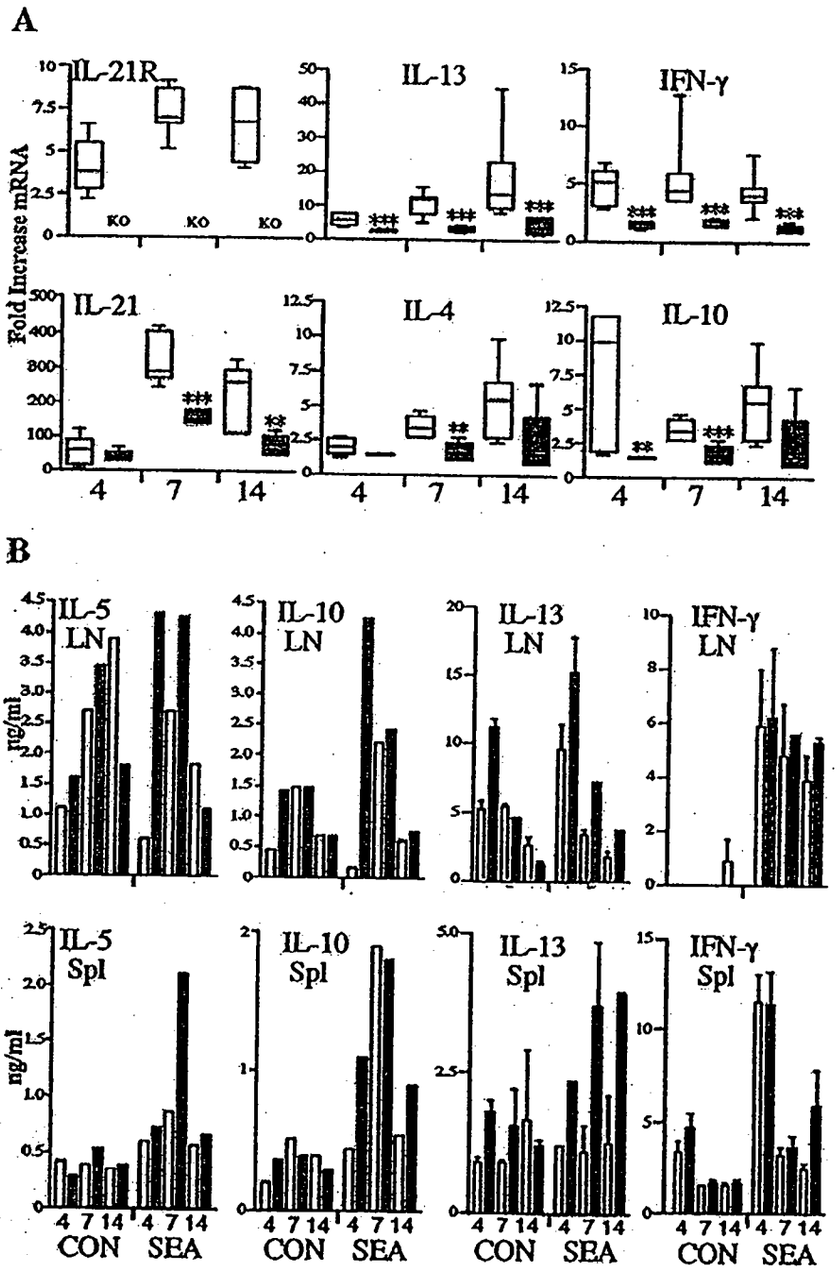

A
IL-21R
IL-13
IFN-γ
IL-21
IL-4
IL-10
Fold Increase mRNA
KO
4
7
14
B
IL-5 LN
IL-10 LN
IL-13 LN
IFN-γ LN
IL-5 Spl
IL-10 Spl
IL-13 Spl
IFN-γ Spl
ng/ml
CON
SEA

Figure 17 (continued)

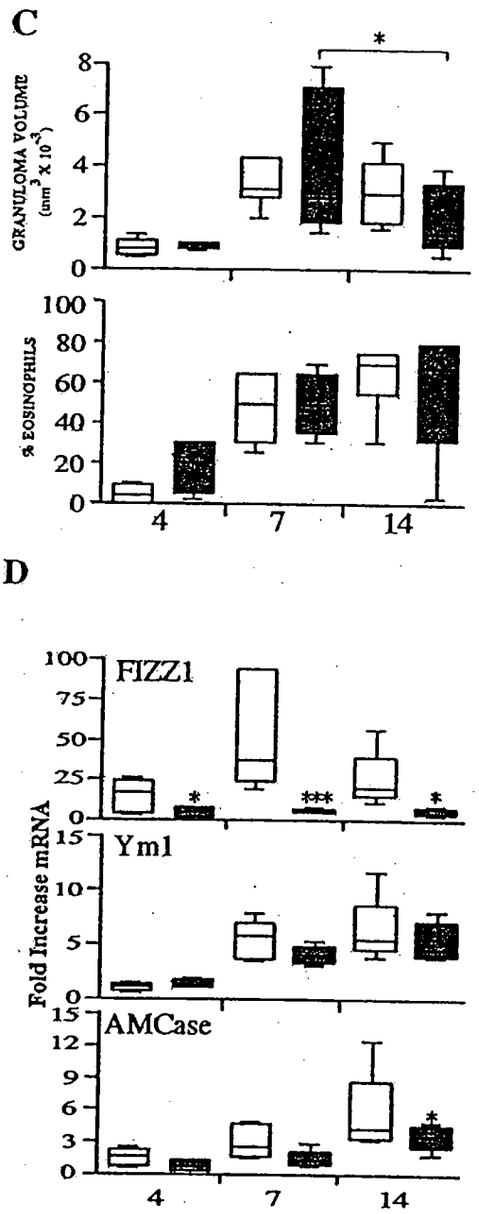


Figure 18

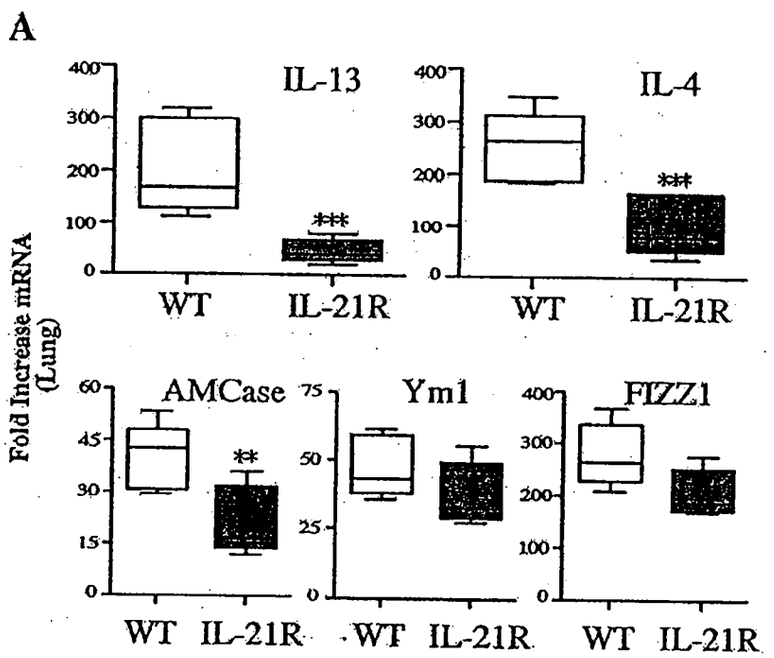


Figure 18 (continued)

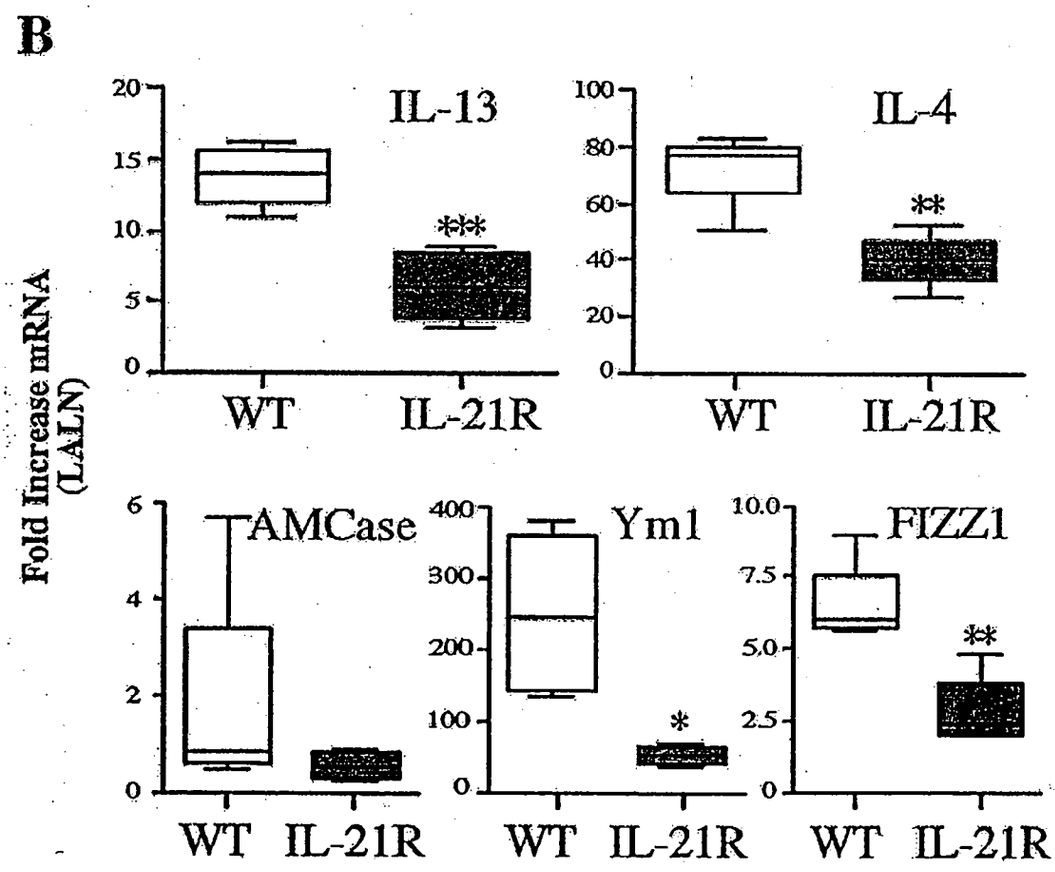


Figure 19

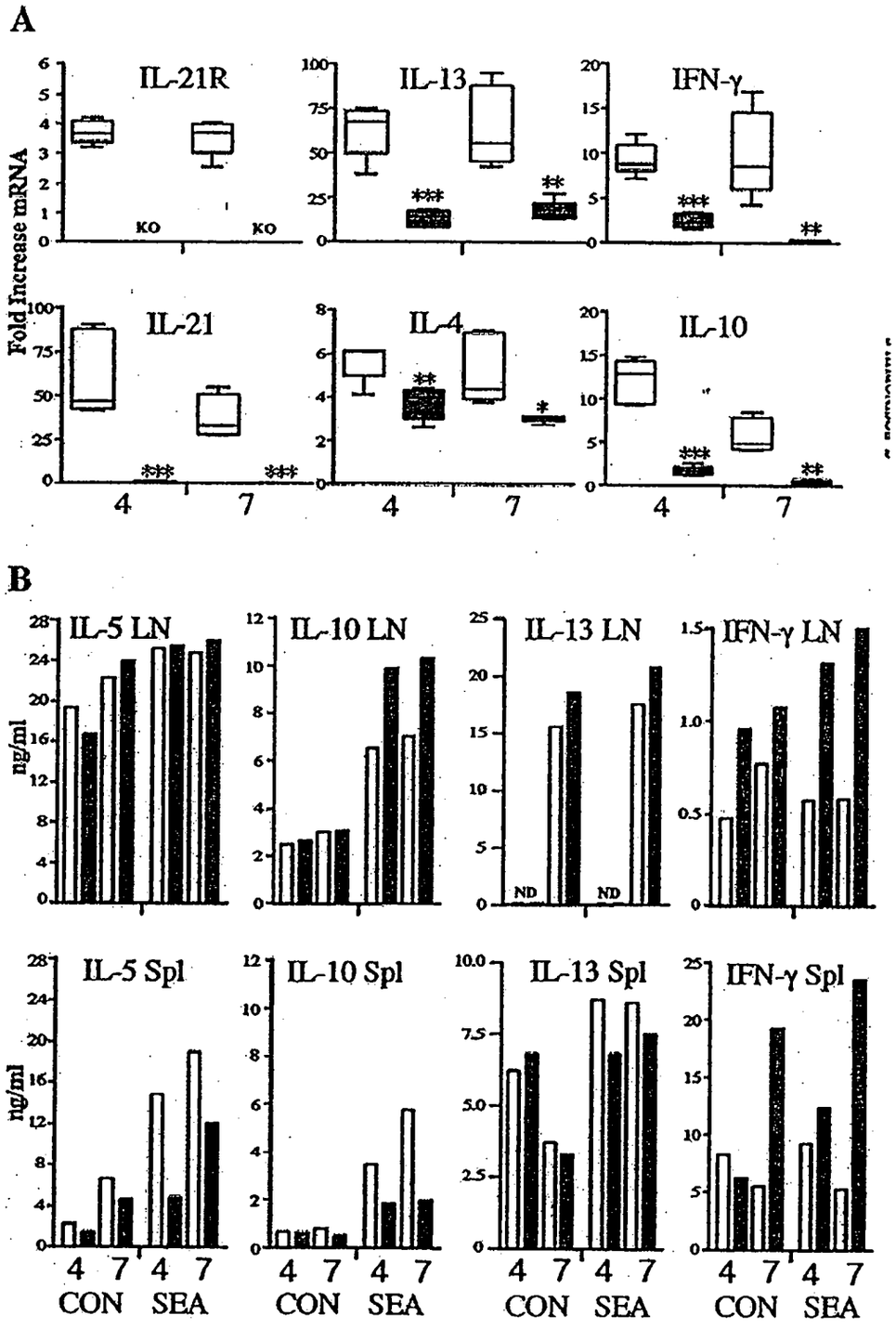
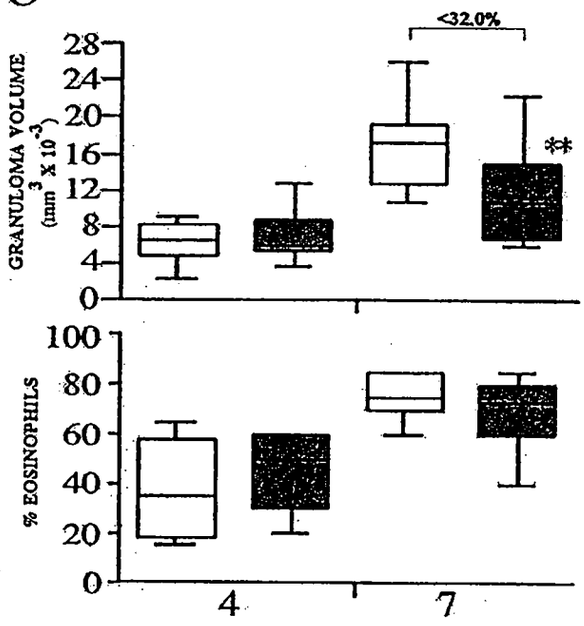

A
IL-21R
IL-13
IFN-γ
IL-21
IL-4
IL-10
Fold Increase mRNA
KO
KO
4
7
B
IL-5 LN
IL-10 LN
IL-13 LN
IFN-γ LN
IL-5 Spl
IL-10 Spl
IL-13 Spl
IFN-γ Spl
ng/ml
ND
CON
SEA

Figure 19 (continued)

C



D

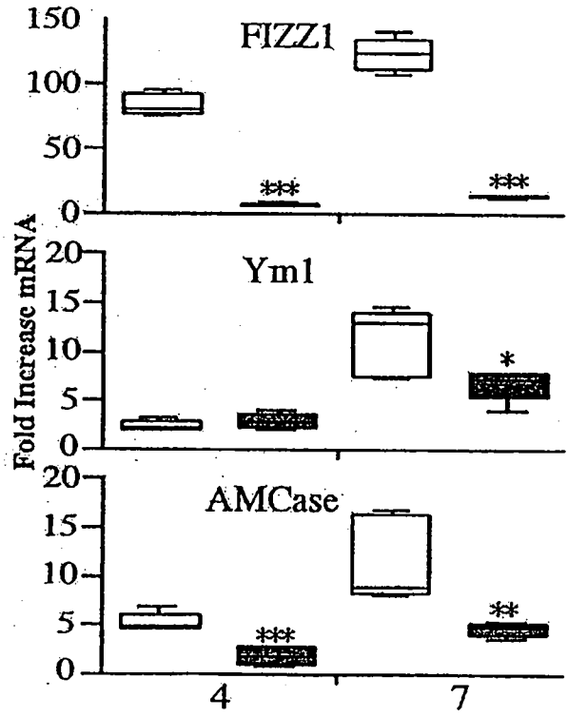


Figure 20

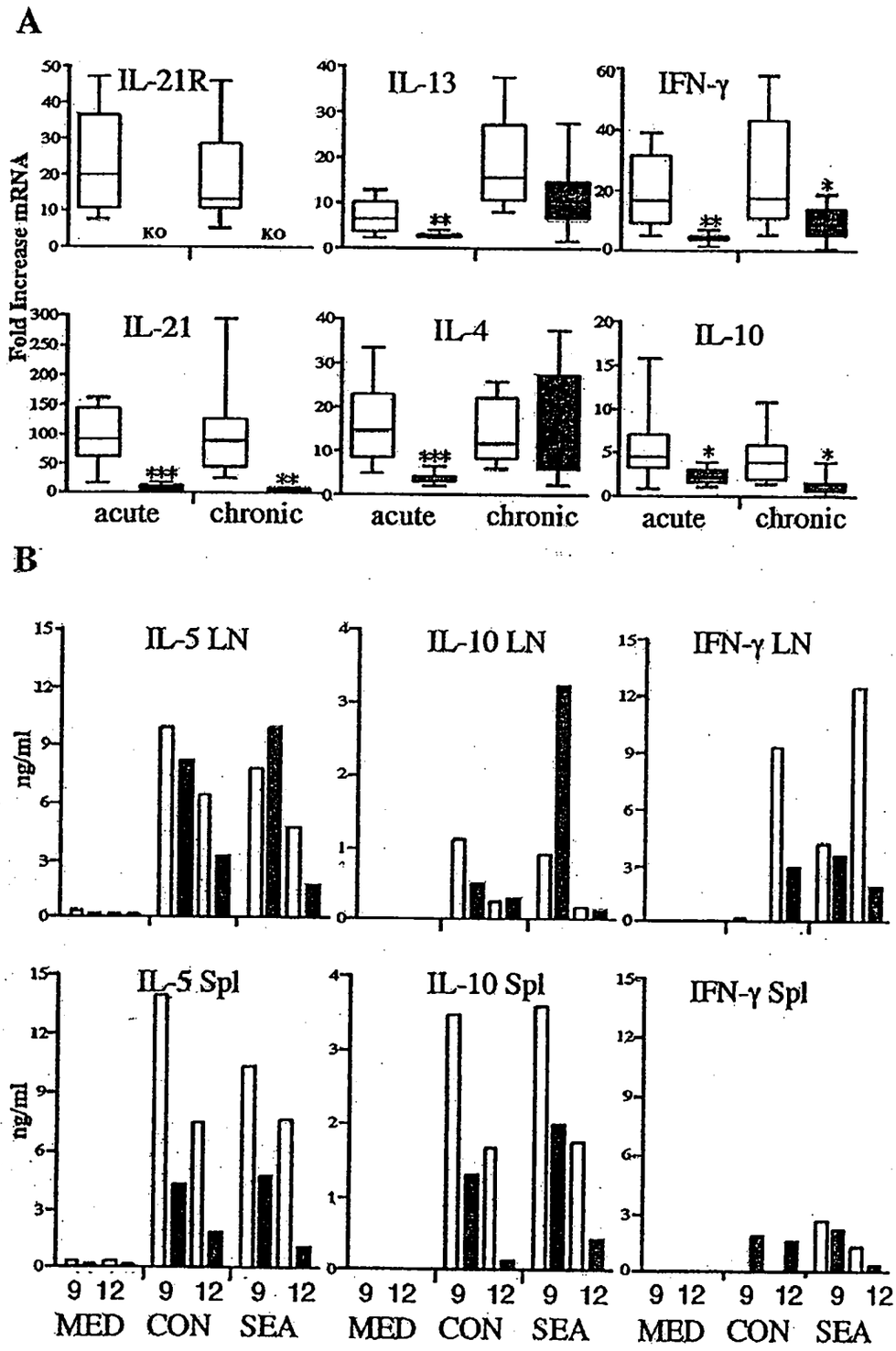

A
IL-21R
IL-13
IFN-γ
IL-21
IL-4
IL-10
Fold Increase mRNA
KO
KO
acute
chronic
acute
chronic
acute
chronic
B
IL-5 LN
IL-10 LN
IFN-γ LN
IL-5 Spl
IL-10 Spl
IFN-γ Spl
ng/ml
ng/ml
9 12 9 12 9 12
MED CON SEA
9 12 9 12 9 12
MED CON SEA
9 12 9 12 9 12
MED CON SEA

Figure 20 (continued)

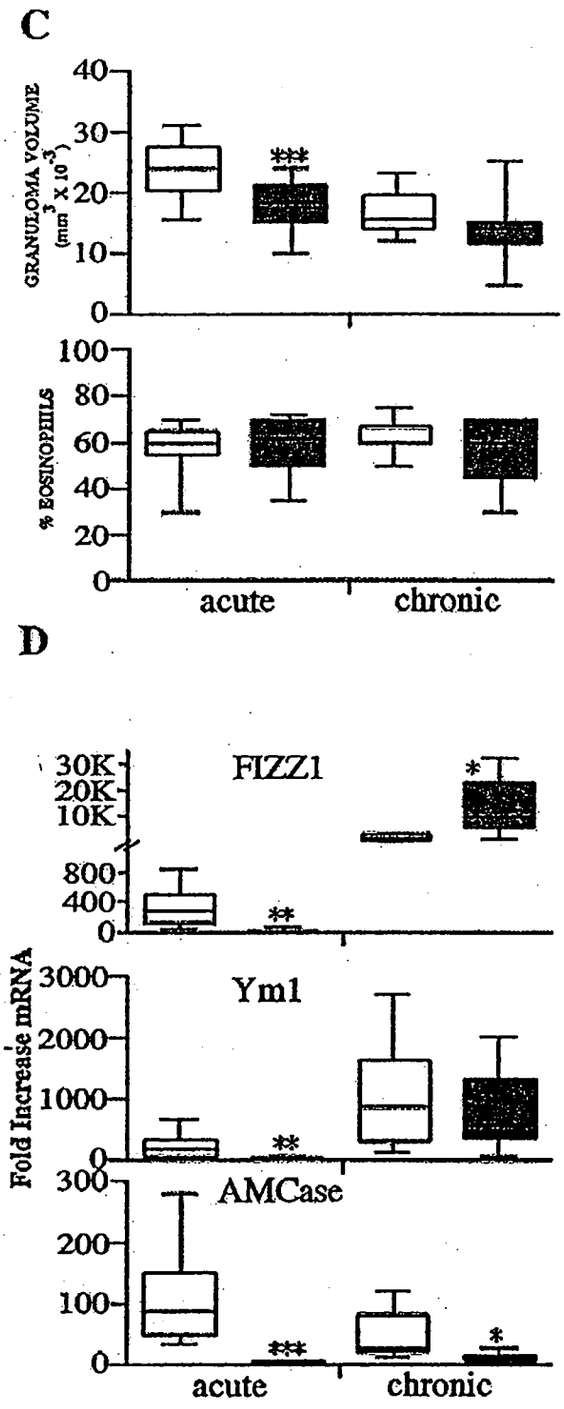


Figure 21

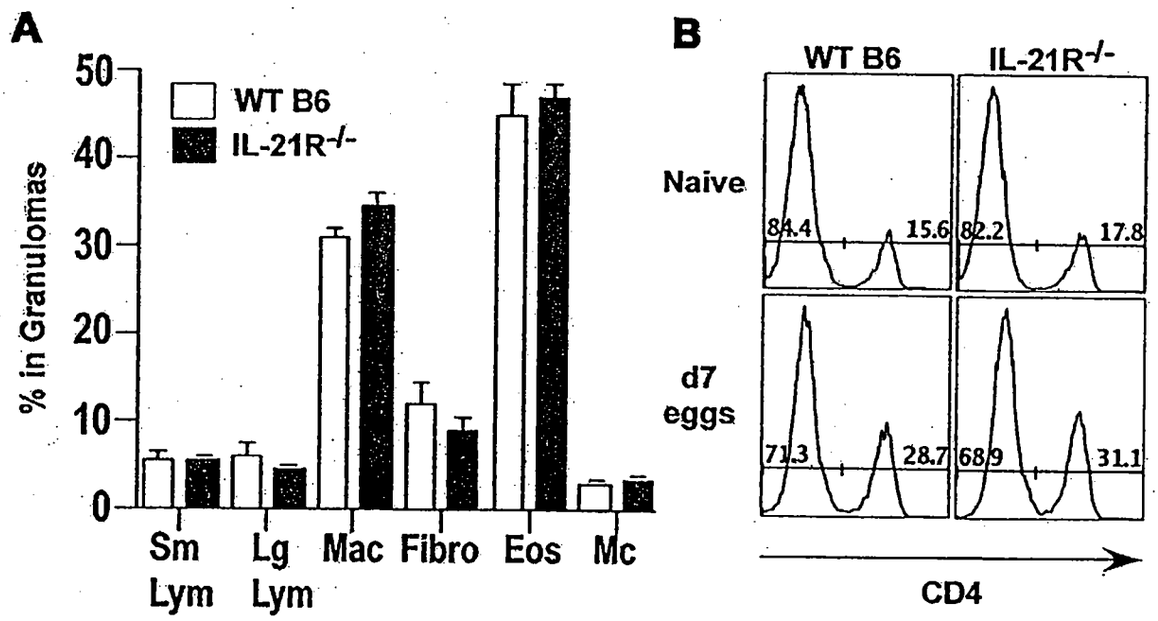

A
50
40
30
20
10
0
% in Granulomas
WT B6
IL-21R-/-
Sm Lym
Lg Lym
Mac
Fibro
Eos
Mc
B
WT B6
IL-21R-/-
Naive
84.4
15.6
82.2
17.8
d7 eggs
71.3
28.7
68.9
31.1
CD4

Figure 22

A

Week postinfection	Group	Worm Pairs	Total Worms	Eggs/worm pair (in thousands)
9	WT (*n*=29)	6.53± 0.63	15.53± 1.55	7.29 ±0.49
	KO (*n*=26)	5.00± 0.70	12.30± 1.74	9.63 ±1.16
12	WT (*n*=19)	3.74± 0.60	10.44± 2.08	14.75 ±1.91
	KO (*n*=19)	4.05± 0.62	9.89± 1.77	14.50 ±1.95

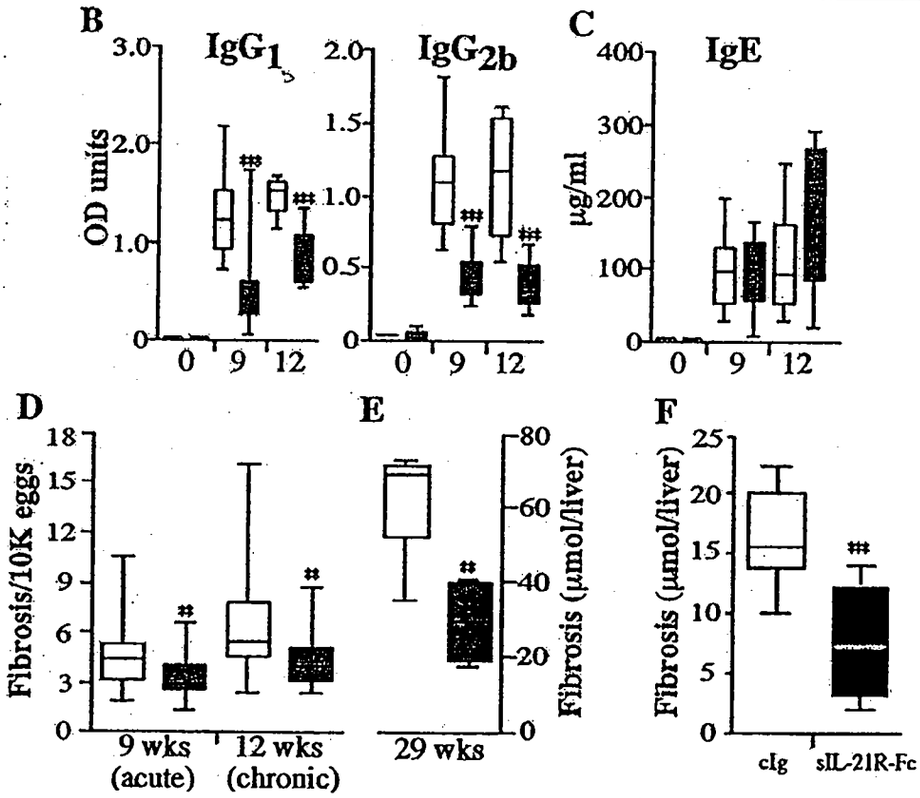


Figure 23

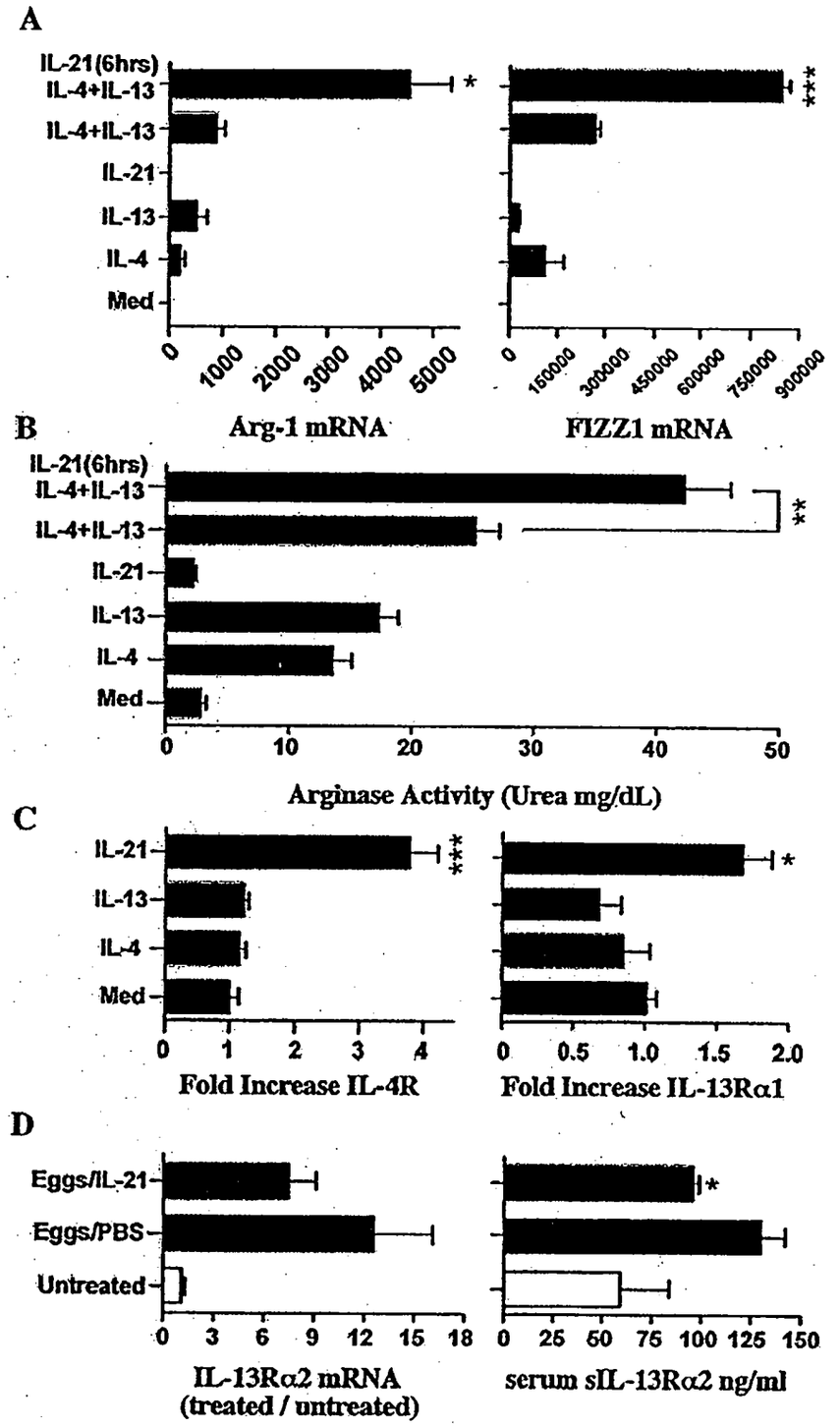
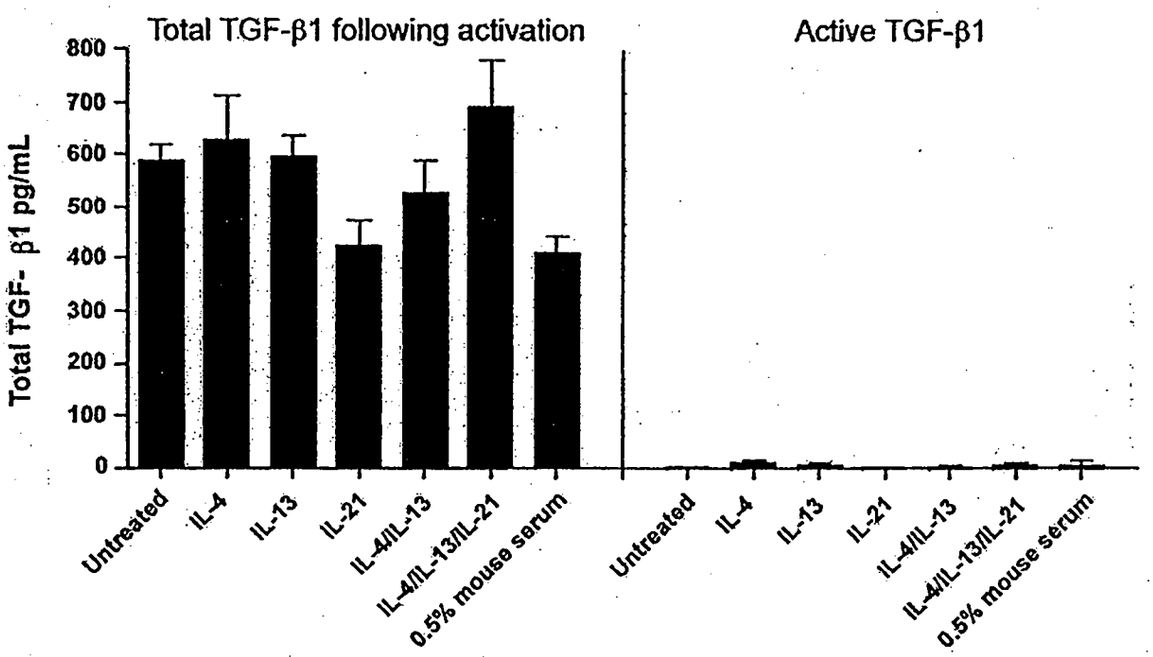

A
IL-21(6hrs)
IL-4+IL-13
IL-4+IL-13
IL-21
IL-13
IL-4
Med
0
1000
2000
3000
4000
5000
Arg-1 mRNA
0
150000
300000
450000
600000
750000
900000
FIZZ1 mRNA
B
IL-21(6hrs)
IL-4+IL-13
IL-4+IL-13
IL-21
IL-13
IL-4
Med
0
10
20
30
40
50
Arginase Activity (Urea mg/dL)
C
IL-21
IL-13
IL-4
Med
0
1
2
3
4
Fold Increase IL-4R
0
0.5
1.0
1.5
2.0
Fold Increase IL-13Rα1
D
Eggs/IL-21
Eggs/PBS
Untreated
0
3
6
9
12
15
18
IL-13Rα2 mRNA
(treated / untreated)
0
25
50
75
100
125
150
serum sIL-13Rα2 ng/ml

Figure 24


Total TGF-β1 following activation
Active TGF-β1
Total TGF- β1 pg/mL
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Untreated
IL-4
IL-13
IL-21
IL-4/IL-13
IL-4/IL-13/IL-21
0.5% mouse serum
Untreated
IL-4
IL-13
IL-21
IL-4/IL-13
IL-4/IL-13/IL-21
0.5% mouse serum

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth
The Government of the United States of America as Represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services
The President and Fellows of Harvard College

<120> METHODS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS

<130> 01997.043800

<150> 60/671,374
<151> 2005-04-14

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 2665
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (236)..(1849)

<400> 1
gtcgactgga ggcccagctg cccgtcatca gagtgacagg tcttatgaca gcctgattgg 60

tgactcgggc tgggtgtgga ttctcacccc aggcctctgc ctgctttctc agaccctcat 120

ctgtcacccc cacgctgaac ccagctgcca cccccagaag cccatcagac tgcccccagc 180

acacggaatg gatttctgag aaagaagccg aaacagaagg cccgtgggag tcagc atg 238
Met
1

ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga ggc 286
Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly Gly
5 10 15

tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg gtc 334
Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val
20 25 30

atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc ctt 382
Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu
35 40 45

acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc 430
Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys
50 55 60 65

agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc 478
Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys
70 75 80

cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac 526
His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn
85 90 95

```
atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc      574
Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu
        100                 105                 110

ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg acc      622
Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr
    115                 120                 125

ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct      670
Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro
130                 135                 140                 145

gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg      718
Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg
                150                 155                 160

aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca      766
Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser
            165                 170                 175

gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac      814
Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp
        180                 185                 190

tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc      862
Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser
    195                 200                 205

tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc      910
Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr
210                 215                 220                 225

cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac ctg ctg ctt ctc      958
Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu Leu
                230                 235                 240

ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc ttc tgg agc ctg aag acc     1006
Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys Thr
            245                 250                 255

cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata tgg gcc gtc ccc agc cct     1054
His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro
        260                 265                 270

gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc tgc agc gga gac ttc aag     1102
Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe Lys
    275                 280                 285

aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc agc ctg gag ctg gga ccc     1150
Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro
290                 295                 300                 305

tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag gtg tac agc tgc cac cca     1198
Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro
                310                 315                 320

cca cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc acg gag cta caa gaa cca     1246
Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu Pro
            325                 330                 335

gca gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc aag ccc agc ttc tgg ccg     1294
Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp Pro
```

```
        340                 345                 350

aca gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac agt gag gag agg gat cgg      1342
Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg
    355                 360                 365

cca tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg act gtg cta gat gca gag      1390
Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu
370                 375                 380                 385

ggg cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag gat gac ggc tac cca gcc      1438
Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala
                390                 395                 400

ctg gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc cca ggc cta gag gac cca      1486
Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro
            405                 410                 415

ctc ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc tgt ggc tgt gtc tca gct      1534
Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala
        420                 425                 430

ggc agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga agc ctc ctg gac aga cta      1582
Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu
    435                 440                 445

aag cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg gct ggg gga ctg ccc tgg      1630
Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp
450                 455                 460                 465

ggt ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag agt gag gcg ggc tca ccc      1678
Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro
                470                 475                 480

ctg gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac agt ggc ttt gtg ggc tct      1726
Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser
            485                 490                 495

gac tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc agc ccc ggg gac gaa      1774
Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu
        500                 505                 510

gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg gtc att cct ccg cca      1822
Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro
    515                 520                 525

ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc taatgaggct gactggatgt            1869
Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
530                 535

ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagagacaa ggtcacctgg gctgtgatgt    1929

gaagacacct gcagcctttg gtctcctgga tgggcctttg agcctgatgt ttacagtgtc    1989

tgtgtgtgtg tgtgcatatg tgtgtgtgtg catatgcatg tgtgtgtgtg tgtgtgtctt    2049

aggtgcgcag tggcatgtcc acgtgtgtgt gtgattgcac gtgcctgtgg gcctgggata    2109

atgcccatgg tactccatgc attcacctgc cctgtgcatg tctggactca cggagctcac    2169

ccatgtgcac aagtgtgcac agtaaacgtg tttgtggtca acagatgaca acagccgtcc    2229

tccctcctag ggtcttgtgt tgcaagttgg tccacagcat ctccggggct ttgtgggatc    2289
```

agggcattgc ctgtgactga ggcggagccc agccctccag cgtctgcctc caggagctgc 2349

aagaagtcca tattgttcct tatcacctgc caacaggaag cgaaagggga tggagtgagc 2409

ccatggtgac ctcgggaatg gcaatttttt gggcggcccc tggacgaagg tctgaatccc 2469

gactctgata ccttctggct gtgctacctg agccaagtcg cctcccctct ctgggctaga 2529

gtttccttat ccagacagtg gggaaggcat gacacacctg ggggaaattg gcgatgtcac 2589

ccgtgtacgg tacgcagccc agagcagacc ctcaataaac gtcagcttcc ttcaaaaaaa 2649

aaaaaaaaaa tctaga 2665

<210> 2
<211> 538
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
20 25 30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
35 40 45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
50 55 60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65 70 75 80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
85 90 95

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

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

```
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

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

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

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

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
                245                 250                 255

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

Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
        275                 280                 285

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

Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
305                 310                 315                 320

Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
                325                 330                 335

Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
            340                 345                 350

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

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

Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
385                 390                 395                 400

Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
                405                 410                 415
```

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

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

Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
    450                 455                 460

Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
465                 470                 475                 480

Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
                485                 490                 495

Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
            500                 505                 510

Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
        515                 520                 525

Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
    530                 535
```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Chemokine receptor conserved motif

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

```
Trp Ser Xaa Trp Ser
1               5
```

<210> 4
<211> 2628
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (407)..(1993)

<400> 4

```
gtcgacgcgg cggtaccagc tgtctgccca cttctcctgt ggtgtgcctc acggtcactt     60

gcttgtctga ccgcaagtct gcccatccct ggggcagcca actggcctca gcccgtgccc    120

caggcgtgcc ctgtctctgt ctggctgccc cagccctact gtcttcctct gtgtaggctc    180

tgcccagatg cccggctggt cctcagcctc aggactatct cagcagtgac tcccctgatt    240

ctggacttgc acctgactga actcctgccc acctcaaacc ttcacctccc accaccacca    300

ctccgagtcc cgctgtgact cccacgccca ggagaccacc caagtgcccc agcctaaaga    360

atggctttct gagaaagacc ctgaaggagt aggtctggga cacagc atg ccc cgg        415
                                                    Met Pro Arg
                                                    1

ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg ctg att ctc cat gga gct tgg agc        463
Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser
    5                  10                  15

tgc ctg gac ctc act tgc tac act gac tac ctc tgg acc atc acc tgt        511
Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys
20                  25                  30                  35

gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg        559
Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp
                40                  45                  50

caa gat gaa tat gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc tgc agc cta        607
Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu
            55                  60                  65

cac agg tct ggc cac aac acc aca cat ata tgg tac acg tgc cat atg        655
His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met
        70                  75                  80

cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg        703
Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr
    85                  90                  95

gac cag tct ggc aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct        751
Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala
100                 105                 110                 115

gag agc atc aaa cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca        799
Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser
                120                 125                 130

gga cgc tat gat atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac        847
Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn
            135                 140                 145

tac gtg ctg agg ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc        895
Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu
        150                 155                 160

aga gac ccc tat gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac        943
Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp
    165                 170                 175

tca aga aac gtc tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc        991
Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser
```

```
180                 185                 190                 195

tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg     1039
Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg
                200                 205                 210

ggg acc tgg agt gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag acc cag gct     1087
Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala
            215                 220                 225

ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac cct cac atg ctg ctg ctc ctg gct     1135
Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu Leu Leu Ala
        230                 235                 240

gtc ttg atc att gtc ctg gtt ttc atg ggt ctg aag atc cac ctg cct     1183
Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile His Leu Pro
    245                 250                 255

tgg agg cta tgg aaa aag ata tgg gca cca gtg ccc acc cct gag agt     1231
Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr Pro Glu Ser
260                 265                 270                 275

ttc ttc cag ccc ctg tac agg gag cac agc ggg aac ttc aag aaa tgg     1279
Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe Lys Lys Trp
                280                 285                 290

gtt aat acc cct ttc acg gcc tcc agc ata gag ttg gtg cca cag agt     1327
Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val Pro Gln Ser
            295                 300                 305

tcc aca aca aca tca gcc tta cat ctg tca ttg tat cca gcc aag gag     1375
Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro Ala Lys Glu
        310                 315                 320

aag aag ttc ccg ggg ctg ccg ggt ctg gaa gag caa ctg gag tgt gat     1423
Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu Glu Cys Asp
    325                 330                 335

gga atg tct gag cct ggt cac tgg tgc ata atc ccc ttg gca gct ggc     1471
Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu Ala Ala Gly
340                 345                 350                 355

caa gcg gtc tca gcc tac agt gag gag aga gac cgg cca tat ggt ctg     1519
Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu
                360                 365                 370

gtg tcc att gac aca gtg act gtg gga gat gca gag ggc ctg tgt gtc     1567
Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly Leu Cys Val
            375                 380                 385

tgg ccc tgt agc tgt gag gat gat ggc tat cca gcc atg aac ctg gat     1615
Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met Asn Leu Asp
        390                 395                 400

gct ggc cga gag tct ggc cct aat tca gag gat ctg ctc ttg gtc aca     1663
Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu Leu Val Thr
    405                 410                 415

gac cct gct ttt ctg tct tgc ggc tgt gtc tca ggt agt ggt ctc agg     1711
Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser Gly Leu Arg
420                 425                 430                 435

ctt gga ggc tcc cca ggc agc cta ctg gac agg ttg agg ctg tca ttt     1759
```

```
Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg Leu Ser Phe
                440                 445                 450

gca aag gaa ggg gac tgg aca gca gac cca acc tgg aga act ggg tcc      1807
Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg Thr Gly Ser
            455                 460                 465

cca gga ggg ggc tct gag agt gaa gca ggt tcc ccc cct ggt ctg gac      1855
Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro Gly Leu Asp
        470                 475                 480

atg gac aca ttt gac agt ggc ttt gca ggt tca gac tgt ggc agc ccc      1903
Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys Gly Ser Pro
    485                 490                 495

gtg gag act gat gaa gga ccc cct cga agc tat ctc cgc cag tgg gtg      1951
Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val
500                 505                 510                 515

gtc agg acc cct cca cct gtg gac agt gga gcc cag agc agc              1993
Val Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser Ser
                520                 525

tagcatataa taaccagcta tagtgagaag aggcctctga gcctggcatt tacagtgtga   2053

acatgtaggg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt   2113

gtgtgtgtgt cttgggttgt gtgttagcac atccatgttg ggatttggtc tgttgctatg   2173

tattgtaatg ctaaattctc tacccaaagt tctaggccta cgagtgaatt ctcatgttta   2233

caaacttgct gtgtaaacct tgttccttaa tttaatacca ttggttaaat aaaattggct   2293

gcaaccaatt actggaggga ttagaggtag ggggcttttg agttacctgt ttggagatgg   2353

agaaggagag aggagagacc aagaggagaa ggaggaagga gaggagagga gaggagagga   2413

gaggagagga gaggagagga gaggagagga gaggagaggc tgccgtgagg ggagagggac   2473

catgagcctg tggccaggag aaacagcaag tatctggggt acactggtga ggaggtggcc   2533

aggccagcag ttagaagagt agattagggg tgacctccag tatttgtcaa agccaattaa   2593

aataacaaaa aaaaaaaaaa agcggccgct ctaga                              2628
```

<210> 5
<211> 529
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

```
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> 6
<211> 224
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Immunoglobulin Fc Fragment

<400> 6

```
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser
1               5                  10                  15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
            20                  25                  30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
        35                  40                  45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
    50                  55                  60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65                  70                  75                  80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
                85                  90                  95

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145                 150                 155                 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
                165                 170                 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
            180                 185                 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
        195                 200                 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
```

210 215 220

<210> 7
<211> 617
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (47)..(532)

<400> 7

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

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

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

atg att aga atg cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag ctg aaa aat      199
Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn
                40                  45                  50

tat gtg aat gac ttg gtc cct gaa ttt ctg cca gct cca gaa gat gta      247
Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val
            55                  60                  65

gag aca aac tgt gag tgg tca gct ttt tcc tgc ttt cag aag gcc caa      295
Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln
        70                  75                  80

cta aag tca gca aat aca gga aac aat gaa agg ata atc aat gta tca      343
Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser
    85                  90                  95

att aaa aag ctg aag agg aaa cca cct tcc aca aat gca ggg aga aga      391
Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg
100                 105                 110                 115

cag aaa cac aga cta aca tgc cct tca tgt gat tct tat gag aaa aaa      439
Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys
                120                 125                 130

cca ccc aaa gaa ttc cta gaa aga ttc aaa tca ctt ctc caa aag atg      487
Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met
            135                 140                 145

att cat cag cat ctg tcc tct aga aca cac gga agt gaa gat tcc          532
Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
        150                 155                 160

tgaggatcta acttgcagtt ggacactatg ttacatactc taatatagta gtgaaagtca    592

tttctttgta ttccaagtgg aggag                                         617
```

<210> 8
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Apis mellifera

<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> 786
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(780)

<400> 10

```
atg aaa ttc tta gtc aac gtt gcc ctt gtt ttt atg gtc gtg tac att      48
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                  10                  15

tct tac atc tat gcc ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc      96
Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

ggc gac tat aaa gac gat gac gat aag ggt tcc gga tgc ccc gac ctc     144
Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Pro Asp Leu
        35                  40                  45

gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg     192
Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met
    50                  55                  60

tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat     240
Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr
65                  70                  75                  80

gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc     288
Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala
                85                  90                  95

cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac     336
His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His
            100                 105                 110

ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc     384
Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag     432
Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat     480
Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn
145                 150                 155                 160

atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag     528
Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys
                165                 170                 175

ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg     576
Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp
            180                 185                 190

gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc     624
Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val
        195                 200                 205

tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag     672
```

```
Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln
    210                 215                 220

gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt      720
Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag      768
Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys
                245                 250                 255

gaa ggc tgg aac taatga                                              786
Glu Gly Trp Asn
            260
```

<210> 11
<211> 260
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                   10                  15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Pro Asp Leu
        35                  40                  45

Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met
    50                  55                  60

Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr
65                  70                  75                  80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala
                85                  90                  95

His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His
            100                 105                 110

Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn
145                 150                 155                 160
```

```
Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys
                165                 170                 175

Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp
            180                 185                 190

Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val
        195                 200                 205

Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln
    210                 215                 220

Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys
                245                 250                 255

Glu Gly Trp Asn
            260
```

<210> 12
<211> 1472
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(1415)

<400> 12

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg        50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                   10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat        98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc       146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac       194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat       242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac       290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90
```

```
att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag      338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc      386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca      434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat      482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg      530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg      578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc      626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg      674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220

gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345
```

```
cca gtc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga      1106
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag      1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac      1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag      1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc      1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca      1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tgagtgaatt cacacgcaga agagcctctc         1445
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                465

cctgtccccg ggtaaatgag tgaattc                                       1472
```

<210> 13
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                   10                  15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80
```

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
85 90 95

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

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
165 170 175

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

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

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

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly Ser Gly Ser Arg
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

```
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Pro Gly Lys
465
```

<210> 14
<211> 1499
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(1493)

<400> 14

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg      50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                   10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat      98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc     146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac     194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60
```

```
gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat      242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac      290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag      338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc      386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca      434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat      482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg      530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg      578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc      626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg      674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220

gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
```

305 310 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
320 325 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
335 340 345

cca gtc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga 1106
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
350 355 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365 370 375 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
400 405 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc 1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
415 420 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca 1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
430 435 440

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc 1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445 450 455 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tca gga atg gca tca atg aca gga ggt 1442
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly
465 470 475

caa caa atg ggt tct gga tct cat cat cat cat cat cat tct gga ggt 1490
Gln Gln Met Gly Ser Gly Ser His His His His His His Ser Gly Gly
480 485 490

tga gaattc 1499

<210> 15
<211> 492
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
20 25 30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
35 40 45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
50 55 60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65 70 75 80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
85 90 95

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

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
165 170 175

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

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

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

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly Ser Gly Ser Arg
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
465 470 475 480

Ser Gly Ser His His His His His His Ser Gly Gly
485 490

<210> 16
<211> 1426
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(1415)

<400> 16

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg        50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                   10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat        98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc       146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac       194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat       242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac       290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag       338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc       386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca       434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat       482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg       530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg       578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc       626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg       674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220

gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc       722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct       770
```

```
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                240                 245                 250

gaa gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc     1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tgagtgaatt c                           1426
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                465
```

<210> 17
<211> 467
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
20 25 30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
35 40 45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
50 55 60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65 70 75 80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
85 90 95

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

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
165 170 175

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

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

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

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly Ser Gly Ser Arg
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly
245 250 255

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 18
<211> 741

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(735)

<400> 18

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac     480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc     528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc     624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag     672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
```

210 215 220

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

cag gtt gct ccg gca taatga 741
Gln Val Ala Pro Ala
245

<210> 19
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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 Lys Thr Glu Thr Ser
225 230 235 240

Gln Val Ala Pro Ala
245

<210> 20
<211> 1413
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)

<400> 20

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
```

```
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac      480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc      528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa      576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc      624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag      672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220

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

ggc tcc ggc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa      768
Gly Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380
```

```
cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc      1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc      1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag      1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc      1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc      1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga                                         1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 21
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

```
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                   10                  15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

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

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125
```

```
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

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

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

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

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Asp Asp Asp Asp Lys
225                 230                 235                 240

Gly Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380
```

```
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 22
<211> 1754
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(720)

<400> 22

```
atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg ctg att ctc cat gga       48
Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
1               5                   10                  15

gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac act gac tac ctc tgg acc       96
Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
            20                  25                  30

atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt      144
Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
        35                  40                  45

ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc      192
Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
    50                  55                  60

tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca cat ata tgg tac acg      240
Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc      288
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
                85                  90                  95

aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt      336
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
```

```
                100                 105                 110

gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg      384
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa      432
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
    130                 135                 140

ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat      480
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc      528
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa      576
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
            180                 185                 190

gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act      624
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
        195                 200                 205

tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag      672
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220

acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac ggc tcc ggc tct aga      720
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly Ser Arg
225                 230                 235                 240

gagccccgcg gaccgacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagg taagtcacta     780

gaccagagct ccactcccgg gagaatggta agtgctataa acatccctgc actagaggat     840

aagccatgta cagatccatt tccatctctc ctcatcagca cctaacctcg agggtggacc     900

atccgtcttc atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat     960

agtcacatgt gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt    1020

tgtgaacaac gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag    1080

tactctccgg gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaaggc    1140

tttcgcatgc gccgtcaaca acaaagacct cccagcgccc atcgagagaa ccatctcaaa    1200

acccaaaggt gagagctgca gcctgactgc atgggggctg ggatgggcat aaggataaag    1260

gtctgtgtgg acagccttct gcttcagcca tgacctttgt gtatgtttct accctcacag    1320

ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag atgactaaga    1380

aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt    1440

ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg    1500

atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa    1560

atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct    1620
```

tctcccggac tccgggtaaa tgagctcagc acccacaaaa ctctcaggtc caaagagaca 1680

cccacactca tctccatgct tcccttgtat aaataaagca cccagcaatg cctgggacca 1740

tgtaatagga attc 1754

<210> 23
<211> 240
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly Ser Arg
225                 230                 235                 240
```

<210> 24
<211> 795
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (19)..(783)

<400> 24

```
ctgcaggtcg acaccacc atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg       51
                       Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu
                       1               5                   10

ctg att ctc cat gga gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac act       99
Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr
            15                  20                  25

gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac      147
Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn
        30                  35                  40

ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag      195
Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln
    45                  50                  55

gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca      243
Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr
60                  65                  70                  75

cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat      291
His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp
                80                  85                  90

gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa      339
Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln
            95                  100                 105

gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc      387
Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro
        110                 115                 120

ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac      435
Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp
    125                 130                 135

tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa      483
Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln
140                 145                 150                 155
```

```
tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg      531
Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro
                160                 165                 170

gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct      579
Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro
            175                 180                 185

gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg      627
Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala
        190                 195                 200

cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac      675
Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp
    205                 210                 215

ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac      723
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp
220                 225                 230                 235

ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc ggc gac tat aaa gac      771
Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp
                240                 245                 250

gat gac gat aag tagtgagaat tc                                       795
Asp Asp Asp Lys
            255
```

<210> 25
<211> 255
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

```
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

His His His His Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
                245                 250                 255
```

<210> 26
<211> 792
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(786)

<400> 26

```
atg aaa ttc tta gtc aac gtt gcc ctt gtt ttt atg gtc gtg tac att      48
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                   10                  15

tct tac atc tat gcc ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc      96
Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

ggc gac tat aaa gac gat gac gat aag ggt tcc gga tgc ctg gac ctc     144
Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Leu Asp Leu
        35                  40                  45

act tgc tac act gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca     192
Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr
    50                  55                  60
```

```
cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat      240
Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr
65                  70                  75                  80

gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc      288
Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly
                85                  90                  95

cac aac acc aca cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa      336
His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln
            100                 105                 110

ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc      384
Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa      432
Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat      480
Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp
145                 150                 155                 160

atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg      528
Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg
                165                 170                 175

ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat      576
Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr
            180                 185                 190

gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc      624
Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val
        195                 200                 205

tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag      672
Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln
    210                 215                 220

gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt      720
Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag      768
Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu
                245                 250                 255

gca ggc tgg gac tag tga gaattc                                      792
Ala Gly Trp Asp
            260
```

<210> 27
<211> 260
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27

```
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                  10                  15
```

Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
20 25 30

Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Leu Asp Leu
35 40 45

Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr
50 55 60

Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly
85 90 95

His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln
100 105 110

Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly
115 120 125

Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp
145 150 155 160

Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg
165 170 175

Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr
180 185 190

Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val
195 200 205

Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln
210 215 220

Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser
225 230 235 240

Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu
245 250 255

Ala Gly Trp Asp

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR Primer

<400> 28
gccagatcgc ctcctgatta 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR Primer

<400> 29
catgctcaca gtgccccttt 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR Primer

<400> 30
ctcccccctt gaacgtgact 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR Primer

<400> 31
ttgcccctca gcacgtagtt 20

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR Primer

<400> 32
agagccagat tatctctttc tacctcag 28

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR Primer

<400> 33
cctttttcgc cttgctgttg 20

TÍTULO

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO Y LA PREVENCIÓN DE FIBROSIS

Solicitudes relacionadas

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. Nº 60/671.374, presentada el 14 de abril de 2005, que se incorpora en este documento por referencia, en su totalidad.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Campo del invento

[002] El presente invento se relaciona con métodos para el tratamiento y la prevención de la fibrosis y de afecciones asociadas con la fibrosis.

Antecedentes relacionados

[003] La lesión en cualquier órgano típicamente conduce a una respuesta fisiológica que comprende hemostasia por plaquetas, seguida de un influjo de células inflamatorias y fibroblastos activados. Las citocinas producidas por estos tipos de células inducen la

formación de una nueva matriz extracelular y nuevos vasos sanguíneos que, colectivamente, forman tejido de granulación. La formación de tejido fibroso forma parte del proceso normal de cicatrización que sigue a la lesión. No obstante, la fibrosis es una afección caracterizada por una acumulación anormal de una matriz de colágeno después de una lesión o inflamación, que altera la estructura y función de diversos tejidos. La fibrosis progresiva en el riñón, hígado, pulmón, corazón, hueso, médula ósea y piel es una causa importante de muerte o un factor que contribuye a la muerte.

[004] Muchas de las enfermedades asociadas con la proliferación de tejido fibroso son crónicas y frecuentemente debilitantes, por ejemplo, enfermedades de la piel, como esclerodermia. Algunas, entre ellas la fibrosis pulmonar, pueden ser mortales debido en parte al hecho de que los tratamientos actuales tienen efectos secundarios considerables y generalmente no son eficaces para reducir la velocidad de avance o detener la progresión de la fibrosis. Por consiguiente, existe una necesidad constante de nuevos agentes antifibróticos.

[005] El receptor de IL-21 (IL-21R) es un miembro de la familia de receptores de citocina de clase I descubierto recientemente (Parrish-Novak et al. (2000) *Nature* 408:57-63; Ozaki et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11439-44). El receptor de IL-21 muestra una homología secuencial y estructural considerable con el receptor alfa de la cadena IL-4 y es adyacente a IL-4Rα en los genomas humano y murino, mientras que su ligando, IL-21, comparte una homología considerable con las citocinas IL-2, IL-4 e IL-15 (Sivakumar et al. (2004) *Immunology* 112:177-82; Habib et al. (2003) *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:1033-45). Por ende, IL-21 e IL-21R son miembros recientemente descritos de la red de citocinas dependiente de la cadena gamma (γc) debido a su homología con las citocinas y los receptores, que requieren γc para la señalización funcional (Vosshenrich y Di Santo (2001) *Curr. Biol.* 11:R175-77). Como todos los miembros de la red γc exhiben papeles importantes y exclusivos en la inmunidad del huésped, hay un interés creciente en el análisis de las novedosas funciones del IL-21R durante las respuestas inmunitarias desencadenadas por antígenos *in vivo*.

[006] Los estudios iniciales que examinaron la función de IL-21 demostraron que la expansión de las células destructoras naturales (NK) es antagonizada, mientras que la

inmunidad de células T específicas para el antígeno, es fomentada por IL-21, incluso la inmunidad antitumoral (Ma et al. (2003) *J. Immunol.* 171:608-15; Kishida et al. (2003) *Mol. Ther.* 8:552-58; Di Carlo et al. (2004) *J. Immunol.* 172:1540-47), lo cual sugiere que IL-21 sirve de puente entre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Collins et al. (2003) *Immunol. Res.* 28:131-40). IL-21 también regula la función *in vivo* de las células B y T $CD8^+$ (Ozaki et al. (2002) *Science* 298:1630-34; Suto et al. (2002) *Blood* 100:4565-73; Mehta et al. (2003) *J. Immunol.* 170:4111-18; Pene et al. (2004) *J. Immunol.* 172:5154-57; Jin et al. (2004) *J. Immunol.*173:657-65; Zeng et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201:139-48). Otros estudios sugieren que IL-21 es una citocina T_H2 que puede inhibir la diferenciación de células T_H no expuestas previamente, en células T_H1 secretoras de IFN-α (Wurster et al. (2002) *J. Exp. Med.* 196:969-77). En efecto, el tratamiento exógeno con IL-21 inhibió en forma potente la producción de IFN-α sin afectar otras citocinas asociadas con T_H1/T_H2, sugiriendo que la represión de IFN-α por parte de IL-21 es de gran especificidad. Por lo tanto, en virtud de su capacidad para suprimir el desarrollo de células T_H1, se presentó la hipótesis de que IL-21 tal vez fomentaría las respuestas T_H2 (Wurster et al., *supra*). No obstante, la participación del pasaje de señalización IL-21R en el desarrollo de la respuesta T_H2 no se investigó previamente en ningún trastorno dependiente de T_H2.

[007] En la esquistosomiasis, las citocinas T_H2 desempeñan un papel indispensable en la patogénesis de la enfermedad (Wynn (2004) *Nat. Rev. Immunol.* 4:583-594; Pearce y MacDonald (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 2:499-511). En efecto, los ratones deficientes en IL-4/IL-13, IL-4Rα y Stat6 muestran, en todos los casos, formación de granuloma significativamente afectada y fibrosis hepática después de la infección con *S. mansoni* (Chiaramonte et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104:777-85; Kaplan et al. (1998) *J. Immunol.* 160:1850-56; Jankovic et al. (1999) *J. Immunol.* 163:337-42; Fallon et al. (2000) *J. Immunol.* 164:2585-91). Dada la clasificación reciente de IL-21 como una citocina T_H2 (Wurster et al. (2002), *supra*; Mehta et al. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:2016-21), las similitudes notables entre los receptores de IL-4 e IL-21 (Sivakumar et al., *supra*; Habib et al., *supra*) y el papel crítico desempeñado por el pasaje de la señalización de IL-4Rα/Stat6 relacionado, en esta enfermedad así como en otros

trastornos inflamatorios inducidos por la citocina T_H2 (Wynn (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:425-56), un interrogante importante que surge de estos estudios fue si la señalización de IL-21R desempeñaría un papel significativo en el inicio y/o el mantenimiento de la inmunidad a T_H2.

RESUMEN DEL INVENTO

[008] El presente invento proporciona métodos para tratar, aliviar o prevenir la fibrosis o un trastorno asociado con la fibrosis, así como métodos para seleccionar compuestos y composiciones útiles en estos métodos. El invento proporciona también métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso (por ejemplo, el curso de tratamiento) de la fibrosis y/o afecciones asociadas con la fibrosis. Estos métodos se relacionan con medir y/o modular el nivel de IL-21 y/o IL-21R [es decir, el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, el nivel de productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R), y el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R]. El invento proporciona además antagonistas de IL-21 o IL-21R para el tratamiento de la fibrosis y afecciones asociadas con la fibrosis.

[009] En una realización, el invento proporciona un método para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que reduce el nivel de IL-21 y/o IL-21R en el sujeto. En otra realización, el agente es un antagonista de IL-21/IL-21R seleccionado a partir del grupo que comprende un anticuerpo anti-IL-21R, un anticuerpo anti-IL-21, un fragmento conjugante de antígeno de un anticuerpo anti-IL-21R, un fragmento conjugante de antígeno de un anticuerpo anti-IL-21, y un fragmento soluble de un IL-21R. En otra realización más, el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y el fragmento soluble del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica, en al menos en un 90%, a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que comprende los aminoácidos 1-538 de la SEC ID Nº: 2, los aminoácidos 20-538 de la SEC ID Nº: 2, los aminoácidos 1-235 de la SEC ID Nº: 2, los aminoácidos 20-235 de la SEC ID Nº: 2, los aminoácidos 1-236 de la SEC ID Nº: 2, los aminoácidos 20-236 de la

SEC ID Nº: 2, los aminoácidos 1-529 de la SEC ID Nº: 5, los aminoácidos 20-529 de la SEC ID Nº: 5, los aminoácidos 1-236 de la SEC ID Nº: 5, y los aminoácidos 20-236 de la SEC ID Nº: 5. En otra realización, el fragmento soluble del IL-21R se conjuga con un polipéptido de IL-21.

[010] En otra realización, el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y el fragmento soluble del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 17, SEC ID Nº: 19, SEC ID Nº: 21, SEC ID Nº: 23, SEC ID Nº: 25, o la SEC ID Nº: 27. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del fragmento soluble del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID Nº: 11 o en SEC ID Nº: 13. En otra realización, el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y el fragmento soluble del IL-21R es codificado por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 12, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 18, SEC ID Nº: 20, SEC ID Nº: 22, SEC ID Nº: 24 o la SEC ID Nº: 26. En otra realización, el fragmento soluble del IL-21R es codificado por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC ID Nº: 12 o la SEC ID Nº: 16.

[011] En otra realización, el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y el fragmento soluble del IL-21R comprende un dominio extracelular de IL-21R y un fragmento Fc de inmunoglobulina. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica, en al menos un 90%, a los aminoácidos 1-235 de la SEC ID Nº: 2 o a los aminoácidos 20-235 de la SEC ID Nº: 2. En otra realización, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene una función alterada. En otra realización más, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 244-467 de la SEC ID Nº: 17.

[012] En otra realización, la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis afecta hígado, epidermis, endodermis, músculo, tendón, cartílago, corazón, páncreas, pulmón, útero,

sistema nervioso, testículos, ovario, glándula suprarrenal, arteria, vena, colon, intestino delgado, tracto biliar o estómago. En una realización más, la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis es fibrosis pulmonar intersticial. En otra realización, la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis es el resultado de una infección con esquistosoma. En otra realización, la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis es el resultado de cicatrización de una herida. En una realización más, la cicatrización de la herida es el resultado de una incisión quirúrgica.

[013] En otra realización, el invento consiste además, en administrar al sujeto al menos un agente terapéutico adicional. En otra realización, el otro agente terapéutico adicional se selecciona a partir del grupo que comprende inhibidores de citocina, inhibidores de factor del crecimiento, inmunodepresores, agentes antinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos, agentes citotóxicos y agentes citostáticos. En otra realización más, el agente terapéutico adicional se selecciona a partir del grupo que comprende antagonistas de FNT, agentes anti-FNT, antagonistas de IL-12, antagonistas de IL-15, antagonistas de IL-17, antagonistas de IL-18, antagonistas de IL-22, agentes de depleción de células T, agentes de depleción de células B, ciclosporina, FK506, CCI-779, etanercept, infliximab, rituximab, adalimumab, prednisolona, azatioprina, oro, sulfasalacina, hidroxicloroquina, minociclina, anakinra, abatacept, metotrexato, leflunomida, rapamicina, análogos de rapamicina, inhibidores de Cox-2, inhibidores de PLA2, FAINEs, inhibidores de p38, antagonistas de B7.1, B7.2, ICOSL, ICOS y CD28, y agonistas de CTLA4.

[014] En otra realización, el invento proporciona un método para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa; (b) poner en contacto la célula o muestra que interesa con un compuesto, y (c) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa después del contacto con el compuesto, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, que ha entrado en contacto, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, que no ha entrado en contacto, identifica al compuesto como un compuesto útil para el

tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto.

[015] En otra realización, el invento proporciona un método para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa; (b) poner en contacto la célula o muestra que interesa con un compuesto; (c) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa después del contacto con el compuesto, y (d) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa que se ha puesto en contacto, con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa que se ha puesto en contacto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, identifica al compuesto como un compuesto útil para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto.

[016] En otra realización, el invento proporciona un método para monitorear el progreso de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto en un primer momento; y (b) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa obtenida del sujeto en un segundo momento, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto al segundo momento, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto en el primer momento, ofrece una indicación de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis ha disminuido en severidad.

[017] En otra realización, el invento proporciona un método para pronosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida de un sujeto en un primer momento, y (b) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa obtenida en un segundo momento, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto al segundo momento, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa

obtenida del sujeto en el primer momento, indica una probabilidad menor de que el sujeto vaya a desarrollar fibrosis o la afección asociada con la fibrosis o una probabilidad menor de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis empeore en el sujeto.

[018] En otra realización, el invento proporciona un método para pronosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa obtenida del sujeto; y (b) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, indica una probabilidad menor de que el sujeto desarrolle fibrosis o la afección asociada con la fibrosis o una probabilidad menor de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis empeore en el sujeto.

[019] En otra realización, el invento proporciona un método para diagnosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto, y (b) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel mayor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, indica la presencia de fibrosis o de afección asociada con la fibrosis en el sujeto.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS GRÁFICOS

[020] La FIG. 1 representa la secuencia de ADNc completa para IL-21R/MU-1 murina. La secuencia nucleótida corresponde a los nucleótidos 1-2628 de la SEC. ID N°: 4.

[021] Las FIGS. 2A y 2B representan las secuencias de aminoácidos de IL-21R/MU-1 murina y humana. La FIG. 2A representa la secuencia de aminoácidos de IL-21R/MU-1 murina (correspondiente a los aminoácidos 1-529 de la SEC. ID N°: 5). Hay una secuencia líder (prevista por SPScan, con un puntaje de 10,1) a la altura de los aminoácidos 1-19 (negrita). Un dominio transmembranoso previsto (subrayado) se

observa a la altura de los aminoácidos 237-253 de la SEC. ID Nº: 5. Los motivos de señalización previstos incluyen el de "Secuencia 1" a los aminoácidos 265-274 y el de "Secuencia 2" a los aminoácidos 311-324 (negrita y subrayado). Seis tirosinas están situadas en las posiciones de los aminoácidos 281, 319, 361, 368, 397 y 510, de la SEC. ID Nº: 5. El motivo WSXWS (SEC. ID Nº: 3) está situado a la altura de los residuos aminoácidos 214-218 (en letra grande, en negrita). Los sitios potenciales de acoplamiento Stat incluyen los aminoácidos 393-398 y los aminoácidos 510-513 de la SEC. ID Nº: 5. La FIG. 2B presenta la secuencia de aminoácidos de IL-21R/MU-1 humana (correspondiente a la SEC. ID Nº: 2). Se indican la localización de la secuencia de señal prevista (sobre los aminoácidos 1-19 de DE ID SEC. Nº: 2); el motivo WSXWS (sobre los aminoácidos 213-217 de la SEC. ID Nº: 2), y el dominio transmembranoso (sobre los aminoácidos 236-252, 236-253, ó 236-254) de la SEC. ID Nº: 2 (subrayada). Los sitios potenciales de conjugación JAK, motivos de señalización de Secuencias 1 y 2 y sitios de acoplamiento Stat están indicados por las flechas rotuladas.

[022] La FIG. 3 representa la comparación GAP de las secuencias IL-21R/MU-1 humana y murina de ADNc (correspondiente a los ácidos nucleicos 1-2665 de la SEC. ID Nº: 1 y a los ácidos nucleicos 1-2628 de la SEC. ID Nº: 4, respectivamente). huMU-1= IL-21R/MU-1 humana, murMU-1= IL-21R/MU-1 murina. Parámetros Gap: peso de Gap=50; promedio de apareamiento=10,000; peso de la longitud =3; desapareamiento promedio =0,000; identidad porcentual =66,116.

[023] La FIG. 4 representa una comparación GAP de proteína IL-21R/MU-1 humana (correspondiente a los aminoácidos de la SEC. ID Nº: 2) y proteína IL-21R/MU-1 murina (correspondiente a los aminoácidos de la SEC. ID Nº: 5). El alineamiento fue generado por la matriz BLOSUM62 de sustitución de aminoácidos (Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915-19). Parámetros de Gap=peso de Gap: 8; promedio de apareamiento=2,912; peso de la longitud=2; desapareamiento promedio=-2,003; Identidad porcentual=65,267.

[024] La FIG. 5 representa el alineamiento de una secuencia múltiple de los aminoácidos de IL-21R/MU-1 humana (correspondiente a la SEC. ID Nº: 2), IL-21R/MU-1 murina (correspondiente a la SEC. ID Nº: 5) y cadena beta de IL-2 humana (GENBANK® Nº de

acceso M26062). Se subrayan los dominios líder y transmembranoso. Los motivos conservados de módulo receptor de citocinas se indican en negritas. Las regiones potenciales de señalización se indican subrayándolas y en negritas.

[025] La FIG. 6 representa la señalización a través de IL-21R/MU-1. Fosforilatos de IL-21R/MU-1 Stat 5 en células de expresión de quimera de E7 EPO IL-21R/MU-1 clonal estimuladas con EPO. El tratamiento de las células control o BAF-3 quiméricas usando IL-3 dio lugar a la fosforilación de Stat 3, pero no de Stat 1 ó 5.

[026] Las FIGS. 7A-7B representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de IL-21R humano maduro, fundido en la terminal amino a una secuencia líder de abeja y marcadores His_6 y Flag. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de fusión representada en las FIGS. 7A-7B se presentan en la SEC. ID Nº: 10 y la SEC. ID Nº: 11, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del fragmento de IL-21R humano maduro y el fragmento líder de abeja / marcadores His, de la proteína de fusión, corresponden a los aminoácidos 20-235 de la SEC. ID Nº: 2 y a los aminoácidos 1-44 de la SEC. ID Nº: 11, respectivamente.

[027] Las FIGS. 8A-8C representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humano, fundido en la terminal C mediante un vinculador a la secuencia de inmunoglobulina humana G1 (IgG1) Fc. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de fusión representada en las FIGS. 8A-8C se presentan en la SEC. ID Nº: 12 y la SEC. ID Nº: 13, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humano, el vinculador y la secuencia de inmunoglobulina humana G1 (IgG1) Fc corresponden a los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 236-243 de la SEC. ID Nº: 13 y los aminoácidos 244-467 de la SEC. ID Nº: 13, respectivamente.

[028] Las FIGS. 9A-9C representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humano, fundido en la terminal C mediante un vinculador a la secuencia G1 (IgG1) Fc de inmunoglobulina humana y al marcador de la secuencia His_6. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de fusión representada en las FIGS. 9A-9C se presentan en la SEC. ID Nº: 14 y la SEC. ID Nº: 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del dominio

extracelular de IL-21R humano, el vinculador, la secuencia G1 (IgG1) Fc de inmunoglobulina humana y el marcador de secuencia His_6 corresponden a los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 236-243 de la SEC. ID Nº: 15, los aminoácidos 244-467 de la SEC. ID Nº: 15 y los aminoácidos 468-492 de la SEC. ID Nº: 15, respectivamente.

[029] Las FIGS. 10A-10C representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular IL-21R humano fundido en la terminal C mediante un vinculador a la secuencia mutada G1 (IgG1) Fc de inmunoglobulina humana. La secuencia Fc humana ha sido mutada a los residuos 254 y 257 a partir de la secuencia silvestre, para reducir la conjugación al receptor FC. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de fusión representada en las FIGS. 10A-10C se presentan en las SEC. ID Nº: 16 y SEC. ID Nº: 17, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular IL-21R humano, el vinculador y la secuencia mutada G1 (IgG1) Fc de inmunoglobulina humana corresponden a los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 236-243 de la SEC. ID Nº 17 y los aminoácidos 244-467 de la SEC. ID Nº: 17, respectivamente.

[030] Las FIGS. 11A-11B representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular IL-21R humano, fundido en la terminal C a un marcador de secuencia de rhodopsina. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de fusión se presentan en las SEC. ID Nº: 18 y SEC. ID Nº: 19, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular IL-21R humano corresponde a los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2.

[031] Las FIGS. 12A-12C representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular IL-21R humano, fundido en la terminal C a un sitio de escisión EK y región IgG1 Fc mutada. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la proteína de fusión representada en las FIGS. 12A-12C se presentan en las SEC. ID Nº: 20 y SEC. ID Nº: 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular IL-21R humano y el sitio de escisión EK / región IgG1 Fc mutada, corresponden a los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2 y a los aminoácidos 236-470 de la SEC. ID Nº: 21, respectivamente.

[032] Las FIGS. 13A-13B representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos del dominio extracelular IL-21R murino fundidas en la terminal C a inmunoglobulina G2a (IgG2a) de ratón. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se presentan en las SEC. ID Nº: 22 y SEC. ID Nº: 23, respectivamente.

[033] Las FIGS. 14A-14B representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular IL-21R murino, fundidas en la terminal C a las marcas de secuencia Flag y His_6. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se presentan en las SEC. ID Nº: 24 y SEC. ID Nº: 25, respectivamente.

[034] FIGS. 15A-15B representan un alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio extracelular IL-21R murino (líder de abeja) fundido en la terminal N a las marcas de secuencia Flag y His_6. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se presentan en las SEC. ID Nº: 26 y SEC. ID Nº: 27, respectivamente.

[035] La FIG. 16 muestra los cuadros de expresión de IL-21 e IL-21R durante las respuestas inmunitarias altamente polarizadas, de tipos 1 y 2. Se sensibilizaron grupos de cinco ratones IL-10/IL-4 KO (TH1, Δ) e IL-10/IL-12 KO (TH2, •) por vía intraperitoneal, con huevos de *S. mansoni* y se desafiaron por vía intravenosa 14 días más tarde. Se prepararon especimenes de ARN pulmonar individualmente, para efectuar análisis de reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RCP-TI) en tiempo real, de IL-13 e IFN-γ (FIG. 16A) y de IL-21R e IL-21 (FIG. 16B). Las medias ± DEM en la expresión del gen se expresaron como múltiplos de aumento sobre los controles WT no desafiados después de normalización a HPRT. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos a un intervalo dado, * $p<0,05$.

[036] La FIG. 17 muestra que la producción de citocina de tipo 2 se reduce en los pulmones de ratones IL-21R$^{-/-}$ desafiados con huevos de esquistosoma. Grupos de ratones WT no expuestos (barras abiertas) y ratones IL-21R$^{-/-}$ barras sólidas) fueron desafiados i.v. con huevos vivos de *S. mansoni* y se sacrificaron en los días 4, 7 y 14 después del desafío. (A) Se preparó ARN a partir de tejidos pulmonares y se analizó individualmente (N=5 por grupo/intervalo) usando RCP-TI en tiempo real. Los resultados se presentan como trazados de secuencias y diagrama de caja y bigotes con barras de resumen de cinco cifras indicando la mediana, los cuartilos y los percentilos más pequeños y más

grandes, en la distribución; las barras (de abajo hacia arriba) indican los percentilos 10°, 25°, 50°, 75° y 90°, respectivamente, de las muestras ensayadas. Los asteriscos indican diferencias significativas en relación con los valores del tipo silvestre, a un intervalo dado, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. (B) Los ganglios linfáticos asociados con el bazo (Spl) y pulmón (LN) se reunieron (2 grupos separados, 3 a 4 ratones por grupo) y se ensayaron suspensiones celulares individuales para IL-5, IL-10, IL-13 e IFN-γ después de incubación de 72 horas en presencia de Con A (CON, 1 μg/ml) o antígeno soluble de huevo (SEA, 20 μg/ml). Las citocinas fueron inferiores al nivel de detección en los cultivos no estimulados. (C) El tamaño del granuloma (volumen, $mm^3 \times 10^{-3}$) y porcentaje de eosinófilos en los granulomas se determinaron cuantitativamente por microscopia. (D) Análisis por RCP en tiempo real, de genes inflamatorios regulados por T_H2 en tejido pulmonar granulomatoso. Todos los datos representan al menos dos experimentos separados.

[037] La FIG. 18 muestra que la respuesta tipo 2 está afectada en los ratones IL-21R$^{-/-}$ infectados con *N. brasiliensis*. Los pulmones (A) y los ganglios linfáticos asociados con los pulmones (LALN) (B) fueron extraídos en el día 7 de los ratones individuales C57BL/6 o IL-21R$^{-/-}$, infectados con *N. brasiliensis* y no tratados (5 por grupo de tratamiento). Se aisló ARN y se generó ADNc como se describe en la leyenda de la FIG. 17. El ARNm se analizó individualmente para IL-13, IL-4, AMCase, Ym1 y FIZZ1 usando RCP cuantitativa en tiempo real. Los niveles de los transcritos se basan en comparaciones de ratones infectados con animales no expuestos.

[038] La FIG. 19 muestra que la inflamación inducida por citocina de tipo 2 se redujo en ratones IL-21R$^{-/-}$. Los ratones WT (barras abiertas) y IL-21R$^{-/-}$ (barras sólidas) se sensibilizaron por vía i.p. con huevos, se desafiaron por i.v. dos semanas más tarde con huevos vivos de *S. mansoni* y se sacrificaron en los días 4 y 7 después del desafío. (A) Se preparó ARN a partir de tejidos pulmonares y se analizó individualmente (N=5 por grupo/intervalo) mediante RCP-TI en tiempo real, como se describió antes, en la leyenda de la FIG. 17. (B) Los ganglios linfáticos asociados con el bazo (Spl) y el pulmón (LN) se examinaron para IL-5, IL-10, IL-13 e IFN-γ después de estímulo con antígeno (SEA) o mitógeno (CON). (C) Se determinaron cuantitativamente por microscopia el tamaño del

granuloma (mm^3 X 10^{-3}) y el porcentaje de eosinófilos en los granulomas, en ratones WT (ratones por grupo: N=10, día 4; N=15, día 7) y ratones IL-21R$^{-/-}$ (N=11, día 4; N=16, día 7). (D) Análisis por RCP en tiempo real, de los genes inflamatorios T_H2 en tejido pulmonar granulomatoso (N=5 por grupo/intervalo). Los asteriscos indican diferencias significativas frente a los valores silvestres en el intervalo dado, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Los datos presentados son los resultados combinados de 3 experimentos distintos.

[039] La FIG. 20 muestra que la enfermedad hepática crónica posterior a la infección percutánea con *S. mansoni* se reduce en ausencia de IL-21R. Se infectaron ratones WT (barras abiertas) e IL-21R$^{-/-}$ (barras sólidas) con 25 a 30 cercarias de *S. mansoni*. Todos los animales se sacrificaron a la semana 9 (aguda) o semana 12 (crónica) después de la infección. (A) Se aisló ARN a partir de tejidos hepáticos y se analizó individualmente (N=8-10 por grupo/intervalo) mediante RCP-TI en tiempo real, como se describió antes, en la leyenda de la FIG. 17. (B) Los ganglios linfáticos del bazo (Spl) y mesentéricos (LN) se reunieron en grupos de 2 a 4 ratones y se ensayaron suspensiones celulares individuales para IL-5, IL-10 e IFN-γ. Los datos muestran los promedios de tres grupos distintos agrupados. (C) El tamaño del granuloma (mm^3 X 10^{-3}) y el porcentaje de eosinófilos en los granulomas fueron evaluados microscópicamente en ratones WT (ratones por grupo: N=30 para la semana 9, N=17 para la semana 12) y ratones IL-21R$^{-/-}$ (ratones por grupo: N=27 para la semana 9, N=19 para la semana 12). (D) Análisis por RCP en tiempo real, de genes inflamatorios Th2 en tejido hepático granulomatoso (N=8-10 por grupo/intervalo). Los datos presentados son los resultados combinados de 3 experimentos distintos, llevados a cabo en la semana 9 y dos realizados en la semana 12. Los asteriscos indican diferencias significativas frente a los valores silvestres, en un intervalo dado, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

[040] La FIG. 21 muestra que la composición celular de los granulomas no es alterada por deficiencia de IL-21R. (A) La composición celular de los granulomas se evaluó en los hígados de ratones WT (N=10) e IL-21R$^{-/-}$ (N=9) infectados por 9 semanas. Se presentan los promedios ± DEM de linfocitos pequeños (Lin Peq), linfocitos grandes (Lin Gra), macrófagos (Mac), fibroblastos (Fibro), eosinófilos (Eos) y mastocitos (Mc). (B) Se

aislaron linfocitos a partir de pulmones perfundidos de ratones WT e IL-21R$^{-/-}$ no expuestos previamente (paneles superiores) y en el día 7 después del desafío i.v. con 5000 huevos de *S. mansoni* (paneles inferiores). Los números de los histogramas indican los porcentajes de células $CD4^{-y}$ $CD4^{+}$ T entre el total de linfocitos pulmonares.

[041] La FIG. 22 muestra que la deficiencia de IL-21R reduce considerablemente la progresión de la fibrosis dependiente de citocina T_H2. Se infectaron ratones WT (barras abiertas) y ratones IL-21R$^{-/-}$ (barras sólidas) con cercarias de *S. mansoni.* Los animales se sacrificaron a las 9 semanas (aguda), 12 semanas (crónica) (paneles A-D) o a las 29 semanas (crónica tardía) (panel E) después de la infección. (A) Se presentan el promedio de pares de gusanos, el total de gusanos y los huevos por par de gusanos, en miles ± DE, para cada grupo. No se observó una diferencia en la intensidad de la infección en ninguno de los experimentos (*n*=número de ratones). (B) Los ratones fueron exanguinados a la hora del sacrificio y se determinaron los títulos de anticuerpos específicos para isotipos SEA, usando ELISA. (C) Valores séricos totales de IgE en µl/ml. (D-F) La fibrosis se evaluó mediante la cantidad de hidroxiprolina en micromoles detectada en el hígado por cada 10.000 huevos (panel D) o en hígado total (paneles E y F). En el panel F, los ratones WT C57BL/6 infectados fueron tratados sea con un anticuerpo control IgG2a (Igc – barra abierta) o con sIL-21R-Fc (barra sólida) por 6 semanas. Los asteriscos indican diferencias significativas con los valores de tipo silvestre al intervalo dado, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

[042] La FIG. 23 muestra que la señalización de IL-21 fomenta la activación de macrófagos alternativa al modular la expresión del receptor IL-13. Los macrófagos derivados de médula ósea se trataron con varias combinaciones de IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml) e IL-21 (20 ng/ml) durante la noche. Los macrófagos tratados con IL-4, IL-13 e IL-21 fueron pretratados con IL-21 durante 6 horas antes de la administración de IL-4 e IL-13. Las células se lisaron 20 horas después y el ARN se analizó individualmente mediante RCP-TI a tiempo real. (A) La capacidad de IL-21 para fomentar activación alternativa de macrófagos se evaluó midiendo Arg-1 y la expresión de gen FIZZ1. (B) La actividad de arginasa se determinó cuantitativamente en lisados celulares, midiendo la conversión de L-arginina a urea (mg/dl ± DEM, medidas en triplicado) (C) La expresión

de ARNm de IL-4Rα e IL-13Rα1 se evaluó mediante RCP en tiempo real. El ARNm de IL-13Rα2 fue casi indetectable bajo todas las condiciones (no se muestra). Los datos presentados en los paneles A, B y C son representativos de 3 experimentos separados. (D) Los ratones C57BL/6 no expuestos previamente se desafiaron por vía intravenosa con 5000 huevos vivos de *S. mansoni* y se trataron con PBS o rIL-21 (2 μg/dosis) en días alternos, desde el día 1 al día 6. Los animales (5 por grupo) se sacrificaron en el día 7 y se evaluaron las concentraciones pulmonares de ARNm de IL-13Rα2 mediante RCP en tiempo real, expresándose múltiplos de aumento sobre los controles no tratados (barras abiertas). Los ratones se exanguinaron también a la hora del sacrificio y se evaluó la cantidad de sIL-13Rα2 en muestras séricas individuales, mediante ELISA. Los asteriscos indican diferencias significativas, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

[043] La FIG. 24 muestra que los macrófagos alternativamente activados no producen cantidades significativas de TGF-β1 activo. El panel derecho muestra TGF-β1 activo después de la activación de macrófagos, mientras que el panel izquierdo muestra las concentraciones totales de TGF-β1 después de la activación de macrófagos. Los macrófagos derivados de médula ósea fueron tratados con varias combinaciones de IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml) e IL-21 (20 ng/ml) durante la noche. Los macrófagos tratados con IL-4, IL-13 e IL-21 fueron tratados previamente con IL-21 durante 6 horas antes de la administración de IL-4 e IL-13. A las 20 horas después de la activación, se evaluaron los materiales sobrenadantes por TGF-β1 total y activo mediante ELISA. Se detectaron concentraciones elevadas de TGF-β1 total en todos los grupos (por ejemplo, comparar el panel izquierdo "IL-4" con el "No tratado") excepto por las células tratadas con IL-21 sola (comparar el panel izquierdo "IL-21" con "No tratado"). Aunque la expresión total de TGF-β1 fue elevada, TGF-β1 activo fue mínimo en todos los grupos (panel derecho). Los datos presentados son representativos de 3 experimentos separados que dieron resultados similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

[044] Con el objeto de examinar el papel del camino de señalización de IL-21/IL-21R en la patogénesis de la fibrosis, se compararon las respuestas inmunitarias en ratones

carentes de un IL-21R funcional (IL-21R$^{-/-}$) y en ratones de tipo silvestre, usando varios modelos de inflamación pulmonar y hepática. En un modelo, se inyectaron huevos de esquistosoma por vía intravenosa en animales no expuestos o sensibilizados con antígeno, para estudiar la inflamación granulomatosa primaria y secundaria en el pulmón. En otro modelo, los ratones fueron infectados percutáneamente con cercarias de *S. mansoni* y se observó el desarrollo de inflamación y fibrosis inducidas por los huevos en el hígado. En otro modelo, los ratones fueron infectados con *N. brasiliensis*. Usando estos modelos, se estudió la influencia del IL-21R sobre la patología inducida por citocina de tipo 2 en ambientes de enfermedad aguda y crónica. Los resultados demuestran un papel importante para el IL-21R en la generación de respuestas polarizadas de tipo 2 *in vivo,* particularmente en la inflamación y fibrosis mediadas por citocina de tipo 2.

[045] Por consiguiente, el presente invento ofrece métodos para el tratamiento, el alivio o la prevención de la fibrosis o de trastornos asociados con la fibrosis en un sujeto (por ejemplo, un humano, o un paciente humano) usando un agente o agentes que reduzcan la concentración de IL-21 y/o IL-21R [por ejemplo, el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, el nivel de productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R (es decir, proteína y/o ARNm)], el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R, etc.) comparado con un control no tratado (por ejemplo, un sujeto control que sufre de fibrosis o una afección asociada con fibrosis, un sujeto control que no sufre de fibrosis o una afección asociada con fibrosis) o comparado con un nivel apropiado de referencia. En relación con un agente o agentes identificadores, que reduzcan el nivel de IL-21 y/o IL-21R, la medida "del nivel de IL-21 y/o IL-21R" incluye, entre otros, (1) medir el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R [por ejemplo, medir el nivel de los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, la proteína y/o su ARNm correspondiente)]; (2) medir el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R; y (3) medir el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R [por ejemplo, en una célula o muestra que interese, tal como, por ejemplo, obtenida de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano, un sujeto control)]. Como se describe en mayor detalle en este documento, los ejemplos de agentes que sirven para tratar, aliviar y/o prevenir la fibrosis o una afección o trastornos asociados con la fibrosis incluyen anticuerpos anti-IL-21R,

fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos anti-IL-21R, anticuerpos anti-IL-21, fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos anti-IL-21y fragmentos solubles de polipéptidos de IL-21R. El invento ofrece además, métodos para controlar el tratamiento de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis, diagnosticar y pronosticar y seleccionar compuestos útiles para el tratamiento de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis.

[046] Como se usa en este documento, "IL-21" o "IL-21R" significa cualquier polipéptido que es sustancialmente idéntico a IL-21 o al receptor de la proteína IL-21, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que codifican por interleucina-21 humana (IL-21) y su receptor (IL-21R) se describen, por ejemplo, en WO 00/53761, WO 01/85792, Parrish-Novak et al. (2000) *Nature* 408:57-63 y Ozaki et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:11439-44. Se espera que el polipéptido de IL-21 se una a IL-21R o el polipéptido de IL-21R se una a IL-21, y al ocurrir interacción haya un aumento en la actividad de señalización del camino IL-21/IL-21R de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del 100% sobre los niveles control, según se miden por cualquier método estándar. IL-21R también se conoce como "MU-1", "NILR" y "zalpha11".

[047] Un agente que reduce la concentración de IL-21 y/o IL-21R comprende cualquier agente que reduzca la actividad de señalización del camino de IL-21/IL-21R, el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R, y/o el nivel de interacción de IL-21 y IL-21R al menos en un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o un 100%. Otra opción es evaluar la reducción en las concentraciones de IL-21 y/o IL-21R midiendo el grado de reducción de la fibrosis. Un agente que reduzca el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R comprende cualquier agente que reduzca la interacción de IL-21 con IL-21R al menos en un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100%. Estos agentes mencionados que reducen el nivel de actividad o expresión de IL-21 y/o IL-21R y/o reducen el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R (es decir, agentes que reducen el nivel de IL-21 y/o IL-21R) pueden referirse en este documento como "antagonistas" de IL-21 y/o IL-21R.

[048] Un "gen de IL-21" o "gen de IL-21R" se define como un ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-21 o de IL-21R, respectivamente.

[049] La "fibrosis" se define como cualquier afección patológica resultante de una producción excesiva o aberrante de tejido fibroso. La fibrosis puede ocurrir en cualquier órgano, por ejemplo, el riñón, pulmón, hígado, piel, sistema nervioso central, hueso, médula ósea, sistema cardiovascular, un órgano endocrino o el sistema gastrointestinal. "Afección asociada con fibrosis" se refiere a cualquier afección que se relacione con fibrosis. Por consiguiente, una afección asociada con la fibrosis puede ser causada, ser concomitante o causar fibrosis.

[050] La reducción del nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R puede referirse a una reducción en el nivel de actividad biológica de IL-21 en comparación con el nivel o la actividad biológica de IL-21 y/o IL-21R en un control no tratado o una muestra de referencia (por ejemplo, un nivel de referencia). Tal nivel o actividad puede ser disminuido al menos en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100%. Una reducción en la actividad de IL-21 y/o IL-21R también puede asociarse con una reducción en la expresión y/o función de citocina de tipo 2 ("Th2"), que puede incluir una modulación en, por ejemplo, los niveles y la actividad de IL-4, IL-13, AMCase, Ym1 y Fizz1/RELMα.

[051] La reducción en el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R puede referirse a una reducción en la interacción en una célula o muestra tratada en comparación con el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R en un control no tratado o muestra de referencia. Tal nivel de interacción puede reducirse en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100%. El nivel de interacción puede ser evaluado mediante varias técnicas de biología molecular conocidas, ELISA y pruebas de inmunotransferencia Western.

[052] La reducción del nivel de productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R se refiere a una reducción en el nivel de expresión de ARNm y/o proteína en una célula tratada o una muestra, en comparación con el nivel de expresión de genes o proteína de IL-21 y/o IL-21R en un control no tratado o muestra de referencia. Tal expresión puede ser reducida en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100%. El

nivel de expresión puede evaluarse mediante numerosas técnicas de biología molecular conocidas, por ejemplo, pruebas Northern o Western de inmunotransferencia.

[053] Por "tratamiento o alivio de la fibrosis" se quiere decir reducir el grado de fibrosis en comparación con un control no tratado, según se mide por cualquier método estándar. Una reducción en la fibrosis también puede ser medida por una reducción en cualquier síntoma asociado con la fibrosis o con una afección asociada con fibrosis. Los ejemplos divulgados en este documento ofrecen ejemplos de métodos para determinar si el grado de fibrosis disminuye en comparación con un control.

[054] "Tratamiento o alivio de una afección (o trastorno) asociada con fibrosis" se refiere a reducir tal afección antes o después de haber ocurrido. En comparación con un control equivalente no tratado, tal reducción o grado de prevención es de al menos un 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95% ó 100% según se mide mediante cualquier técnica estándar. Un sujeto que está siendo tratado por una afección asociada con la fibrosis es el sujeto a que un médico profesional le ha diagnosticado tal afección. El diagnóstico puede hacerse por cualquier medio adecuado. Un sujeto en tratamiento de prevención de una afección asociada con la fibrosis puede o no haber recibido dicho diagnóstico. Una persona que trabaje en la técnica comprenderá que estos sujetos (por ejemplo, los pacientes) pueden haber sido sometidos a pruebas estándares para diagnosticar la afección asociada con la fibrosis o pueden haber sido identificados, sin un examen, como grupo de riesgo elevado debido a la presencia de uno o más factores de riesgo. Los ejemplos divulgados en este documento ofrecen ejemplos de métodos para determinar si el nivel de un trastorno asociado con la fibrosis disminuyó en comparación con un control.

[055] La "prevención" se refiere a demorar el inicio de una fibrosis o una afección asociada con fibrosis, o no permitir el inicio de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto con probabilidad de desarrollar tal afección.

[056] "Una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto, sea solo o combinado, necesaria para tratar, aliviar, reducir o prevenir la fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un mamífero. La cantidad eficaz del o de los compuestos activos varía dependiendo de la vía de administración, la edad, el peso corporal y la salud

general del sujeto. Finalmente, el médico o veterinario de cabecera decidirá cuál será la cantidad apropiada y el régimen posológico.

[057] "Sustancialmente idéntico", cuando se refiere a una proteína o polipéptido, se refiere a una proteína o polipéptido que exhibe al menos un 75%, pero preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, todavía más preferiblemente un 95%, o hasta un 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, por ejemplo, SEC. ID Nº: 2, SEC. ID Nº: 5 y proteínas de fusión como las establecidas en las SEC. ID Nº: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27. Para las proteínas o polipéptidos, la longitud de secuencias de comparación generalmente será de al menos 20 aminoácidos, preferiblemente al menos 30 aminoácidos, más preferiblemente, al menos 40 aminoácidos, y aún más preferiblemente, 50 aminoácidos o la longitud completa de la proteína o polipéptido. Los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas o polipéptidos "sustancialmente idénticos" constituyen ejemplos de ácidos nucleicos "sustancialmente idénticos". Se reconoce que, debido a la redundancia del código genético, varios ácidos nucleicos pueden codificar una proteína o polipéptido dado; tales ácidos nucleicos se encuentran dentro del alcance del invento si codifican un polipéptido que es "sustancialmente idéntico" a un polipéptido de referencia.

[058] Los ácidos nucleicos relacionados con el presente invento pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos. La referencia a una secuencia de nucleótidos, como se establece en este documento, comprende una molécula de ADN con la secuencia especificada (o un complemento de la misma), y comprende una molécula de ARN con la secuencia especificada, donde U es sustituida por T, a menos que el contexto exija lo contrario.

[059] Los polinucleótidos aislados relacionados con el presente invento pueden usarse como *primers* y sondas de hibridación, para identificar y aislar ácidos nucleicos con secuencias idénticas o similares a las que codifican los polinucleótidos divulgados. Los métodos de hibridación para identificar y aislar ácidos nucleicos incluyen la reacción en cadena de polimerasa (RCP), la hibridación Southern, hibridación *in situ* e hibridación Northern y son conocidos por los expertos en la técnica.

[060] Las reacciones de hibridación pueden realizarse bajo condiciones de exigencias diversas. La exigencia de una reacción de hibridación incluye la dificultad con la cual cualquier grupo de dos moléculas de ácido nucleico se hibriden entre sí. Preferiblemente, un polinucleótido hibridante se hibrida a su polinucleótido correspondiente bajo condiciones de exigencia reducidas, más preferiblemente bajo condiciones exigentes y aún más preferiblemente bajo condiciones muy exigentes. Los ejemplos de condiciones de exigencia se presentan en la Tabla 1 a continuación: las condiciones altamente exigentes son las que son al menos tan exigentes como, por ejemplo, las condiciones A-F; las condiciones exigentes son al menos tan exigentes como, por ejemplo, las condiciones G-L, y las condiciones de exigencia reducida son al menos tan exigentes como, por ejemplo, las condiciones M-R.

Tabla 1: Condiciones de exigencia

Condición de exigencia	Híbrido Poli-nucleótido	Longitud del híbrido (pb)[1]	Temperatura y *buffer* de hibridación[2]	Temperatura y *buffer* de lavado[2]
A	ADN:ADN	>50	65°C; 1xCSS -o- 42°C; 1xCSS, formamida 50%	65°C; 0,3xCSS
B	ADN:ADN	<50	T_B*; 1xCSS	T_B*; 1xCSS
C	ADN:ARN	>50	67°C; 1xCSS -o- 45°C; 1xCSS, formamida 50%	67°C; 0,3xCSS
D	ADN:ARN	<50	T_D*; 1xCSS	T_D*; 1xCSS
E	ARN:ARN	>50	70°C; 1xCSS -o- 50°C; 1xCSS, formamida 50%	70°C; 0,3xCSS
F	ARN:ARN	<50	T_F*; 1xCSS	T_F*; 1xCSS
G	ADN:ADN	>50	65°C; 4xCSS -o- 42°C; 4xCSS, formamida 50%	65°C; 1xCSS
H	ADN:ADN	<50	T_H*; 4xCSS	T_H*; 4xCSS
I	ADN:ARN	>50	67°C; 4xCSS -o- 45°C; 4xCSS, formamida 50%	67°C; 1xCSS
J	ADN:ARN	<50	T_J*; 4xCSS	T_J*; 4xCSS
K	ARN:ARN	>50	70°C; 4xCSS -o- 50°C; 4xCSS, formamida 50%	67°C; 1xCSS
L	ARN:ARN	<50	T_L*; 2xCSS	T_L*; 2xCSS
M	ADN:ADN	>50	50°C; 4xCSS -o- 40°C; 6xCSS, formamida 50%	50°C; 2xCSS
N	ADN:ADN	<50	T_N*; 6xCSS	T_N*; 6xCSS
O	ADN:ARN	>50	55°C; 4xCSS -o- 42°C; 6xCSS, formamida 50%	55°C; 2xCSS
P	ADN:ARN	<50	T_P*; 6xCSS	T_P*; 6xCSS
Q	ARN:ARN	>50	60°C; 4xCSS -o- 45°C; 6xCSS, formamida 50%	60°C; 2xCSS
R	ARN:ARN	<50	T_R*; 4xCSS	T_R*; 4xCSS

1: La longitud del híbrido es la prevista para las regiones hibridadas de los polinucleótidos hibridantes. Cuando se hibrida un polinucleótido a un polinucleótido objetivo de secuencia desconocida, la longitud del híbrido se supone que

es la del polinucleótido hibridante. Cuando se hibridan polinucleótidos de secuencia conocida, la longitud del híbrido puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando las regiones de complementariedad óptima de la secuencia.

2: SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH_2PO_4 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por CSS (1xCSS es NaCl 0,5 M y citrato de sodio 15 mM) en los *buffers* de hibridación y de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de completarse la hibridación.

T_B* - T_R*: La temperatura de hibridación para híbridos que se anticipa serán de menos de 50 pares de bases en longitud, deben ser de 5-10 °C menores que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde la T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases en longitud, T_m(°C) = 2(número de bases A + T) + 4(número de bases G + C). Para híbridos de entre 18 y 49 pares de bases en longitud, T_m(°C) = 81,5 + 16,6 ($\log_{10}Na^+$) + 0,41 (%G+C) - (600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y Na^+ es la concentración de iones de sodio en el *buffer* de hibridación (Na^+ para 1xCSS = 0,165 M).

Se proporcionan ejemplos adicionales de condiciones de exigencia para hibridación de polinucleótidos en Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, incorporados aquí por referencia.

[061] Los polinucleótidos aislados relacionados con el presente invento pueden usarse como sondas y *primers* de hibridación, para identificar y aislar ADN con secuencias codificadoras de variantes alélicas de los polinucleótidos divulgados. Las variantes alélicas son formas alternativas naturales de los polinucleótidos divulgados, que codifican polipéptidos idénticos o con similitud considerable con los polipéptidos codificados por los polinucleótidos divulgados. Preferiblemente, las variantes alélicas tienen al menos un 90% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos un 95% de identidad, todavía más preferiblemente, al menos un 99% de identidad) con los polinucleótidos divulgados. Alternativamente, existe una similitud considerable cuando los segmentos de ácido nucleico se hibridan bajo condiciones de hibridación selectiva (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente exigentes) a los polinucleótidos divulgados.

[062] Los polinucleótidos aislados, relacionados con el presente invento, también pueden usarse como sondas y *primers* de hibridación para identificar y aislar ADN que presenta secuencias codificantes de polipéptidos homólogos a los polinucleótidos divulgados. Estos homólogos son polinucleótidos y polipéptidos aislados de una especie diferente de la de los polipéptidos y polinucleótidos divulgados, o dentro de la misma especie, pero con similitud de secuencia considerable con las de los polinucleótidos y polipéptidos divulgados. Preferiblemente, los homólogos polinucleótidos tienen al menos una

identidad de secuencia del 50% (más preferiblemente, al menos una identidad del 75%, aún más preferiblemente, al menos una identidad del 90%) con los polinucleótidos divulgados, donde los homólogos de polipéptidos tienen al menos una identidad de secuencia del 30% (más preferiblemente, al menos una identidad del 45%, aún más preferiblemente, al menos una identidad del 60%) con los polipéptidos divulgados. Preferiblemente los homólogos de los polinucleótidos y polipéptidos divulgados, son los aislados de especies de mamíferos.

[063] Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias se realizan por medios conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un medio general para calcular la identidad de secuencia se describe de la siguiente manera. Las secuencias se alinean para fines óptimos de comparación (por ejemplo, pueden insertarse gaps en uno o ambos de un primer y un segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico para alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden desecharse para los fines de la comparación). En una realización preferida, la longitud de la secuencia de referencia alineada para fines de comparación, es al menos un 30%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, todavía más preferiblemente, al menos un 60%, y aún más preferiblemente, al menos un 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de gaps, y la longitud de cada gap, que se necesita introducir para lograr un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

[064] La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias, puede lograrse usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-53)

que ha sido incorporado en el programa GAP, en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otra realización preferida, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz NWSgapADN.CMP y un peso de gap de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Un juego preferido de parámetros es una matriz de clasificación Blossum 62 con una penalización de gap de 12, una penalización extensa de gap de 4 y una penalización de desplazamiento de gap de 5. La identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos también puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller ((1989) *CABIOS* 4:11-17), que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando un cuadro PAM120 de residuo de peso, una penalización de longitud de gap de 12 y una penalización de gap de 4.

[065] "Sustancialmente puro" se define como un ácido nucleico, polipéptido u otra molécula que se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente, por ejemplo, material genético, proteínas asociadas, membranas y residuos celulares. Típicamente, un polipéptido es sustancialmente puro si está al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o hasta un 99%, en peso, libre de las proteínas y moléculas orgánicas con las que se asocia naturalmente. Por ejemplo, un polipéptido sustancialmente puro puede obtenerse mediante extracción de una fuente natural, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula que normalmente no expresa esa proteína, o mediante síntesis química.

[066] El término "ADN aislado" se define como el ADN que está relativa o sustancialmente libre de los genes y otras secuencias de ADN que rodean al ADN en el genoma natural del organismo desde el cual se deriva el ADN dado. Por consiguiente, el término "ADN aislado" comprende, por ejemplo, ADNc, ADN genómico clonado y ADN sintético.

[067] Un polipéptido o proteína de "fusión de IL-21" o un polipéptido o proteína de "fusión de IL-21R" se define como toda o parte de una secuencia de aminoácido de IL-21

o IL-21R, por ejemplo, el fragmento extracelular de IL-21R a partir de los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2, unido a una segunda secuencia de aminoácido heterólogo. En una realización, la segunda secuencia de aminoácido heterólogo es una secuencia de marca. Las secuencias de marca comunes incluyen marcas myc, his, flag, etc. En otra realización del invento, la segunda secuencia de aminoácido heterólogo es una secuencia de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fc. Tales proteínas y polipéptidos de fusión, que se describen en mayor detalle en este documento, son codificadas por secuencias de ácido nucleico referidas como "genes de fusión de IL-21" o "genes de fusión de IL-21R".

[068] En los métodos de selección, un "compuesto" se refiere a un agente químico, sea de ocurrencia natural o derivado artificialmente. Tales compuestos pueden incluir, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, moléculas orgánicas sintéticas, moléculas orgánicas naturales, moléculas de ácido nucleico, moléculas peptídicas de ácido nucleico y sus componentes y derivados. Por ejemplo, un compuesto útil de acuerdo con el presente invento reduce la unión de IL-21 a IL-21R.

[069] Los antagonistas de IL-21 y IL-21R para usar en el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis también pueden consistir en moléculas pequeñas. El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos que no son macromoléculas (ver, por ejemplo, Karp (2000) *Bioinformatics Ontology* 16:269-85; Verkman (2004) *AJP-Cell Physiol.* 286:465-74). Por ende, se suele considerar moléculas pequeñas a los compuestos que son, por ejemplo, menores de mil daltones [por ejemplo, Voet y Voet, *Biochemistry, 2nd ed.*, ed. N. Rose, Wiley y Sons, New York, 14 (1995)]. Por ejemplo, Davis et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5981-86, usan la frase molécula pequeña para indicar folatos, metotrexato y neuropéptidos, mientras que Halpin y Harbury (2004) *PLos Biology* 2:1022-30, usan la frase para indicar productos genéticos de molécula pequeña, por ejemplo, ADNs, ARNs y péptidos. Ejemplos de moléculas pequeñas naturales y sintetizadas incluyen, entre otros, colesteroles, neurotransmisores, ARNsi y varios agentes químicos enumerados en numerosos bancos comerciales de datos de moléculas pequeñas disponibles, por ejemplo, FCD (Fine Chemicals Database), SMID (Small Molecule Interaction Database), ChEBI (Chemical

Entities of Biological Interest) y CSD (Cambridge Structural Database) (ver, por ejemplo, Alfarano et al. (2005) *Nuc. Acids Res. Database Issue* 33:D416-24).

[070] El término "composición farmacológica" significa cualquier composición que contiene al menos un agente terapéutico o biológicamente activo y que es adecuado para administrar a un sujeto. Cualquiera de estas fórmulas puede ser preparada mediante métodos conocidos y aceptados en la técnica. Ver, por ejemplo, *Remington: The Science y Practice of Pharmacy,* 21st Ed., (ed. A.R. Gennaro), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD (2005).

[071] El presente invento ofrece ventajas significativas sobre las terapias estándares para el tratamiento y la prevención de afecciones asociadas con la fibrosis. Como se describe en este documento, la administración de un agente terapéutico que reduce el nivel de actividad o expresión de IL-21 y/o IL-21R o reduce las interacciones entre IL-21 y IL-21R (es decir, reduce el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R) resulta en el alivio, la reducción o la prevención de la fibrosis y afecciones asociadas con la fibrosis. Además, los métodos de selección de compuestos, proporcionados por este invento, permiten que se identifiquen terapéuticas novedosas que modifiquen el proceso de lesión, en lugar de sólo mitigar los síntomas.

Trastornos fibróticos

[072] La generación de tejido de granulación es un proceso cuidadosamente orquestado, en el cual la expresión de inhibidores de la proteasa y proteínas de matriz extracelular se regula en forma creciente y la expresión de proteasas se reduce, dando lugar a la acumulación de matriz extracelular. La acumulación anormal de materiales fibrosos, sin embargo, puede finalmente conducir a fallas de los órganos (por ejemplo, Border et al. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:1286-92). El desarrollo de afecciones fibróticas, sea inducido o espontáneo, es causado, por lo menos en parte, por el estímulo de la actividad de fibroblastos. El influjo de células inflamatorias y fibroblastos activados dentro del órgano lesionado depende de la habilidad de estos tipos celulares para interactuar con la matriz intersticial, que contiene principalmente colágenos. Ejemplos de tejidos que pueden ser afectados por fibrosis incluyen el riñón, pulmón, hígado, piel, sistema

nervioso central, hueso, médula ósea, tejidos del sistema cardiovascular, órganos endocrinos y tejidos del sistema gastrointestinal.

[073] Los métodos y composiciones del presente invento son útiles para cualquier fibrosis o afección asociada con la fibrosis que afecte cualquier tejido, entre ellos, por ejemplo, fibrosis de un órgano interno, trastorno fibrosante cutáneo o dérmico y afecciones fibróticas del ojo. La fibrosis de órganos internos (por ejemplo, el hígado, pulmón, riñón, vasos sanguíneos cardíacos, aparato digestivo) ocurre en trastornos tales como fibrositis pulmonar, fibrosis idiopática, fibrosis autoinmunitaria, mielofibrosis, cirrosis hepática, enfermedad veno-ocluyente, glomerulonefritis proliferante mesangial, glomerulonefritis crescéntica, nefropatía diabética, fibrosis intersticial renal, fibrosis renal en sujetos que reciben ciclosporina, rechazo de aloinjerto, nefropatía asociada con el VIH. Otros trastornos asociados con la fibrosis incluyen esclerosis sistémica, síndrome de eosinofilia-mialgia y trastornos del SNC asociados con la fibrosis, tales como fibrosis intraocular. Los trastornos fibrosantes dérmicos incluyen, por ejemplo, esclerodermia, morfea, queloides, cicatrices hipertróficas, colagenoma cutáneo familiar, y nevos de tipo colágeno, del tejido conectivo. Las afecciones fibróticas del ojo incluyen afecciones tales como retinopatía diabética, cicatrización posquirúrgica (por ejemplo, después de cirugía de filtración de glaucoma y después de cirugía de estrabismo) y vitreorretinopatía proliferante. Otras afecciones fibróticas que pueden ser tratadas por los métodos del presente invento pueden ser el resultado, por ejemplo, de artritis reumatoidea, enfermedades asociadas con dolor articular prolongado y deterioro articular, esclerosis sistémica progresiva, polimiositis, dermatomiositis, fascitis eosinofílica, morfea, síndrome de Raynaud y poliposis nasal. Como se describe en este documento, un antagonista de pasaje de IL-21/IL-21R puede administrarse para tratar o prevenir la fibrosis y los trastornos asociados con la fibrosis, o para aliviar uno o más de los síntomas asociados con estos trastornos.

Antagonistas de IL-21 o IL-21R (antagonistas de IL-21/IL-21R)

[074] Los antagonistas de IL-21 o los antagonistas de IL-21R del invento interactúan con IL-21 o IL-21R (por ejemplo, IL-21 o IL-21R de mamífero, tal como ser humano, bovino, rata, ratón, caballo o perro), respectivamente, y reducen el nivel de IL-21 y/o IL-

21R, por ejemplo, reducen una o más actividades biológicas asociadas con IL-21 y/o IL-21R. Cuando esta interacción comprende una unión directa, los antagonistas se unen a IL-21 o IL-21R con alta afinidad (por ejemplo, con una constante de afinidad aproximada de al menos 10^7 M^{-1}, preferiblemente de alrededor de 10^8 M^{-1}, y más preferiblemente, alrededor de 10^9 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} o más fuerte).

[075] Es conveniente reducir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o hasta un 100%. Un antagonista puede, por ejemplo, reducir la actividad de IL-21R mediante la neutralización de IL-21. Un antagonista puede ser una proteína de fusión que incluye un fragmento de una IL-21R fundido a un fragmento que no sea IL-21R tal como una región Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, las proteínas de fusión establecidas en las SEC ID Nº: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27. Otros ejemplos de antagonistas son anticuerpos anti-IL-21R o anti-IL-21 o sus fragmentos conjugantes de antígeno, formas solubles de IL-21R, péptidos, polinucleótidos inhibidores (por ejemplo, ARNsi, NPS, y aptámeros) y moléculas pequeñas.

[076] En una realización, el antagonista de IL-21/IL-21R es un anticuerpo anti-IL-21R o anti-IL-21, o uno de sus fragmentos conjugantes de antígeno. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. Si se desea, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o de una sola especificidad, que se une a IL-21 o IL-21R o uno de sus fragmentos conjugante con antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, $F(ab')_2$, Fv o un fragmento Fv de una cadena). El anticuerpo puede ser humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro* al polipéptido de IL-21 o IL-21R.

[077] Alternativamente, el antagonista de IL-21 o el de IL-21R puede ser de longitud completa (por ejemplo, una secuencia mutada) o un fragmento de un polipéptido de IL-21 o un polipéptido de IL-21R (por ejemplo, humano). Los ejemplos de antagonistas incluyen, por ejemplo, un dominio conjugante de receptor de IL-21 inhibidor de un polipéptido de IL-21 (por ejemplo, humano) o el dominio extracelular del IL-21R murino o humano. El antagonista de IL-21 puede ser una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica [por ejemplo, presentando al menos un 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia) al IL-21R natural (por ejemplo, SEC. ID Nº: 2 (humana)

o SEC. ID Nº: 5 (murina)] o un fragmento del mismo (ver Tabla 2). Como alternativa, el antagonista puede ser una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a IL-21R natural de mamífero o a uno de sus fragmentos [por ejemplo, SEC. ID Nº: 1 (humana) o SEC. ID Nº: 4 (murina)] o por una secuencia de nucleótidos que hibrida una de las secuencias precedentes de nucleótidos bajo condiciones exigentes, por ejemplo, bajo condiciones muy exigentes (ver Tabla 1).

Tabla 2: Resumen de secuencias

Designación	**Descripción**
SEC. ID Nº: 1	Secuencia de ácido nucleico del ADNc de IL-21R humano
SEC. ID Nº: 2	Secuencia de aminoácidos de IL-21R humano
SEC. ID Nº: 3	Secuencia de aminoácidos de motivo WSXWS conservado
SEC. ID Nº: 4	Secuencia de ácido nucleico de ADNc de IL-21R de ratón
SEC. ID Nº: 5	Secuencia de aminoácidos de IL-21R de ratón
SEC. ID Nº: 6	Secuencia de aminoácidos de fragmento Fc
SEC. ID Nº: 7	Secuencia de ácido nucleico (ADNc) de IL-21 humana
SEC. ID Nº: 8	Secuencia de aminoácidos de IL-21 humana
SEC. ID Nº: 9	Secuencia de señal de péptido
SEC. ID Nº: 10	Secuencias de ácido nucleico (ADNc) de monómero de IL-21R humano fundida a una secuencia líder de abeja y marcas de terminal amino His_6 y Flag
SEC. ID Nº: 11	Secuencia de aminoácidos de monómero de IL-21R humano (20-235) fundida a una secuencia líder de abeja y marcas de terminal amino His_6 y Flag
SEC. ID Nº: 12	Secuencia de ácido nucleico (ADNc) de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a un fragmento de IgG
SEC. ID Nº: 13	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de IL-21R humana (1-235) fundida a un fragmento de IgG
SEC. ID Nº: 14	Secuencia de ácido nucleico (ADNc) de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a un fragmento de IgG y a marca His_6
SEC. ID Nº: 15	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a un fragmento de IgG y a marca His_6
SEC. ID Nº: 16	Secuencia de ácido nucleico (ADNc) de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a un fragmento de IgG mutado a la altura de los residuos 254 y 257
SEC. ID Nº: 17	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a un fragmento de IgG mutado a la altura de los residuos 254 y 257

Designación	Descripción
SEC. ID Nº: 18	Secuencia de ácido nucleico (ADNc) de monómero de IL-21R humano fundida a una marca de rhodopsina
SEC. ID Nº: 19	Secuencia de aminoácidos de monómero de IL-21R humano (20-235) fundida a una marca de rhodopsina
SEC. ID Nº: 20	Secuencia de ácido nucleico (ADNc) de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a sitios de escisión EK y un fragmento de IgG1 con una región Fc mutada
SEC. ID Nº: 21	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de IL-21R humano (1-235) fundida a sitios de escisión EK y un fragmento de IgG1 con una región Fc mutada
SEC. ID Nº: 22	Secuencia de ácido nucleico de dominio extracelular de IL-21R murino fundida a un fragmento IgG2a genómico murino
SEC. ID Nº: 23	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de IL-21R murino fundida a un fragmento IgG2a genómico murino
SEC. ID Nº: 24	Secuencia de ácido nucleico (genómico) de dominio extracelular de IL-21R murino fundida a marcas Flag y His_6
SEC. ID Nº: 25	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular IL-21R murino fundida a marcas Flag y His_6
SEC. ID Nº: 26	Secuencia de ácido nucleico de dominio extracelular de IL-21R murino fundida a una secuencia líder de abeja y marcas Flag y His_6 de terminal amino
SEC. ID Nº: 27	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de IL-21R murino fundidas a una secuencia líder de abeja y marcas Flag y His_6 de terminal amino
SEC. ID Nº: 28	Primer sentido para IL-21 murino
SEC. ID Nº: 29	Primer antisentido para IL-21 murino
SEC. ID Nº: 30	Primer sentido para IL-21R murino
SEC. ID Nº: 31	Primer antisentido para IL-21R murino
SEC. ID Nº: 32	Primer sentido para IFN-γ murino
SEC. ID Nº: 33	Primer antisentido para IFN-γ murino

[078] Otra opción es que el polipéptido de IL-21R sea un polipéptido soluble incapaz de retener la membrana. Tales polipéptidos solubles incluyen, por ejemplo, polipéptidos de IL-21R que carecen de una porción suficiente de su membrana que cubra el dominio, o se han modificado de tal modo que la membrana que cubre el dominio no es funcional. Por ejemplo, el polipéptido de IL-21R puede ser un fragmento soluble de un IL-21R [por ejemplo, un fragmento de un IL-21R que contiene el dominio extracelular de IL-21R murino o humano, que incluye una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235 ó 20-236 de la SEC. ID Nº: 2 (humana), o desde aproximadamente los aminoácidos 1-236 ó 20-236 de la SEC. ID Nº: 5 (murina)]. Los

ejemplos de antagonistas de IL-21 pueden tener una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a los aminoácidos 20-538 de la SEC. ID Nº: 2 (IL-21R humano maduro), aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2 (dominio extracelular de IL-21R humano), aminoácidos 1-236 de la SEC. ID Nº: 2, aminoácidos 20-235 de la SEC. ID Nº: 2, aminoácidos 20-236 de la SEC. ID Nº: 2, aminoácidos 1-236 de la SEC. ID Nº: 5, o aminoácidos 20-236 de la SEC. ID Nº: 5.

[079] Un antagonista de IL-21 del invento, también puede ser codificado por ácidos nucleicos que hibridan la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC. ID Nº: 1, SEC. ID Nº: 4, SEC. ID Nº: 10, SEC. ID Nº: 12, SEC. ID Nº: 14, SEC. ID Nº: 16, SEC. ID Nº: 18, SEC. ID Nº: 20, SEC. ID Nº: 22, SEC. ID Nº: 24 o SEC. ID Nº: 26, bajo condiciones altamente exigentes, por ejemplo, como se establece en la Tabla 1. Los polinucleótidos aislados que codifican proteínas o proteínas de fusión de IL-21R, pero que difieren de la secuencia de nucleótidos establecida en las SEC ID Nº: 1, 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26, en virtud de la degeneración del código genético, también están comprendidos por el presente invento. Las variaciones en la secuencia de nucleótidos establecidas en las SEC ID Nº:1, 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26, que son causadas por mutaciones en ciertos puntos o por modificaciones inducidas, también se incluyen en el invento.

[080] Si se desea, un polipéptido soluble de IL-21R puede incluir, o fundirse con una segunda porción, tal como un polipéptido (por ejemplo, una cadena inmunoglobulínica, una secuencia de polipéptidos GST, Lex-A o MBP). Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir un fragmento de un polipéptido de IL-21R, que es capaz de conjugar IL-21, tal como un fragmento soluble de un IL-21R [por ejemplo, un fragmento que contiene el dominio extracelular de IL-21R murina o humana, tales como aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235 ó 20-236 de la SEC. ID Nº: 2 (humana), o aminoácidos 1-236 ó 20-236 de la SEC. ID Nº: 5 (murina)] fundida a una segunda porción (por ejemplo, una cadena inmunoglobulínica, un fragmento Fc, una región constante de cadena pesada de varios isotipos inmunoglobulínicos, entre ellos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD y IgE).

[081] Lo que se espera es que el antagonista de IL-21 del invento reduzca al menos una actividad biológica asociada con el IL-21R natural, incluso, por ejemplo, la capacidad

para interactuar o ligarse con un polipéptido de IL-21, la capacidad de asociarse con moléculas de transducción de señal, tales como γc o JAK1, la capacidad de estimular la fosforilación y/o activación de proteínas stat (por ejemplo, Stat 5 y/o Stat 3) y la capacidad de modular (por ejemplo, estimular o reducir) la proliferación, diferenciación, función celular efectora, actividad citolítica, secreción de citocina, y/o supervivencia de células inmunitarias, tales como las células T (células CD8+ y CD4+ T, entre ellas, células Th1 y Th2), células NK, células B, macrófagos y megacariocitos.

[082] De acuerdo con el presente invento, un polipéptido de IL-21 es una citocina que muestra homología de secuencia con IL-2, IL-4 y IL-15 (Parrish-Novak et al. (2000) *Nature* 408:57-63). A pesar de la baja homología de secuencia entre las citocinas interleucínicas, las citocinas comparten un motivo secundario común, es decir, una estructura de "paquete de cuatro hélices" que es representativo de la familia IL-21, se expresa principalmente en células T CD4+ activadas y se ha informado que ejerce efectos sobre las células NK, B y T (Parrish-Novak et al. (2000) *supra*; Kasaian et al. (2002) *Immunity* 16:559-69). IL-21 se une a IL-21R (también conocido como "MU-1", "NILR" y "zalpha11"). Al unirse IL-21, la activación de IL-21R conduce a la señalización de Stat5 y/o Stat3 (Ozaki et al. (2000) *supra*).

[083] Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de IL-21 son de dominio público. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de una IL-21 humana está disponible en GenBank, Cuenta N° NM_021803. Abajo se presenta la secuencia de nucleótidos de la IL-21 humana divulgada:

```
1   gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc
61  tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcatc ttcttgggga cactggtcca
121 caaatcaagc tcccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc tttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatg
421 tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
541 taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg
601 tattccaagt ggaggag (SEC ID N°:: 7)
```

[084] A continuación se presenta la secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-21 humana divulgada:

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVND
LVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPST
NAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
(SEC ID N°: 8)

[085] En consecuencia, un polipéptido de IL-21 se refiere a una proteína capaz de interactuar o conjugarse con un IL-21R, que tiene una de las siguientes características: (i) una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una IL-21 de mamífero natural o fragmento del mismo [por ejemplo, SEC ID N°: 8 (humana)]; (ii) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos de IL-21 de mamífero natural o fragmento de la misma (por ejemplo, SEC ID N°: 7 (humana) o un fragmento de la misma); (iii) una secuencia de aminoácidos codificada por un secuencia de nucleótidos degenerada en una secuencia de nucleótidos de IL-21 natural o fragmento de la misma, por ejemplo, SEC ID N°: 7 (humana) o un fragmento de la misma, o (iv) una secuencia de nucleótidos que se hibrida a una de las secuencias de secuencia de nucleótidos bajo condiciones exigentes.

[086] En todos los aspectos mencionados del invento, los polipéptidos de IL-21 o IL-21R pueden proporcionarse como un polipéptido variante con una mutación en la secuencia de IL-21 o IL-21R natural (tipo silvestre) que resulta en una conjugación de afinidad más elevada (en relación con la secuencia no mutada) para la IL-21 o IL-21R natural, respectivamente. Dichas mutaciones podrán resultar útiles, por ejemplo, para aumentar la resistencia a la proteólisis (en relación con la secuencia no mutada). Algunas secuencias de aminoácidos en las secuencias divulgadas pueden variarse sin modificar significativamente la estructura o función de la IL-21 o IL-21R. En general, es posible reemplazar residuos que forman una estructura terciaria de proteína de IL-21 o IL-21R, siempre que se usen residuos que realicen una función similar. En otros casos, el tipo de residuo puede carecer totalmente de importancia si ocurre una alteración en un área no crítica. En consecuencia, el invento incluye además variantes de IL-21 y IL-21R que exhiben actividad biológica sustancial tipo IL-21. Dichas variantes incluyen

eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo (por ejemplo, la sustitución de un residuo hidrofílico con otro, pero no de un residuo altamente hidrofílico con un residuo altamente hidrofóbico). A menudo, los cambios pequeños o sustituciones de aminoácidos "neutrales" tendrán poco impacto en la función de las proteínas (Taylor (1986) *J. Theor. Biol.* 119:205-18). Las sustituciones conservadoras podrán incluir, entre otras, reemplazos entre los aminoácidos alifáticos, sustituciones entre residuos amídicos, intercambios de residuos básicos y reemplazos entre otros residuos aromáticos. Bowie et al. (1990) *Science* 247:1306-10 y Zvelebil et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 195:957-61 contiene más información con respecto a cuál cambio de aminoácidos tiene la probabilidad de ser fenotípicamente silencioso (es decir, es poco probable que afecte significativamente la función).

[087] El antagonista del IL-21 o IL-21R puede ser una proteína de fusión que contiene los polipéptidos de IL-21 o IL-21R o fragmentos de los mismos, descritos en este documento, fusionada con una segunda mitad, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fc, una secuencia de epítope (marcador), por ejemplo, GST o mic, y secuencias adicionales conocidas, tales como la secuencia de polipéptidos Lex-A, o MBP. Si se desea, la proteína de fusión podrá incluir un fragmento de un polipéptido de una IL-21R capaz de conjugar a IL-021, por ejemplo, un fragmento soluble de una IL-21R (por ejemplo, un fragmento de una IL-21R que contiene el dominio extracelular de IL-21R murina o humana de alrededor de los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235 ó 20-236 de la SEC ID Nº: 2 (humana), o de alrededor de los aminoácidos 1-236 ó 20-236 de la SEC ID Nº: 5 (murina) o un fragmento idéntico, o sustancialmente idéntico a un polipéptido codificado por SEC ID Nº: 1 ó 4) fusionado con una segunda mitad (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, un fragmento de Fc, regiones constantes de cadena pesada de los distintos isotipos, entre ellos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE). Alternativamente, la secuencia Fc humana ha sido mutada en uno o más aminoácidos (por ejemplo, mutada en los residuos 254 y 257 de la SEC ID Nº: 16) en la secuencia natural para reducir la conjugación con los receptores de Fc. En otras realizaciones, la proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de la IL-21R murina [de alrededor de los aminoácidos 1-236 ó 20-235 de la

SEC ID Nº: 5 (murina)] fusionado con una cadena Fc de inmunoglobulina murina (incluso, entre otras, una IgG murina, por ejemplo, IgG2a murina o una forma mutada de IgG2a murina).

[088] En las FIG. 7-15 se muestran ejemplos de las proteínas de fusión antagonísticas que pueden usarse en los métodos del invento. La proteína de fusión podrá incluir una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 17, SEC ID Nº: 19, SEC ID Nº: 21, SEC ID Nº: 23, SEC ID Nº: 25 o SEC ID Nº: 27 o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a SEC ID Nº: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ó 26. Una proteína de fusión ejemplar contiene el dominio extracelular de la IL-21R humana (por ejemplo, los aminoácidos 1-235 de la SEC ID Nº: 2), fusionados en la terminal C mediante un enlace (correspondiente a los aminoácidos 236-243 de la SEC ID Nº: 17) a una secuencia Fc mutada de inmunoglobulina G1 humana (IgG1) (correspondiente a los aminoácidos 244-467 de la SEC ID Nº: 17). La secuencia Fc humana ha sido mutada en los residuos 254 y 257 desde la secuencia silvestre para reducir la conjugación de los receptores de Fc. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se muestran como SEC ID Nº: 16 e SEC ID Nº: 17, respectivamente.

[089] El segundo polipéptido es preferiblemente soluble. El segundo polipéptido puede mejorar la vida media (por ejemplo, la vida media en suero) del polipéptido enlazado. Si se desea, el segundo polipéptido puede incluir una secuencia que facilita la asociación del polipéptido de fusión con un segundo polipéptido de IL-21R o IL-21. El segundo polipéptido podrá incluir por lo menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. Los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nº 5.225.538; 5.428.130; 5.514.582; 5.714.147, y 5.455.165.

[090] El segundo polipéptido puede ser un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa o fragmento (por ejemplo, una cadena pesada, una cadena liviana, Fab, Fab_2, Fv, o Fc).

[091] En un ejemplo, el segundo polipéptido tiene una menor función determinante de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo silvestre. La función

determinante de Fc incluye, por ejemplo, la conjugación de receptores de Fc, la fijación de complementos y depleción de células T (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.136.310). Los métodos para analizar la depleción de células T, función determinante de Fc y estabilidad de anticuerpos son conocidos en la técnica. En una realización, el segundo polipéptido tiene baja afinidad o ninguna afinidad con el receptor de Fc. En una realización alternativa, el segundo polipéptido tiene baja afinidad o ninguna afinidad con la proteína complementaria C1q.

[092] Una segunda secuencia de polipéptidos preferida incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6. Esta secuencia incluye una región Fc. Los aminoácidos subrayados son los que se diferencian de los aminoácidos que se encuentran en las posiciones correspondientes de la secuencia de inmunoglobulina del tipo silvestre.

HTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK **(SEC ID N°: 6)**

[093] Las proteínas de fusión pueden incluir además una secuencia o secuencias de enlace que unen la primera mitad con la segunda mitad. Por ejemplo, la proteína de fusión podrá incluir un enlazador peptídico de alrededor de 4 a 20 aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 10 aminoácidos de longitud, y lo aún más preferiblemente, alrededor de 8 aminoácidos de longitud. Los aminoácidos en el enlazador peptídico podrán incluir, por ejemplo, Gli, Ser, Asn, Tr y Ala. En consecuencia un enlazador peptídico podrá consistir en un elemento Gli-Ser. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye un enlazador peptídico con la fórmula $(Ser\text{-}Gli\text{-}Gli\text{-}Gli\text{-}Gli)_y$, donde "y" es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

[094] En otras realizaciones, pueden incorporarse secuencias de aminoácidos adicionales a la terminal N o C a fin de facilitar la expresión, detección y/o el aislamiento o purificación. Por ejemplo, una proteína de fusión de IL-21/IL-21R podrá estar enlazada con una o más mitades adicionales, por ejemplo, marcadores de GST (es decir, glutationa S-transferasa), His, FLAG, o mic. Por ejemplo, la proteína de fusión podrá incluir

además un péptido GST en el cual las secuencias de la proteína de fusión están fusionadas con la terminal C de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión facilitan la purificación o identificación de la proteína de fusión de IL-21R/MU-1. En otras realizaciones, pueden incorporarse secuencias de aminoácidos adicionales a la terminal N o C de la proteína de fusión para facilitar la expresión, flexibilidad estérica, detección y/o el aislamiento o purificación.

[095] La proteína de fusión también podrá incluir una secuencia de señal heteróloga en su terminal N. Por ejemplo, la secuencia de señal de IL-21R nativa podrá quitarse y reemplazarse con una secuencia de señal de otra proteína. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamíferos), la expresión y/o secreción de IL-21R podrá aumentarse usando una secuencia de señal heteróloga. Un péptido de señal que puede incluirse en la proteína de fusión es MPLLLLLLLLPSPLHP (SEC ID Nº: 9). Si se desea, puede insertarse además uno o más aminoácidos entre la primera mitad del polipéptido que integra la mitad de IL-21R/MU-1 y la segunda mitad de polipéptido.

[096] Los antagonistas de IL-21/IL-21R aquí descritos pueden derivarse o enlazarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, la proteína de fusión o anticuerpo, o porción conjugante de antígeno, podrá enlazarse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares adicionales, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros).

[097] Puede producirse una proteína quimérica o de fusión del invento mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para distintas secuencias de polipéptidos se ligan juntos en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, al emplear terminales de extremo romo o de extremo pegajoso para ligación, digestión enzimática de restricción para crear terminales apropiadas, llenado de extremos pegajosos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una ligación indeseable y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, entre ellas, sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, la amplificación por RCP de los

fragmentos del gen puede llevarse a cabo usando *primers* de anclaje que dan lugar a solapas complementarias entre dos fragmentos de gen consecutivos, que pueden templarse y reamplificarse para generar una secuencia quimérica de gen (ver, por ejemplo, Ausubel et al., *supra*). Además, muchos vectores de expresión que codifican una mitad de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina) están disponibles comercialmente. Un ácido nucleico de codificación de IL-21R/MU-1 o IL-21 puede clonarse en este tipo de vector de expresión de modo tal que la mitad de fusión esté enlazada en marco a la proteína de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, los polipéptidos de fusión de IL-21R/MU-1 o IL-21 existen en forma de oligómeros, tales como dímeros o trímeros. Puede construirse un monómero de IL-21R/MU-1 o monómero de IL-21, y/o ácidos nucleicos que codifican una IL-21R/MU-1 o IL-21 mediante métodos conocidos en la técnica.

Producción de ácidos nucleicos

[098] Los polinucleótidos aislados del invento pueden enlazarse operativamente a una secuencia de control de expresión, por ejemplo, los vectores de expresión pMT2 o pED divulgados en Kaufman et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4485-90, a fin de producir los polipéptidos de IL-21R o IL-21 (incluso fragmentos y fusiones de los mismos) en forma recombinante. Hay muchas secuencias de control de expresión apropiadas conocidas en la técnica. Los métodos generales para la expresión de las proteínas recombinantes también son conocidos en la técnica, según los ejemplos citados en Kaufman (1990) *Meth. Enzym.* 185:537-66. Según se define en este documento, el término "operativamente enlazado" significa ligado enzimática o químicamente para formar un enlace covalente entre el polinucleótido aislado del invento y la secuencia de control de expresión, de modo tal que el polipéptido de IL-21R o IL-021 sea expresado por una célula huésped que ha sido transformada (transfectada) con el polinucleótido/la secuencia de control de expresión ligada.

[099] Según se usa en este documento, el término "vector" tiene por finalidad referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un asa de ADN bicatenario circular, en el cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es

un vector vírico, en el cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriana y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped con la introducción dentro de la célula huésped, y de esta manera ser replicados junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están operativamente enlazados. Dichos vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo tienen la forma de plásmidos. En la presente especificación, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. No obstante, el invento tiene por finalidad incluir otras formas de vectores de expresión, por ejemplo, vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

[0100] Los constructos de expresión recombinante del invento pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias reguladoras [es decir, secuencias que regulan la replicación del vector, orígenes de replicación, transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido (o péptido) de interés, o expresión del polipéptido codificado], secuencias marcadoras, tales como la histidina y genes marcadores seleccionables. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, realzadores y cualquier elemento de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación, sitios de empalme de transcripción), que controlan la transcripción, replicación o traslación. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology,* Academic Press, San Diego, CA (1990). Las personas versadas en la técnica reconocerán que el diseño del vector de expresión, incluso la selección de las secuencias reguladoras, dependerá de varios factores, entre ellos, la elección de la célula huésped y el nivel de expresión de proteína deseado. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de las proteínas

en células huésped de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen elevados niveles de expresión de proteínas, por ejemplo, promotores y/o realzadores derivados del promotor FF-1a y BGH poli A, citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, el promotor/realzador de CMV), virus simio 40 (SV40) (por ejemplo, el promotor/realzador SV40), adenovirus [por ejemplo, el promotor principal atrasado de adenovirus (AdMLP)], y polioma. Los elementos reguladores víricos y secuencias de los mismos se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 5.168.062; 4.510.245, y 4.968.615.

[0101] Los vectores de expresión recombinantes del invento pueden llevar secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, secuencias de orígenes de replicación y de terminación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las cuales el vector ha sido introducido (ver, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia de la célula huésped transfectada o transformada con el marcador seleccionable, a compuestos tales como G418 (geneticina), higromicina o metotrexato. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr$^-$ con selección/ampliación por metotrexato), el gen *neo* (para la selección de G418) y genes que confieren resistencia a la tetraciclina y/o ampicilina a las bacterias.

[0102] Los vectores apropiados, que contienen secuencias reguladoras, entre ellas, secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias realzadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado, pueden seleccionarse o construirse. También puede usarse en el método divulgado la expresión inducible de proteínas, lograda mediante el uso de vectores con secuencias promotoras inducibles, por ejemplo, vectores inducibles por tetraciclina, por ejemplo, pTet-On™ y pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA). Para más detalles con respecto a los vectores de expresión, ver, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*. También se describen en Sambrook et al., *supra,* muchas técnicas y protocolos para la manipulación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis,

secuenciado, introducción de ADN en las células, expresión de genes y análisis de proteínas.

[0103] Existe una diversidad de tipos de células que pueden actuar como células huésped apropiadas para la expresión de la IL-21R/MU-1 o IL-21 o su proteína de fusión. Puede usarse cualquier tipo de célula capaz de expresar la proteína funcional de IL-21R/MU-1 o IL-21 o su fusión. Las células huésped de mamífero apropiadas incluyen, por ejemplo, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (OHC), células 293 de riñón humano, células epidérmicas A431 humanas, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV01, otras líneas celulares transformadas de primate, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HeLa, células L de ratón, células BHK, HL-60, U937, HaK, C3H10T1/2, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x o C2C12.

[0104] El polipéptido de IL-21R o IL-21 o proteína de fusión del mismo también puede producirse enlazando operativamente el polinucleótido aislado del invento con secuencias de control apropiadas en uno o más vectores de expresión de insecto y empleando un sistema de expresión de insecto. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/Sf9 pueden obtenerse comercialmente en forma de kit (por ejemplo, el kit MAXBAC®, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las formas solubles de los polipéptidos aquí descritos también pueden producirse en células de insectos, usando polinucleótidos aislados apropiados según se describe más arriba.

[0105] Alternativamente, el polipéptido de IL-21R o IL-21 o proteína de fusión del mismo puede producirse en eucariotas más bajos, tales como la levadura, o en procariotas, tales como bacterias. Las cepas de levadura apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces strains*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas apropiadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. La expresión en bacterias puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. En consecuencia, podrá necesitarse el plegamiento de la proteína recombinante a fin de producir material activo o más activo. Existen varios

métodos que se conocen en la técnica para obtener correctamente proteínas heterólogas plegadas de cuerpos de inclusión bacterianos. Por lo general, estos métodos involucran solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión y luego desnaturalizar totalmente la proteína usando un agente caotrópico. Cuando hay residuos de cisteína presentes en la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína, a menudo resulta necesario lograr el plegamiento en un ambiente que permite la formación correcta de enlaces de disulfuro (un sistema redox). Los métodos generales de plegamiento se divulgan en Kohno (1990) *Meth. Enzym.* 185:187-95, EP 0433225, y en la Patente de EE.UU., N° 5.399.677.

[0106] Una proteína del invento (o un fragmento o fusión de la misma) también puede expresarse como producto de animales transgénicos, por ejemplo, como componente de la leche de vaca, cabra, cerda u oveja transgénica, que son caracterizadas por células somáticas o microbianas que contienen una secuencia de polinucleótidos, por ejemplo, que codifican la IL-21R o IL-21 o proteína de fusión de la misma. Conforme a ello, la proteína puede prepararse mediante el cultivo de células huésped transformadas bajo condiciones de cultivo necesarias para expresar la proteína deseada. Luego, la proteína expresada resultante puede purificarse a partir del medio de cultivo o extractos celulares. Las formas solubles de la proteína pueden purificarse a partir del medio acondicionado. Las formas conjugadas con membrana de la proteína de IL-21R del invento pueden purificarse mediante la preparación de una fracción de membrana total de la célula expresora y la extracción de las membranas con un detergente no iónico, por ejemplo, TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA).

[0107] Los polipéptidos aquí descritos pueden purificarse usando métodos conocidos por las personas expertas en la técnica. Por ejemplo, la proteína del invento puede concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, usando una unidad de ultrafiltración AMICON® o PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). Después del paso de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación, como un medio de filtración de gel. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos pendientes de dietilaminoetilo (DEAE) o polietileneimino (PEI). Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrán, celulosa u otros tipos empleados

comúnmente en la purificación de las proteínas. Los intercambiadores catiónicos apropiados incluyen varias matrices insolubles que integran grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo (por ejemplo, columnas de S-SEPHAROSE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La purificación de la proteína de IL-21R/MU-1 o proteína de fusión del material sobrenadante del cultivo también puede incluir uno o más pasos de columna sobre resinas de afinidad tales como concanavalina A-agarosa, AF-HEPARIN650, heparina-TOYOPEARL® o Cibacron azul 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); o mediante cromatografía de interacción hidrofóbica usando resinas tales como éter fenílico, éter butílico o éter propílico; o mediante cromatografía de inmunoafinidad. Por último, puede emplearse uno o más pasos de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (CLAR-FI), que emplea medios CLAR-FI hidrofóbicos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos pendientes etílicos u otros grupos alifáticos, a fin de purificar además la proteína IL-21R/MU-1 o IL-21. También pueden emplearse en la purificación columnas de afinidad que incluyen anticuerpos a la proteína del invento, de acuerdo con los métodos conocidos. También pueden emplearse algunos o todos los pasos de purificación que anteceden, en varias combinaciones o con otros métodos conocidos, a fin de proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente purificada. Preferiblemente, la proteína aislada se ha purificado de modo que se encuentre sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero.

Producción de anticuerpos

[0108] Los polipéptidos de IL-21 o IL-21R del invento pueden usarse para la inmunización de animales a fin de obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con la IL-21 o IL-21R y regulan la expresión de IL-21 y/o IL-21R, o que regulan el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden obtenerse usando la IL-21 entera o fragmentos de la misma como agentes inmunogénicos. Los agentes inmunogénicos peptídicos pueden contener además un residuo de cisteína en la terminal carboxilo y conjugarse con un hepteno, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH). Pueden generarse agentes inmunogénicos peptídicos adicionales mediante el reemplazo de los residuos de tirosina con residuos de

tirosina sulfatada. Los métodos para la síntesis de dichos péptidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, según se divulga en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-54 y Krstenansky y Mao (1987) *FEBS Lett.* 211:10-16.

[0109] Pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos (AcM) dirigidos contra IL-21 o IL-21R usando ratones transgénicos que llevan los genes de inmunoglobulina humana en vez del sistema murino. Se usan esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés para producir hibridomas que secretan AcM humanos con afinidades específicas para epítopes de una proteína humana (ver, por ejemplo, WO 91/00906, WO 91/10741, WO 92/03918, WO 92/03917, Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856-59, Green et al. (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21, Morrison et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55 y Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3720-24).

[0110] También pueden generarse anticuerpos monoclonales mediante otros métodos conocidos por las personas expertas en la técnica del ADN recombinante. Se ha desarrollado un método ejemplar denominado el método de "exhibición de anticuerpos combinatorios" para identificar y aislar fragmentos de anticuerpos que tienen una especificidad de antígeno particular, y puede utilizarse para producir anticuerpos monoclonales (para descripciones de la exhibición de anticuerpos combinatorios), ver, por ejemplo, Sastry et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5728-32; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-81; y Orlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833-37). Después de inmunizar a un animal con un agente inmunogénico según lo descrito, se clona el repertorio de anticuerpos del pool de células B resultantes. Puede obtenerse la secuencia de ADN de las regiones variables de una población diversa de moléculas de inmunoglobulina usando una mezcla de *primers* de oligómero y RCP. Por ejemplo, pueden usarse *primers* de oligonucleótidos mixtos correspondientes a las secuencias líderes 5' (péptido de señal) y/o marco 1 (FR1), así como un *primer* a un *primer* de región constante conservado 3' para la amplificación por RCP de las regiones variables de cadena pesada y liviana de una diversidad de anticuerpos murinos (Larrick et al. (1991) *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2:106-10).

[0111] También pueden producirse anticuerpos quiméricos, inclusive cadenas de inmunoglobulina quimérica mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, se digiere un gen que codifica la región constante Fc de un anticuerpo monoclonal murino (o de otra especie) con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica el Fc murino y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante de Fc humano (ver PCT/US86/02269; EP 184,187; EP 171,496; EP 173,494; WO 86/01533; Patentes de EE.UU. Nº 4.816.567; EP 125.023; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-43; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:3439-43; Liu et al. (1987), *J. Immunol.* 139:3521-26; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:214-18; Nishimura et al. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-49; y Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59).

[0112] Si así se desea, puede humanizarse un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina mediante métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados, incluso las cadenas de inmunoglobulina humanizada, pueden generarse mediante el reemplazo de secuencias de la región variable Fv que no están involucradas directamente en la conjugación de antígenos, con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. En Morrison (1985) *Science* 229:1202-07; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214-21; y las Patentes de EE.UU., 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, todos los cuales por este medio se incorporan en su totalidad en el presente documento como referencia, se proporcionan métodos generales para la humanización de anticuerpos. Dichos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todas o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de por lo menos una cadena pesada o liviana. Las fuentes de dicho ácido nucleico son conocidas por las personas expertas en la técnica y, por ejemplo, podrán obtenerse de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un objetivo predeterminado. Luego, el ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, podrá clonarse en un vector de expresión apropiado.

[0113] Pueden producirse moléculas o inmunoglobulinas de anticuerpos humanizados o injertados por CDR mediante injerto de CDR o sustitución de CDR, donde uno, dos o

todos los CDR de una cadena de inmunoglobulina pueden reemplazarse. Ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.225.539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-25; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534-36; y Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-60, todos los cuales por este medio se incorporan en su totalidad en el presente documento como referencia. La Patente de EE.UU. N°. 5.225.539 describe un método de injerto de CDR que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados del presente invento (ver también, GB 2188638A). Todos los CDR de un anticuerpo humano específico pueden sustituirse con por lo menos una porción de CDR no humano, o sólo algunos de los CDR pueden reemplazarse con CDR no humanos. Sólo es necesario reemplazar el número de CDR requerido para la conjugación del anticuerpo humanizado con un antígeno predeterminado.

[0114] Los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados, que han sido modificados, por ejemplo, mediante eliminación, adición o sustitución de otras porciones del anticuerpo, por ejemplo, la región constante, también quedan dentro del alcance del invento. Por ejemplo, un anticuerpo puede modificarse de la siguiente manera: (i) la eliminación de la región constante; (ii) el reemplazo de la región constante con otra región constante, por ejemplo, una región constante diseñada para aumentar la vida media, estabilidad o afinidad del anticuerpo, o una región constante de otra especie o clase de anticuerpos; o (iii) la modificación de uno o más aminoácidos en la región constante para alterar, por ejemplo, el número de sitios de glucosilación, la función de las células determinantes, la conjugación con receptores de Fc (FcR) y la fijación de complementos, entre otros.

[0115] Los métodos para la alteración de la región constante de anticuerpos son conocidos en la técnica. Los anticuerpos con función alterada (por ejemplo, afinidad alterada para un ligando determinante, por ejemplo, FcR en una célula, o el componente C2 del complemento) pueden producirse mediante el reemplazo de por lo menos un residuo de aminoácidos en la porción constante del anticuerpo con un residuo diferente (ver, por ejemplo, EP 388.151 A1, Patente de EE.UU. N° 5.624.821 y 5.648.260, , cuyos documentos por este medio se incorporan en su totalidad en el presente documento como referencia). También pueden aplicarse tipos de alteraciones similares a las

inmunoglobulinas murinas e inmunoglobulinas de otras especies. Por ejemplo, es posible alterar la afinidad de una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un IgG, por ejemplo, IgG humana) para un FcR (por ejemplo, Fc gamma R1) o para conjugación de C1q, reemplazando el residuo o residuos especificados con un residuo o residuos que tengan la funcionalidad apropiada en su cadena lateral, o introduciendo un grupo funcional cargado, por ejemplo, glutamato o aspartato, o quizás un residuo no polar aromático, como fenilalanina, tirosina, triptofano o alanina (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.624.821).

[0116] Además, pueden producirse anticuerpos humanos a IL-21 y/o IL-21R usando animales no humanos transgénicos que están modificados de modo de producir anticuerpos plenamente humanos en vez de anticuerpos endógenos del animal, en respuesta a agresión por un antígeno. Ver, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/02602. Los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y liviana en el huésped no humano se han incapacitado y se insertan sitios activos que codifican inmunoglobulina de cadena pesada y liviana en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Luego, se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie mediante el apareamiento cruzado de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. Una realización de dicho animal no humano es un ratón, y se denomina el XENOMOUSE™ (XENORRATÓN) según las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas plenamente humanas. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente del animal después de la inmunización con el agente inmunogénico de interés, por ejemplo, un compuesto de un anticuerpo policlonal, o alternativamente de células B inmortalizadas derivadas del animal, por ejemplo, hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, pueden recuperarse y expresarse genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas a fin de obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse además para obtener análogos de los anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas Fv de cadena sencilla.

[0117] También pueden emplearse otras moléculas conjugantes de proteínas para modular la actividad de IL-21 y/o IL-21R. Dichas moléculas conjugantes de proteínas incluyen fármacos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP™) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). Los SMIP son polipéptidos de cadena sencilla compuestos de un dominio de conjugación para una estructura relacionada como un antígeno, un contrarreceptor o agente similar, un polipéptido de región bisagra que tiene uno o ningún residuo de cisteína y dominios de inmuoglobulina CH2 y CH3 (ver también www.trubion.com). Los SMIP y sus usos y aplicaciones se encuentran en, por ejemplo, las Solicitudes de Patente de EE.UU., publicadas N° 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 y 2005/0238646, y la familia de patentes relacionada, todas las cuales por este medio se incorporan en su totalidad en el presente documento como referencia.

[0118] Según se analiza en este documento, los anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes (preferiblemente anticuerpos monoclonales) que se conjugan con IL-21R o IL-21 o una proteína de fusión de la misma, pueden resultar útiles en el tratamiento de afecciones inmunológicas, por ejemplo, la fibrosis o afecciones asociadas con la fibrosis.

[0119] Conforme a ello, el presente invento se ocupa además de compuestos que integran un anticuerpo que reacciona específicamente con una IL-21 o IL-21R o una proteína de fusión de la misma.

Pruebas de detección

[0120] Los polipéptidos de IL-21R o IL-21 o proteínas de fusión del presente invento también podrán usarse para la detección de agentes capaces de conjugarse con IL-21 o IL-21R, y regular el nivel de IL-21 y/o IL-21R, por ejemplo, el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, el nivel de productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R) y/o el nivel de interacción entre IL-21 e IL-21R. Las pruebas de conjugación usando una proteína del invento, o una pareja de conjugación de la misma, son conocidas en la técnica. Pueden usarse pruebas de detección basadas en células purificadas o basadas en proteínas (libres de células) para identificar las parejas de conjugación y/o ligandos (naturales o sintéticos, por ejemplo,

compuestos de prueba) de los polipéptidos de IL-21R o IL-21 o proteínas de fusión del invento. Por ejemplo, puede inmovilizarse IL-21R en forma purificada en un portador, y determinarse la conjugación de los potenciales ligandos a IL-21R.

Métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso de la fibrosis y trastornos asociados con la fibrosis, relacionados con IL-21

[0121] El presente invento proporciona métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear (por ejemplo, vigilar el curso del tratamiento) de trastornos, es decir, fibrosis o afecciones asociadas con la fibrosis, en relación con IL-21 y/o IL-21R mediante, por ejemplo, la detección y/o medición de la concentración de IL-21 y/o IL-21R, donde la frase "nivel de IL-21 y/o IL-21R" y sus equivalentes incluye, entre otros, (1) el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R productos genéticos de los mismos (por ejemplo, la concentración de proteína de IL-21 y/o IL-21R y/o ARNm en una célula o muestra que interese); (2) el grado de actividad de la proteína de IL-21 y/o la proteína de IL-21R (por ejemplo, expresión de citocina Th2 y/o función en una célula o muestra que interese); y (3) el grado de interacción de IL-21 con IL-21R (por ejemplo, en una célula o muestra que interese). Por ejemplo, el invento proporciona métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear, por ejemplo, mediante la detección de la regulación creciente o decreciente de los productos genéticos y/o la actividad de IL-21 y/o IL-21R, y/o midiendo la interacción de IL-21 con IL-21R, etc. (incluso, entre otros, el uso de tales métodos en sujetos humanos). Los niveles de IL-21 y/o IL-21R también pueden medirse en una célula o muestra que interese, para producir u obtener un valor de referencia para IL-21 y/o IL-21R, o tal nivel de referencia puede obtenerse por otros métodos o puede ser generalmente conocido por una persona versada en la técnica. Estos métodos pueden ser realizados, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico, que contengan al menos uno en el grupo que comprende un polinucleótido de IL-21 o IL-21R (o un fragmento del mismo); un polipéptido de IL-21 o IL-21R (o fragmentos y/o proteínas de fusión de los mismos); un anticuerpo a un polipéptido de IL-21 o IL-21R (o sus derivados, o sus fragmentos

conjugantes de antígeno); o moduladores de polinucleótidos y/o polipéptidos de IL-21 o IL-21R como se describió en este documento, que pueden usarse convenientemente, por ejemplo, en un ambiente clínico.

[0122] "Diagnóstico" o "diagnosticar" significan identificar la presencia o ausencia de un estado patológico. Los métodos de diagnóstico incluyen, entre otros, detectar la regulación creciente del nivel de IL-21 y/o IL-21R mediante la determinación de cantidades de prueba de los productos genéticos (por ejemplo, ARN, ADNc o polipéptido, incluso sus fragmentos) de IL-21 y/o IL-21R, mediante la medida de la actividad de IL-21 y/o IL-21R, y/o midiendo el grado de interacción de IL-21 con IL-21R, en una muestra biológica tomada de un sujeto (mamífero humano o no humano), y comparando la cantidad de prueba con, por ejemplo, una cantidad o rango de cantidades normales (por ejemplo, una cantidad o rango de cantidades de un individuo o individuos que se sabe que no sufren de los trastornos relacionados con IL-21, o de un individuo que se sabe que no sufre de fibrosis o de una afección asociada con fibrosis). Aunque un método diagnóstico en particular tal vez no proporcione un diagnóstico definitivo de los trastornos relacionados con IL-21, es suficiente si el método ofrece una indicación positiva que ayude a efectuar un diagnóstico.

[0123] Además, el presente invento proporciona métodos para pronosticar tales trastornos al detectar, por ejemplo, la regulación creciente de niveles de IL-21 y/o IL-21R, por ejemplo, al detectar la regulación creciente y/o la actividad de productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R, y/o midiendo el grado de interacción de IL-21 con IL-21R, etc. "Pronóstico" o "pronosticar" significa prever el desarrollo y/o la gravedad probables de una afección patológica. Los métodos para pronosticar incluyen determinar la cantidad de prueba de un producto genético de IL-21 y/o IL-21R en una muestra biológica de un sujeto y comparar dicha cantidad de prueba con una cantidad o rango de cantidades de pronóstico (es decir, una cantidad o rango de cantidades provenientes de individuos con gravedades variables de los trastornos, es decir, fibrosis y/o a afección asociada con fibrosis, por ejemplo, relacionadas con IL-21) para el nivel de IL-21 y/o IL-21R. Varias cantidades relacionadas con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una muestra de prueba guardan uniformidad con ciertos pronósticos para trastornos, por ejemplo, fibrosis

o afección o trastornos asociados con la fibrosis, relacionados con IL-21 y/o IL-21R. La detección de una cantidad y/o nivel de IL-21 y/o IL-21R a un valor de pronóstico particular, proporciona un pronóstico para el sujeto.

[0124] El presente invento también proporciona métodos para monitorear el progreso o el curso de dichos trastornos relacionados con IL-21 al detectar, por ejemplo, la regulación creciente de los niveles de IL-21 y/o IL-21R, por ejemplo, detectando la regulación creciente de los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R, la actividad y/o la interacción de IL-21 con IL-21R. Los métodos de monitoreo incluyen determinar las cantidades de prueba de un producto genético de IL-21 en muestras biológicas tomadas de un sujeto una primera y segunda vez, y comparando las cantidades. Un cambio en la cantidad de un producto genético de IL-21 y/o IL-21R entre la primera y segunda vez indica un cambio en el curso de un trastorno relacionado con IL-21 y una reducción en la cantidad indica la remisión de dichos trastornos y un aumento en la cantidad indicando la progresión de dichos trastornos. Tales ensayos de monitoreo son siempre útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica en particular, en pacientes tratados por fibrosis o por un trastorno asociado con la fibrosis.

Medida del nivel de IL-21 y/o IL-21R

[0125] El nivel de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, el nivel de los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21, la actividad y/o la interacción) en métodos del invento (por ejemplo, métodos para seleccionar y/o identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con fibrosis, los métodos para diagnosticar, pronosticar y/o monitorear el progreso de la fibrosis o de una afección asociada con fibrosis, y los métodos para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con fibrosis) bosquejados en este documento pueden medirse en una variedad de muestras biológicas, entre ellas, líquidos corporales (como sangre entera, plasma y orina), células (como células enteras, fracciones de células y extractos de células) y otros tejidos. Las muestras biológicas incluyen también secciones de tejidos, tales como biopsias y secciones congeladas, tomadas para fines histológicos. Las muestras biológicas preferidas incluyen sangre, plasma, linfa, biopsias de tejidos, orina, RCL (líquido cefalorraquídeo), líquido sinovial y LBA (lavado broncoalveolar). Se

apreciará que el análisis de una muestra biológica no requiere, necesariamente, extraer células o tejidos del sujeto. Por ejemplo, los agentes rotulados en forma apropiada, que se conjugan con productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R (como, anticuerpos, ácidos nucleicos) pueden administrarse a un sujeto y visualizarse (cuando se han unido a su objetivo) usando tecnología estándar de obtención de imágenes (por ejemplo, TAC, RMN y PET).

[0126] En los métodos para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis, en los métodos para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto y en los ensayos y métodos diagnósticos, pronósticos y de monitoreo del presente invento, se detecta y se mide el nivel de IL-21 y/o IL-21R para obtener una cantidad de prueba. La cantidad de prueba se compara entonces, por ejemplo, con una cantidad o rango de cantidades normales. Por ejemplo, una cantidad superior (por ejemplo, un nivel mayor) que la cantidad o rango de cantidades normales es un signo positivo en el diagnóstico de los trastornos relacionados con IL-21.

[0127] Las cantidades normales o niveles basales de IL-21 y/o IL-21R pueden determinarse para cualquier tipo de muestra y población en particular. Generalmente, los niveles basales (normales) de IL-21 y/o IL-21R se determinan midiendo los niveles respectivo de IL-21 y/o IL-21R en un tipo de muestra biológica obtenido de sujetos normales (es decir, sanos). Como alternativa, los niveles normales de IL-21 y/o IL-21R pueden determinarse midiendo la cantidad en células o tejidos sanos tomados del mismo sujeto de quien se tomaron las células o tejidos de prueba enfermos (o posiblemente enfermos). El nivel de IL-21 y/o IL-21R (sea la cantidad normal o la cantidad de prueba) puede determinarse o expresarse para una célula, para la proteína total o para el volumen. Para determinar la cantidad celular de una muestra, se puede medir el nivel de un producto genético constitutivamente expresado, u otro producto genético expresado a niveles conocidos, en las células del mismo tipo de la muestra biológica obtenida.

[0128] Se apreciará que los métodos de ensayo del presente invento no requieren, necesariamente, medir los valores absolutos para el nivel de IL-21 y/o IL-21R ya que los valores relativos son suficientes para muchas aplicaciones de estos métodos. También se

apreciará que, además de la cantidad o la abundancia de los niveles de IL-21 y/o IL-21R, pueden identificarse variantes o niveles anormales de IL-21 y/o IL-21R o sus patrones de expresión (por ejemplo, transcriptos mutados, polipéptidos truncados) haciendo una comparación con los niveles y patrones de expresión normales.

[0129] Que el nivel de un gen o proteína en particular, en dos muestras aumentade (es decir, sea mayor) o se reduzca (es decir, menor), por ejemplo, significativamente superior o significativamente inferior a un nivel dado, respectivamente, depende del gen en sí e *inter alia,* su variabilidad en cuanto a expresión, actividad y/o interacción con un ligando entre diferentes individuos o diferentes muestras. Está dentro de la pericia en la técnica, determinar si los niveles de IL-21 y/o IL-21R son significativamente similares o diferentes entre las muestras. Los factores, tales como la variación genética entre los individuos, especies, órganos, tejidos o células, se pueden tener en cuenta (cuando y donde sea necesario) para determinar si el nivel de IL-21 y/o IL-21R entre dos muestras aumentó o se redujo. Como resultado de la heterogeneidad natural en los niveles de IL-21 y/o IL-21R entre los individuos, especies órganos, tejidos o células, no se pueden definir frases tales como "significativamente superior" o "significativamente inferior", como un porcentaje o valor preciso, sino más bien puede ser verificado por una persona con pericia en la técnica durante la práctica del invento. Los métodos particulares de detección y medida de los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R, la actividad y la interacción se describen en este documento.

Ensayos para medir los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R

[0130] Los métodos del presente invento implican detectar y determinar cuantitativamente el nivel de IL-21 y/o IL-21R, por ejemplo, el nivel de los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, y/o el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R, en muestras biológicas. Los productos genéticos de IL-21 y IL-21R incluyen ARNm y polipéptidos, y ambos pueden medirse usando métodos conocidos para los expertos en la técnica.

[0131] Por ejemplo, el ARNm puede detectarse directamente y determinarse cuantitativamente usando ensayos basados en hibridación, como la hibridación Northern,

hibridación *in situ,* ensayo de *dot blot* y *slot blot*, y conjuntos de oligonucleótidos. Los ensayos basados en hibridación se refieren a ensayos en que se hibrida una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico objetivo. en algunos formatos, el objetivo, la sonda o ambos se inmovilizan. El ácido nucleico inmovilizado puede ser ADN, ARN u otro oligonucleótido o polinucleótido y puede comprender nucleótidos naturales o no naturales, análogos de nucleótidos, o esqueletos. Los métodos para seleccionar secuencias de sonda de ácido nucleico para usar en el presente invento (por ejemplo, basándose en la secuencia de ácido nucleico de IL-21) son conocidos en la técnica.

[0132] Como alternativa, el ARNm puede ser amplificado antes de la detección y determinación cuantitativa. Tales ensayos basados en amplificación son conocidos en la técnica, e incluyen la reacción en cadena de polimerasa (RCP), RCP-transcripción inversa (RCP-TI), RCP-ensayo inmunosorbente unido a enzima (RCP-ELISA), y reacción en cadena de ligasa (RCL). Los *primers* y sondas para producir y detectar productos genéticos amplificados de IL-21 (por ejemplo, ARNm o ADNc) pueden ser fácilmente diseñados y producidos sin experimentación indebida por los expertos en la técnica, basándose en las secuencias de ácido nucleico de IL-21 y/o IL-21R. Los productos genéticos amplificados de IL-21 y/o IL-21R pueden analizarse directamente, por ejemplo, mediante electroforesis de gel, por hibridación a una sonda de ácido nucleico; por secuenciado; por detección de una señal fluorescente, fosforescente o radiactiva, o por cualquiera de una variedad de métodos conocidos. Además, los expertos en la técnica conocen métodos para aumentar la señal producida por la amplificación de las secuencias de ácido nucleico objetivos. Una persona con pericia en la técnica reconocerá que, cualquiera sea el método de amplificación que se use, se pueden usar diferentes métodos cuantitativos conocidos en la técnica (por ejemplo, RCP cuantitativa) si se desea una determinación cuantitativa de los productos genéticos.

[0133] Un polipéptido de IL-21 y/o IL-21R (o sus fragmentos) puede detectarse usando varios ensayos inmunológicos conocidos, empleando los respectivos anticuerpos anti-IL-21 y/o IL-21R que pueden ser generados como se describe en este documento. Los ensayos inmunológicos se refieren a ensayos que utilizan un anticuerpo (por ejemplo, policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, scFv, y/o sus fragmentos) que se

conjugue específicamente, por ejemplo, a un polipéptido de IL-21 (o un fragmento del mismo). Tales ensayos inmunológicos conocidos, adecuados para la práctica del presente invento, incluyen ELISA, radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) e inmunotransferencia Western. Cualquier técnico reconocerá que un polipéptido de IL-21 también puede ser detectado usando un polipéptido o polipéptidos rotulados de IL-21R. Un experto en la técnica entenderá que los métodos mencionados pueden aplicarse a trastornos relacionados con IL-21, especialmente a fibrosis o una afección asociada con fibrosis.

Ensayos para medir la actividad de IL-21 y/o IL-21R

[0134] La actividad de IL-21/IL-21R (por ejemplo, en respuesta a antagonistas de IL-21/IL-21R como moduladores de la producción de citocina y proliferación/diferenciación celular) pueden ensayarse usando uno de varios ensayos rutinarios de proliferación celular dependientes de factores, para líneas celulares que incluyen, sin limitaciones, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK.

[0135] Se describen ensayos para proliferación de células T o timocitos, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds.) Greene Pub. Assoc. & Wiley-Interscience, NY, NY (1991) (Capítulo 3, "In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function" y Capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Takai et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3494-500; Bertagnolli et al. (1990) *J. Immunol.* 145:1706-12; Bertagnolli et al. (1991) *Cell. Immunol.* 133:327-41; Bertagnolli et al. (1992) *J. Immunol.* 149:3778-83; Bowman et al. (1994) *J. Immunol.* 152:1756-61. Los ensayos para producción de citocina y/o proliferación de células esplénicas, células de ganglios linfáticos o timocitos, se describen, por ejemplo, en "Polyclonal T cell stimulation" Kruisbeek y Shevach en *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) págs. 3.12.1-14, John Wiley y Sons, Toronto (1994); y "Measurement of mouse y human Interferon gamma" Schreiber, R.D. in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) págs. 6.8.1-8, John Wiley y Sons, Toronto (1994).

[0136] Los ensayos para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas se describen, por ejemplo, en "Measurement of Human y Murine Interleukin 2 y Interleukin 4" Bottomly et al. en *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) págs. 6.3.1-12, John Wiley y Sons, Toronto (1991); deVries et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173:1205-11; Moreau et al. (1988) *Nature* 336:690-92; Greenberger et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2931-38; "Measurement of mouse y human interleukin 6" Nordan, R. en *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) págs. 6.6.1-5, John Wiley y Sons, Toronto (1991); Smith et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 83:1857-61; "Measurement of human Interleukin 11" Bennett et al. en *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 Coligan et al. (eds.) pág. 6.15.1, John Wiley y Sons, Toronto (1991); "Measurement of mouse and human Interleukin 9" Ciarletta et al. en *Current Protocols in Immunology,* Vol. 1. Coligan et al. (eds.) pág. 6.13.1, John Wiley y Sons, Toronto (1991).

[0137] Los ensayos para respuestas clonales de células T a los antígenos (que identificarán, entre otras, a las proteínas que afectan las interacciones entre APC-células T, así como los efectos directos en células T midiendo la proliferación y producción de citocina) incluyen, por ejemplo, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds.) Greene Pub. Assoc. y Wiley-Interscience, NY, NY (1991) (Capítulo 3, "In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function"; Capítulo 6, "Cytokines y their cellular receptors"; Capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Weinberger et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6091-95; Weinberger et al. (1981) *Eur. J. Immunol.* 11:405-11; Takai et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3494-500; Takai et al. (1988) *J. Immunol.* 140:508-12.

Ensayos para medir la interacción de IL-21 con IL-21R

[0138] Métodos para detectar y/o medir el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R son conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichas interacciones entre una citocina y su receptor pueden detectarse y/o medirse, entre otras, con técnicas tales como ELISA, inmunotransferencia Western, inmmunoprecipitación, análisis de Biacore, etc.

Composiciones farmacéuticas

[0139] En un aspecto, el invento presenta un método para tratar, aliviar o prevenir un trastorno relacionado con IL-21, es decir, fibrosis o una afección asociada con fibrosis. El método puede comprender el contacto de una población de células (por ejemplo, administrando a un sujeto que sufre de fibrosis o un trastorno asociado con la fibrosis o que corre riesgo de sufrirlo) con un agente que reduce el nivel de actividad de IL 21 y/o IL 21R en el sujeto, por ejemplo, un antagonista de IL-21/IL-21R [por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-21R, un anticuerpo anti-IL-21, un fragmento conjugante de antígeno o un anticuerpo anti-IL-21R, un fragmento conjugante de antígeno de un anticuerpo anti-IL-21 y un fragmento soluble de un IL-21R (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que comprende los aminoácidos 1-538 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 20-538 de la SEC. ID Nº 2, los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº 2, los aminoácidos 20-235 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 1-236 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 20-236 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 1-529 de la SEC. ID Nº: 5, los aminoácidos 20-529 de la SEC. ID Nº: 5, los aminoácidos 1-236 de la SEC. ID Nº: 5 y los aminoácidos 20-236 de la SEC. ID Nº: 5)] en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de IL-21 en la célula o la población.

[0140] Los antagonistas de IL-21/IL-21R para el tratamiento de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis pueden usarse como una composición farmacológica cuando se combinan con un portador farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede contener, además de los antagonistas de IL-21/IL-21R-y el portador, varios diluyentes, rellenos, sales, *buffers*, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la vía de administración y generalmente son conocidos en la técnica.

[0141] La composición farmacológica del invento puede tomar la forma de un liposoma, en el cual se combina un antagonista o antagonistas de IL-21/IL-21R, además de otros portadores farmacéuticamente aceptables, agentes anfipáticos, tales como lípidos, que

existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas lamelares, que existen en solución acuosa. Los lípidos adecuados para las fórmulas liposómicas incluyen, entre otros, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de tales fórmulas liposómicas está dentro del nivel de pericia en la técnica, como se divulga, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nº 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 4.737.323, todas las cuales se incorporan en este documento como referencia, en su totalidad.

[0142] En el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacológica o del método, que es suficiente para mostrar un beneficio subjetivo significativo, por ejemplo, alivio o reducción de los síntomas, prevención, curación o aumento en la tasa de curación de tales afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a dicho ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos, que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea administrados en combinación, serialmente o simultáneamente.

[0143] En la práctica del método de tratamiento o el uso del presente invento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-21/IL-21R se administra a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Un antagonista o antagonistas de IL-21/IL-21R puede administrarse de acuerdo con el método del invento ya sea solo o combinado con otras terapias, como se describe en mayor detalle en el presente documento. Cuando se administra junto con uno o más agentes, un antagonista de IL-21 y/o IL-21R puede administrarse simultáneamente con el segundo agente, o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico de cabecera decidirá cuál será la secuencia apropiada de la administración de un antagonista de IL-21/IL-21R en combinación con otros agentes.

[0144] La administración de un antagonista de IL-21/IL-21R usado en una composición farmacológica del presente invento o la práctica de un método del presente invento, puede realizarse de diferentes formas convencionales, como ingestión oral, inhalación o inyección cutánea, subcutánea o intravenosa. A veces, se prefiere la administración

intravenosa al sujeto. Cuando se administra por vía oral una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R, el agente conjugante estará en forma de una tableta, cápsula, solución o elixir. Cuando se administra en forma de tableta, la composición farmacológica del invento puede, además, contener un portador sólido tal como una gelatina o un adyuvante. La tableta, cápsula y polvo contienen entre el 5 y el 95% del agente conjugante y, preferiblemente entre el 25 y el 90% de agente conjugante. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un portador líquido, como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, como aceite de maní (aunque siempre recordando la frecuencia de alergias al maní en la población), aceite mineral, aceite de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacológica puede, además, contener solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos, o glicoles, tales como el glicol etilénico, glicol propilénico o glicol polietilénico. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacológica contiene entre 0,5 y 90% en peso del agente conjugante, y preferiblemente, entre aproximadamente el 1 y el 50% del agente conjugante.

[0145] Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-21/IL-21R por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente conjugante estará en forma de una solución acuosa sin pirógenos, parenteralmente aceptable. La preparación de tales soluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo la debida cuenta del pH, la isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro de las habilidades en la técnica. Una composición farmacológica preferida para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, debe contener, además de un agente conjugante, un vehículo isotónico, tal como cloruro de sodio inyectable, Ringer inyectable, dextrosa inyectable, dextrosa y cloruro de sodio inyectable, lactato de Ringer inyectable u otro vehículo conocido en la técnica. La composición farmacológica del presente invento puede contener también agentes estabilizantes, conservadores, *buffers*, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los versados en la técnica.

[0146] La cantidad de un antagonista de IL-21/IL-21R en la composición farmacológica del presente invento dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección tratada, y de la naturaleza de tratamientos que el sujeto haya recibido previamente. Finalmente, el

médico de cabecera decidirá la cantidad de agente conjugante con que tratará a cada sujeto individual. Inicialmente, el médico de cabecera administrará dosis bajas de agente conjugante y observará la respuesta del sujeto. Pueden administrarse dosis mayores del agente conjugante hasta obtener el efecto terapéutico óptimo para el sujeto y, en ese punto, la posología generalmente no se aumenta más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para practicar el método del presente invento deban contener aproximadamente 0,1 μg a unos 100 mg de antagonista de IL-21/IL-21R por kg de peso corporal.

[0147] La duración del tratamiento intravenoso usando la composición farmacológica del presente invento variará dependiendo de la gravedad de la enfermedad tratada y el estado y respuesta idiosincrática potencial de cada sujeto individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de un antagonista de IL-21/IL-21R puede variar entre las 12 y 24 horas de administración i.v. continua. También se contempla el tratamiento subcutáneo (s.c.) usando una composición farmacológica del presente invento. Estos tratamientos pueden administrarse de manera diaria, semanal o, más preferiblemente, bisemanal o mensual. También se contempla que cuando el antagonista de IL-21/IL-21R es una molécula pequeña (por ejemplo, para administración por vía oral), los tratamientos pueden administrarse diariamente, dos veces al día, tres veces al día, etc. Finalmente, el médico de cabecera decidirá cuál será la duración apropiada del tratamiento i.v. o s.c., o el tratamiento con una molécula pequeña, y el tiempo de administración del tratamiento usando la composición farmacológica del presente invento.

[0148] Se espera que el polinucleótido y las proteínas del presente invento exhiban uno o más de los usos o actividades biológicas (incluso los asociados con los ensayos citados en este documento) que se identifican más adelante. Los usos o actividades descritos para las proteínas, anticuerpos o polinucleótidos del presente invento pueden ser proporcionados por la administración o el uso de tales proteínas o anticuerpos, o por la administración o el uso de los polinucleótidos que codifican tales proteínas o anticuerpos (tales, por ejemplo, como las terapias o vectores de genes adecuados para introducir ADN).

Tratamiento combinado

[0149] En una realización, se administra una composición farmacológica que comprende al menos un antagonista de IL-21R/IL-21, por ejemplo, un anticuerpo a IL-21R/IL-21 y al menos un agente terapéutico, en tratamiento combinado. Tal terapia es útil para el tratamiento de afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos inmunitarios y/o inflamatorios. El término "en combinación", en este caso, significa que la composición antagonista y el agente terapéutico se administran en forma sustancialmente contemporánea, sea simultánea o secuencialmente. Si se administran secuencialmente, al inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos puede ser todavía detectable a concentraciones eficaces, en el sitio de tratamiento.

[0150] Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir al menos un antagonista de IL-21R/IL-21 coformulado y/o coadministrado con al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes adicionales pueden incluir al menos un inhibidor de citocina, inhibidor de factor de crecimiento, agente inmunodepresor, agente antinflamatorio, inhibidor metabólico, inhibidor enzimático, agente citotóxico o agente citostático, como se describe más detalladamente más adelante. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente, posologías menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Además, los agentes terapéuticos divulgados aquí, actúan sobre vías que se diferencian de la vía de IL-21/IL-21R y, por lo tanto, se espera que fomenten y/o actúen sinérgicamente con los efectos de los antagonistas de IL-21R/IL-21.

[0151] Los agentes terapéuticos usados en combinación con antagonistas de IL-21R/IL-21 pueden ser los agentes que interfieren en diferentes etapas de la respuesta autoinmunitaria y respuesta inflamatoria subsiguiente. En una realización, al menos un antagonista de IL-21R/IL-21 descrito en este documento puede coformularse y/o coadministrarse con al menos un antagonista de citocina y/o factor de crecimiento. Los antagonistas de citocina y/o factor de crecimiento pueden incluir receptores solubles, inhibidores peptídicos, moléculas pequeñas, fusiones de ligandos, anticuerpos (que conjuguen citocinas o factores de crecimiento o sus receptores u otras moléculas de la superficie celular) y "citocinas antinflamatorias" y sus agonistas.

[0152] Los ejemplos no limitantes de los agentes que pueden usarse en combinación con los antagonistas de IL-21R/IL-21 que se describen, incluyen entre otros, antagonistas de, al menos, una interleucina (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 e IL-22); citocina (por ejemplo, FNTα, LT, EMAP-II y GM-CSF), o factor de crecimiento (por ejemplo, FGF y PDGF). Los agentes pueden también incluir, entre otros, antagonistas de al menos un receptor para una interleucina, citocina y factor de crecimiento. Los antagonistas de IL-21R/IL-21 pueden también combinarse con inhibidores, por ejemplo, de anticuerpos a, moléculas de superficie celular, como CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 [por ejemplo, el inhibidor de CD20 rituximab (RITUXAN®)], CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90 o sus ligandos, entre ellos, CD154 (gp39 o CD40L), o LFA-1/ICAM-1 y VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al. (2002) *Med. Res. Rev.* 22:146-67). Otros compuestos que pueden usarse en combinación con los antagonistas de IL-21R/IL-21 descritos aquí, pueden incluir antagonistas de los receptores para IL-1, IL-12, FNTα, IL-15, IL-17, IL-18 e IL-22.

[0153] Los ejemplos de agentes útiles en tratamientos combinados con un antagonista de IL-21R/IL-21 incluyen antagonistas de IL-12 (como anticuerpos que conjugan IL-12 (ver, por ejemplo, WO 00/56772); inhibidores del receptor de IL-12 (tales como anticuerpos al receptor de IL-12), y receptor de IL-12 soluble y sus fragmentos. Los ejemplos de antagonistas de IL-15 incluyen anticuerpos contra IL-15 o su receptor, fragmentos solubles del receptor de IL-15 y proteínas conjugantes de IL-15. Los ejemplos de antagonistas de IL-18 incluyen anticuerpos a IL-18, fragmentos solubles del receptor de IL-18 y proteínas conjugantes de IL-18 (IL-18BP, Mallat et al. (2001) *Circ. Res.* 89:E41-45). Los ejemplos de antagonistas de IL-1 incluyen inhibidores de la enzima convertidora de interleucina 1 (ECI) (tales como Vx740), antagonistas de IL-1 [por ejemplo, IL-1RA (anakinra (KINERET™), Amgen)], sIL-1RII (Immunex), y anticuerpos contra el receptor de IL-1.

[0154] Los ejemplos de antagonistas del FNT incluyen anticuerpos a FNT (por ejemplo, FNTα humano, como D2E7 (anticuerpo humano anti-FNTα, Patente de EE.UU. Nº 6.258.562, HUMIRA™, Abbott Labs); CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpos

humanizados anti-FNTα, Celltech/Pharmacia); cA2 (anticuerpo quimérico anti-FNTα, REMICADE™, Centocor), y fragmentos de anticuerpo anti-FNT (por ejemplo, CPD870). Otros ejemplos incluyen fragmentos y derivados de receptor de FNT soluble (por ejemplo, p55 ó p75 humanos) tales como p55 kdTNFR-IgG (proteína de fusión de IgG, de receptor 55 kD FNT, LENERCEPT™) y 75 kdTNFR-IgG [proteína de fusión de IgG de receptor 75 kD FNT, ENBREL™ (etanercept - Immunex)]. Ver, por ejemplo, van der Poll et al. (1997) *Blood.* 89:3727-34; Mori et al. (1996) *J. Immunol.* 157:3178-82. Otros ejemplos incluyen antagonistas enzimáticos [por ejemplo, inhibidores de enzima convertidora de FNTα (TACE) tales como derivado de ácido alfa-sulfonil hidroxámico (WO 01/55112) o inhibidores de N-hidroxiformamida (GW 3333, -005 ó –022, GlaxoSmithKline) y FNT-bp/s-TNFR (proteína conjugante de FNT soluble, ver, por ejemplo, Lantz et al. (1991) *J Clin Invest.* 88:2026-31; Kapadia et al. (1995) *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Phys.* 268:H517-25]. Los antagonistas de FNT pueden ser un receptor de FNT soluble (por ejemplo, fragmentos y derivados de p55 o p75 humanos) tales como 75 kdTNFR-IgG, e inhibidores de enzima convertidora de FNTα (TACE).

[0155] En otras realizaciones, los antagonistas de IL-21R/IL-21 descritos en este documento, pueden administrarse en combinación con al menos uno de los siguientes: antagonistas de IL-13, como los receptores de IL-13 y/o anticuerpos anti-IL-13; y antagonistas de IL-2 tales como las proteínas de fusión de IL-2 [por ejemplo, DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 fabricadas por Seragen, ver, por ejemplo, Sewell et al. (1993) *Arthritis Rheum.* 36:1223-33] y anticuerpos anti-IL-2R [por ejemplo, anticuerpo anti-Tac (anticuerpo humanizado, Protein Design Labs, ver Junghans et al. (1990) *Cancer Res.* 50:1495-502]. Otra combinación incluye antagonistas de IL-21R/IL-21 combinados con inhibidores no agotadores anti-CD4 tales como IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4, GlaxoSmithKline). Todavía otras combinaciones incluyen antagonistas de IL-21R/IL-21 con antagonistas de pasaje coestimulante de CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) (tales como anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonísticos); ligando de glucoproteína P-selectina (PSGL) e inhibidores de PSGL-1 (tales como anticuerpos a PSGL y/o PSGL-1 e inhibidores de moléculas pequeñas); agentes de depleción de células T y B (tales como anticuerpos anti-CD4 o anti-CD22) y citocinas antinflamatorias y sus

agonistas (por ejemplo, anticuerpos). Las citocinas antinflamatorias pueden incluir IL-4 (por ejemplo, Schering-Plough Biopharma); IL-10 (por ejemplo, SCH 52000, IL-10 recombinante, Schering-Plough Biopharma); IL-11; IL-13, y TGFα o sus agonistas (por ejemplo, anticuerpos agonistas).

[0156] En otras realizaciones, al menos un antagonista de IL-21R/IL-21 puede coformularse y/o coadministrarse con al menos un fármaco antinflamatorio, inmunodepresor, inhibidor metabólico e inhibidor enzimático. Los ejemplos no limitantes de los fármacos o inhibidores que pueden usarse en combinación con los antagonistas de IL-21R/IL-21 descritos en este documento incluyen, entre otros, al menos uno de los fármacos antinflamatorios no esteroides (FAINE), entre ellos, aspirina, salsalato, diflunisal, ibuprofeno, ketoprofeno, nabumetona, piroxicam, naproxeno, diclofenaco, indometacina, sulindac, tolmetina, etodolaco, ketorolaco, oxaprozina, tenidap, meloxicam, piroxicam, aceclofenaco, tolmetina, ácido tiaprofénico, nimesulida, etc.); sulfasalacina, corticoesteroides (como prednisolona), fármacos antinflamatorios supresores de la citocina (FAISC), inhibidores de la biosíntesis nucleótida (como inhibidores de la biosíntesis de purina, por ejemplo, antagonistas de folato, como el metotrexato; e inhibidores de la biosíntesis de pirimidina, por ejemplo inhibidor de dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) tal como leflunomida [ver, por ejemplo, Kraan et al. (2004) *Ann. Rheum. Dis.* 63:1056-61]. Los agentes terapéuticos para usar en combinación con antagonistas de IL-21/IL-21R pueden incluir uno o más FAINE, FAISC, inhibidores de DHODH (como leflunomida) y antagonistas de folato (como metotrexato).

[0157] Ejemplos de agentes adicionales que pueden usarse en combinación con antagonistas de IL-21/IL-21R pueden incluir al menos uno entre: corticoesteroides (orales, inhalados e inyectables locales) inmunodepresores [como ciclosporina y tacrolimus (FK-506)]; un inhibidor de TORm [como sirolimus (rapamicina) o un análogo y/o derivado de rapamicina, por ejemplo, derivado de éster de rapamicina, como CCI-779 (ver, por ejemplo, Elit (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1249-53; Huang et al. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:295-304]; un agente que interfiere con la señalización de citocinas proinflamatorias, como FNTα e IL-1 (por ejemplo, un inhibidor de IRAK, NIK,

IKK, p38 o MAP cinasa); inhibidores de TPL-2, Mk-2 y NFκb; inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, etc., y sus variantes); inhibidores de la fosfodiesterasa (como Rolipram); inhibidores de la fosfolipasa [por ejemplo, un inhibidor de fosfolipasa 2 citosólica (PLA2c) como análogos de trifluorometicetona (Patente de EE.UU. N° 6.350.892)]; inhibidores del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (FCEV); inhibidores del receptor de FCEV; inhibidores de la angiogénesis; RAGE y RAGE soluble; agonistas de receptor beta de estrógeno (RBE) antagonistas de RBE-NFκb; interferón-α (por ejemplo, IFNα-1a e IFNα-1b); copaxona, y corticoesteroides.

[0158] Otros agentes terapéuticos útiles que pueden combinarse con un antagonista de IL-21R/IL-21 incluyen: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de la lipoxygenasa; mesalamina; olsalazina; balsalacida; antioxidantes; inhibidores del tromboxano; factores de crecimiento, inhibidores de la elastasa; compuestos piridinil-imidazólicos; profármacos de prednisolona conjugados con glucurónido o dextrán; dexametasona o budesónido; fosforotioatos oligodesoxinucleótidos antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor de complemento 1 soluble (TP10; T Cell Sciences, Inc.); mesalacina de liberación lenta; antagonistas del factor activante de plaquetas (FAP); ciprofloxacina; lignocaína; ciclosporina A; hidroxicloroquina (PLAQUENIL™); minociclina (MINOCIN™), y anakinra (KINERET™).

[0159] La elección de un agente terapéutico en particular, para la administración combinada con un antagonista de IL-21/IL-21R, del invento, dependerá mayormente de factores tales como el sujeto en particular, el objetivo deseado y la duración del tratamiento que se ha escogido. Tales decisiones se encuentran bien dentro de las habilidades y conocimientos de las personas versadas en la técnica.

[0160] Entre los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden combinarse con un antagonista de IL-21R/IL-21 se encuentran: 6-mercaptopurinas (6-MP); azatioprina; sulfasalacina; mesalacina; olsalacina; cloroquina, hidroxicloroquina (PLAQUENIL®); penicilamina; aurotiomalato (intramuscular y oral); azatioprina; colchicina; agonistas de adrenorreceptores beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeterol); xantinas (teofilina, aminofilina); cromoglicato; nedocromil; ketotifeno; ipratropium y oxitropium; mofetil

micofenolato; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento y agentes adrenérgicos.

[0161] En una realización, puede usarse un antagonista de IL-21R/IL-21 en combinación con uno o más anticuerpos dirigidos contra otros objetivos involucrados en la regulación de las respuestas inmunológicas. Los ejemplos no limitantes de los agentes para el tratamiento o prevención de respuestas inmunológicas en los cuales puede combinarse un antagonista de IL-21R/IL-21 del invento, incluyen los siguientes: anticuerpos contra otras moléculas superficiales celulares, incluso, entre otros, CD25 (interleucina-2 receptor-a), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28, CTLA4, ICOSL, ICOS, CD80 (B7.1) y/o CD86 (B7.2). En otra realización, se usa un antagonista de IL-21R/IL-21 en combinación con uno o más agentes inmunodepresores generales, por ejemplo, la ciclosporina A o FK506. En otra realización, se usa un antagonista de IL-21/IL-21R en combinación con un agonista de CTLA4, [por ejemplo, CTLA4 Ig – abatacept (ORENCIA®)].

[0162] El contenido íntegro de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas en toda esta solicitud se incorporan en su totalidad por este medio en el presente documento, como referencia.

EJEMPLOS

[0163] Los siguientes Ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas del invento y de ninguna manera limitan el alcance del invento. Una persona con conocimientos normales de la técnica reconocerá que el alcance del invento abarca numerosas realizaciones adicionales.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Ejemplo 1.1: Ratones, infecciones parasitarias y preparación de antígenos

[0164] Se obtuvieron ratones hembras o machos C57BL/6, C57BL/6/Ai-IL-10KO/IL-4KO y C57BL/6Ai-IL-10KO/IL-12KO de Taconic Farms (Germantown, NY) (Hoffmann et al. (1999) *J. Immunol.* 163:927-938). Se obtuvieron parejas apareadas de ratones IL-21R$^{-/-}$ en un fondo de C57BL/6 de una colonia de apareamiento albergada en la Facultad de Salud Pública de Harvard (Boston, MA) [Kasaian et al. (2002)

Immunity 16:559-69]. Todos los ratones se albergaron bajo condiciones específicas sin patógenos en un centro aprobado por la Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El comité de cuidado y uso de animales de NIAID aprobó todos los procedimientos experimentales. Se extrajeron huevos *S. mansoni* de los hígados de los ratones infectados (Biomedical Research Institute, Rockville, MD) según se describió anteriormente [Wynn et al. (1995) *Nature* 376:594-96]. Para la inducción de granulomas pulmonares sincrónicos, se administraron a los ratones 5.000 huevos por vía intravenosa (i.v.). Para la inducción de granulomas secundarios, se sensibilizó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) con 5.000 huevos vivos, y luego se les desafió con 5.000 huevos vivos i.v. (Wynn et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:551-61). En los experimentos de infección, los ratones se infectaron por vía percutánea a través de la cola con 25 – 30 cercarias de una cepa puertorriqueña de *S. mansoni* (NMRI) que se obtuvo de caracoles infectados con *Biomphalaria glabrata* (Biomedical Research Institute, Rockville, MD). Los compuestos de antígeno soluble de huevos (ASH) y compuestos de antígeno soluble de lombriz (CASL) se obtuvieron de huevos *S. mansoni* purificados y homogeneizados y de parásitos adultos, según lo descrito anteriormente [Cheever et al. (1994) *J. Immunol.* 153:753-59]. Todos los animales se sometieron a perfusión en el momento del sacrificio para poder determinar la carga de lombrices y huevos tisulares, según se describe en otro lugar (*id.*). Se prepararon larvas de *Nippostrongylus brasiliensis* (L3) según se describió anteriormente [Katona et al. (1983) *J. Immunol.* 130:350-56]. Se inoculó a los ratones mediante inyección s.c. de 500 L3. En el día siete después de la inoculación, se recogieron muestras de tejido pulmonar y ganglios linfáticos mediastinales para análisis de citocinas.

Ejemplo 1.2: Histopatología y fibrosis

[0165] Los tamaños de los granulomas pulmonares y hepáticos se determinaron en secciones histológicas teñidas con la tinción Giemsa de Wright (Histopath of America, Clinton, MD). Se incluyeron alrededor de 30 granulomas por ratón en todos los análisis. Un patólogo experto evaluó los porcentajes de eosinófilos, mastocitos y otros tipos de células en las mismas secciones. Se determinó el número de huevos esquistosomiales en

el hígado e intestino y el contenido de colágeno del hígado, de acuerdo con la medida de las concentraciones de hidroxipirolina, según se describió anteriormente (Cheever et al., *supra*). Específicamente, el colágeno hepático se midió como hidroxiprolina mediante la técnica de Bergman y Loxley [Bergman y Loxley (1963) *Analytical Biochem.* 35:1961-65] después de la hidrólisis de una porción de 200 mg de hígado en 5 ml de HCl 6N a 110 °C durante 18 horas. El aumento de hidroxiprolina hepática estuvo relacionado positivamente con el número de huevos en todos los experimentos, y el colágeno hepático se informa como el aumento por encima del colágeno hepático normal en micromoles por 10.000 huevos; (colágeno hepático infectado – colágeno hepático normal)/huevos hepáticos X 10^{-4} o micromoles por par de lombrices. A intervalos crónicos tardíos, la fibrosis se informa como el colágeno hepático total por hígado. La misma persona efectuó la puntuación de todas las características histológicas y no tuvo conocimiento del diseño experimental.

Ejemplo 1.3: Análisis FACS

[0166] Se recogieron pulmones enteros y se colocaron en RPMI. Los tejidos se alteraron mediante cribado a través de una malla de nylon de 70 micrones (BD Falcon, San Diego, CA). Las suspensiones de una célula se lavaron y se efectuó la lisis de los eritrocitos mediante incubación con solución de lisis ACK durante 3 minutos. Los linfocitos pulmonares se marcaron con anti-CD4 marcado con PE-CVy5, junto con Bloque Fc (siendo ambos anticuerpos de BD Pharmingen, San Diego, CA) y *buffer* FACS durante 15 min a 4 °C. Después del lavado, las células se analizaron en un equipo FACS Calibur usando software FLOWJO™ (Treestar, Inc., Ashland, OR).

Ejemplo 1.4: IL-21 Experimentos de bloqueo con sIL-21R-Fc

[0167] Se infectaron ratones C57BL/6 (10/grupo) por vía percutánea a través de la cola con 30-35 cercarias de *S. mansoni*. Comenzando en la semana 6 después de la infección, los ratones fueron tratados con mIL-21R-Fc (Wyeth Research) o el anticuerpo de control anti-*E. tenella* IgG2a murina (Wyeth Research). Cada ratón recibió una dosis de 200 μg por inyección i.p. 3 veces por semana durante un total de 5 semanas. Los ratones se

sacrificaron a 12 semanas luego de la infección y la fibrosis hepática se midió mediante prueba de hidroxiprolina.

Ejemplo 1.5: Cultivo de linfocitos y detección de citocinas usando la Prueba inmunoabsorbente unida a enzimas (ELISA)

[0168] Se extirparon ganglios linfáticos esplénicos y mesentéricos (modelo de infección) o ganglios linfáticos asociados con el pulmón (modelo pulmonar) por medios asépticos y se prepararon suspensiones de una célula según se describió anteriormente [Hesse et al. (2000) *Am. J. Pathol.* 157:945-55]. Los cultivos se incubaron a 37 °C en un ambiente humifidicado de 5% CO_2. Las células se estimularon con ASH (20 μg/ml), CASL (50 μg/ml), concanavalina A (Con A; 1 μg/ml) o con medio solo. Se recogieron los líquidos sobrenadantes a las 72 horas y se sometieron a prueba para la producción de citocinas. Se midió la concentración de IFN-α, IL-5 e IL-10 mediante ELISA de tipo sándwich usando anticuerpos apareados (BD Pharmingen, San Diego, CA) según se describe anteriormente (*id.*). Las concentraciones de citocinas se calcularon con curvas estándar construidas usando citocinas murinas recombinantes (BD Pharmingen, San Diego, CA). Las concentraciones de IL-13 se midieron usando conjuntos ELISA de IL-13 murina (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de TGF-β1 se determinaron cuantitativamente usando el sistema de desarrollo de TGF-β1 murino DUOSET® de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para evitar la contaminación con TGF-β1 de derivación bovina, las células se lavaron 3X en PBS y se cultivaron en un medio que contenía suero murino al 0,5%.

Ejemplo 1.6: Aislamiento y purificación de ARN y reacción en cadena de polimerasa en tiempo real

[0169] Se extrajo ARN total de muestras tisulares de pulmón e hígado colocadas individualmente en 1 ml de reactivo TRIZOL™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). La muestra se homogeneizó usando un politrón tisular (Omni International Inc., Marietta, GA), se extrajo el ARN total de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se purificó adicionalmente usando el Mini-kit RNEASY™ de Qiagen (Qiagen Sciences,

Germantown, MD). Se efectuó la transcripción inversa de las muestras individuales de ARN (1 µg) usando SUPERSCRIPT II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y una mezcla de oligo *primers* (dT) y *primers* aleatorios. Se realizó la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RCP-TR) en un sistema de detección de secuencia ABI PRISM™ 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se determinaron cantidades relativas de ARNm para varios genes usando matriz maestra SYBR™ Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) y mediante el método de ciclo umbral comparativo, según lo descrito por Applied Biosystems para los sistemas de detección de secuencia ABI PRISM™ 7700/7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). En este método, las concentraciones de ARNm para cada muestra se normalizaron a concentraciones de ARNm de hipoxantina guanina fosforibosil transferasa y luego se expresaron como aumento o disminución relativa en comparación con las concentraciones en los controles sin infectar. Los *primers* se diseñaron usando software PRIMER EXPRESS™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los *primers* para IL-13, IL-4, IL-10, HPRT [Hesse et al. (2001) *J. Immunol.* 167:6533-44], IL-13Rα2 [Chiaramonte et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:687-701], Ym1, FIZZ1 quitinasa acídica (AMCase) (Sandler et al., *supra*) han sido publicados anteriormente, e incluyen:

[0170] IL-21

5' GCCAG ATCGC CTCCT GATTA 3' (sentido) (SEC ID Nº: 28);

5' CATGC TCACA GTGCC CCTTT 3' (antisentido) (SEC ID Nº: 29);

[0171] IL-21R

5' CTCCC CCCTT GAACG TGACT 3' (sentido) (SEC ID Nº: 30);

5' TTGCC CCTCA GCACG TAGTT 3' (antisentido) (SEC ID Nº: 31);

[0172] IFN-γ

5' AGAGC CAGAT TATCT CTTTC TACCT CAG 3' (sentido) (SEC ID Nº: 32);

5' CCTTT TTCGC CTTGC TGTTG 3' (antisentido) (SEC ID Nº: 33).

Ejemplo 1.7: Análisis de isotipos de anticuerpos séricos y macrófagos derivados de médula ósea

[0173] Se midió la IgE total usando el set Elisa de IgE murina BD OPTEIA™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se evaluaron titulaciones de anticuerpos específicos de ASH de IgG1 y específicos de isotipos IgG2B (Ab) mediante ELISA indirecto. Se recubrieron placas IMMULON™ 4 (Thermo Labsystems Inc., Beverly MA) con 10 μg/ml de ASH (100 μl/pocillo) diluido en PBS, y las muestras séricas se analizaron usando diluciones dobles en serie. Se usó IgG1 antimurina de biotina-conejo (Zymed, San Francisco, CA) a una dilución de 1:1000. Esto se siguió de una enzima de sustrato de estreptavidina marcada con peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD) a una dilución de 1:1000. Se usó Anticuerpo de IgG2b antimurina de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante de segundo paso a una dilución de 1:1000. La absorbancia en los pocillos se leyó a 450 nm usando un lector de microplacas cinético VMAX™ (Molecular Devices) después de añadir 100 μl de sustrato de peroxidasa ABTS de componente único (KPL, Gaithersburg, MD).

[0174] Se recuperó médula ósea de ratones hembras C57BL/6 y se cultivó en placas de Petri (100 X 15 mm) que contenían medio DMEM suplementado (medio acondicionado con L929) durante un período de 6 días. Después de seis días, las células se recogieron y se sembraron a una concentración de 0,5 X 10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos que contenían medio DMEM suplementado (10% FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomicina). Las células se estimularon con IL-4, IL-13 e IL-21 (R&D, Minneapolis, MN) durante un período de 20 horas. En algunas pruebas, las células fueron pretratadas con IL-21. Las células se sometieron a lisis y se purificó el ARN usando el procedimiento de limpieza de ARN con los kits RNEASY™ (Qiagen Sciences, Germantown, MD).

Ejemplo 1.8: Prueba de actividad de arginasa

[0175] Se fijaron en placas macrófagos derivados de médula ósea a 6 X 10^5 por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se estimularon con combinaciones de IL-4, IL-13 e IL-21. Se añadió IL-21 6 horas antes del estímulo con IL-4 o IL-13. Después de

la estimulación, las células se lavaron con PBS y se sometieron a lisis con Triton X-100 al 0,1% que contenía un inhibidor de la proteasa (Roche, Nutley, NJ). Los lisados se transfirieron a una placa RCP de 96 pocillos y se incubaron con $MnCl_2$ 10 mM y Tris HCl 50mM (pH 7,5) para la activación enzimática durante 10 minutos a 55 °C. Después de la activación enzimática, se quitaron 25 µl de lisado y se añadieron a 25 µl arginina 1M (pH 9,7) en una nueva placa RCP y se incubó durante 20 horas a 37 °C. Se añadieron 5 µl de cada muestra por duplicado en una placa ELISA de 96 pocillos, junto con 5 µl de cada solución patrón, diluida bajo las mismas condiciones de prueba, comenzando en 100 mg/dl. Se usó el kit de reactivo de determinación de urea de QUANTICHROM™ (BioAssay Systems, Hayward, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 1.9: Estadísticas

[0176] La fibrosis hepática (ajustada para el número de huevos) disminuye al aumentar la intensidad de la infección (parejas de lombrices). En consecuencia, estas variables se compararon mediante el análisis de covarianza, usando el logaritmo de huevos hepáticos totales como covariante y el logaritmo del contenido de hidroxiprolina por huevo. Las variables que no cambiaron con la intensidad de la infección se compararon mediante ANOVA de una sola vía o la prueba *t* de Student (Cheever et al., *supra*). Los cambios de expresión de ARNm de citocinas y de tamaño de los granulomas se evaluaron usando ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p<0,05$*, $p<0,01$** o $p<0,001$***.

Ejemplo 2: Regulación de IL-21 e IL-21R durante respuestas polarizadas tipo 1 y tipo 2

[0177] A fin de investigar la regulación y función del receptor de IL-21 *in vivo,* se examinaron varios sistemas experimentales de inflamación dependiente de T_H2, entre ellos, modelos de inflamación pulmonar y hepática, así como un modelo experimental de infección por nematodos [Pearce et al., *supra*; Wynn et al. (1994), *supra*]. En cada caso, se compararon las respuestas inmunológicas de animales de tipo silvestre (TS) con ratones con deficiencia de IL-21R [Hoffman et al., *supra*; Kasaian et al. (2002), *supra*].

[0178] En comparación con IL-21 [Wurster et al. (2002), *supra*; Mehta et al. (2004) *Immunol. Rev.* 202:84-95], se conoce muy poco acerca de la regulación y función del

receptor de IL-21. A fin de determinar si IL-21 y su receptor son regulados durante una respuesta patológica T_H2 *in vivo*, se usó el modelo *S. mansoni* de la formación de granulomas. En este modelo, se sabe que las citocinas T_H2 juegan un papel prominente en la formación de lesiones (Pearce y MacDonald, *supra*). Se diseñaron estudios iniciales para determinar si la expresión de ARNm de IL-21 e IL-21R estuvo asociada con respuestas polarizadas de citocinas T_H2 *in vivo*. Esto se logró usando ratones que desarrollan respuestas de citocinas T_H1 (IL-$4^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$) o T_H2 (IL-$12^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$) altamente exageradas después de la exposición a huevos de *S. mansoni*. En ratones IL-$4^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$ "T_H1", la expresión de ARNm IFN-γ aumentó 75 veces en el pulmón, respecto a valor basal a los 4 días después del desafío y permaneció aproximadamente 50 veces por encima del fondo hasta el día 14 (FIG. 16A). El ARNm de IL-13 no fue detectable en estos ratones en ningún intervalo, lo que confirma el establecimiento de una respuesta inflamatoria T_H1 altamente polarizada. Por el contrario, los ratones IL-$12^{-/-}$/IL-$10^{-/-}$ "T_H2" exhibieron un aumento de 200 a 250 veces del ARNm de IL-13 en todos los intervalos posteriores al desafío, con poco a ningún cambio de IFN-γ. En contraste con las citocinas T_H1/ T_H2, que exhibieron un patrón de expresión altamente polarizada, IL-21 no estuvo asociada con un fenotipo polarizado (FIG. 16B). En ambos grupos, las concentraciones de ARNm de IL-21 aumentaron por lo menos 50 veces respecto al valor basal, posterior al desafío con huevos esquistosomales, aunque el aumento observado en los ratones polarizados con T_H1 en promedio fue 3 a 4 veces mayor que los animales polarizados con T_H2 (FIG. 16B; panel inferior). Asimismo, IL-21R no estuvo asociada específicamente con una respuesta inmunológica a T_H1 o T_H2. No obstante, en contraste con IL-21, que fue más pronunciada en los animales polarizados hacia T_H1, la respuesta máxima para IL-21R se observó en los ratones polarizados con T_H2 (FIG. 16B; panel superior).

Ejemplo 3: Se reduce la producción de citocinas tipo 2 en los pulmones de ratones con deficiencia de IL-21R durante una respuesta primaria a huevos esquistosomales

[0179] Dada la elevación significativa de la expresión de IL-21R en ratones sometidos a desafío con huevos esquistosomales (FIG. 16), la siguiente serie de experimentos estudió si la señalización de IL-21R estaba teniendo influencia en el desarrollo de la respuesta T_H2. En estos experimentos, se inyectaron ratones TS normales y ratones IL-$21R^{-/-}$ con

huevos esquistosomales vivos y se vigiló la producción de citocinas T_H2 y genes regulados por T_H2 en el pulmón, bazo y ganglios linfáticos de drenaje durante los 14 días siguientes. En los ratones TS, la expresión de ARNm de IL-21R aumentó rápidamente después de la exposición a huevos y permaneció elevada hasta el día 14 (FIG. 17A). La IL-21 exhibió un cuadro similar, ocurriendo la expresión máxima en el día 7, después de lo cual disminuyó ligeramente. Notablemente, se observó una disminución constante y altamente significativa de la expresión de IL-21 en los días 7 y 14 en los ratones IL-21R$^{-/-}$, lo que sugiere que IL-21R estaba teniendo una influencia positiva en la expresión de su propio ligando. En concordancia con observaciones anteriores [Wynn et al. (1993) *J. Immunol.* 151:1430-40; Vella y Pearce (1992) *J. Immunol.* 148:2283-88], la expresión de citocinas asociadas con T_H2 IL-4 e IL-13 aumentó gradualmente en los tejidos granulomatosos de los ratones TS, con aumentos de 5 a 15 veces para el día 15. Por contraste, se observó una disminución marcada y significativa de la expresión de ARNm de IL-4 e IL-13 en los tejidos IL-21R$^{-/-}$. Si bien se detectó poco cambio de ARNm de IFN-γ e IL-10 en los ratones TS entre los días 4 y 14 posteriores al desafío, la producción de IFN-γ e IL-10 también disminuyó ligeramente en los animales IL-21R$^{-/-}$. En consecuencia, la respuesta reducida de T_H2 observada en los ratones IL-21R$^{-/-}$ no estuvo asociada con una producción aumentada de citocinas T_H1. La disminución de las citocinas T_H2 también fue específica de los tejidos granulomatosos, ya que se observó una producción significativa de citocinas T_H2 en los cultivos de ganglios linfáticos y esplenocitos después del estímulo *in vitro* con antígeno de huevo soluble (ASH) o mitógeno (FIG. 17B). De hecho, ASH estimuló constantemente respuestas de IL-5, IL-10 e IL-13 más potentes en los cultivos de ganglios linfáticos preparados a partir de ratones IL-21R$^{-/-}$. No obstante, en consonancia con la respuesta T_H2 reducida en el pulmón, se observó una resolución más rápida de la formación de granulomas en los animales IL-21R$^{-/-}$ (FIG. 17C). Además, se observó una disminución pronunciada de varios genes asociados con la activación-Stat6 o "macrófagos activados alternativamente" (AAMø) [Nair et al. (2005) *Infect. Immun.* 73:385-94; Zhu et al. (2004) *Science* 304:1678-82; Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Gordon, S. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*

3:23-35], lo que proporciona evidencia adicional de una reducción global de la respuesta del determinante de T_H2 en los ratones IL-21R$^{-/-}$ (FIG. 17D).

Ejemplo 4: La respuesta TH2 está reducida en ratones IL-21R$^{-/-}$ después de la infección con *N. brasiliensis*

[0180] A fin de determinar si la respuesta reducida del determinante de T_H2 fue específica de la formación de granulomas pulmonares *S. mansoni*, se infectaron ratones TS e IL-21R$^{-/-}$ con el nematodo intestinal *N. brasiliensis*. La infección se establece mediante la inoculación de larvas de estadio 3 (L3) debajo de la piel. A medida que maduren los parásitos, migran desde el sitio de inoculación y entran en los pulmones a través del sistema circulatorio. Una vez dentro de los pulmones, los parásitos activan una respuesta T_H2 vigorosa y altamente polarizada [Urban et al. (1993) *J. Immunol.* 151:7086-94], que se confirmó mediante el análisis de la expresión de varios genes asociados con T_H2 en el pulmón (FIG. 18A) y ganglios linfáticos asociados con el pulmón (FIG. 18B). Los pulmones y ganglios linfáticos de los ratones TS exhibieron aumentos pronunciados de expresión de ARNm de IL-4, IL-13, AMCase, FIZZ1/RELM1α, e Ym1 después de la infección con *N. brasiliensis* (FIG. 18A y 18B). No obstante, de conformidad con el modelo de granuloma pulmonar, se observaron concentraciones significativamente reducidas de IL-4, IL-13 y AMCase, así como concentraciones ligeramente reducidas de ARNm de Ym1 y FIZZ1 en los pulmones de los ratones IL-21R$^{-/-}$ (FIG. 18A). Los ganglios linfáticos de drenaje exhibieron una reducción similar, aunque las disminuciones de Ym1 y FIZZ1 fueron más significativas en los ganglios linfáticos (FIG. 18B). La única otra diferencia importante entre los dos tejidos fue la respuesta de ARNm de AMCase, que pareció estar restringida al pulmón. Juntos, estos datos confirman un papel importante para el desarrollo de IL-21R en el desarrollo de la respuesta T_H2 *in vivo*. Notablemente, sin embargo, a pesar de desarrollar una respuesta T_H2 pronunciadamente atenuada, los ratones IL-21R$^{-/-}$ infectados con *N. brasileniensis* no exhibieron demora significativa en la expulsión de lombrices adultas (no se muestra).

Ejemplo 5: Inflamación inducida por citocinas tipo 2 disminuida en los pulmones de ratones IL-21R$^{-/-}$

[0181] La siguiente serie de experimentos se diseñó para determinar si IL-21R modula el desarrollo de respuestas T_H2 secundarias. Para estos experimentos, se sensibilizaron a ratones TS e IL-21R$^{-/-}$ con huevos de *S. mansoni* y se desafiaron por vía intravenosa 2 semanas más tarde. Según se esperaba, los ratones sensibilizados desarrollaron una respuesta granulomatosa robusta de 4 a 5 veces superior (FIG. 19C) que los animales de del desafío primario (FIG. 17C). Según se observó en el modelo primario, hubo un aumento significativo de ARNm de IL-21 e IL-21R en los pulmones después de la exposición a huevos, aunque la respuesta de IL-21 alcanzó su máximo mucho más temprano durante el desafío secundario. Sólo ocurrió un aumento modesto de IL-21R al compararse con IL-21, aunque permaneció significativamente elevada en ambos intervalos, en tanto que las concentraciones de ARNm de IL-21 disminuyeron después de alcanzar un máximo en el día 4 (FIG. 19A). En consecuencia, hubo evidencia de una regulación más estrecha del ligando en los tejidos. También hubo una disminución notable de la expresión de IL-21 en los ratones IL-21R$^{-/-}$, lo que confirma un potente mecanismo de retroalimentación entre el receptor y su ligando. Entre las citocinas asociadas con T_H2, IL-13 fue la respuesta más robusta, exhibiendo un aumento de 50 a 100 veces sobre el valor basal en los ratones TS. No obstante, se redujo a 10 a 20 veces por encima del fondo en los ratones IL-21R$^{-/-}$, lo que demuestra que se necesita la IL-21R para el desarrollo máximo de la respuesta T_H2 secundaria. Nuevamente, la reducción de la expresión de citocinas T_H2 en los ratones IL-21R$^{-/-}$ no estuvo acompañada de un aumento significativo de IFN-γ. De hecho, la expresión de ARNm de IFN-γ disminuyó en los pulmones de los ratones IL-21R$^{-/-}$. No obstante, los animales *knockout* exhibieron un aumento modesto pero constante de la producción de IFN-γ en los ganglios linfáticos y el bazo, lo que sugiere una inhibición mayor de las citocinas T_H2 en general (FIG. 19B). En consonancia con el modelo de desafío primario de huevos, la reducción de la producción de citocinas T_H2 y T_H1 fue más pronunciada en los tejidos granulomatosos (FIG. 19A), aunque la respuesta T_H2 inducida por ASH también fue

parcialmente reducida en el bazo (FIG. 19B). La reducción significativa de la inflamación granulomatosa secundaria fue acorde al desarrollo de una respuesta T_H2 más débil en el pulmón (FIG. 19C). Además, ocurrió una disminución pronunciada de la expresión de FIZZ1, Ym1 y AMCase (FIG. 19D), confirmando adicionalmente un menoscabo significativo de las respuestas secundarias del determinante de T_H2 en los ratones IL-21R$^{-/-}$.

Ejemplo 6: Anticuerpos de IgG, formación de granulomas y citocinas tipo 2 sustancialmente reducidos en ratones infectados con deficiencia de IL-21R

[0182] Luego, a fin de determinar si se necesita la señalización de IL-21 para el mantenimiento de una respuesta crónica dominada por T_H2, los animales se expusieron por vía percutánea a cercarias de *S. mansoni*, y se analizaron sus reacciones patológicas y respuestas inmunológicas a intervalos agudos y crónicos después de la infección. Según se observa en los estudios de granuloma pulmonar, hubo una regulación ascendente pronunciada en la expresión de ARNm de IL-21R e IL-21 en los hígados de los ratones TS infectados. Por contraste, el ARNm de IL-21 prácticamente no fue detectable en los ratones IL-21R$^{-/-}$ incluso después de la infección crónica (FIG. 20A). En la etapa aguda después de la infección, los ratones IL-21R$^{-/-}$ también manifestaron una reducción pronunciada de la expresión de ARNm de citocinas T_H2 (FIG. 20A). No obstante, los cambios quedaron otra vez restringidos a los tejidos granulomatosos, ya que las respuestas de los ganglios linfáticos y esplenocitos de ambos grupos fueron similares después del estímulo *in vitro* con antígenos parasitarios (FIG. 20B). La única diferencia constante observada en las pruebas *in vitro* fue una disminución de 2 a 3 veces en la producción de IL-10 en los cultivos de esplenocitos. Los ratones IL-21R$^{-/-}$ también desarrollaron granulomas significativamente más pequeños en la etapa aguda posterior a la infección (FIG. 20C), lo que fue consonante con las respuestas reducidas de ARNm de IL-4 e IL-13 en el hígado (FIG. 20A). No obstante, esto no fue acompañado de ningún cambio evidente en el porcentaje eosinófilos en los granulomas (FIG. 20C). Un análisis microscópico más detallado de las lesiones confirmó que no hubo cambio detectable en la composición general de los granulomas (FIG. 21A). También se realizaron experimentos para determinar si la deficiencia de IL-21R estaba afectando específicamente el

reclutamiento de células T $CD4^+$ en los tejidos granulomatosos. Para abordar este asunto, se usó el modelo de granuloma pulmonar a fin de sincronizar el reclutamiento de las células inflamatorias. Sin embargo, en consonancia con las evaluaciones microscópicas de los granulomas hepáticos (FIG. 21A), el porcentaje de células T CD4+ en los pulmones fue similar en los ratones TS e IL-$21R^{-/-}$, tanto antes como después de la exposición a huevos (FIG. 21B). En consecuencia, es poco probable que los cambios de reclutamiento de las células T CD4+ expliquen la disminución de las respuestas de citocinas Th1/Th2 observadas en los tejidos. En cambio, parecen ser el resultado de una reducción más generalizada en la respuesta inflamatoria global. Es importante notar que ambos grupos modularon efectivamente hacia abajo sus respuestas granulomatosas para la semana 12 después de la infección (Pearce and MacDonald, *supra*). En consecuencia, no hubo diferencia significativa en el tamaño de los granulomas al intervalo crónico (FIG. 20C). Se observó un menoscabo mínimo de la respuesta de citocinas T_H2 en los ratones *knockout* con infección crónica (FIG. 20A). La reducción pronunciada de FIZZ1 e Ym1 observada en la etapa aguda también había disminuido en los animales IL-$21R^{-/-}$ con infección crónica (FIG. 20D). No obstante, la expresión de AMCase permaneció notablemente baja a la semana 12, lo que sugiere una disminución sostenida de por lo menos un subconjunto de las respuestas impulsadas por T_H2 en ratones IL-$21R^{-/-}$ con infección crónica.

[0183] También se examinaron a los ratones IL-$21R^{-/-}$ para cambios en las concentraciones séricas de anticuerpos (FIG. 22). En consonancia con sus respuestas citocínicas deprimidas (FIG. 20A), los ratones IL-$21R^{-/-}$ exhibieron una reducción pronunciada de las titulaciones de IgG_1 (anticuerpo asociado con T_H2) e IgG_{2b} (anticuerpo asociado con T_H1) específicas de parásitos, que se mantuvo al intervalo crónico (FIG. 22B). No obstante, es interesante notar que esto no fue acompañado de un cambio significativo de IgE (FIG. 22C), lo que sugiere un menoscabo selectivo en un subconjunto de isotipos de anticuerpos séricos solamente. Se ha demostrado que la IL-21 exógena inhibe la producción de IgE (Suto et al. (2002) *Blood* 100:4565-73), lo que podría explicar la ligera elevación de IgE en los ratones IL-$21R^{-/-}$ con infección crónica, Es importante notar que la reducción global en la respuesta tipo 2 en los ratones IL-$21R^{-/-}$

no se atribuyó a diferencias en la carga parasitaria, ya que se encontraron números similares de huevos y parásitos adultos en los tejidos apareados de ambos grupos en todos los intervalos (FIG. 22A).

Ejemplo 7: La deficiencia de IL-21R demora la progresión de la fibrosis hepática

[0184] Debido a que se cree que las citocinas T_H2 juegan un papel importante en la fibrogénesis tisular (Wynn (2004), *supra*), se examinó después el desarrollo y la progresión de la fibrosis hepática en ratones IL-21R$^{-/-}$ infectados con *S. mansoni*. Se analizaron las concentraciones hepáticas de hidroxiprolina a varios intervalos después de la infección como medición directa del contenido de colágeno. Según se esperaba, se observó fibrosis hepática pronunciada en los ratones TS (FIG. 22D). Por contraste, los ratones IL-21R$^{-/-}$ exhibieron significativamente menos fibrosis a los intervalos agudos y crónicos. Notablemente, para la semana 29 después de la infección, los ratones IL-21R$^{-/-}$ exhibieron una disminución de más del 50% en el contenido hepático total de colágeno en comparación con los ratones TS (FIG. 22E), confirmando así una función importante e indispensable para la IL-21R en la progresión de la fibrosis dependiente de T_H2.

[0185] Se emprendieron experimentos para examinar si un inhibidor de la IL-21 podría demorar la progresión de la fibrosis en ratones TS infectados. Para estos experimentos, se trataron grupos de ratones C57BL/6 con sIL-21R-Fc o proteína de control durante un total de 5 semanas, comenzando en la semana 6 después de la infección, alrededor del momento en el cual se detectan huevos por primera vez en el hígado. Si bien ambos grupos tuvieron cargas de lombrices y huevos tisulares similares (no se muestran los datos), los ratones que recibieron el bloqueador de IL-21 exhibieron una reducción en exceso del 50% en la fibrosis hepática a la terminación del experimento (FIG. 22F). La expresión de ARNm de IL-4 IL-13 también disminuyó en el hígado y se registró una reducción del tamaño de los granulomas de aproximadamente el 15% (no se muestran los datos). En consecuencia, estos datos complementan los experimentos realizados con ratones IL-21R$^{-/-}$.

Ejemplo 8: IL-21 La señalización fomenta el desarrollo de macrófagos activados alternativamente

[0186] Debido a que Arg-1, FIZZ1 y TGF-β1 han estado asociados con el desarrollo de fibrosis, y a que se redujo la expresión de varios genes regulados por T_H2/Stat6 en los tejidos enfermos de ratones IL-21R$^{-/-}$ (FIG. 17-20) (ver también, Gordon, *supra*; Nair et al., *supra*), se emprendieron experimentos para determinar si Arg-1, FIZZ1 y TGF-β1 son modulados directamente en los macrófagos después del estímulo con IL-21. Arg-1 y FIZZ1 también son marcadores conocidos de macrófagos activados alternativamente (AAMø) (Gordon, *supra*). Para estos estudios, se generaron cultivos de macrófagos derivados de médula ósea (BMMø) y se estimularon con varias combinaciones de IL-4, IL-13 e IL-21. Según se esperaba, tanto, IL-4 como IL-13 aumentaron la expresión de ARNm de Arg-1 y FIZZ1, con efecto aditivo observado cuando los dos estímulos se usaron en combinación (FIG. 23A). Notablemente, sin embargo, si bien IL-21 no tuvo efecto en ninguno de los genes al usarse solo, los cultivos pretratados con IL-21 exhibieron aumentos altamente significativos de la expresión de ARNm de Arg-1 y FIZZ1 al estimularse subsecuentemente con IL-4 e IL-13 (FIG. 23A). La misma combinación también produjo un aumento significativo de la función de la arginasa en las células. Por contraste, IL-21 no tuvo efecto alguno en las concentraciones de TGF-β1 total o activo en los materiales sobrenadantes de los cultivos (FIG. 24). Sorprendentemente, el tratamiento con IL-21 solo produjo un aumento significativo de la expresión de IL-4Rα e IL-13Rα1 (FIG. 23C). Por contraste, IL-4 e IL-13 carecieron de efecto al usarse solos y no hubo efecto adicional al usarse tres estímulos en combinación (no se muestra).

[0187] Debido a que la IL-13Rα2 también puede tener influencia en la señalización dependiente de IL-13 [Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Mentink-Kane et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:586-90; Wood et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:703-09], se emprendieron experimentos para examinar si IL-21 regulaba la producción de IL-13Rα2. Como era de esperar, debido a que la IL-13Rα2 es producida principalmente por células no hematopoyéticas tales como los fibroblastos y el músculo liso [Chiaramonte et al.

(2003), *supra*; Jakubzick et al. (2003) *Am. J. Pathol.* 162:1475-86; Zheng et al. (2003) *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:720-28; Morimoto et al. (2006) *J. Immunol.* 176:342-48], no hubo evidencia de regulación de receptores señuelo en los cultivos de BMMø (no se muestran los datos). No obstante, al examinarse la regulación del receptor señuelo *in vivo,* IL-21 reguló hacia abajo la expresión de ARNm de IL-13Rα2 en los pulmones de ratones con desafío de huevos por i.v. y disminuyó significativamente las concentraciones de la IL-13Rα2 soluble en su suero (FIG. 23D). Al considerarse juntos, estos datos sugieren que IL-21 contribuye hacia el desarrollo de los macrófagos activados alternativamente, al regular hacia arriba el receptor de IL-4 tipo 2 (receptor de señalización) en los macrófagos y al disminuir simultáneamente las concentraciones de la IL-13Rα2 soluble (receptor señuelo) en el suero. Es probable que ambos mecanismos contribuyeran hacia la activación aumentada de Arg-1 y FIZZ1 en los macrófagos estimulados por IL-4/IL-13. Como tal, proporcionan una explicación mecanística adicional para las respuestas menoscabadas de T_H2 y la fibrosis dependiente de T_H2 en los ratones IL-21R$^{-/-}$ infectados por helmintos.

Ejemplo 9: Comentarios

[0188] La IL-21 fue caracterizada recientemente como citocina T_H2 capaz de inhibir la diferenciación de células T_H normales en células T_H1 productoras de IFN-γ [Wurster et al. (2002), *supra*]. Debido a que la respuesta inmunológica en la esquistosomiasis evoluciona desde una respuesta precoz de IFN-γ a una repuesta T_H2 sostenida y dominante (Pearce and MacDonald, *supra*), se examinó la influencia de la señalización de IL-21R en el desarrollo de respuestas T_H2 inducidas por helmintos. La infección de ratones TS con *S. mansoni* aumentó la expresión de IL-21 e IL-21R en el hígado, confirmando una asociación de la señalización de IL-21 con inmunidad tipo 2 inducida por helminto. No obstante, en el pulmón, los huevos esquitosomales indujeron una expresión significativa de IL-21 durante las respuestas polarizadas T_H1 y T_H2. De hecho, la expresión de IL-21 aumentó más cuando los ratones se polarizaron hacia una respuesta T_H1. Estos datos sugieren que IL-21 exhibe un patrón menos restringido de expresión que el de otras citocinas asociadas con T_H2. El receptor para IL-21 tampoco exhibió un

patrón específico de T_H1/T_H2. No obstante, el receptor de IL-21 se indujo casi 4 veces más en los pulmones de los ratones polarizados hacia T_H2 que en los ratones polarizados hacia T_H1, dato que proporcionó una de las primeras indicaciones de que la señalización IL-21R podrá estar involucrada en la regulación de la inflamación mediada por T_H2.

[0189] A fin de determinar si las respuestas de determinantes tipo 2 quedaban comprometidas en ausencia de la IL-21R, se examinó la expresión de varios genes inducidos preferencialmente bajo condiciones de polarización T_H2. Dichos genes incluyeron AMCase, Ym1 y FIZZ1, todos los cuales se considera que juegan papeles importantes y no redundantes en la regulación de la inflamación mediada por T_H2 [Zhu et al., *supra*; Chiaramonte et al. (2003), *supra*; Nair et al., *supra*; Mentink-Kane et al., *supra*; Guo et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:8032-37]. Si bien se observó cierta variación durante una respuesta inmunológica primaria, secundaria o crónica, en cada caso, los ratones IL-21R$^{-/-}$ exhibieron disminuciones altamente significativas en estos genes asociados con T_H2. Los genes Ym1 y AMCase son miembros de una familia de proteínas que comparten la homología con las quitinasas de los organismos inferiores (Nair et al., *supra*). Si bien su función exacta en las reacciones inmunológicas anfitrionas permanece en duda, se considera que juegan papeles importantes en la quimiotaxis eosinofílica, remodelación tisular y fibrosis. De hecho, un estudio reciente demostró que la neutralización de AMCase podría mejorar la inflamación impulsada por alergenos e hiperrespuesta de las vías respiratorias, confirmando así la participación de las quitinasas de mamífero en la inmunidad T_H2 (Zhu y colab, *supra*). FIZZ1 también está asociado con la fibrogénesis tisular [Mentink-Kane et al., *supra*; Liu et al. (2004) *J. Immunol.* 173:3425-31]. En consecuencia, una función importante de la IL-21R podría ser la de regular los mecanismos de cicatrización de heridas y la fibrosis. Por ello, además de la participación en las respuestas inmunológicas inducidas por helmintos, la IL-21R podría estar involucrada en la regulación de una diversidad de trastornos inflamatorios mediados por T_H2.

[0190] En la esquistosomiasis, la deficiencia de IL-21R ejerció un efecto profundo sobre la progresión de la enfermedad. Aunque las intensidades de infección fueron iguales en los ratones WT y IL-21R$^{-/-}$ la respuesta inflamatoria inducida por huevos se redujo significativamente en ausencia del IL-21R. También hubo una reducción notable en la formación de granulomas secundarios y una resolución más rápida de los granulomas primarios en el pulmón. Conjuntamente, estos datos ilustran un papel indispensable para IL-21R en la inflamación granulomatosa. Los estudios previos demostraron que IL-4 y IL-13 son esenciales para formación de la lesión (Pearce y MacDonald; *supra*), por consiguiente, se cree que IL-21R está afectando directa o indirectamente la actividad de estas citocinas. Estos estudios sugirieron que IL-21 no estaba actuando solo, ya que se observaron concentraciones extremadamente elevadas de IL-21 en ratones con genes doblemente inactivados por IL-4/IL-10, no obstante lo cual, la formación de granuloma fue casi totalmente eliminada en estos animales deficientes de T_H2 (Hoffmann et al. (2000) *J. Immunol.* 164:6406-16; Sandler et al. (2003) *J. Immunol.* 171:3655-67). Por lo tanto, IL-21 parece colaborar con IL-4 e IL-13 para inducir una respuesta máxima. Los datos divulgados aquí muestran que no hay cambio detectable en la composición celular de los granulomas en ratones IL-21R$^{-/-}$ y no hay un menoscabo específico en el reclutamiento de células T CD4$^+$ T. En conjunto, estos hallazgos sugieren que IL-21R regula el desarrollo de patología inducida por parásitos al modular la intensidad general de la respuesta efectora T_H2.

[0191] No se piensa que IL-21 regula la diferenciación celular T_H2 inducida por IL-4 directamente [Suto et al., *supra*; Wurster et al. (2002), *supra*]. En cambio, se presentó la hipótesis, en un artículo reciente, de que IL-21 podría amplificar las respuestas inducidas por T_H2 al regular en forma decreciente la expansión de células T_H 1 productoras de IFN-γ [Wurster et al. (2002), *supra*]. Como tal, se presenta la teoría de que la respuesta de IFN-γ en ratones infectados con esquistosomas podría aumentar en ausencia del receptor de IL-21. Aunque se observó un pequeño aumento en los ganglios linfáticos asociados con el pulmón, *in vitro*, la producción de IFN-γ fue uniformemente reducida en los tejidos granulomatosos. Por ende, los estudios no mostraron que el IL-21R endógeno jugara un papel sustancial en la inhibición de la producción de IFN-γ durante la infección

helmíntica. Sin embargo, los ratones IL-21R$^{-/-}$ generaron simultáneamente respuestas de citocinas T_H1 y T_H2 más débiles en los tejidos. La reducción significativa en títulos de anticuerpos IgG_{2b} (asociados con T_H1) e IgG_1 (asociados con T_H2) en todos los intervalos después de la infección, apoya esta conclusión. Las citocinas Th2 también disminuyeron a nivel del ARNm en los pulmones y ganglios linfáticos después de la infección por *N. brasiliensis*. En efecto, todos los datos *ex vivo* directos confirmaron una reducción notable en la expresión y la función de citocina T_H2 dentro de los tejidos afectados. No obstante, no hubo una reducción uniforme en la producción de citocina T_H2 por los linfocitos aislados, después de volver a estimular con antígeno, lo que sugiere que los ratones IL-21R$^{-/-}$ son capaces de generar respuestas T_H2 significativas, al menos *in vitro*. Por consiguiente, los datos que se divulgan aquí sugieren que IL-21R aumenta selectivamente las respuestas T_H2 en los tejidos. Además de fomentar la respuesta T_H2, IL-21R también aumentó la producción de IL-21. Por consiguiente, IL-21R parece operar en forma autocrina para impulsar la expresión de citocina T_H2 y las funciones de efector de tipo 2 *in vivo*.

[0192] Con el objeto de aclarar aún más los mecanismos implicados, se llevaron a cabo experimentos para determinar si IL-21 estaría modulando directamente la función macrófaga, ya que los datos *in vivo* mostraban una reducción notable en varios genes que se habían asociado con el fenotipo "alternativamente activado" [Gordon, *supra*; Mantovani et al. (2005) *Immunity* 23:344-46]. Los macrófagos y fibroblastos que exhiben un fenotipo alternativamente activado son constituyentes celulares importantes de los granulomas esquistosomales y los estudios funcionales sugieren que están críticamente implicados en la progresión de la enfermedad [Hesse et al.(2001), *supra*]. En efecto, un estudio importante, realizado por Brombacher et al. demostró que los ratones con deficiencia completa en macrófagos alternativamente activados, desarrollan una patología letal inducida por huevos después de la infección con *S. mansoni* [Herbert et al. (2004) *Immunity* 20:623-35]. Además, como se ha implicado a TGF-β1 derivado de macrófagos en el mecanismo de la fibrosis mediada por IL-13 [Lee et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:809-21; Fichtner-Feigl et al. (2006) *Nat. Med.* 12:99-106], se realizaron experimentos para determinar si IL-21 estaría modulando la producción de TGF-β1 en

los macrófagos. Para investigar estos temas, se midieron la actividad del ARNm de Arg-1 y FIZZ1, la actividad de arginasa y las respuestas de proteína TGF-β1 en los macrófagos derivados de médula ósea después del estímulo con varias combinaciones de IL-21, IL-4 e IL-13. Arg-1 y FIZZ1 son genes dependientes de IL-4Rα/Stat6 [Liu et al., *supra*; Hesse et al. (2001), *supra*; Munder et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5347-54]; por consiguiente, sirven como marcadores funcionales de activación alternativa de macrófagos. Un punto importante es que los hallazgos sugirieron que, cuando los macrófagos se exponen a IL-21, se vuelven mucho más sensibles a las actividades inductoras de Arg-1 y de FIZZ1, de IL-4 y IL-13. La actividad de arginasa, evaluada por la producción de urea, también aumentó significativamente, confirmando que IL-21 es un estímulo importante para el desarrollo de macrófagos alternativamente activados, altamente funcionales. Por el contrario, no ejerció efecto sobre la producción de TGF-β1 por los macrófagos. Por ende, la citocina profibrótica TGF-β1 no parece estar implicada, lo que es congruente con estudios previos, que han investigado el papel desempeñado por TGF-β1 en la esquistosomiasis [Kaviratne et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4020-29]. En cambio, IL-21 aumentó significativamente la expresión de IL-4Rα y IL-13Rα1 en BMMøs y redujo la producción del receptor señuelo soluble IL-13 *in vivo*, lo que probablemente explicaría su sensibilidad mayor a IL-4 e IL-13. Como tal, estos datos complementan los estudios *in vivo* realizados con ratones IL-21R$^{-/-}$ y sugieren que una función importante de la señalización de IL-21R es fomentar el desarrollo de AAMø, que ha sido implicado en el mecanismo de la fibrosis [Hesse et al. (2001), *supra*; Hesse et al. (2000), *supra*]. Más aún, debido a que AAMø ha demostrado amplificar la diferenciación de células CD4$^+$ T_H2 [Bonecchi et al. (1998) *Blood* 92:2668-71], estos datos tal vez expliquen también la reducción global en la actividad de T_H2 inducida por helmintos en los ratones IL-21R$^{-/-}$.

[0193] En la esquistosomiasis humana, el desarrollo de la patología hepática fibrótica es la causa principal de morbilidad crónica y mortalidad [Pearce y MacDonald, *supra*; Wynn et al. (2004) *Immunol. Rev.* 201:156-67]. Debido a que se sabe que la respuesta de citocina T_H2 desempeña un papel importante en la deposición de colágeno [Wynn et al. (2004), *supra*], una serie final de experimentos examinó la influencia del IL-21R sobre la progresión de la fibrosis hepática. Notablemente, el desarrollo de fibrosis disminuyó

significativamente en los ratones IL-21R$^{-/-}$, con los animales con genes inactivados mostrando más de un 50% de reducción en la fibrosis hepática a la semana 29 después de la infección. Un punto importante, es que hallazgos similares también se generaron cuando los ratones WT fueron tratados con sIL-21R-Fc. Por consiguiente, el receptor de IL-21 se reveló como un nuevo blanco potencial para el tratamiento contra la fibrosis. En conclusión, estos estudios ilustraron un papel esencial para IL-21R en la progresión de la enfermedad mediada por citocina T_H2. Como tal, IL-21R debe añadirse a la lista de receptores importantes que regulan la inmunidad de tipo 2 y la polarización de macrófagos.

Ejemplo 10: Tratamientos proféticos

[0194] A continuación se presenta un conjunto no limitante de ejemplos de tratamientos proféticos.

[0195] Un sujeto a quien se diagnostica cirrosis hepática recibe una proteína de fusión IL-21R para reducir la acumulación de tejido fibrótico en el hígado. La proteína de fusión IL-21R incluye los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2 fundidos en su terminal C mediante un vinculador (correspondiendo a los aminoácidos 236-243 de la SEC. ID Nº: 17) a una secuencia de inmunoglobulina humana G1 (IgG1) Fc mutada (correspondiendo a los aminoácidos 244-467 de la SEC. ID Nº: 17).

[0196] Un sujeto a quien se ha diagnosticado una infección con esquistosomas recibe un fragmento soluble de IL-21R para reducir la acumulación de tejido fibrótico. El fragmento contiene los aminoácidos 20-538 de la SEC. ID Nº: 2.

[0197] Después de la cirugía, un sujeto recibe un anticuerpo IL-21R para reducir la acumulación de fibrosis debida a la incisión quirúrgica durante el proceso de cicatrización de la herida.

[0198] Un sujeto a quien se ha diagnosticado cirrosis hepática recibe un anticuerpo IL-21 para reducir la acumulación de tejido fibrótico en el hígado.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que consiste en la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que reduce el nivel de IL-21 y/o IL-21R en el sujeto.

2. El método de la reivindicación 1, donde el agente es un antagonista de IL-21/IL-21R seleccionado a partir del grupo que comprende un anticuerpo anti-IL-21R, un anticuerpo anti-IL-21, un fragmento conjugante de antígeno de un anticuerpo anti-IL-21R, un fragmento conjugante de antígeno de un anticuerpo anti-IL-21 y un fragmento soluble de un IL-21R.

3. El método de la reivindicación 2, donde el agente es un fragmento soluble de un IL-21R y donde el fragmento soluble del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que comprende los aminoácidos 1-538 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 20-538 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 20-235 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 1-236 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 20-236 de la SEC. ID Nº: 2, los aminoácidos 1-529 de la SEC. ID Nº: 5, los aminoácidos 20-529 de la SEC. ID Nº: 5, los aminoácidos 1-236 de la SEC. ID Nº: 5 y los aminoácidos 20-236 de la SEC. ID Nº: 5.

4. El método de la reivindicación 3, donde el fragmento soluble de IL-21R se conjuga con un polipéptido de IL-21.

5. El método de la reivindicación 1, donde el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y donde el fragmento soluble del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC. ID Nº: 11, SEC. ID Nº: 13, SEC. ID Nº: 15, SEC. ID Nº: 17, SEC. ID Nº: 19, SEC. ID Nº: 21, SEC. ID Nº: 23, SEC. ID Nº: 25 o la SEC. ID Nº: 27.

6. El método de la reivindicación 5, donde la secuencia de aminoácidos del fragmento soluble del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC. ID Nº: 11 o la SEC. ID Nº: 13.

7. El método de la reivindicación 1, donde el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y donde el fragmento soluble del IL-21R es codificado por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC. ID Nº: 10, SEC. ID Nº: 12, SEC. ID Nº: 14, SEC. ID Nº: 16, SEC. ID Nº: 18, SEC. ID Nº: 20, SEC. ID Nº: 22, SEC. ID Nº: 24 o la SEC. ID Nº: 26.

8. El método de la reivindicación 7, donde el fragmento soluble del IL-21R es codificado por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC. ID Nº: 12 o SEC. ID Nº: 16.

9. El método de la reivindicación 2, donde el agente es un fragmento soluble de un IL-21R, y donde el fragmento soluble del IL-21R comprende un dominio extracelular de IL-21R y un fragmento de inmunoglobulina Fc.

10. El método de la reivindicación 9, donde la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del IL-21R comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90% a los aminoácidos 1-235 de la SEC. ID Nº: 2 o los aminoácidos 20-235 de la SEC. ID Nº: 2.

11. El método de la reivindicación 9, donde el fragmento de inmunoglobulina Fc presenta una función alterada.

12. El método de la reivindicación 11, donde el fragmento de inmunoglobulina Fc tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 244-467 de la SEC. ID Nº: 17.

13. El método de la reivindicación 1, donde la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis afecta al hígado, epidermis, endodermis, músculo, tendón, cartílago, corazón, páncreas, pulmón, útero, sistema nervioso, testículo, ovario, glándula suprarrenal, arteria, vena, colon, intestino delgado, sistema biliar o estómago.

14. El método de la reivindicación 13, donde la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis afecta al hígado, epidermis, endodermis o pulmón.

15. El método de la reivindicación 14, donde la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis es fibrosis pulmonar intersticial.

16. El método de la reivindicación 13, donde la fibrosis o trastorno asociado con la fibrosis es el resultado de una infección con esquistosoma.

17. El método de la reivindicación 1, donde la fibrosis o el trastorno asociado con la fibrosis es el resultado de cicatrización de herida.

18. El método de la reivindicación 17, donde la cicatrización de herida es el resultado de una incisión quirúrgica.

19. El método de la reivindicación 1, que comprende además administrar al sujeto al menos un agente terapéutico adicional.-

20. El método de la reivindicación 19, donde al menos el agente terapéutico adicional es seleccionado a partir del grupo que comprende inhibidores de citocina, inhibidores de factor de crecimiento, inmunodepresores, agentes antinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos, agentes citotóxicos y agentes citostáticos.

21. El método de la reivindicación 19, donde al menos el agente terapéutico adicional es seleccionado a partir del grupo que comprende antagonistas de FNT, agentes anti-FNT,

antagonistas de IL-12, antagonistas de IL-15, antagonistas de IL-17, antagonistas de IL-18, antagonistas de IL-22, agentes de depleción de células T, agentes de depleción de células B, ciclosporina, FK506, CCI-779, etanercept, infliximab, rituximab, adalimumab, prednisolona, azatioprina, oro, sulfasalacina, hidroxicloroquina, minociclina, anakinra, abatacept, metotrexato, leflunomida, rapamicina, análogos de rapamicina, inhibidores de Cox-2, inhibidores de cPLA2, FAINE, inhibidores de p38, antagonistas de B7.1, B7.2, ICOSL, ICOS y/o CD28 y agonistas de CTLA4.

22. El método de la reivindicación 1, donde el sujeto es un ser humano.

23. Un método para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa; (b) poner en contacto la célula o muestra que interesa con un compuesto, y (c) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa después del contacto con el compuesto, con lo que un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, que ha entrado en contacto, comparado con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa y que no ha entrado en contacto, identifica al compuesto como un compuesto útil para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto.

24. Un método para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa; (b) poner en contacto la célula o muestra que interesa con un compuesto; (c) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa después del contacto con el compuesto, y (d) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa que ha entrado en contacto, con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa y que ha entrado en contacto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, identifica al

compuesto como un compuesto útil para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto.

25. Un método para monitorear el progreso de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto en un primer momento; y (b) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa. obtenida del sujeto en un segundo momento, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto al segundo momento, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto en el primer momento, ofrece una indicación de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis ha disminuido en severidad.

26. Un método para pronosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida de un sujeto en un primer momento, y (b) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida en un segundo momento, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto al segundo momento, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto en el primer momento, indica una probabilidad menor de que el sujeto vaya a desarrollar fibrosis o la afección asociada con la fibrosis o una probabilidad menor de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis empeore en el sujeto.

27. Un método para pronosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa obtenida del sujeto; y (b) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, indica una probabilidad menor de que el sujeto desarrolle fibrosis o la afección asociada

con la fibrosis o una probabilidad menor de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis empeore en el sujeto.

28. Un método para diagnosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto, y (b) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel mayor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, indica la presencia de fibrosis o de afección asociada con la fibrosis en el sujeto.

RESUMEN

El presente invento proporciona métodos de selección para composiciones útiles para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis y/o afección asociada con la fibrosis midiendo los cambios en los niveles de IL-21 y/o receptor de IL-21 (IL-21R) (por ejemplo, el nivel de expresión de proteína y/o ARNm de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R). El invento proporciona además, antagonistas de IL-21 o IL-21R para el tratamiento de fibrosis y/o afección asociada con fibrosis. En este documento se proporcionan también métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso (por ejemplo, el curso de tratamiento) de fibrosis y/o afección asociada con la fibrosis midiendo el nivel de IL-21 y/o IL-21R [es decir, el nivel de actividad de IL-21 y/o IL-21R, el nivel de expresión de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, el nivel de los productos genéticos de IL-21 y/o IL-21R), y/o el nivel de interacción de IL-21 con IL-21R].

Fig. 1

```
   1 GTCGACGCGG CGGTACCAGC TGTCTGCCCA CTTCTCCTGT GGTGTGCCTC
  51 ACGGTCACTT GCTTGTCTGA CCGCAAGTCT GCCCATCCCT GGGGCAGCCA
 101 ACTGGCCTCA GCCCGTGCCC CAGGCGTGCC CTGTCTCTGT CTGGCTGCCC
 151 CAGCCCTACT GTCTTCCTCT GTGTAGGCTC TGCCCAGATG CCCGGCTGGT
 201 CCTCAGCCTC AGGACTATCT CAGCAGTGAC TCCCCTGATT CTGGACTTGC
 251 ACCTGACTGA ACTCCTGCCC ACCTCAAACC TTCACCTCCC ACCACCACCA
 301 CTCCGAGTCC CGCTGTGACT CCCACGCCCA GGAGACCACC CAAGTGCCCC
 351 AGCCTAAAGA ATGGCTTTCT GAGAAAGACC CTGAAGGAGT AGGTCTGGGA
 401 CACAGCATGC CCCGGGGCCC AGTGGCTGCC TTACTCCTGC TGATTCTCCA
 451 TGGAGCTTGG AGCTGCCTGG ACCTCACTTG CTACACTGAC TACCTCTGGA
 501 CCATCACCTG TGTCCTGGAG ACACGGAGCC CCAACCCCAG CATACTCAGT
 551 CTCACCTGGC AAGATGAATA TGAGGAACTT CAGGACCAAG AGACCTTCTG
 601 CAGCCTACAC AGGTCTGGCC ACAACACCAC ACATATATGG TACACGTGCC
 651 ATATGCGCTT GTCTCAATTC CTGTCCGATG AAGTTTTCAT TGTCAATGTG
 701 ACGGACCAGT CTGGCAACAA CTCCCAAGAG TGTGGCAGCT TTGTCCTGGC
 751 TGAGAGCATC AAACCAGCTC CCCCCTTGAA CGTGACTGTG GCCTTCTCAG
 801 GACGCTATGA TATCTCCTGG GACTCAGCTT ATGACGAACC CTCCAACTAC
 851 GTGCTGAGGG GCAAGCTACA ATATGAGCTG CAGTATCGGA ACCTCAGAGA
 901 CCCCTATGCT GTGAGGCCGG TGACCAAGCT GATCTCAGTG GACTCAAGAA
 951 ACGTCTCTCT TCTCCCTGAA GAGTTCCACA AAGATTCTAG CTACCAGCTG
1001 CAGGTGCGGG CAGCGCCTCA GCCAGGCACT TCATTCAGGG GGACCTGGAG
1051 TGAGTGGAGT GACCCCGTCA TCTTTCAGAC CCAGGCTGGG GAGCCCGAGG
1101 CAGGCTGGGA CCCTCACATG CTGCTGCTCC TGGCTGTCTT GATCATTGTC
1151 CTGGTTTTCA TGGGTCTGAA GATCCACCTG CCTTGGAGGC TATGGAAAAA
1201 GATATGGGCA CCAGTGCCCA CCCCTGAGAG TTTCTTCCAG CCCCTGTACA
1251 GGGAGCACAG CGGGAACTTC AAGAAATGGG TTAATACCCC TTTCACGGCC
1301 TCCAGCATAG AGTTGGTGCC ACAGAGTTCC ACAACAACAT CAGCCTTACA
1351 TCTGTCATTG TATCCAGCCA AGGAGAAGAA GTTCCCGGGG CTGCCGGGTC
1401 TGGAAGAGCA ACTGGAGTGT GATGGAATGT CTGAGCCTGG TCACTGGTGC
```

Fig. 1 (continuación)

1451 ATAATCCCCT TGGCAGCTGG CCAAGCGGTC TCAGCCTACA GTGAGGAGAG

1501 AGACCGGCCA TATGGTCTGG TGTCCATTGA CACAGTGACT GTGGGAGATG

1551 CAGAGGGCCT GTGTGTCTGG CCCTGTAGCT GTGAGGATGA TGGCTATCCA

1601 GCCATGAACC TGGATGCTGG CCGAGAGTCT GGCCCTAATT CAGAGGATCT

1651 GCTCTTGGTC ACAGACCCTG CTTTTCTGTC TTGCGGCTGT GTCTCAGGTA

1701 GTGGTCTCAG GCTTGGAGGC TCCCCAGGCA GCCTACTGGA CAGGTTGAGG

1751 CTGTCATTTG CAAAGGAAGG GGACTGGACA GCAGACCCAA CCTGGAGAAC

1801 TGGGTCCCCA GGAGGGGGCT CTGAGAGTGA AGCAGGTTCC CCCCCTGGTC

1851 TGGACATGGA CACATTTGAC AGTGGCTTTG CAGGTTCAGA CTGTGGCAGC

1901 CCCGTGGAGA CTGATGAAGG ACCCCCTCGA AGCTATCTCC GCCAGTGGGT

1951 GGTCAGGACC CCTCCACCTG TGGACAGTGG AGCCCAGAGC AGCTAGCATA

2001 TAATAACCAG CTATAGTGAG AAGAGGCCTC TGAGCCTGGC ATTTACAGTG

2051 TGAACATGTA GGGGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG

2101 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTCTTGGGT TGTGTGTTAG CACATCCATG

2151 TTGGGATTTG GTCTGTTGCT ATGTATTGTA ATGCTAAATT CTCTACCCAA

2201 AGTTCTAGGC CTACGAGTGA ATTCTCATGT TTACAAACTT GCTGTGTAAA

2251 CCTTGTTCCT TAATTTAATA CCATTGGTTA AATAAAATTG GCTGCAACCA

2301 ATTACTGGAG GGATTAGAGG TAGGGGGCTT TTGAGTTACC TGTTTGGAGA

2351 TGGAGAAGGA GAGAGGAGAG ACCAAGAGGA GAAGGAGGAA GGAGAGGAGA

2401 GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA

2451 GGCTGCCGTG AGGGGAGAGG GACCATGAGC CTGTGGCCAG GAGAAACAGC

2501 AAGTATCTGG GGTACACTGG TGAGGAGGTG GCCAGGCCAG CAGTTAGAAG

2551 AGTAGATTAG GGGTGACCTC CAGTATTTGT CAAAGCCAAT TAAAATAACA

2601 AAAAAAAAAA AAAAGCGGCC GCTCTAGA

Fig. 2A

1 MPRGPVAALL LLILHGAWSC LDLTCYTDYL WTITCVLETR SPNPSILSLT

51 WQDEYEELQD QETFCSLHRS GHNTTHIWYT CHMRLSQFLS DEVFIVNVTD

101 QSGNNSQECG SFVLAESIKP APPLNVTVAF SGRYDISWDS AYDEPSNYVL

151 RGKLQYELQY RNLRDPYAVR PVTKLISVDS RNVSLLPEEF HKDSSYQLQV

201 RAAPQPGTSF RGTWSEWSDP VIFQTQAGEP EAGWDPHMLL LLAVLIIVLV

251 FMGLKIHLPW RLWKKIWAPV PTPESFFQPL YREHSGNFKK WVNTPFTASS

301 IELVPQSSTT TSALHLSLYP AKEKKFPGLP GLEEQLECDG MSEPGHWCII

351 PLAAGQAVSA YSEERDRPYG LVSIDTVTVG DAEGLCVWPC SCEDDGYPAM

401 NLDAGRESGP NSEDLLLVTD PAFLSCGCVS GSGLRLGGSP GSLLDRLRLS

451 FAKEGDWTAD PTWRTGSPGG GSESEAGSPP GLDMDTFDSG FAGSDCGSPV

501 ETDEGPPRSY LRQWVVRTPP PVDSGAQSS

Figure 2B

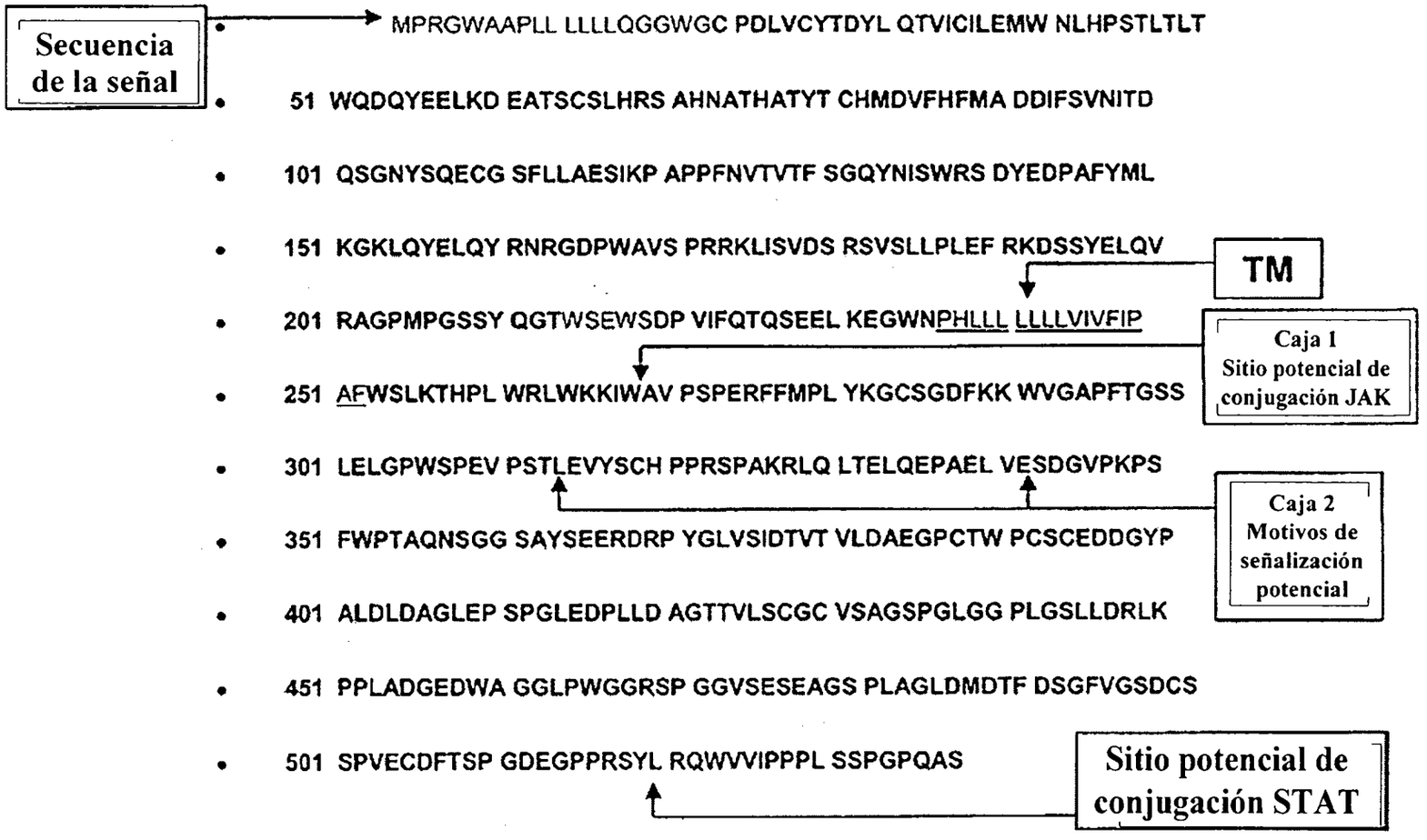


Fig. 2B

Fig. 3

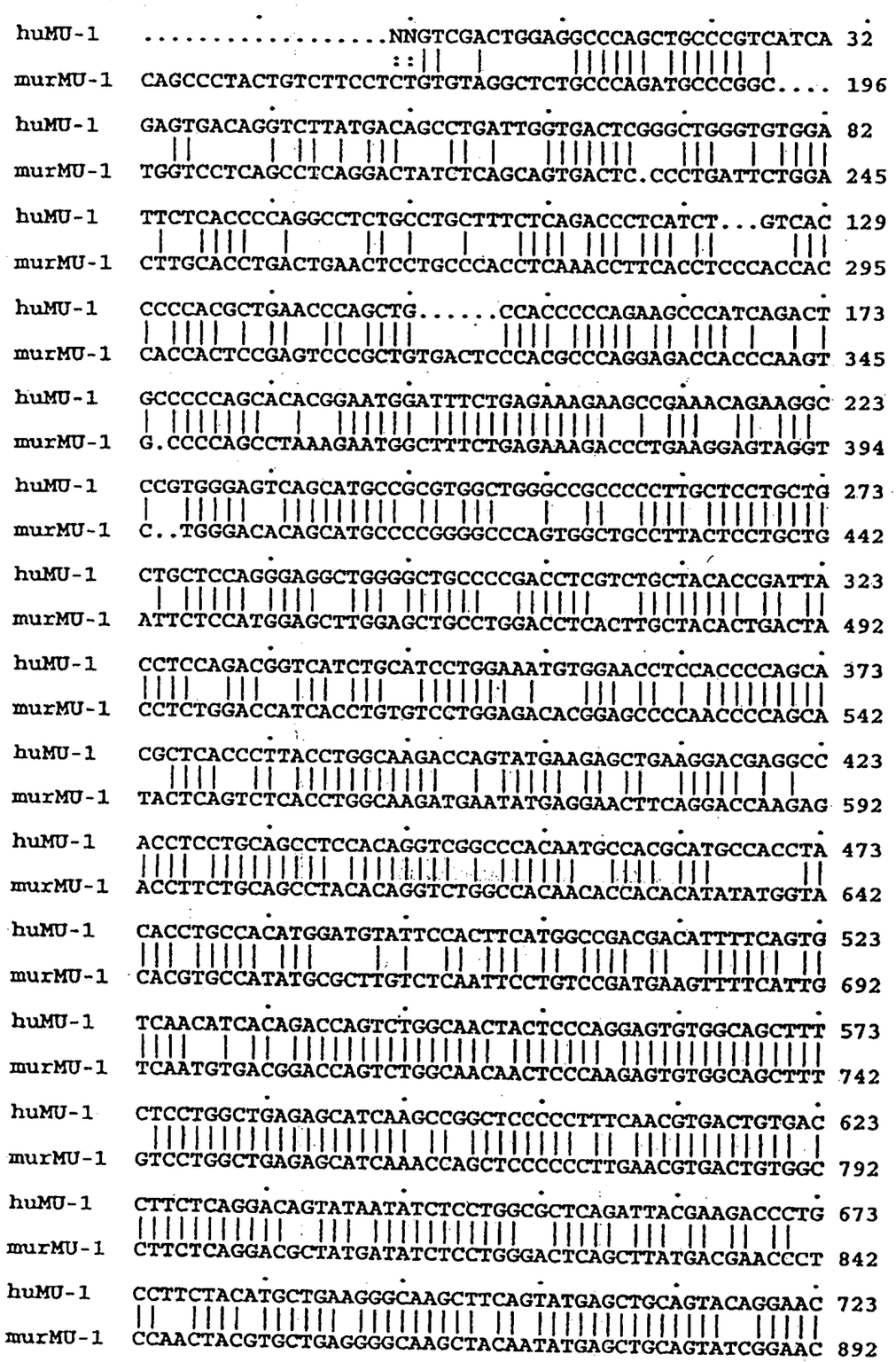

huMU-1 .....NNGTCGACTGGAGGCCCAGCTGCCCGTCATCA 32
murMU-1 CAGCCCTACTGTCTTCCTCTGTGTAGGCTCTGCCCAGATGCCCGGC.... 196
huMU-1 GAGTGACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGA 82
murMU-1 TGGTCCTCAGCCTCAGGACTATCTCAGCAGTGACTC.CCCTGATTCTGGA 245
huMU-1 TTCTCACCCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACCCTCATCT...GTCAC 129
murMU-1 CTTGCACCTGACTGAACTCCTGCCCACCTCAAACCTTCACCTCCCACCAC 295
huMU-1 CCCCACGCTGAACCCAGCTG.....CCACCCCCAGAAGCCCATCAGACT 173
murMU-1 CACCACTCCGAGTCCCGCTGTGACTCCCACGCCCAGGAGACCACCCAAGT 345
huMU-1 GCCCCCAGCACACGGAATGGATTTCTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGC 223
murMU-1 G.CCCCAGCCTAAAGAATGGCTTTCTGAGAAAGACCCTGAAGGAGTAGGT 394
huMU-1 CCGTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCCCTTGCTCCTGCTG 273
murMU-1 C..TGGGACACAGCATGCCCCGGGGCCCAGTGGCTGCCTTACTCCTGCTG 442
huMU-1 CTGCTCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTA 323
murMU-1 ATTCTCCATGGAGCTTGGAGCTGCCTGGACCTCACTTGCTACACTGACTA 492
huMU-1 CCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGGAACCTCCACCCCAGCA 373
murMU-1 CCTCTGGACCATCACCTGTGTCCTGGAGACACGGAGCCCCAACCCCAGCA 542
huMU-1 CGCTCACCCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCC 423
murMU-1 TACTCAGTCTCACCTGGCAAGATGAATATGAGGAACTTCAGGACCAAGAG 592
huMU-1 ACCTCCTGCAGCCTCCACAGGTCGGCCCACAATGCCACGCATGCCACCTA 473
murMU-1 ACCTTCTGCAGCCTACACAGGTCTGGCCACAACACCACACATATATGGTA 642
huMU-1 CACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATTTTCAGTG 523
murMU-1 CACGTGCCATATGCGCTTGTCTCAATTCCTGTCCGATGAAGTTTTCATTG 692
huMU-1 TCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCCAGGAGTGTGGCAGCTTT 573
murMU-1 TCAATGTGACGGACCAGTCTGGCAACAACTCCCAAGAGTGTGGCAGCTTT 742
huMU-1 CTCCTGGCTGAGAGCATCAAGCCGGCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGAC 623
murMU-1 GTCCTGGCTGAGAGCATCAAACCAGCTCCCCCCTTGAACGTGACTGTGGC 792
huMU-1 CTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTG 673
murMU-1 CTTCTCAGGACGCTATGATATCTCCTGGGACTCAGCTTATGACGAACCCT 842
huMU-1 CCTTCTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAAC 723
murMU-1 CCAACTACGTGCTGAGGGGCAAGCTACAATATGAGCTGCAGTATCGGAAC 892

Fig. 3 (continuación)

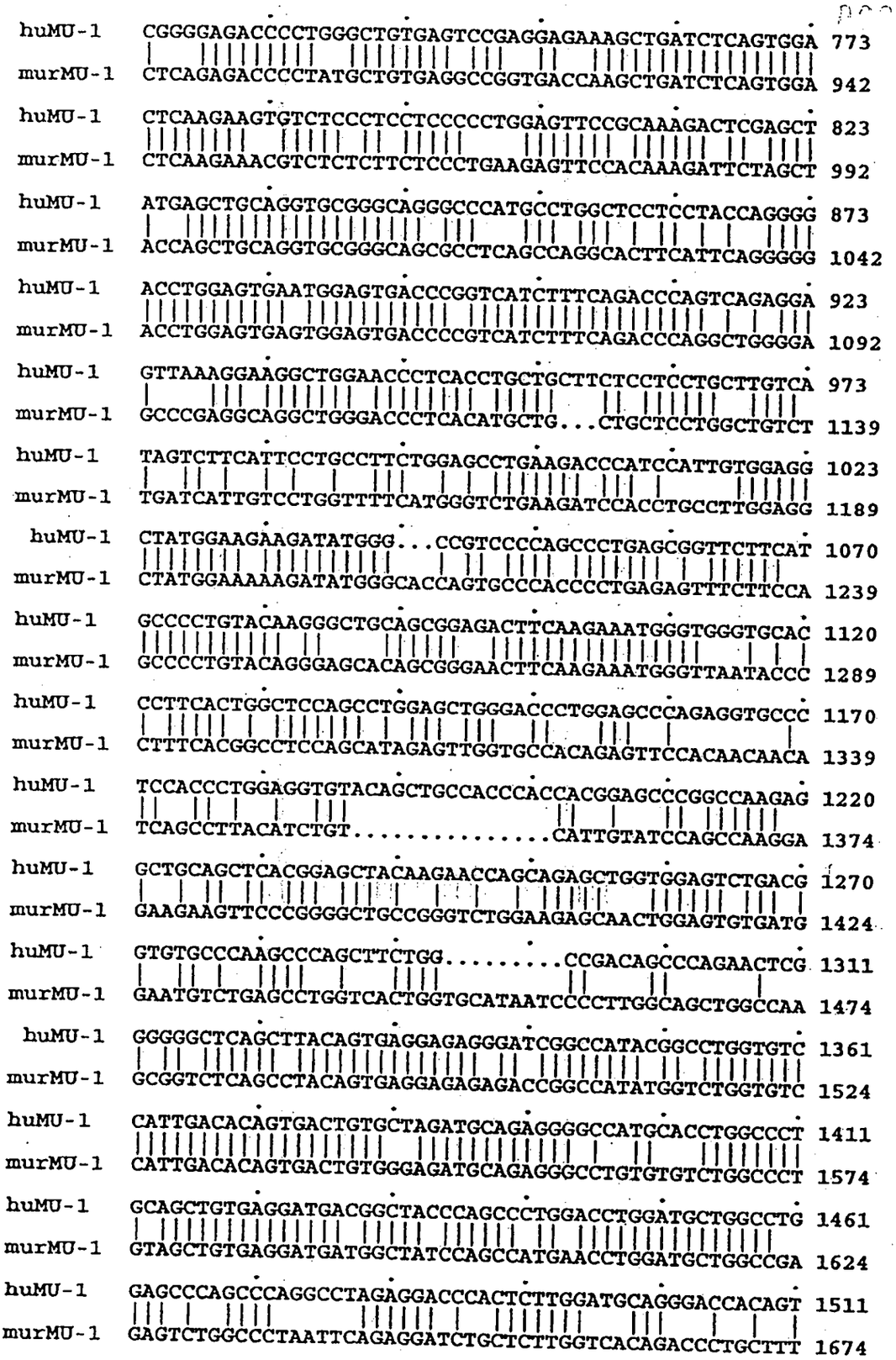


Fig. 3 (continuación)

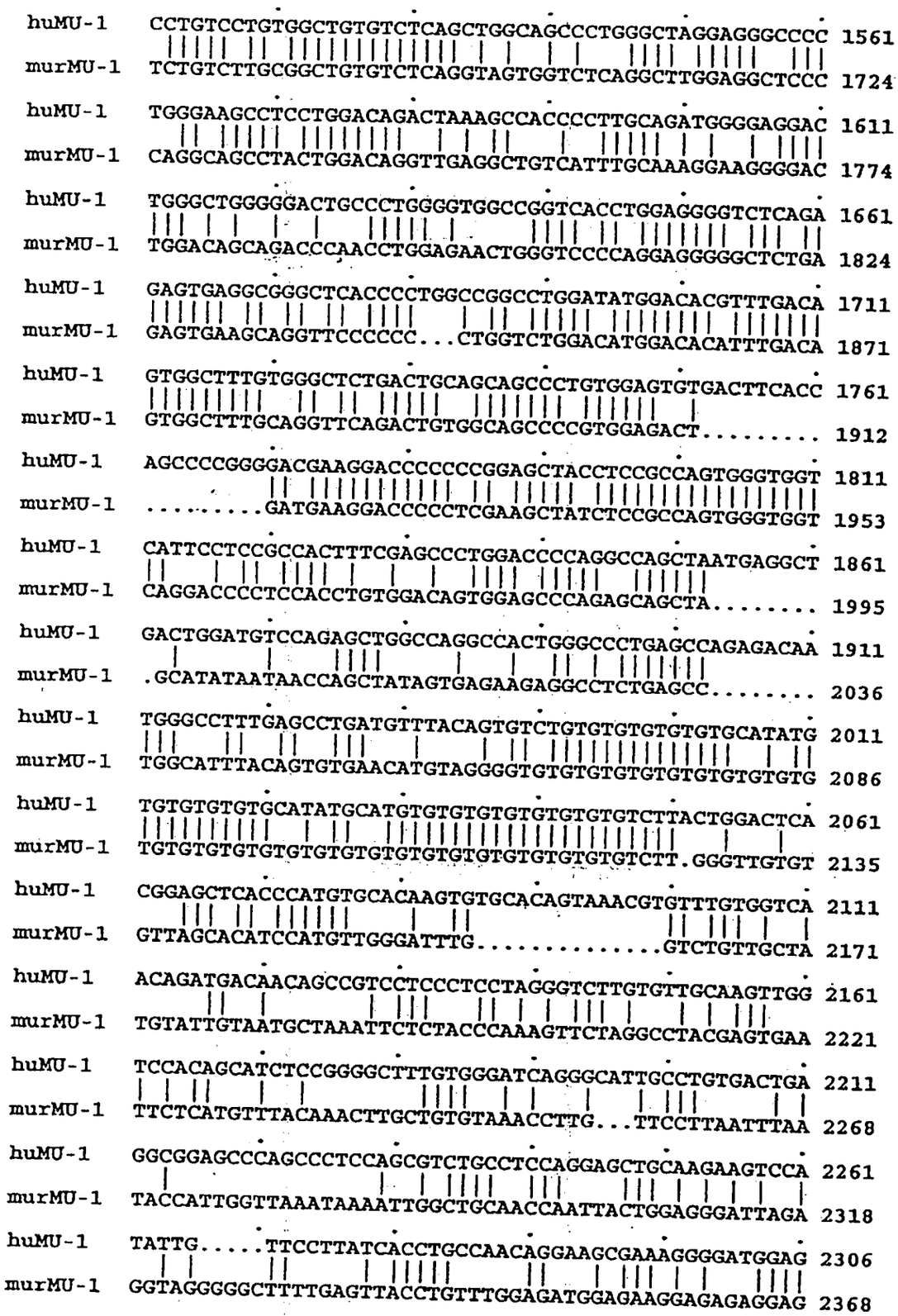


Fig. 3 (continuación)

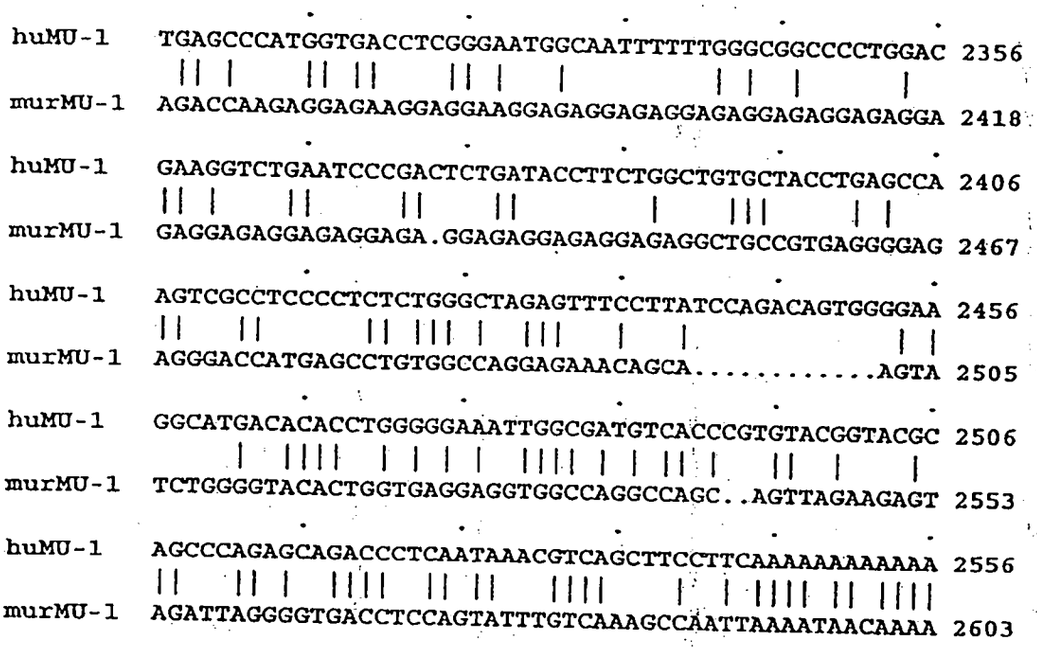


Fig. 4

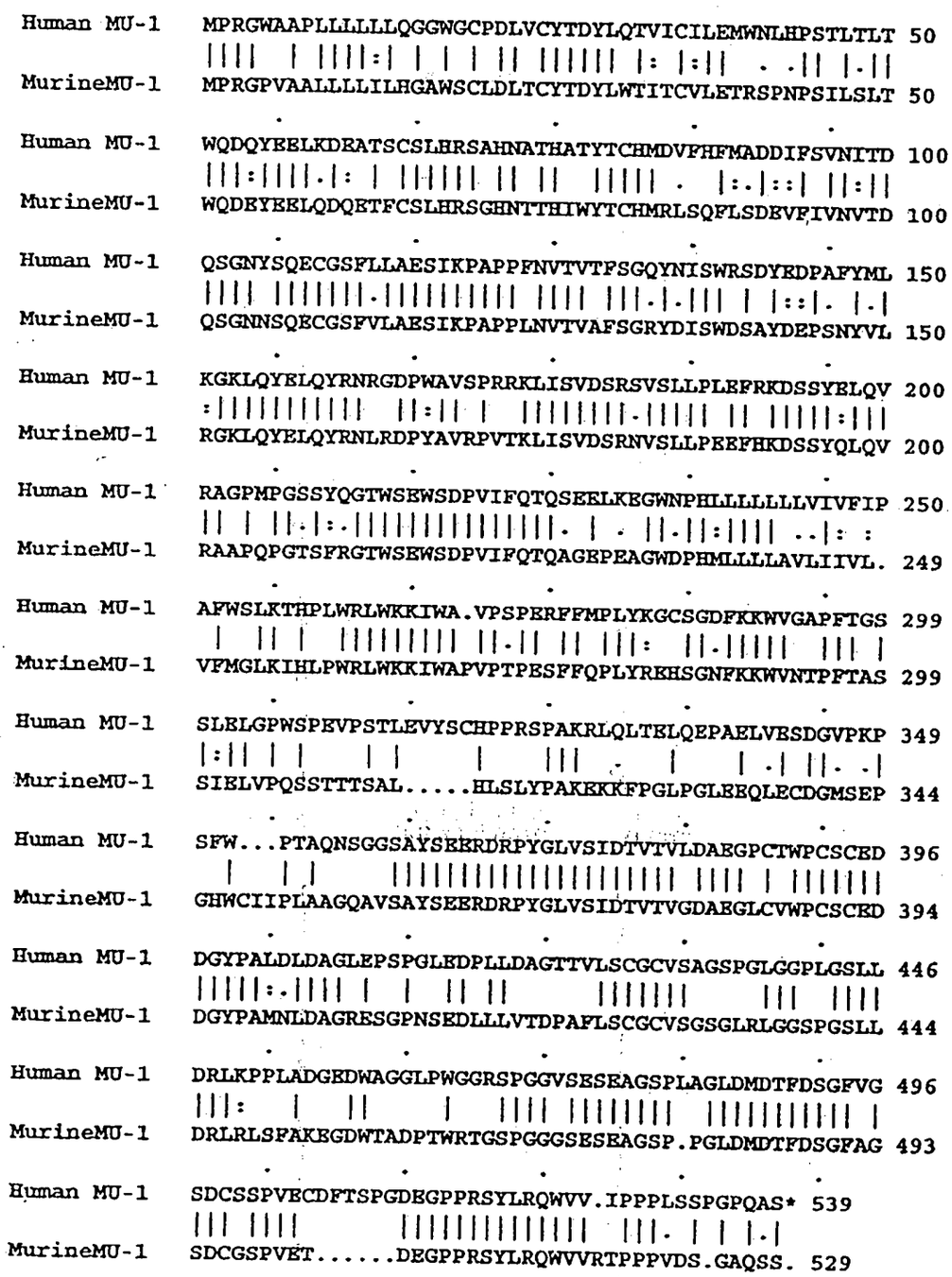

Human MU-1 MPRGWAAPLLLLLLQGGWGCPDLVCYTDYLQTVICILEMWNLHPSTLTLT 50
MurineMU-1 MPRGPVAALLLLILHGAWSCLDLTCYTDYLWTITCVLETRSPNPSILSLT 50
Human MU-1 WQDQYEELKDRATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFHFMADDIFSVNITD 100
MurineMU-1 WQDEYEELQDQETFCSLHRSGHNTTHIWYTCHMRLSQFLSDEVFIVNVTD 100
Human MU-1 QSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRSDYEDPAFYML 150
MurineMU-1 QSGNNSQECGSFVLAESIKPAPPLNVTVAFSGRYDISWDSAYDEPSNYVL 150
Human MU-1 KGKLQYELQYRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLLPLEFRKDSSYELQV 200
MurineMU-1 RGKLQYELQYRNLRDPYAVRPVTKLISVDSRNVSLLPEEFHKDSSYQLQV 200
Human MU-1 RAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEELKEGWNPHLLLLLLLVIVFIP 250
MurineMU-1 RAAPQPGTSFRGTWSEWSDPVIFQTQAGEPEAGWDPHMLLLLAVLIIVL. 249
Human MU-1 AFWSLKTHPLWRLWKKIWA.VPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGS 299
MurineMU-1 VFMGLKIHLPWRLWKKIWAPVPTPESFFQPLYRKHSGNFKKWVNTPFTAS 299
Human MU-1 SLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKP 349
MurineMU-1 SIELVPQSSTTTSAL.....HLSLYPAKKKKFPGLPGLEEQLECDGMSEP 344
Human MU-1 SFW...PTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCED 396
MurineMU-1 GHWCIIPLAAGQAVSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVGDAEGLCVWPCSCED 394
Human MU-1 DGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLL 446
MurineMU-1 DGYPAMNLDAGRESGPNSEDLLLVTDPAFLSCGCVSGSGLRLGGSPGSLL 444
Human MU-1 DRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVG 496
MurineMU-1 DRLRLSPAKEGDWTADPTWRTGSPGGGSESEAGSP.PGLDMDTFDSGFAG 493
Human MU-1 SDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVV.IPPPLSSPGPQAS* 539
MurineMU-1 SDCGSPVET......DEGPPRSYLRQWVVRTPPPVDS.GAQSS. 529

Fig. 5

```
                1                                                   50
      humu  ---MPRGWAA PLLLLL..LQ GGWG..... CPDLVCYTDY LQTVICILEM
   mousemu  ---MPRGPVA ALLLLI..LH GAWG..... CLDLTCYTDY LWTITCVLET
humil2rbc  MAAPALSWRL PLLILLLPLA TSWASAAVNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ
               51                                                  100
      humu  WN..LHPSTL TLTWQDQYEE LKDEATSCSL HRSAHNATHA TYTCHM....
   mousemu  RS..PNPSIL SLTWQDEYEE LQDQETFCSL HRSGHNTTHI WYTCHM....
humil2rbc  DGALQDTSCQ VHAWPDR... .RRWNQTCEL ....LPVSQA SWACNLILGA
              101                                                  150
      humu  .DVFHFMADD IFSVNITDQS GN..YSQECG SFLLAESIKP APPFNVTVTF
   mousemu  .RLSQFLSDE VFIVNVTDQS GN..NSQECG SFVLAESIKP APPLNVTVAF
humil2rbc  PDSQKLTTVD IVTLRVLCRE GVRWRVMAIQ DFKPFENLRL MAPISLQVVH
              151                                                  200
      humu  ..SGQYNISW RSDYEDPAFY MLKGKLQYEL QYRNRGDPWA VSPRRKLISV
   mousemu  ..SGRYDISW DSAYDEPSNY VLRGKLQYEL QYRNLRDPYA VRPVTKLISV
humil2rbc  VETHRCNISW E..ISQASHY FER.HLEFEA RTLSPGHTWE EAP...LLTL
              201                                                  250
      humu  DSRSVSLLPL EFRKDSSYEL QVRAGPMPGS SYQGTWSEWS DPVIFQTQS.
   mousemu  DSRNVSLLPE EFHKDSSYQL QVRAAPQPGT SFRGTWSEWS DPVIFQTQA.
humil2rbc  KQKQEWICLE TLTPDTQYEF QVRVKPLQGE F..TTWSPWS QPLAFRTKPA
              251                                                  300
      humu  ..EELKEGWN PHLLLLL... LLVIVFIPAF WSLKTHPLWR LWKKIWA.VP
   mousemu  ..GEPEAGWD PHMLLLL... AVLIIVL.VF MGLKIHLPWR LWKKIWAPVP
humil2rbc  ALGKDTIPWL GHLLVGLSGA FGFIILVYLL INCRNTGPW. LKKVLKCNTP
              301                                                  350
      humu  SPERFFMPLY KGCSGDFKKW VGAPFTGSSL ELGPWSPEVP STLEVYSCHP
   mousemu  TPESFFQPLY REHSGNFKKW VNTPFTASSI ELVPQSSTTT SAL.....HL
humil2rbc  DPSKFFSQLS SEHGGDVQKW LSSPFPSSSF SPGGLAPEIS PLEVLERDKV
              351                                                  400
      humu  PRSPAKRLQL TELQEPA..E LVESDGVPKP SFW...PTAQ NSGGSAYSEE
   mousemu  SLYPAKEKKF PGLPGLE..E QLECDGMSEP GHWCIIPLAA GQAVSAYSEE
humil2rbc  TQLLLQQDKV PEPASLSSNH SLTSCFTNQG YFFFHLPDAL EIEACQVYFT
              401                                                  450
      humu  RDRPYGLVSI DTVTVLDAEG PC...TWPCS CEDDGYPALD LDAGLEPSPG
   mousemu  RDRPYGLVSI DTVTVGDAEG LC...VWPCS CEDDGYPAMN LDAGRESGPN
humil2rbc  YD.PYSEEDP DEGVAGAPTG SSPQPLQPLS GEDDAYCTF. ........PS
              451                                                  500
      humu  LEDPLLDAGT TVLSCGCVSA GSPGLGGPLG SLLDRLKPPL AD..GEDWAG
   mousemu  SEDLLLVTDP AFLSCGCVSG SGLRLGGSPG SLLDRLRLSF AK..EGDWTA
humil2rbc  RDDLLLFS.P SLL..GGPSP PSTAPGGS.G AGEERMPPSL QERVPRDWDP
              501                                                  550
      humu  GLPWGGRSPG GVSESEAGSP LAGLDMDTFD SGFVGSDCSS PVECDFTSPG
   mousemu  DPTWRTGSPG GGSESEAGSP .PGLDMDTFD SGFAGSDCGS PVET......
humil2rbc  Q.PLGPPTPG VPDLVDFQPP P...ELVLRE AGEEVPDAG. PRE.GVSFPW
              551                                          588
      humu  DEGPPRSYLR QWVVIPPPLS SPGPQAS*-- ---------
   mousemu  DEGPPRSYLR QWVVRTPPPV DSGAQSS--- ---------
humil2rbc  SRPPGQGEFR ALNARLPLNT DAYLSLQELQ GQDPTHLV
```

Fig. 6

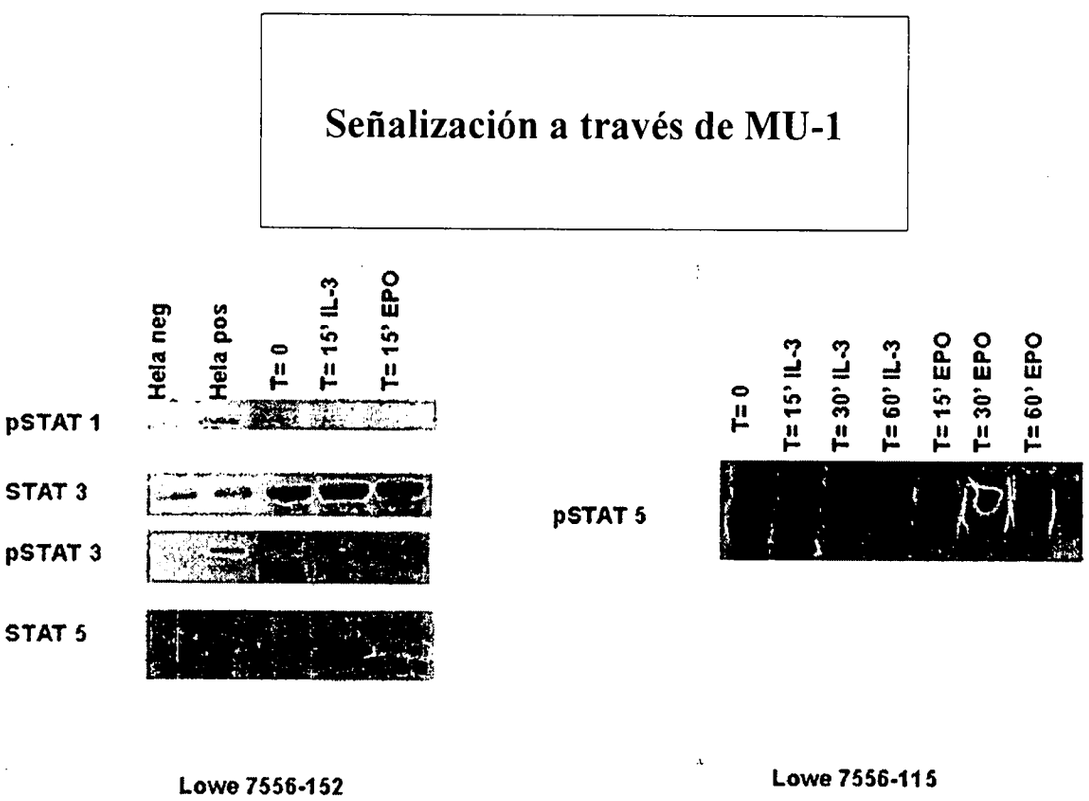

Señalización a través de MU-1
Hela neg
Hela pos
T= 0
T= 15' IL-3
T= 15' EPO
pSTAT 1
STAT 3
pSTAT 3
STAT 5
Lowe 7556-152
T= 0
T= 15' IL-3
T= 30' IL-3
T= 60' IL-3
T= 15' EPO
T= 30' EPO
T= 60' EPO
pSTAT 5
Lowe 7556-115

Fig. 7A

```
atg aaa ttc tta gtc aac gtt gcc ctt gtt ttt atg gtc gtg tac att      48
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                  10                  15

tct tac atc tat gcc ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc      96
Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

ggc gac tat aaa gac gat gac gat aag ggt tcc gga tgc ccc gac ctc     144
Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Pro Asp Leu
        35                  40                  45

gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg     192
Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met
    50                  55                  60

tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat     240
Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr
65                  70                  75                  80

gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc     288
Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala
                85                  90                  95

cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac     336
His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His
            100                 105                 110

ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc     384
Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag     432
Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat     480
Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn
145                 150                 155                 160

atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag     528
Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys
                165                 170                 175

ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg     576
Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp
            180                 185                 190

gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc     624
Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val
        195                 200                 205

tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag     672
Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 7B

```
gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt        720
Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag        768
Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys
                245                 250                 255

gaa ggc tgg aac taa tga                                               786
Glu Gly Trp Asn
            260
```

Fig. 8A

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg          50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                  10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat          98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc         146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac         194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat         242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac         290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag         338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc         386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca         434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat         482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg         530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg         578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc         626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg         674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220
```

Fig. 8B

```
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gtc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440
```

Fig. 8C

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tgagtgaatt c                          1426
Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                465
```

Fig. 9A

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg          50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                  10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat          98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc         146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac         194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat         242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac         290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag         338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc         386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca         434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat         482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg         530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg         578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc         626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg         674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220
```

Fig. 9B

```
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gtc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440
```

Fig. 9C

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tca gga atg gca tca atg aca gga ggt      1442
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly
                465                 470                 475

caa caa atg ggt tct gga tct cat cat cat cat cat cat tct gga ggt      1490
Gln Gln Met Gly Ser Gly Ser His His His His His His Ser Gly Gly
            480                 485                 490

tgagaattc                                                           1499
```

Fig. 10A

```
gcggccgcac cacc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg          50
                Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu
                1               5                  10

ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat          98
Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp
        15                  20                  25

tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc         146
Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro
    30                  35                  40

agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac         194
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp
45                  50                  55                  60

gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat         242
Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His
                65                  70                  75

gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac         290
Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp
            80                  85                  90

att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag         338
Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu
        95                  100                 105

tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc         386
Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe
    110                 115                 120

aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca         434
Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser
125                 130                 135                 140

gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat         482
Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr
                145                 150                 155

gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg         530
Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg
            160                 165                 170

aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg         578
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu
        175                 180                 185

gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc         626
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro
    190                 195                 200

atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg         674
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro
205                 210                 215                 220
```

Fig. 10B

```
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac ggc      722
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly
                225                 230                 235

tcc ggc tct aga gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      770
Ser Gly Ser Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            240                 245                 250

gaa gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      818
Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        255                 260                 265

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      866
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    270                 275                 280

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      914
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
285                 290                 295                 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      962
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                305                 310                 315

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1010
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            320                 325                 330

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1058
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        335                 340                 345

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1106
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    350                 355                 360

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1154
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
365                 370                 375                 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1202
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                385                 390                 395

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            400                 405                 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1298
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        415                 420                 425

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1346
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    430                 435                 440
```

Fig. 10C

```
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
445                 450                 455                 460

ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tgagtgaatt c                          1426
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                465
```

Fig. 11A

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac     480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc     528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc     624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag     672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 11B

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

cag gtt gct ccg gca taa tga                                      741
Gln Val Ala Pro Ala
                245
```

Fig. 12A

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac     480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc     528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc     624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag     672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 12B

```
acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac gat gac gat gac aag
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Asp Asp Asp Asp Lys
225                 230                 235                 240

ggc tcc ggc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa
Gly Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

gcc ctg ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac
Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445
```

Fig. 12C

```
tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc      1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga                                          1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

Fig. 13A

```
atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg ctg att ctc cat gga      48
Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
1               5                  10                  15

gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac act gac tac ctc tgg acc      96
Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
            20                  25                  30

atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt     144
Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
        35                  40                  45

ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
    50                  55                  60

tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca cat ata tgg tac acg     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc     288
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
                85                  90                  95

aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg     384
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa     432
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
    130                 135                 140

ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat     480
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc     528
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa     576
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
            180                 185                 190

gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act     624
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
        195                 200                 205

tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag     672
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 13B

```
acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac ggc tcc ggc tct aga      720
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly Ser Arg
225                 230                 235                 240

gagccccgcg gaccgacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagg taagtcacta    780

gaccagagct ccactcccgg gagaatggta agtgctataa acatccctgc actagaggat    840

aagccatgta cagatccatt tccatctctc ctcatcagca cctaacctcg agggtggacc    900

atccgtcttc atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat    960

agtcacatgt gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt   1020

tgtgaacaac gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag   1080

tactctccgg gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaaggc   1140

tttcgcatgc gccgtcaaca acaaagacct cccagcgccc atcgagagaa ccatctcaaa   1200

acccaaaggt gagagctgca gcctgactgc atgggggctg ggatgggcat aaggataaag   1260

gtctgtgtgg acagccttct gcttcagcca tgacctttgt gtatgtttct accctcacag   1320

ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag atgactaaga   1380

aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt   1440

ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg   1500

atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa   1560

atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct   1620

tctcccggac tccgggtaaa tgagctcagc acccacaaaa ctctcaggtc caaagagaca   1680

cccacactca tctccatgct tcccttgtat aaataaagca cccagcaatg cctgggacca   1740

tgtaatagga attc                                                     1754
```

Fig. 14A

```
ctgcaggtcg acaccacc atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg        51
                       Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu
                       1               5                   10

ctg att ctc cat gga gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac act        99
Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr
            15                  20                  25

gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac       147
Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn
        30                  35                  40

ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag       195
Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln
    45                  50                  55

gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca       243
Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr
60                  65                  70                  75

cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat       291
His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp
                80                  85                  90

gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa       339
Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln
            95                  100                 105

gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc       387
Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro
        110                 115                 120

ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac       435
Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp
    125                 130                 135

tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa       483
Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln
140                 145                 150                 155

tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg       531
Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro
                160                 165                 170

gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct       579
Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro
            175                 180                 185

gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg       627
Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala
        190                 195                 200

cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac       675
Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp
    205                 210                 215
```

Fig. 14B

```
ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac      723
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp
220                 225                 230                 235

ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc ggc gac tat aaa gac      771
Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp
                240                 245                 250

gat gac gat aag tagtgagaat tc                                        795
Asp Asp Asp Lys
            255
```

Fig. 15A

```
atg aaa ttc tta gtc aac gtt gcc ctt gtt ttt atg gtc gtg tac att      48
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1               5                  10                  15

tct tac atc tat gcc ggc agc gga cac cac cat cat cac cac ggt agc      96
Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
            20                  25                  30

ggc gac tat aaa gac gat gac gat aag ggt tcc gga tgc ctg gac ctc     144
Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Leu Asp Leu
        35                  40                  45

act tgc tac act gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca     192
Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr
    50                  55                  60

cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat     240
Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr
65                  70                  75                  80

gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc     288
Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly
                85                  90                  95

cac aac acc aca cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa     336
His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln
            100                 105                 110

ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc     384
Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly
        115                 120                 125

aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa     432
Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys
    130                 135                 140

cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat     480
Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp
145                 150                 155                 160

atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg     528
Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg
                165                 170                 175

ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat     576
Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr
            180                 185                 190

gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc     624
Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val
        195                 200                 205

tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag     672
Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln
    210                 215                 220
```

Fig. 15B

```
gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt      720
Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser
225                 230                 235                 240

gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag      768
Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu
                245                 250                 255

gca ggc tgg gac tagtgagaat tc                                        792
Ala Gly Trp Asp
            260
```

Fig. 16

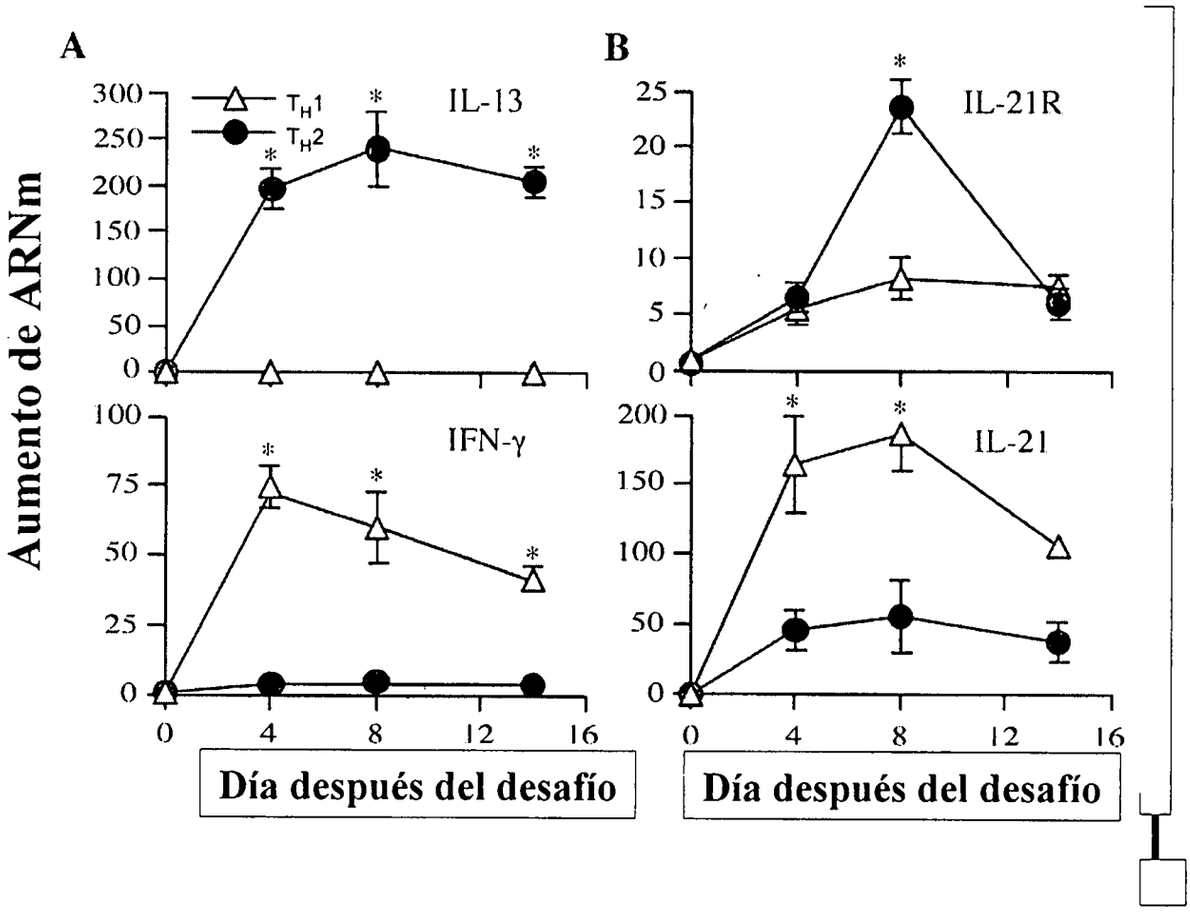

A
B
Aumento de ARNm
T_H1
T_H2
IL-13
IFN-γ
IL-21R
IL-21
300
250
200
150
100
50
0
100
75
50
25
0
25
20
15
10
5
0
200
150
100
50
0
0
4
8
12
16
Día después del desafío
Día después del desafío

Fig. 17

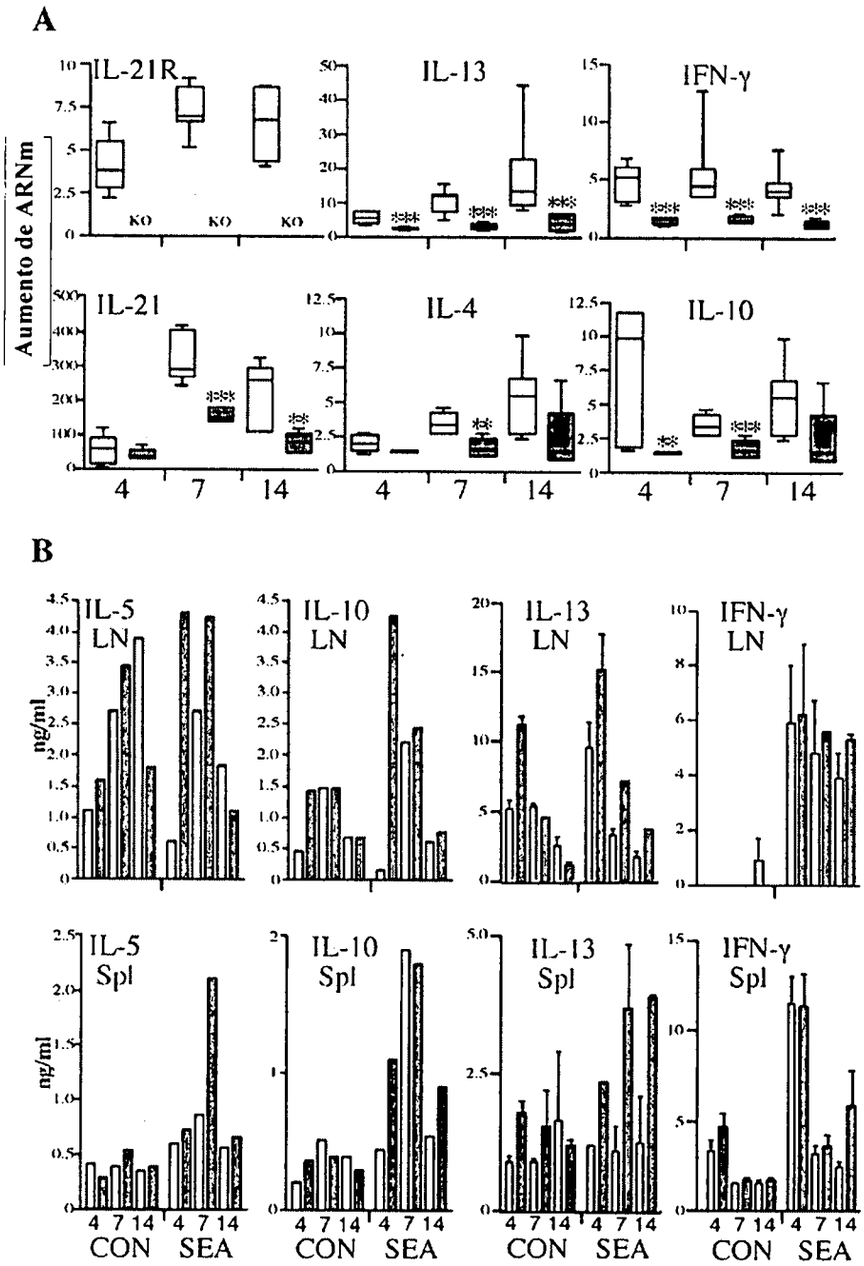

A
IL-21R
IL-13
IFN-γ
IL-21
IL-4
IL-10
Aumento de ARNm
KO
4
7
14
B
IL-5 LN
IL-10 LN
IL-13 LN
IFN-γ LN
IL-5 Spl
IL-10 Spl
IL-13 Spl
IFN-γ Spl
ng/ml
CON
SEA

Fig. 17 (continuación)

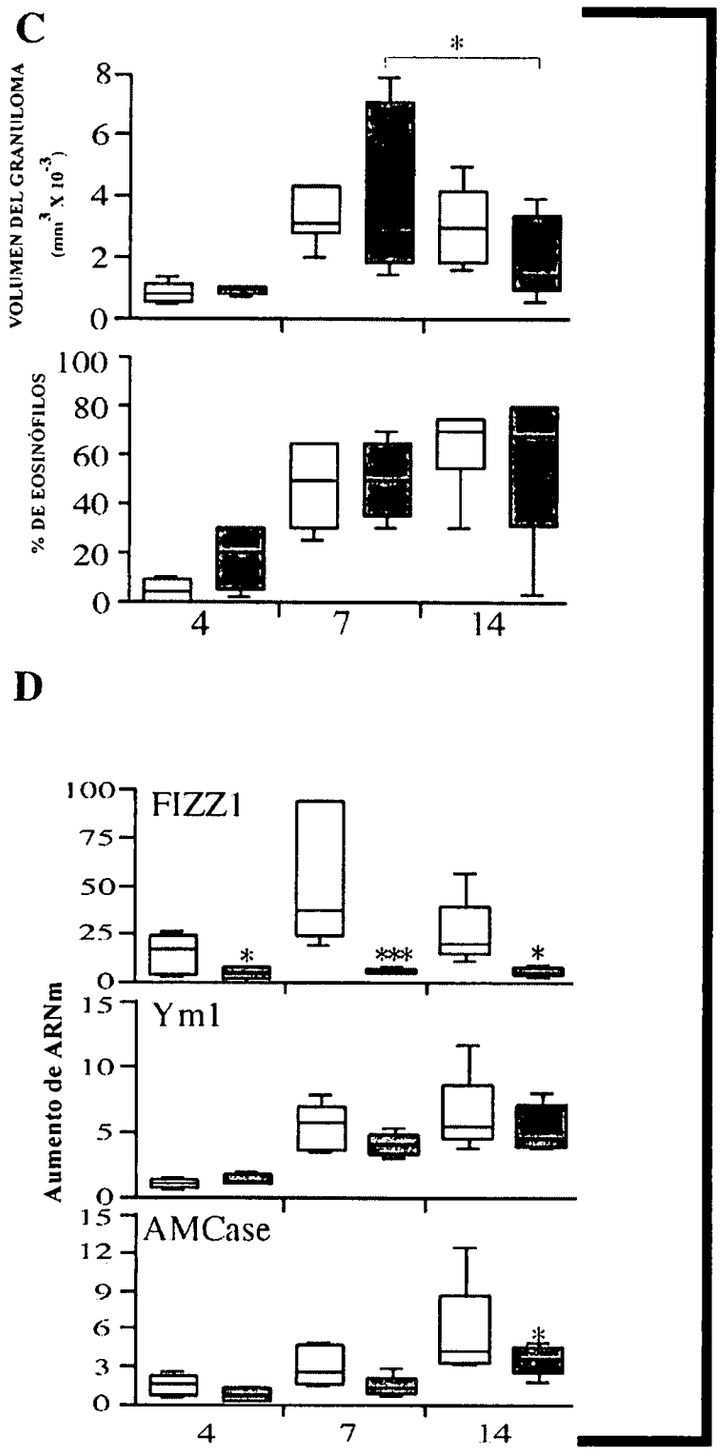


Fig. 18

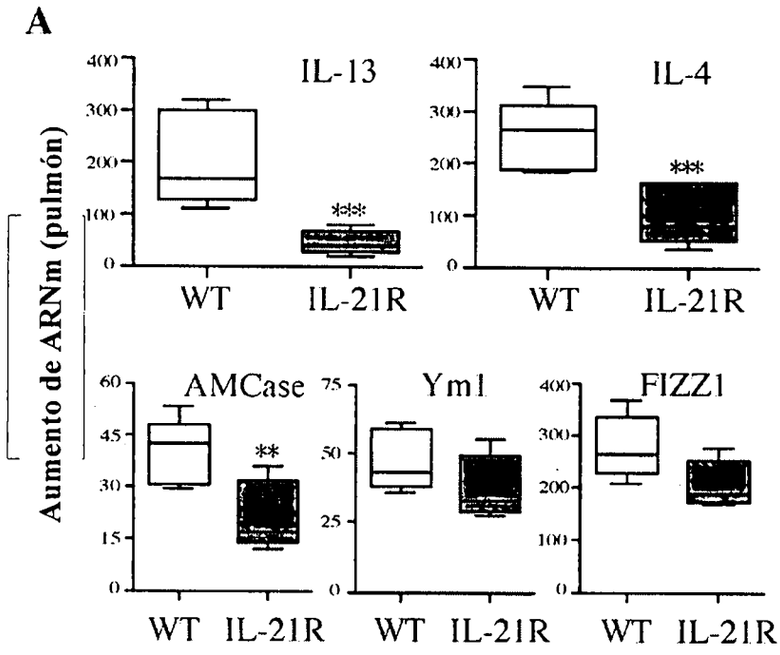


Fig. 18 (continuación)

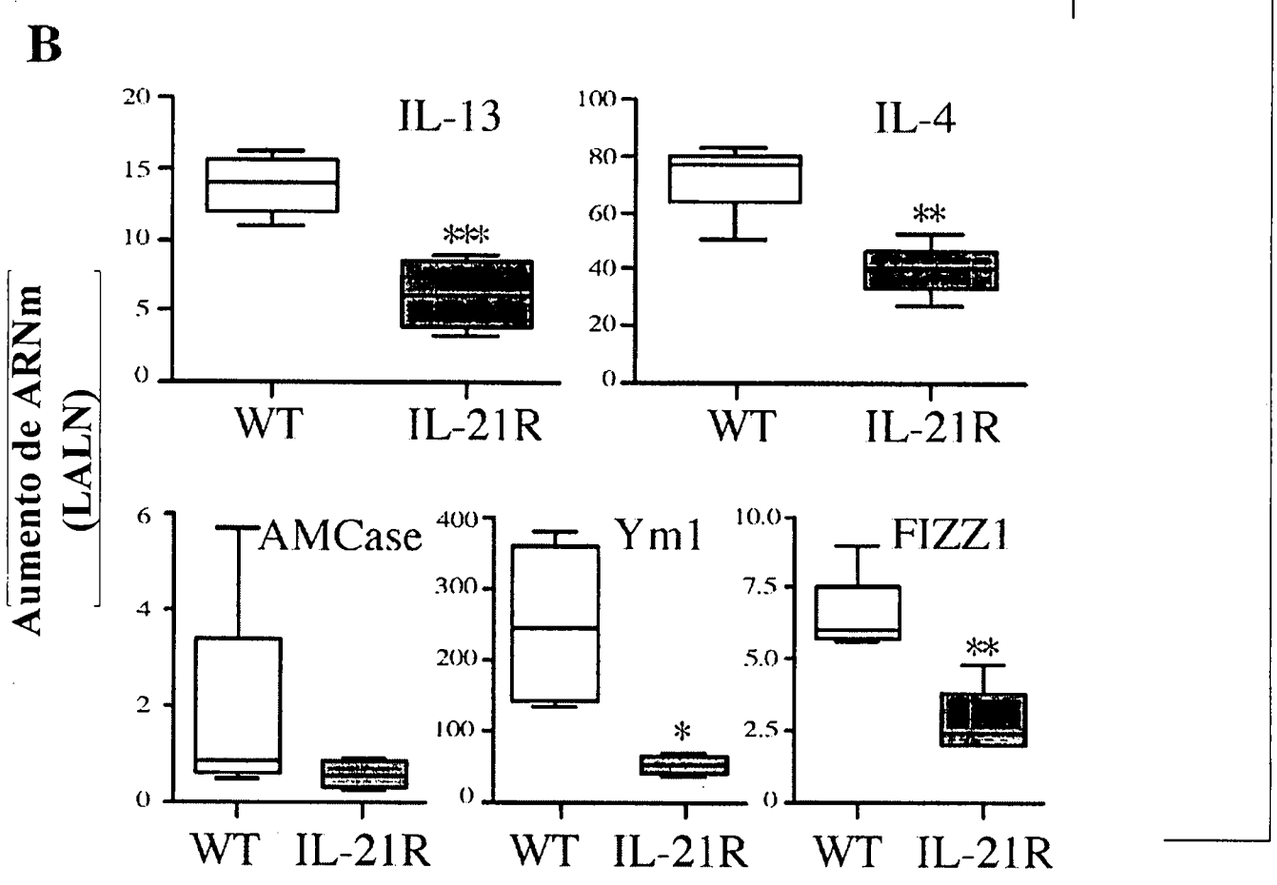


Figure 19

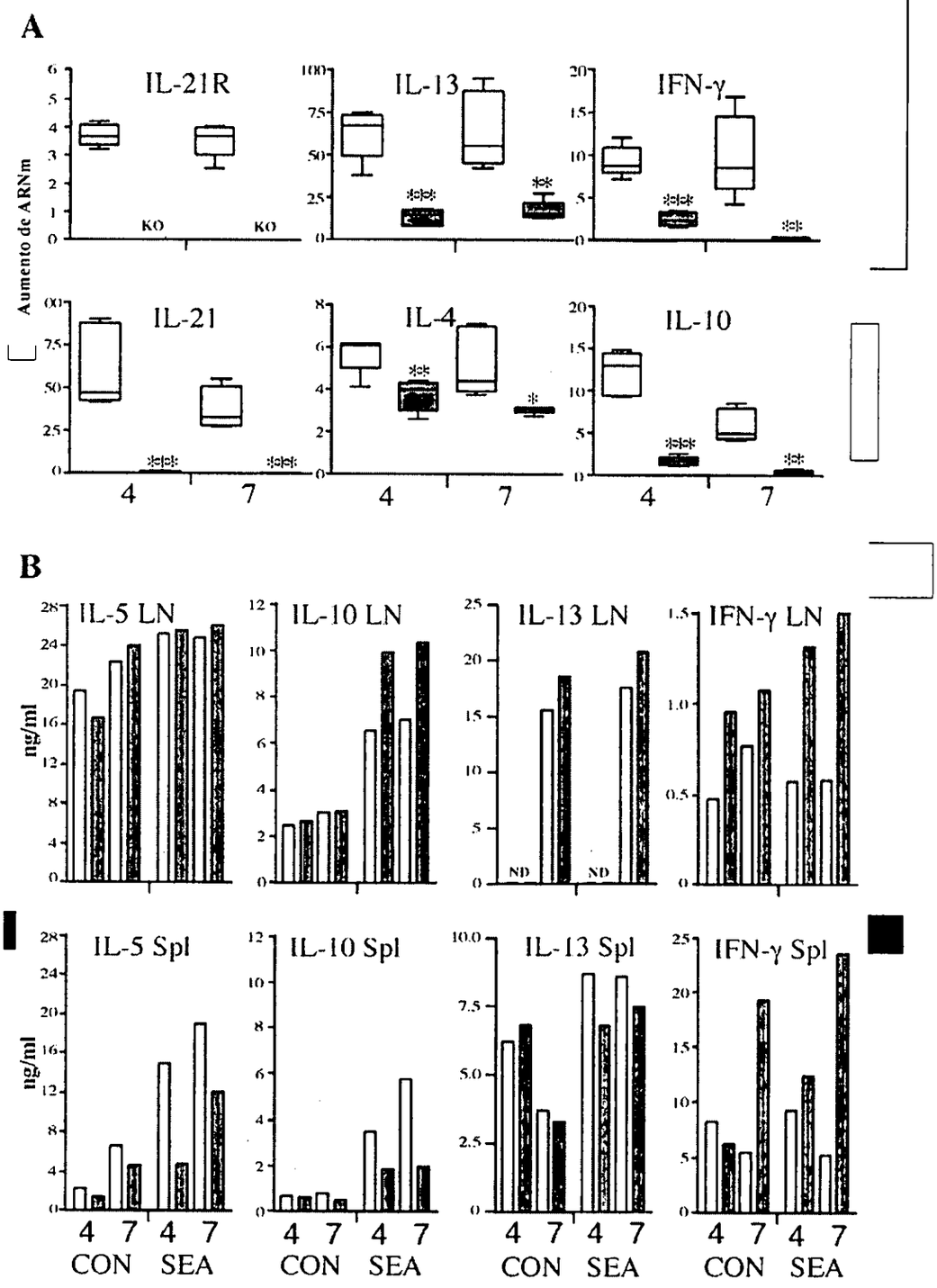

A
IL-21R
IL-13
IFN-γ
IL-21
IL-4
IL-10
Aumento de ARNm
KO
KO
4
7
B
IL-5 LN
IL-10 LN
IL-13 LN
IFN-γ LN
IL-5 Spl
IL-10 Spl
IL-13 Spl
IFN-γ Spl
ng/ml
ND
ND
CON
SEA

Fig. 19 (continuación)

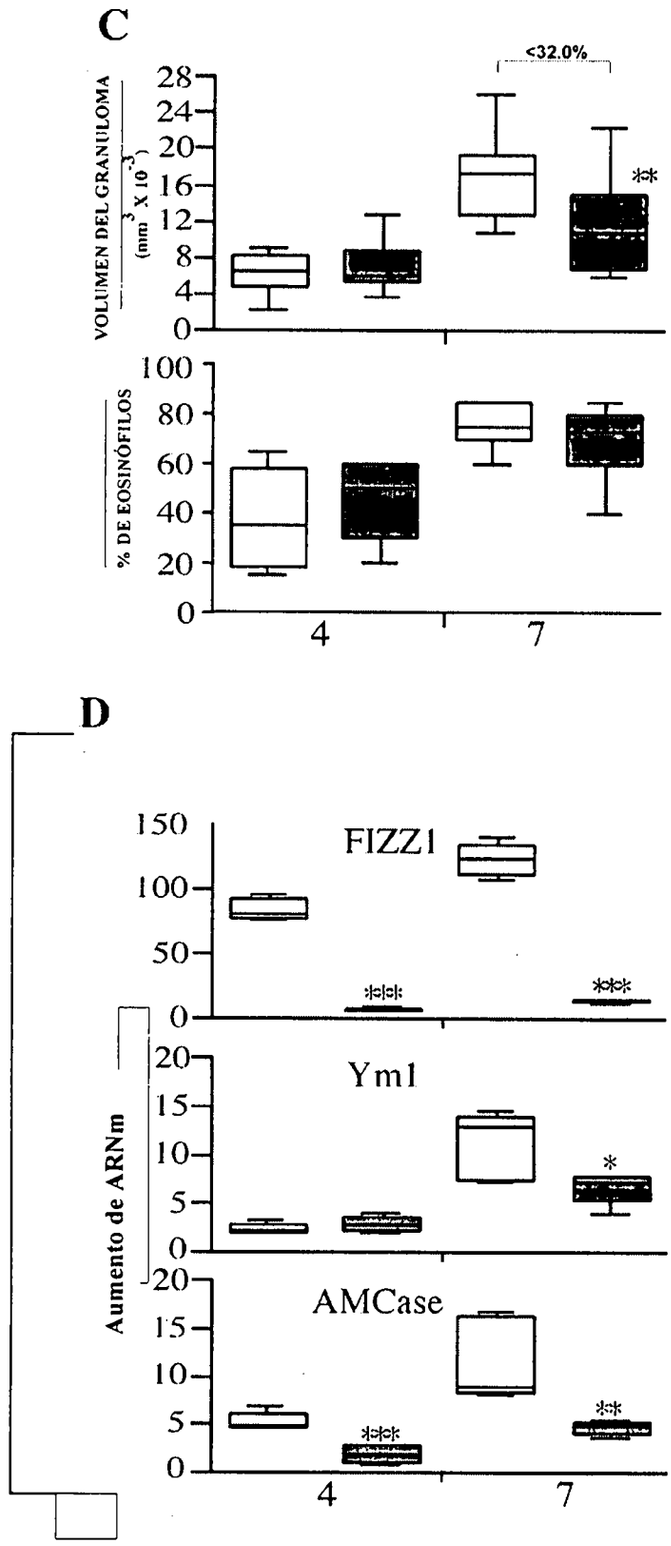


Fig. 20

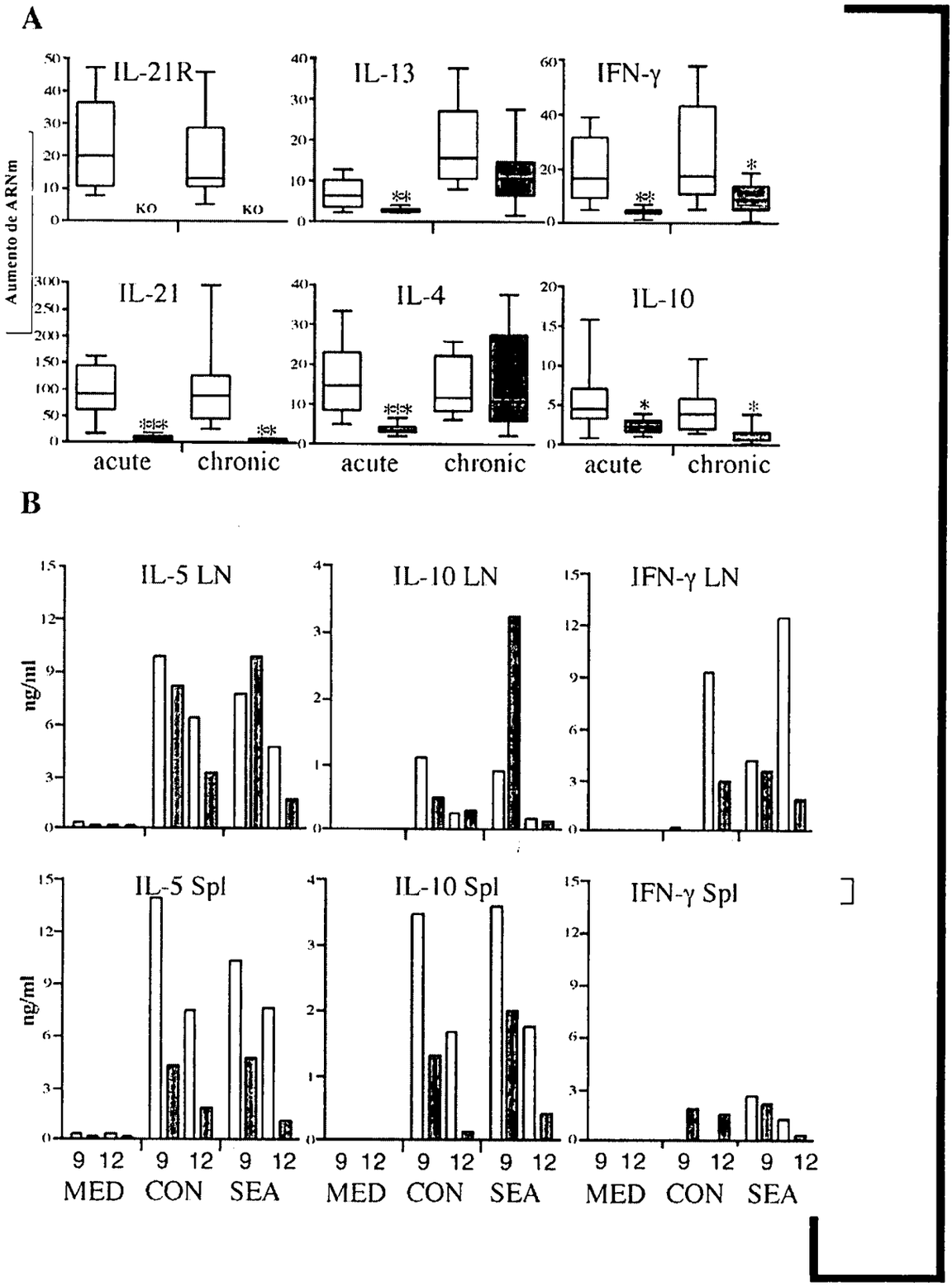

A
IL-21R
IL-13
IFN-γ
IL-21
IL-4
IL-10
Aumento de ARNm
KO
KO
acute
chronic
acute
chronic
acute
chronic
B
IL-5 LN
IL-10 LN
IFN-γ LN
IL-5 Spl
IL-10 Spl
IFN-γ Spl
ng/ml
ng/ml
9 12 9 12 9 12
MED CON SEA
9 12 9 12 9 12
MED CON SEA
9 12 9 12 9 12
MED CON SEA

Fig. 20 (continuación)

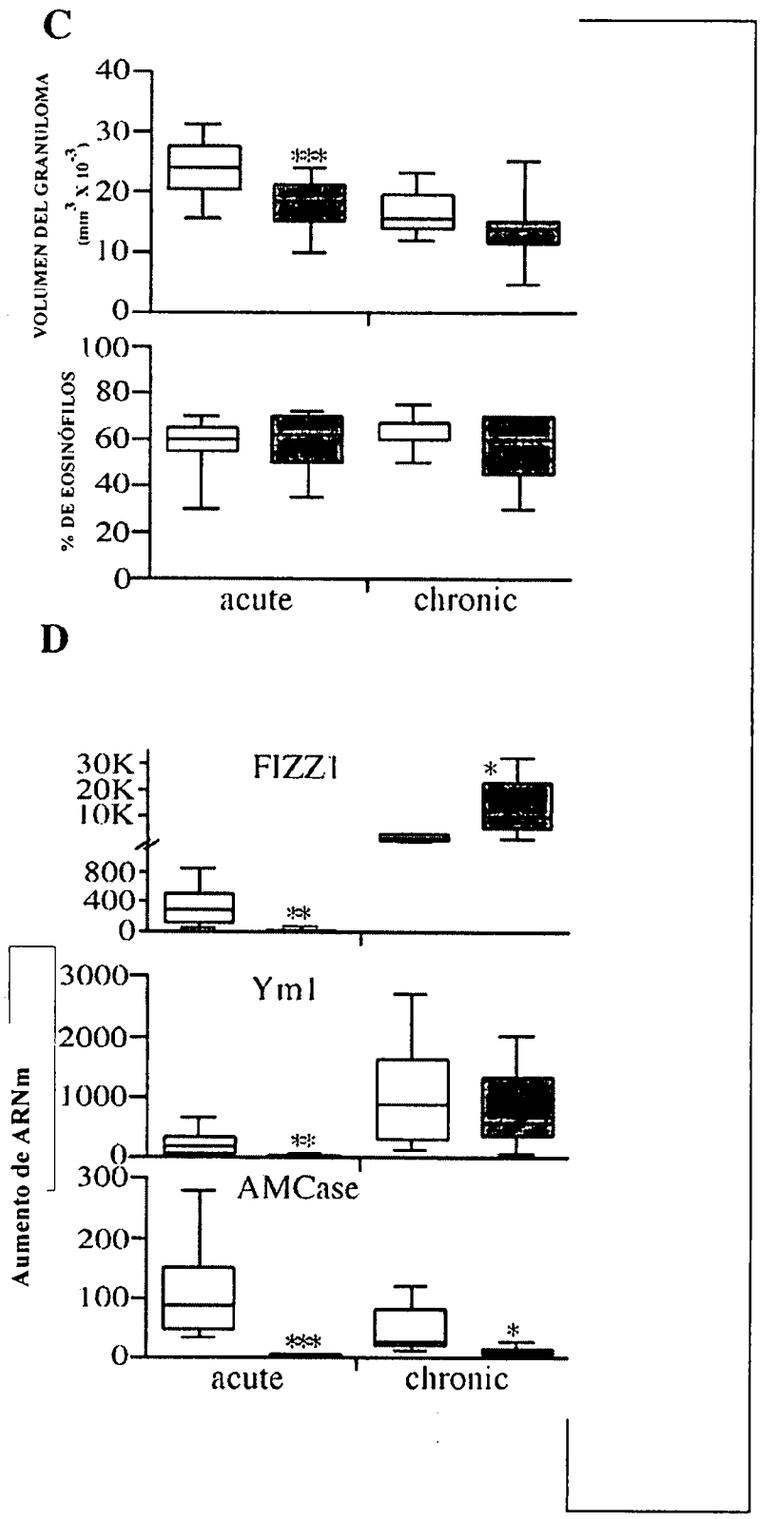


Fig.21

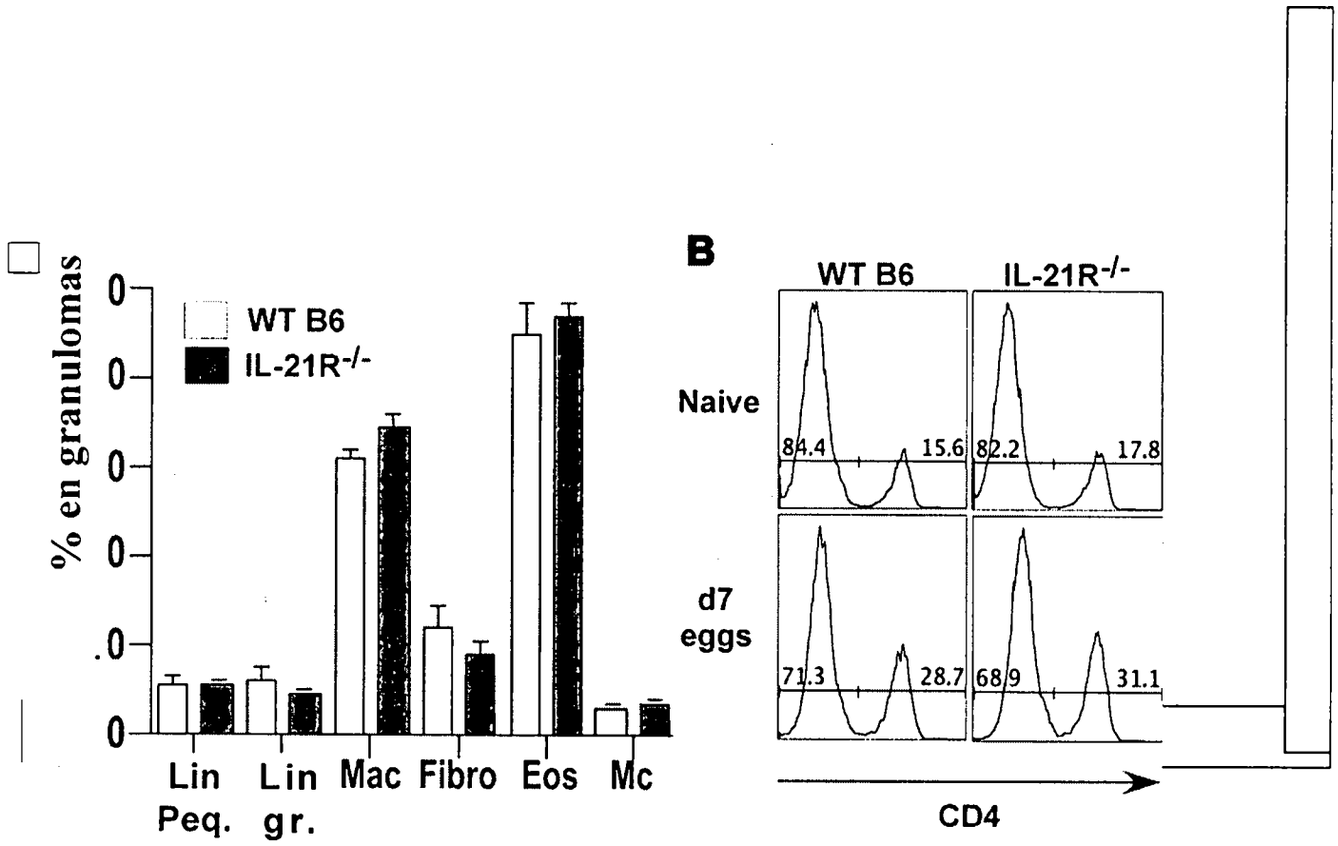

% en granulomas
WT B6
IL-21R-/-
Lin Peq.
Lin gr.
Mac
Fibro
Eos
Mc
B
WT B6
IL-21R-/-
Naive
d7 eggs
84.4
15.6
82.2
17.8
71.3
28.7
68.9
31.1
CD4

Fig. 22

A

Semana posinfección	Grupo	Pares de gusanos	Total de gusanos	Huevos/par de gusanos (en miles)
9	WT (*n*=29)	6.53 ± 0.63	15.53 ± 1.55	7.29 ±0.49
	KO (*n*=26)	5.00 ± 0.70	12.30 ± 1.74	9.63 ±1.16
12	WT (*n*=19)	3.74 ± 0.60	10.44 ± 2.08	14.75 ±1.91
	KO (*n*=19)	4.05 ± 0.62	9.89 ± 1.77	14.50 ±1.95

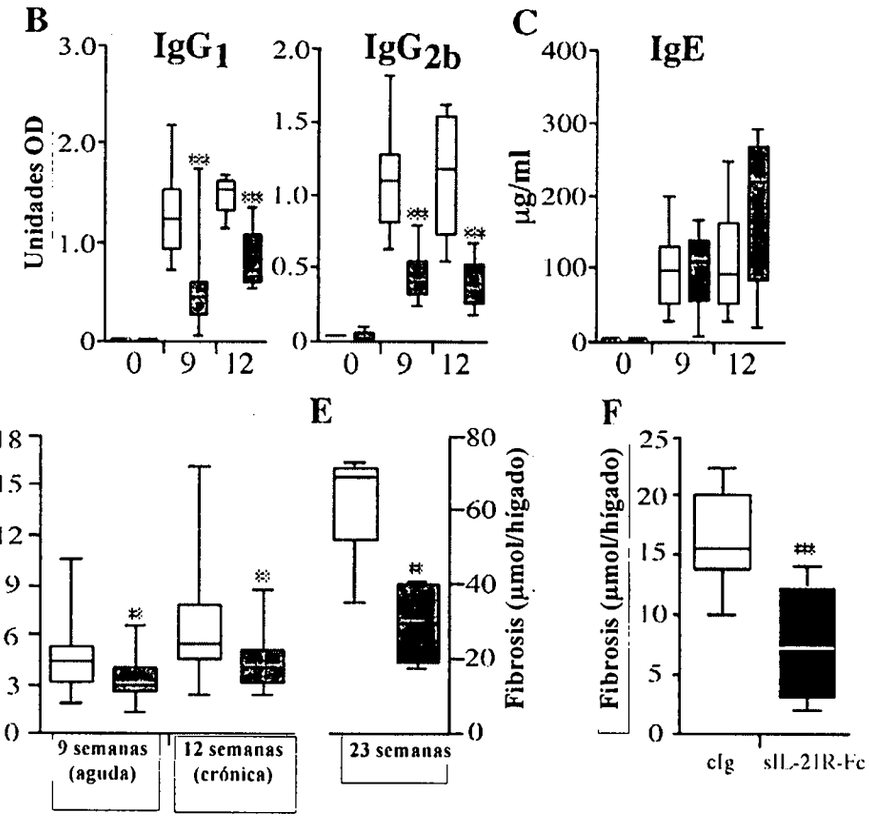


Fig. 23

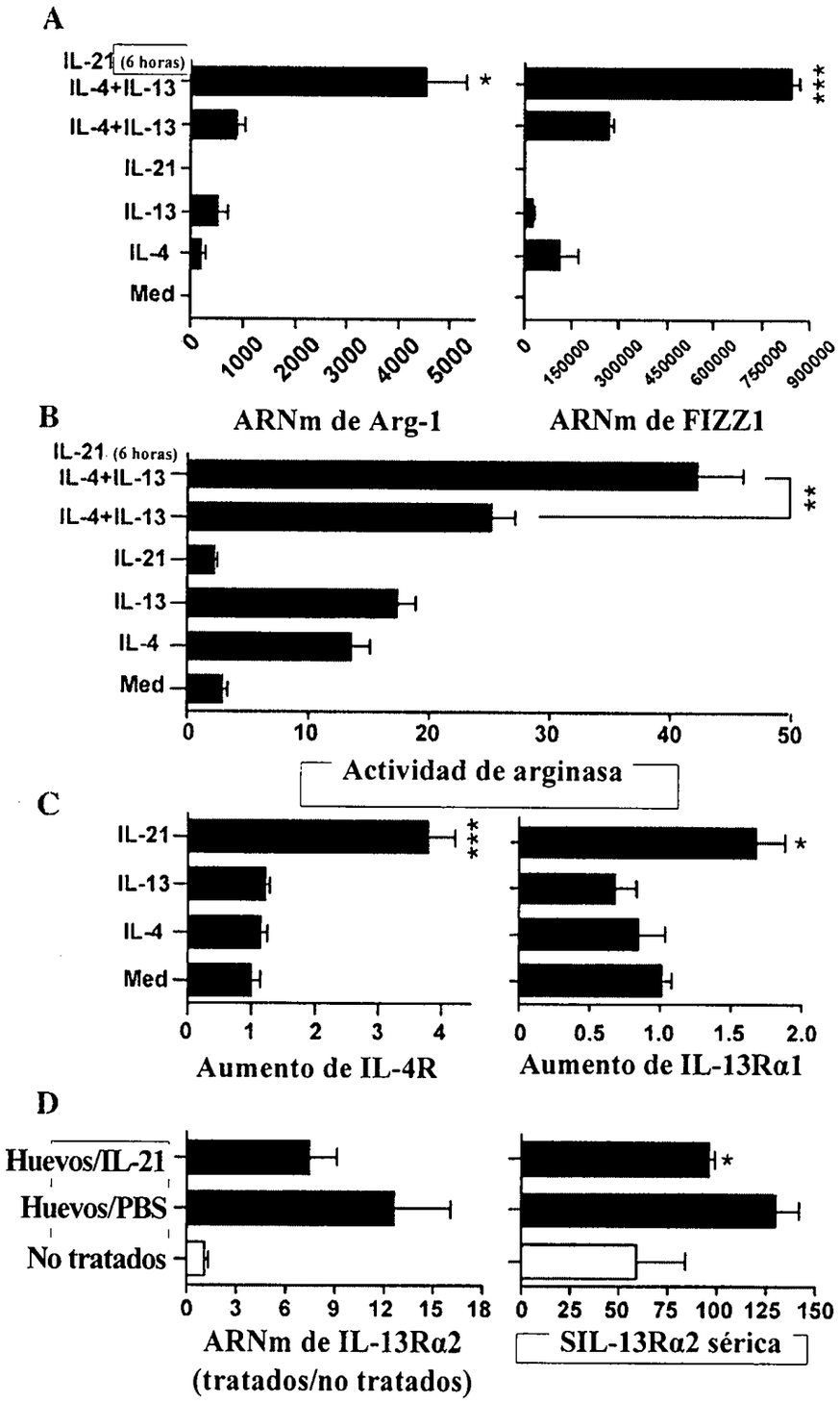
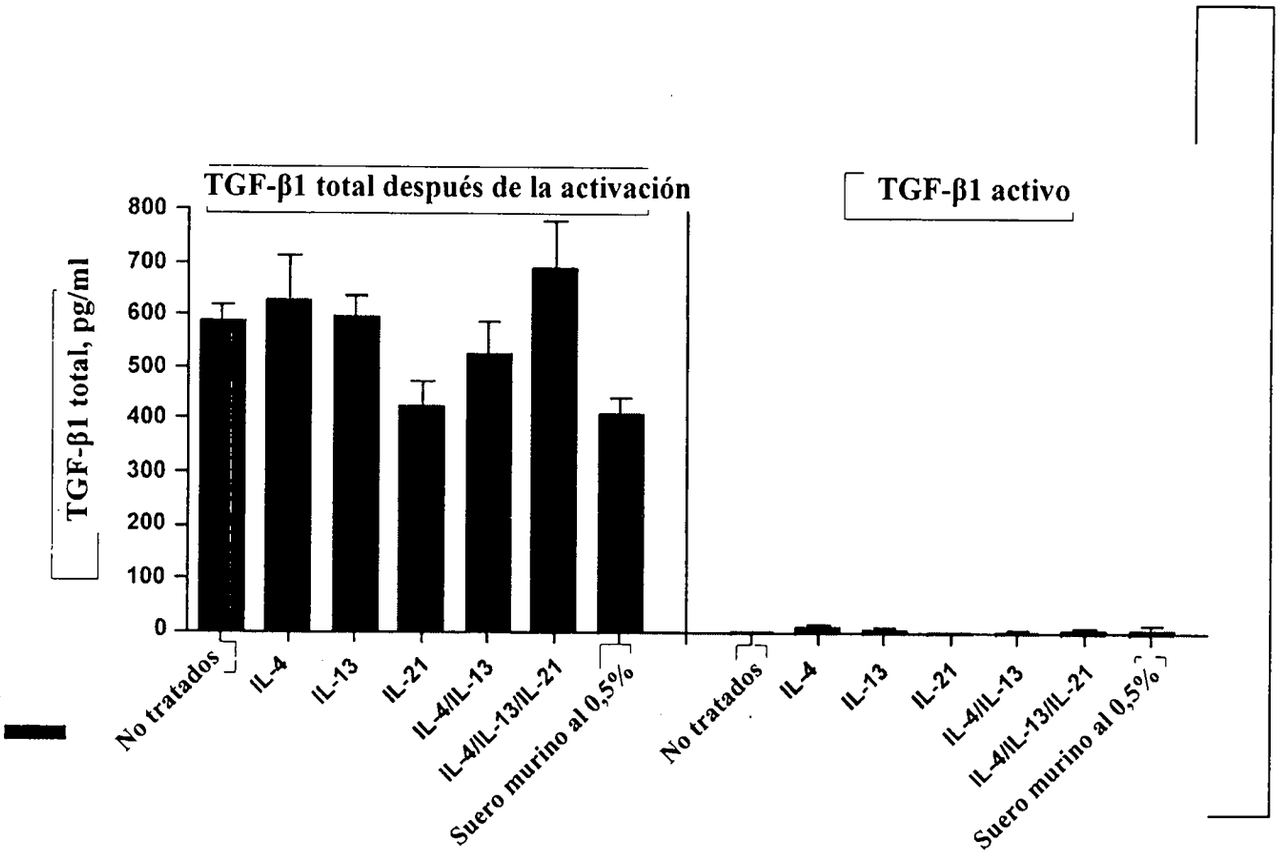

A
IL-21 (6 horas)
IL-4+IL-13
IL-4+IL-13
IL-21
IL-13
IL-4
Med
*
***
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
150000
300000
450000
600000
750000
900000
ARNm de Arg-1
ARNm de FIZZ1
B
IL-21 (6 horas)
IL-4+IL-13
IL-4+IL-13
IL-21
IL-13
IL-4
Med
**
0
10
20
30
40
50
Actividad de arginasa
C
IL-21
IL-13
IL-4
Med
***
*
0
1
2
3
4
0
0.5
1.0
1.5
2.0
Aumento de IL-4R
Aumento de IL-13Rα1
D
Huevos/IL-21
Huevos/PBS
No tratados
*
0
3
6
9
12
15
18
0
25
50
75
100
125
150
ARNm de IL-13Rα2
(tratados/no tratados)
SIL-13Rα2 sérica

Fig. 24


TGF-β1 total después de la activación
TGF-β1 activo
TGF-β1 total, pg/ml
800
700
600
500
400
300
200
100
0
No tratados
IL-4
IL-13
IL-21
IL-4/IL-13
IL-4/IL-13/IL-21
Suero murino al 0,5%
No tratados
IL-4
IL-13
IL-21
IL-4/IL-13
IL-4/IL-13/IL-21
Suero murino al 0,5%

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)* 01997.043800

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHODS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS

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
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
US

Telephone No. (973) 660-5000

Facsimile No. (973) 683-2112

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.)*

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
National Institutes of Health
Office of Technology Transfer
6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852-3804
US

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.)*

MANDRA, Raymond R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112-3801
US

Telephone No. (212) 218-2100

Facsimile No. (212) 218-2200

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
34,382

☐ **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) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

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.)*

THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE
Holyoke Center, Suite 727
1350 Massachusetts Ave.
Cambridge, MA 02138
US

This person is:
[X] 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 [X] all designated States except the United States of America [ ] the United States of America only [ ] the States indicatedin 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, MA 02176
US

This person is:
[ ] applicant only
[X] 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 [X] the United States of America only [ ] the States indicatedin 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.)*

WYNN, Thomas A.
1822 Tilton Drive
Silver Spring, MD 20902
US

This person is:
[ ] applicant only
[X] 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 [X] the United States of America only [ ] the States indicatedin 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.)*

COLLINS, Mary
54 Rathbun Road
Natick, MA 01760
US

This person is:
[ ] applicant only
[X] 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 [X] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

[X] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

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.)*

GRUSBY, Michael J.
5 Nightingale Path
Newton, MA 02459
US

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is*

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 [X] 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

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include posal 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*

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

---

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*

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.

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet need not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*

   (i) if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. 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;

   (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

   (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

   (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

   (vi) if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition", or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).*

3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).*

FITZPATRICK, Joseph M. (Registration No. 17,398), SCINTO, Lawrence F. (Registration No. 18,973), BAECHTOLD, Robert L. (Registration No. 20,860), BOSSES, Stevan J. (Registration No. 22,291), BEHRINGER, John W. (Registration No. 23,086), CUBERT, Jack S. (Registration No. 24,245), O'BRIEN, John A. (Registration No. 24,367), KRAUSE, John A. (Registration No. 24,613), SAXON, Peter (Registration, No. 24,947), RENK, Henry J. (Registration No. 25,499), RAZZANO, Pasquale A. (Reg. No. 25,512), BAKER, Charles P. (Registration No. 26,702), CLAYTON, Ronald A. (Registration No. 26,718), ZUPCIC, Anthony M. (Registration No. 27,276), OLSEN, Warren E. (Registration No. 27,290), WANNISKY, William M. (Registration No. 28,373), JACOBS, Gary M. (Registration No. 28,861), VASSALLO, Edward E. (Registration No. 29,117), DIANA, Leonard P. (Registration No. 29,296), BAUER, Laura A. (Registration No. 29,767), MURNANE, John D. (Registration No. 29,836), FISCHER, Robert H. (Registration No. 30,051), STAHL, Lawrence A. (Registration No. 30,110), KALLAS, Nicholas N. (Registration No. 31,530), PERRY, Lawrence S. (Registration No. 31,865), REED, Scott K. (Registration No. 32,433), MALPEDE, Scott D. (Registration No. 32,533), O'NEILL, Michael K. (Registration No. 32,622), HAAS, Bruce C. (Registration No. 32,734), O'CONNELL, Thomas J. (Registration No. 33,202), WARNER, Steven E. (Registration No. 33,326), WILLIAMSON, Mark A. (Registration No. 33,628), CONDE, Dominick A. (Registration No. 33,856), MANDRA, Raymond R. (Registration No. 34,382), SANDONATO, Michael P. (Registration No. 35,345), WEXLER, Bruce M. (Registration No. 35,409), KLOCK, Brian L. (Registration No. 36,570), CARLIN, John D. (Registration No. 37,292), PENSABENE, Marc J. (Registration No. 37,416), GLUECK, Daniel S. (Registration No. 37,838), YU-JAHNES, Lock See (Registration No. 38,667), SMITH, Leisa M. (Registration No. 39,378), SHARROTT, Douglas (Registration No. 39,832), CIRE, Frank L. (Registration No. 42,419), DELUCIA, Frank A., Jr. (Registration No. 42,476), HOLOWACZ, Elizabeth F. (Registration No. 42,667), KMETT, Edward A. (Registration No. 42,746), RATLIFF II, Preston (Registration No. 43,034), SHAPIRO, Peter (Registration No. 43,107), WISCHHUSEN, Carl B. (Registration No. 43,279), MEE, Brendan (Registration No. 43,391), CHEN, Lucian C. (Registration No. 43,539), DIPERNA, Raymond (Registration No. 44,063), HAUGHEY III, Edmund J. (Registration No. 44,749), KLUCSARITS, Lori A. (Registration No. 44,840), REPKA, Rachel A. (Registration No. 44,970), OLIVER, Justin J. (Registration No. 44,986), LOH, Christopher E. (Registration No. 46,000), FUKUYAMA, James M. (Registration No. 46,006), TSU, Victor (Registration No. 46,185), RUSSO, Alicia A. (Registration No. 46,192), BELISLE, Stephen E. (Registration No. 46,546), BERSCHADSKY, Jonathan (Registration No. 46,551), PINSKY, Douglas W. (Registration No. 46,994), ROBERTS, Simon (Registration No. 47,342), OKUN, Jason M. (Registration No. 48,512), BARON, Jacob K. (Registration No. 48,961), SULZER, Jennifer A. (Registration No. 49,039), TAFFY, Joseph (Registration No. 50,973), DIVINE, David A. (Registration No. 51,275), ORTNER, Carrie L. (Registration No. 52,085), RAO, Chandana R. (Registration No. 52,150), REA, Herbert W. (Registration No. 52,157), TRACY, Colleen (Registration No. 52,295), VADNAIS, Damond E. (Registration No. 52,310), CHEVALIER, Charles H. (Registration No. 52,735), ERTEL, Michael (Registration No. 52,870), GRATALE, Dominick (Registration No. 52,961), GREGORY, Dennis (Registration No. 52,967), PIERONI, Joseph P. (Registration No. 53,469), WEAVER, Gregory S. (Registration No. 53,771), NGUYEN, Chris D. (Registration No. 54,336), KIRKLAND, John (Registration No. 54,595), STOFFAN, Karen (Registration No. 54,739), DIDAS, Michael (Registration No. 55,112), and FISCHER, Leslie (Registration No. 58,393), all at:

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3800
United States of America

Box No. V DESIGNATION

The filing of this request **constitutes under Rule 4.9(a), the designation** all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany **is not designated** for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea **is not designated** for any kind of national protection

☐ RU Russian Federation **is not designated** for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) (14/04/2005) 14/APRIL/2005	60/671,374	US		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* *Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.1(b)(ii)):* . . . . . .

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:
ISA/EP . . . . . .

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)*	Number	Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following **declarations** are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

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 listing and/or tables related thereto)	: 77
claims	: 5
abstracts	: 1
drawings	: 46
Sub-total number of sheets	: 135
sequence listing	: 45
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	: 180

(b) ☐ **only in computer readable form** (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ **also in computer readable form** (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the

☐ sequence listing: . . . . . .

☐ tables related thereto . . . . . .

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following items(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each items)*:

			Number of items
1.	☒	fee calculation sheet :	1 page
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 listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*	
	(i) ☒	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application) :	1 diskette
	(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 13*ter* :	
	(iii) ☒	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :	2 pages
10.	☐	Tables in computer readable form related to sequence listing *(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)* return receipt postcard . . . . . :	

Figure of the drawings which should accompany the abstract: FIGURE 16

Language of filing of the international application: ENGLISH

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next 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).

Raymond R. Mandra (Reg. No.34,382)
Agent for Applicant

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		☐ received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent: ISA/	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:

01997.043800
JPP
NTL CH II 12/14/06
VMG 11/21/06

PCT

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2006/113331
PCT/US2006/013829

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

RECEIVED
2006 NOV 20 A 7:20
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO

MANDRA, Raymond, R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 26 October 2006 (26.10.2006)	
Applicant's or agent's file reference 01997.043800	**IMPORTANT NOTICE**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013829	13 April 2006 (13.04.2006)	14 April 2005 (14.04.2005)

Applicant
WYETH et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:

☑ has **published** the above-indicated international application on 26 October 2006 (26.10.2006) under No. WO 2006/113331

☐ has **republished** the above-indicated international application on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the published international application.

A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address: http://www.wipo.int/pctdb (under "Query" enter the PCT or WO number).

The applicant may also request a paper copy of the published international application from the International Bureau in writing from pct.eproducts@wipo.int or the contact details provided below.

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

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Yolaine Cussac

e-mail: pt11@wipo.int

01997.043800.Pc
JPP
Correct Default
7/2/06

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF SEARCH COPY

(PCT Rule 25.1)

VMS 6/26/06

To:
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
Attn. Mandra, Raymond R.
30 Rockefeller Center
New York, New York 10112-3801
UNITED STATES OF AMERICA

RECEIVED
2006 JUN 24 P 12:12
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO

Date of mailing *(day/month/year)*	20/06/2006
Applicant's or agent's file reference: 01997.043800	IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013829	13/04/2006	14/04/2005

Applicant

WYETH

1. **Where the International Searching Authority and the receiving Office are not the same office:**

The applicant is hereby notified that the search copy of the inter national application was received by this International Searching Authority on the date indicated below.

Where the International Searching Authority and the receiving Office are the same office:

The applicant is hereby notified that the search copy of the international application was received on the date indicated below.

02/06/2006 *(date of receipt).*

2. [X] The search copy was accompanied by a nucleotide and/or amino acid sequence listing or tables related thereto in electronic form.

3. [ ] The search copy contained a nucleotide and/or amino acid sequence listing or tables related thereto in electronic form.

4. **Time limit for establishment of international search report and written opinion of the International Searching Authority**

The applicant is informed that the time limit for establishing the international search report and the written opinion of the International Searching Authority is three months from the date of receipt indicated above or nine months from the priority date, whichever time limit expires later (Rules 42.1 and 43*bis*.1(a))

5. A copy of this notification has been sent to the International Bureau and, where the first sentence of paragraph 1 applies, to the receiving Office.

Name and mailing address of the International Searching Authority	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	ISA/EP

Form PCT/ISA/202 (April 2005)

01997 043800 PC
JPP
MTL CHI 12/14/06
mm 7/6/06

ATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/013829

RECEIVED
2006 JUL -6 A 10:33
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:
MANDRA, Raymond, R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*	IMPORTANT NOTIFICATION
27 June 2006 (27.06.2006)	
Applicant's or agent's file reference	International application No.
01997.043800	PCT/US2006/013829

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

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

WYETH et al (for all designated States except US)
YOUNG, Deborah, A. et al (for US)

International filing date: 13 April 2006 (13.04.2006)
Priority date(s) claimed: 14 April 2005 (14.04.2005)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau: 29 May 2006 (29.05.2006)
List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National: 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex**, relating to:

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

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

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Aumaitre Chantal
nile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 70 80 Telephone No. +41 22 338 86 69

CT/IB/301 (October 2005) CWB3TT6D

INFORMATION ON ENTERING THE NATIONAL PHASE

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

The **applicable time limit** for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

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

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

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

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

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before the date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau and if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
01997.043800		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013829	13/04/2006	14/04/2005
Applicant		
WYETH		

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

This international search report consists of a total of 7 sheets.

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

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant
   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   METHODS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS BY IL-21 / IL-21R ANTAGONISTS

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 16
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013829

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

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

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

IN[illegible]RNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/013829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/715 A61P17/02 A61K38/17
ADD. C07K16/28 C07K16/24 A61K39/395

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/028630 A (WYETH; CARTER, LAURA; WHITTERS, MATTHEW, J; COLLINS, MARY; YOUNG, DEBO) 10 April 2003 (2003-04-10) pages 2-14 pages 52,53; sequences 6,10, 22-39	1-28
X	DISTLER JORG H W ET AL: "Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 52, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 856-864, XP009070828 ISSN: 0004-3591 the whole document	23-28

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August 2006	21/08/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bernhardt, W

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

International application No
PCT/US2006/013829

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	US 2006/039902 A1 (YOUNG DEBORAH A ET AL) 23 February 2006 (2006-02-23) paragraphs [0007] - [0031], [0210] - [0215]; sequences 2,10,23-40	1-28
A	MEHTA DEVANGI S ET AL: "Biology of IL-21 and the IL-21 receptor" IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 202, no. December, December 2004 (2004-12), pages 84-95, XP009070837 ISSN: 0105-2896 the whole document	1-28
T	PESCE JOHN ET AL: "The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. JUL 2006, vol. 116, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 2044-2055, XP009070829 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-22
A	WO 03/087320 A (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC; MOLL, THOMAS; STROM, TERRY,) 23 October 2003 (2003-10-23) pages 2-5 pages 28-30	1-28

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/013829

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03028630 A	10-04-2003	CA 2460916 A1	10-04-2003
		EP 1432431 A2	30-06-2004
		JP 2005508915 T	07-04-2005
US 2006039902 A1	23-02-2006	NONE	
WO 03087320 A	23-10-2003	AU 2003230834 A1	27-10-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013829

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1-22 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. In addition, although claims 25-28 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below
International application No. PCT/US2006/013829	International filing date *(day/month/year)* 13.04.2006
Priority date *(day/month/year)* 14.04.2005	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07K14/715 A61P17/02 A61K38/17 ADD. C07K16/28 C07K16/24 A61K39/395	
Applicant WYETH	

1. This opinion contains indications relating to the following items:

   - ☒ Box No. I Basis of the opinion
   - ☐ Box No. II Priority
   - ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
   - ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - ☒ Box No. VI Certain documents cited
   - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
   - ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

FILE NO. 01997.043800.PC
ATTORNEY JPP
DUE DATE 2/14/07
DOCKETED VMS 8/23/06

2. **FURTHER ACTION**

   If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

   If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

   For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Bernhardt, W Telephone No. +49 89 2399-2804

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/013829

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☒ filed together with the international application in electronic form.

      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-22 (IA)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-22 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	16-18, 23-28
	No:	Claims	1-15, 19-22
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-28
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	23, 24
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regards to industrial applicability

Claims 1-22 and 25-28 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statements

1. Reference is made to the following documents:

   D1: WO 03/028630 A (WYETH; CARTER, LAURA; WHITTERS, MATTHEW, J; COLLINS, MARY; YOUNG, DEBO) 10 April 2003 (2003-04-10)

   D2: DISTLER JORG H W ET AL: "Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 52, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 856-864, XP009070828 ISSN: 0004-3591

2. **Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)**

2.1 Claims 23-24 meet the requirements for industrial applicability according to Art. 33(4) PCT.

2.2 For the assessment of the present claims 1-22 and 25-28 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims.

The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow,

however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

3. **Novelty (Art. 33(2) PCT)**

3.1 The present application does not meet the criteria of Art. 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-15 and 19-22 is not novel in the sense of Art. 33(2) PCT.

3.2 D1 discloses IL-21R antagonists including fusion proteins comprising a fragment of an IL-21R fused to an immunoglobulin Fc region (pg. 3, lines 17-22). SEQ IDs of those soluble fragments of IL-21R (SEQ IDs 6, 10, 22-39) are identical with the SEQ IDs disclosed in the present application. Disorders that can be treated by said IL-21R antagonists include scleroderma and interstitial lung fibrosis (pg. 2, line 31 - pg. 3 line 7; pg. 52, line 24 -pg. 53, line 8). It is further disclosed to combine said IL-21R antagonists with an additional therapeutic modalities (pg. 6-7). Therefore, D1 destroys the novelty of claim 1-15 and 19-22.

4. **Inventive Step (Art. 33(3) PCT)**

4.1 The present application does not meet the criteria of Art. 33(1) PCT because the subject-matter of claims 16-18 and 23-28 does not involve an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT.

4.2 D2 discloses that IL-21R is up-regulated in patients with systemic sclerosis, a fibrotic associated disorder, suggesting the involvement in the pathogenesis of said disease. Claim 25 differs in that it discloses a method for monitoring the progress of a fibrosis-associated condition by measuring the IL-21R levels. The underlying technical problem can be regarded as the provison of a method fo monitoring the progress of a disease. D2 fairly suggests IL-21R as a marker for systemic sclerosis (abstract; pg. 863, last paragraph). It is standard for the skilled person to monitor the marker over the course of the disease. Therefore, claim 25

is considered obvious over D2 and cannot establish an inventive step.

The same considerations apply when regarding D1 as the closest prior art to claim 25. D1 implicitly discloses the role of IL-21R in the pathogenesis of fibrotic diseases like scleroderma and interstitial lung fibrosis as antagonists of said IL-21R are used to treat said diseases.

4.3 The considerations under 4.2 apply in analogy to the methods for identifying a compound for treating fibrosis-associated disorders according to claims 23-24 as well as methods for prognosing and diagnosing fibrosis-associated conditions according to claims 26-28. They are standard application making use of the known involvement of IL-21R in fibrotic diseases.

4.4 The additional features of claims 16-18 relate to further conditions known to lead to fibrosis-associated disorder. They appear to be arbitrarily selected without producing any unforeseeable effect. No inventive step can be acknowledged.

Re Item VI
Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

D3: US 2006/00339902

Should the priority of the present application not be valid, D3 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Art. 33(2) and (3) PCT).

Re Item VIII
Certain observations on the international application

1. Claim 1 refers to an agent that reduces the level of IL-21 and/or IL-21R in a subject. Said claim does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. It would be an undue burden to isolate and characterize all potential inhibitors without any effective pointer to their identity or to test every known compound and every conceivable

future compound for this activity to see if it falls within the scope of the claim. Effectively, the applicant is attempting to patent what has not yet been invented and the fact that the applicant can test for the effect used to define the compounds does not provide any structural features of the claimed compound. Thus, claim 1 does not meet the requirements of Art. 6 PCT.

2. The relative term "substantially identical" used in claim 6 has no well-recognised meaning and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear, Article 6 PCT.

01997-043800.IC
JPP
NTL CH I 10/14/06
MMG 11/29/06

PATENT COOPERATION TREAT

WO 2006/113331
PCT/US2006/013829

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:

RECEIVED
2006 NOV 29 A 10:22
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO

MANDRA, Raymond, R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 16 November 2006 (16.11.2006)	
Applicant's or agent's file reference 01997.043800	**IMPORTANT NOTICE**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013829	13 April 2006 (13.04.2006)	14 April 2005 (14.04.2005)

Applicant
WYETH et al

1. **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 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
26 October 2006 (26.10.2006)

   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 93*bis*.1 :

   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.

4. **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.

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

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Yolaine Cussac

e-mail: pt11@wipo.int

01997.043800 JC
MAC
NTL CH II 10/14/07
8/23/07

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2006/113331
PCT/US2006/013829

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

MANDRA, Raymond, R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
16 August 2007 (16.08.2007)

Applicant's or agent's file reference
01997.043800

IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013829	13 April 2006 (13.04.2006)	14 April 2005 (14.04.2005)

Applicant
WYETH et al

1. **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 not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

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 apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
26 October 2006 (26.10.2006)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

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 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 93*bis*.1 :

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

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.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **30 MONTHS** from the priority date.

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

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

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

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Yolaine Cussac

e-mail: pt11.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
RAYMOND R. MANDRA
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 ROCKEFELLER PLAZA
NEW YORK, NEW YORK 10112-3801

PCT

INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

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

Date of mailing *(day/month/year)*	02 Jun 2006
Applicant's or agent's file reference: 01997.043800	**REPLY DUE** within 1 months/days from the above date of mailing
International application No.: PCT/US2006/013829	International filing date *(day/month/year)*: 13 Apr 2006
Applicant: WYETH	

1. [X] 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)*
   - [X] 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)*

FILE NO. 01997.043800.PC
ATTORNEY JPP
DUE DATE 7/2/06
DOCKETED VMG 6/8/06

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
- [X] 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 Lydell Meadows Telephone No. 703-308-9290 EX 112

Form PCT/RO/106 (January 2004)

ANNEX C1 TO FORM PCT/RO/106

International application No.
PCT/US2006/013829

This receiving Office has found that, with regard to the presentation of the **drawings of the international application as filed**, the physical requirements are not complied with to the extent that compliance therewith is necessary for:

1. [x] reasonably uniform international publication (Rules 11 and 26.3(a)(i)) *(defects to be specified)*:

Sheets containing drawings:

a. [ ] the sheets do not admit of direct reproduction
b. [ ] the sheets are not free from creases, cracks, folds
c. [ ] one side of the sheets is not left unused
d. [ ] the paper of the sheets is not flexible/strong/white/smooth/non-shiny/durable
e. [ ] the drawings do not commence on a new sheet
f. [ ] the sheets are not connected as prescribed (Rule 11.4(b))
g. [ ] the sheets are not A4 size (29.7cm x 21cm)
h. [ ] the minimum margins on the sheets are not as prescribed (top: 2.5cm; left side: 2.5cm; right side: 1.5cm; bottom: 1cm)
i. [ ] the file reference number indicated on the sheets does not appear in the left-hand corner of the sheets, within 1.5 cm of the top of the sheets
j. [ ] the file reference number exceeds the maximum of 12 characters
k. [ ] the sheets are not free from frames around usable or used surfaces
l. [ ] the sheets are not numbered in consecutive Arabic numerals (e.g. 1/3, 2/3, 3/3)
m. [ ] the sheet numbers are not centered at the top or bottom of the sheets
n. [ ] the sheet numbers are in the margin (see h. above for the size of the margins)
o. [ ] the sheets contain alterations/overwritings/interlineations/too many erasures
p. [ ] the sheets contain photocopy marks

Drawings (Rule 11.13):

a. [ ] do not admit of direct reproduction
b. [ ] contain unnecessary text matter
c. [ ] contain words so placed as to prevent translation without interference with lines thereof
d. [ ] are not executed in durable black color; the lines are not uniformly thick and well-defined
e. [ ] contain cross-sections not properly hatched
f. [ ] would not be properly distinguishable in reduced reproduction
g. [ ] contain scales not represented graphically
h. [ ] contain numbers, letters and reference lines lacking simplicity and clarity
i. [ ] contain lines drafted without the aid of drafting instruments
j. [ ] contain disproportionate elements of a figure not necessary for clarity
k. [ ] contain numbers and letters of height less than 0.32 cm
l. [ ] contain letters not conforming to the Latin, and where customary, Greek alphabets
m. [ ] contain figures on two or more sheets which form a single complete figure but which are not able to be assembled without concealing parts thereof
n. [x] contain figures which are not properly arranged and clearly separated
o. [ ] contain different figures not numbered in consecutive Arabic numerals
p. [ ] contain different figures not numbered independently of the numbering of the sheets
q. [ ] are not restricted to reference signs mentioned in the description
r. [ ] do not contain reference signs that are mentioned in the description
s. [ ] contain the same feature denoted by different reference signs
t. [ ] are not arranged in an upright position, clearly separated from one another
u. [ ] are not presented sideways with the top of the figures at the left side of the sheets

2. [ ] satisfactory reproduction (Rules 11 and 26.3(b)(i))

Further observations (if necessary):

New drawings are requested.

RECEIVED
OCT 19 2006
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2006/013829

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MANDRA, Raymond, R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

01997.043800 JPP +19 Amends 10/21/06

10/19/06

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing *(day/month/year)* 28 June 2006 (28.06.2006)	
Applicant's or agent's file reference 01997.043800	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/013829	International filing date *(day/month/year)* 13 April 2006 (13.04.2006)
International publication date *(day/month/year)* Not yet published	Priority date *(day/month/year)* 14 April 2005 (14.04.2005)
Applicant WYETH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote **a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* **An asterisk (*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes **a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
14 April 2005 (14.04.2005)	60/671,374	US	06 June 2006 (06.06.2006)

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

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer

Yolaine Cussac

Facsimile No. +41 22 338 70 80
Telephone No. +41 22 338 90 12

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

NP251

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **C07K 14/715, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 17/02, C07K 16/24, C07K 16/28**
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **WYETH; THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES y PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE**
(30) Prioridad (31) ***No.*** **60/671,374** 32) ***Fecha*** **14/04/2005** (33) ***País*** **US**	(72) Inventor(es) **YOUNG, Deborah A.; WYNN, Thomas A. y Otros**
	(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: **14/11/07** (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 13/04/2006 No. de solicitud PCT/US2006/013829	(87) Publicación internacional Fecha: 26/10/2006 N° publicación: WO/2006/113331

(54) Titulo: **MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO Y LA PREVENCIÓN DE FIBROSIS**

Reivindicación(es):

1. Un método para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que consiste en la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que reduce el nivel de IL-21 y/o IL-21R en el sujeto.

23. Un método para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa; (b) poner en contacto la célula o muestra que interesa con un compuesto, y (c) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa después del contacto con el compuesto, con lo que un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, que ha entrado en contacto, comparado con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa y que no ha entrado en contacto, identifica al compuesto como un compuesto útil para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto.

24. Un método para identificar un compuesto para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de un trastorno asociado con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa; (b) poner en contacto la célula o muestra que interesa con un compuesto; (c) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa después del contacto con el compuesto, y (d) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa que ha entrado en contacto, con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa y que ha entrado en contacto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, identifica al compuesto como un compuesto útil para el tratamiento, alivio o prevención de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto.

25. Un método para monitorear el progreso de la fibrosis o de una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto en un primer momento; y (b) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa. obtenida del sujeto en un segundo momento, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto al segundo momento, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto en el primer momento, ofrece una indicación de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis ha disminuido en severidad.

26. Un método para pronosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida de un sujeto en un primer momento, y (b) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida en un segundo momento, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto al segundo momento, en comparación con el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto en el primer momento, indica una probabilidad menor de que el sujeto vaya a desarrollar fibrosis o la afección asociada con la fibrosis o una probabilidad menor de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis empeore en el sujeto.

27. Un método para pronosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa obtenida del sujeto; y (b) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel menor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, indica una probabilidad menor de que el sujeto desarrolle fibrosis o la afección asociada con la fibrosis o una probabilidad menor de que la fibrosis o la afección asociada con la fibrosis empeore en el sujeto.

28. Un método para diagnosticar fibrosis o una afección asociada con la fibrosis en un sujeto, que comprende: (a) medir el nivel de IL-21 y/o IL-21R en una célula o muestra que interesa, obtenida del sujeto, y (b) comparar el nivel de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto con un nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, donde un nivel mayor de IL-21 y/o IL-21R en la célula o muestra que interesa obtenida del sujeto, en comparación con el nivel de referencia de IL-21 y/o IL-21R, indica la presencia de fibrosis o de afección asociada con la fibrosis en el sujeto.

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 446/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 11 de octubre de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

= =

Cesión del invento titulado "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS". Certificación notarial suscrita por Julianne Decker, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM101991 L1

DECLARACIÓN JURAMENTADA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINJUSTICIA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones, Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/671,374, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS") fechada el 28 de abril de 2006, de Michael J. Grusby al Presidente y los Miembros del Cuerpo Docente y la Junta Rectora de Harvard College y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 14 días del mes de mayo de 2007, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

Wyeth

(Fdo.) Michelle L. McGowan

Michelle L. McGowan
Asociada para Legalizaciones

PARA USO EN COLOMBIA

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva Jersey)
)
Condado de Morris)

A los 14 días del mes de mayo de 2007, ante mi personalmente compareció Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mi haber suscrito el mismo.

(Fdo.) Julianne Decker
Notario Público

(Sello notarial
en relieve)

[Sello] JULIANNE DECKER
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
MI COMISIÓN EXPIRA EL 22 DE OCTUBRE DE 2008

MARÍA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 0474
DE MIRAFLORES

Expediente No: 01997.0043800.pv
Sol. de Patente Provisional No. 60/671,347

Cesión de Invento

En virtud del pago por la CESIONARIA al CEDENTE de contraprestación válida y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por la presente, el CEDENTE:

(1) Nombre Completo del Inventor: Michael J. Grusby
Residencia: 5 Nightingale Path, Newton, Massachusetts 02459
Ciudadanía: Estados Unidos de América

---

por la presente vende, cede y traspasa al CESIONARIO:

El Presidente y los Miembros del Cuerpo Docente y la Junta
Rectora de Harvard College
Holyoke Center, Suite 727

1350 Massachusetts Avenue
Cambridge, Massachusetts 02138

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluidos todos los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

Deborah A. Young, Mary Collins y Thomas A. Wynn

y el cual se encuentra en la **Solicitud Provisional de los E.U. No. 60/671,374** presentada el **14 de abril de 2005**

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0186
DE SRE/SUBSEGOB

[ ] Yo, el suscrito CEDENTE, por la presente autorizo y solicito la inserción anterior del número de solicitud y la fecha de presentación, una vez se conozcan,

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero,

debiendo insertarse anteriormente la fecha de presentación y número de solicitud de dicha solicitud de los E.U., una vez se conozcan, incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que pueda emitirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA, y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0180
DE MINJUSTICIA

y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

(Fdo.) Michael J. Grusby 04/28/06
Michael J. Grusby Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Massachusetts }
ss:
Condado de Suffolk }

A los 28 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Michael J. Grusby, quien me demostró mediante prueba de identidad satisfactoria en la forma de Conocimiento Personal, ser la misma persona cuya firma aparece anteriormente o en el documento anterior o adjunto, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0180
DE HELVETIA

(Fdo.) Rosanna M. Doherty
Notario Público

[Sello] **ROSANNA M. DOHERTY**
NOTARIO PÚBLICO

La comisión expira: 03/06/2009

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Julianne Decker
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Julianne Decker, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey

6. el día 23 de mayo de 2007

7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. No. A292579

9. Sello/Timbre: 10. Firma

(Sello del Estado de Nueva Jersey) (Fdo.) Bradley Abelow

= =

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINJUSTICIA

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

361

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
JULIANNE DECKER

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
JULIANNE DECKER, NOTARY

CERTIFIED

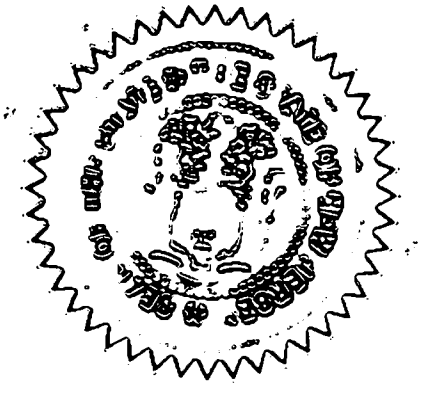
5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 23RD DAY OF MAY 2007

7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A292579

9. SEAL/STAMP:



10. SIGNATURE

Bradley Abelow

AM101991 L1

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/671,374, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS") dated April 28, 2006 from Michael J. Grusby to the President and Fellows of Harvard College and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 14th day of May, 2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth

Michelle L. McGowan
Legalization Associate

TO BE USED IN COLUMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 14th day of May, 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.

Notary Public

JULIANNE DECKER
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
MY COMMISSION EXPIRES OCT. 22, 2008

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Michael J. Grusby
Residence: 5 Nightingale Path, Newton, Massachusetts 02459
Citizenship: U.S.A.

---

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

The President and Fellows of Harvard College
Holyoke Center, Suite 727
1350 Massachusetts Avenue
Cambridge, Massachusetts 02138

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

Deborah A. Young, Mary Collins, and Thomas A. Wynn

and which is found in **U.S. Provisional Application No. 60/671,374** filed **April 14, 2005**

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

the date of filing and application number of said U.S. application when known, to be inserted above, including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: 01997.0043800.pv
Provisional Patent Appln. No. 60/671,374

Michael J. Grusby

04/28/06
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts }
ss:
County of Suffolk }

On the 28th day of April, 2006, before me, personally appeared Michael J. Grusby, proved to me through satisfactory evidence of identity which was Personally Known to be the person whose name is signed above or on the preceding or attached document, and acknowledged that he executed the same, of his own free will and for the purposes set forth.

Notary Public

ROSANNA M. DOHERTY
NOTARY PUBLIC

NY_Main 562119_1

Comm. Exp: 03/04/2009

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 447/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 11 de octubre de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

= =

Cesión del invento titulado "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS". Certificación notarial suscrita por Julianne Decker, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM101991 L1

DECLARACIÓN JURAMENTADA

MARIA TERESA LARA R. TRADUCTORA OFICIAL RESOLUCION No. 01016 DE MINJUSTICIA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones, Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/671,374, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS") fechada el 8 de junio de 2006, de Thomas A. Wynn al Gobierno de los Estados Unidos de América, representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos, y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 14 días del mes de mayo de 2007, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

Wyeth

(Fdo.) Michelle L. McGowan

Michelle L. McGowan
Asociada para Legalizaciones

PARA USO EN COLOMBIA

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva Jersey)
)
Condado de Morris)

A los 14 días del mes de mayo de 2007, ante mi personalmente compareció Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mi haber suscrito el mismo.

(Fdo.) Julianne Decker
Notario Público

(Sello notarial
en relieve)

[Sello] JULIANNE DECKER
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
MI COMISIÓN EXPIRA EL 22 DE OCTUBRE DE 2008

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0176
DE MIRE/OTRELA

PATENTE
Expediente No. 01997.043800
DHHS Ref. No. E-250-2005/0-US-01

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
tel/ (212) 218-2281

CESIÓN

CONSIDERANDO que yo, Thomas A. Wynn, empleado del Departamento de Salud y Servicios Humanos, he coinventado cierto invento titulado:

Métodos y composiciones para tratar y prevenir la fibrosis

para el cual invento he suscrito una solicitud (provisional o no provisional)

para una patente de los E.U., la cual fue presentada el 14 de abril de 2005, bajo la Solicitud de los E.U. No. 60/671,374, y

CONSIDERANDO, que soy uno de los solicitantes nombrados en la solicitud anteriormente identificada para una patente de los E.U.; y

CONSIDERANDO, que las condiciones en las cuales se efectuó dicho invento son tales que otorgan al Gobierno en virtud del numeral 1(a) de la Orden Ejecutiva 10096 todo derecho, título e interés, tanto nacionales como extranjeros, sobre la presente; y

CONSIDERANDO, que el Gobierno de los Estados Unidos de América (en adelante denominado el Cesionario), desea adquirir la totalidad de mi derecho, título e interés, nacionales y extranjeros, en y sobre el invento descrito en la solicitud de patente.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0181
DE MINJUSTICIA

AHORA, POR TANTO, por contraprestaciones válidas y valiosas, el recibo y suficiencia de las cuales se reconocen por la presente, cedo y traspaso al Cesionario, representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos, mis derechos plenos y exclusivos en y sobre el invento en los Estados Unidos y en todo país extranjero y todo derecho, título e interés en y sobre la solicitud de patente y las otras solicitudes (v.g., solicitudes provisionales, solicitudes no provisionales, continuaciones, continuaciones en parte, divisionales, reexpediciones, reexámenes, solicitudes de fase nacional, incluidas las solicitudes de patentes menores (*petty patents*) y las solicitudes de modelos de utilidad) que puedan presentarse en los Estados Unidos y en todo país extranjero para el invento, y las patentes, prórrogas o derivaciones de las mismas, tanto nacionales como extranjeras, que puedan expedirse en virtud de las mismas, y por la presente autorizo y solicito al Comisionado de Patentes expedir patentes de los E.U. al Cesionario

antes nombrado de conformidad con los términos de este documento de cesión.

POR LA PRESENTE AUTORIZO al Cesionario a insertar en este documento de cesión la fecha de presentación y el número de solicitud si la fecha y el número no están disponibles en el momento del otorgamiento de este documento.

EN VIRTUD DE DICHA CONTRAPRESTACIÓN, transfiero al Cesionario el derecho a presentar solicitud en su propio nombre para la protección del invento en los E.U. y en países distintos de los E.U. y para reclamar en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes, el Convenio Inernacional y/u otro acuerdo internacional para cualquier solicitud, la fecha de la solicitud en los E.U. (o cualquier otra solicitud para el invento) a fin de obtener prioridad con respecto a otras solicitudes.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0181
DE MINJUSTICIA

POR LA PRESENTE PACTO y convengo con el Cesionario que no otorgaré ningún escrito ni realizaré ningún acto que pueda ser contrario a los términos de este documento de cesión aquí señalados, y que en cualquier momento, a solicitud, sin otra contraprestación adicional, pero por cuenta del Cesionario, suscribiré y entregaré las cesiones adicionales y demás escritos y realizaré los actos adicionales que el Cesionario pueda considerar necesarios o convenientes para perfeccionar el goce de esta Cesión por parte del Cesionario, y prestaré toda la asistencia necesaria para presentar solicitudes y obtener patentes originales, de continuación, continuación en parte, divisionales, reexpedidas, reexaminadas y de fase nacional de los E.U. o de todos o cualquiera de los países extranjeros para el invento, y para hacer valer cualesquiera derechos o causas de acción que surjan como resultado de dichas solicitudes o patentes, y otorgando afirmaciones y otras declaraciones

juramentadas, siendo entendido que el pacto y acuerdo anteriores obligarán, y redundarán en beneficio de los cesionarios y representantes legales de todas las partes del presente.

EN CONSTANCIA DE O CUAL, he firmado el presente en la fecha señalada a continuación.

Fecha 4/11/2006 (Fdo.) Thomas A. Wynn

ESTADO DE MARYLAND)
) SS:
CONDADO DE MONTGOMERY)

A los 11 días del mes de abril de 2006, ante mí, un Notario Público en y para el antedicho Condado, compareció Thomas A. Wynn, a quien conozco personalmente como la misma persona cuyo nombre suscribe el documento de cesión anterior, y reconoció haber firmado y entregado el documento como su acto libre y voluntario para los fines y propósitos allí señalados.

...RIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 07-15
DE MINUCIPIO

(Fdo.) Michael Lum
Notario Público

[Sello] MICHAEL LUM
NOTARIO PÚBLICO
CONDADO DE MONTGOMERY
MARYLAND
MI COMISIÓN EXPIRA EL 1 DE ABRIL DE 2007

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

2. Este documento público ha sido firmado por: Julianne Decker

371

3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey

4. lleva el sello/timbre de: Julianne Decker, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey

6. el día 23 de mayo de 2007

7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. No. A292578

9. Sello/Timbre:

(Sello del Estado de Nueva Jersey)

10. Firma

(Fdo.) Bradley Abelow

= =

RIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

372

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
JULIANNE DECKER

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
JULIANNE DECKER, NOTARY

CERTIFIED

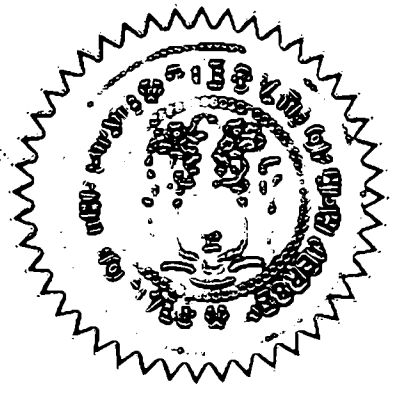
5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 23RD DAY OF MAY 2007

7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A292578

9. SEAL/STAMP:



10. SIGNATURE

Bradley Abelow

AM101991 L1

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/671,374, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS") dated June 8, 2006 from Thomas A. Wynn to the Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 14th day of May, 2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth

Michelle L. McGowan
Legalization Associate

TO BE USED IN COLUMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 14th day of May, 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.

Notary Public

JULIANNE DECKER
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
MY COMMISSION EXPIRES OCT. 22, 2008

PATENT
Attorney Docket No. 01997.043800
DHHS Ref. No. E-250-2005/0-US-01

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
tel/ (212) 218-2281

ASSIGNMENT

WHEREAS, I, Thomas A. Wynn, an employee of the Department of Health and Human Services, have co-invented a certain invention entitled:

Methods and Compositions for treating and preventing fibrosis

for which invention I have executed an application (provisional or non-provisional) for a U.S. patent, which was filed on April 14, 2005, under U.S. Application No. 60/671,374, and

WHEREAS, I am one of the applicants named in the above-identified application for a U.S. patent; and

WHEREAS, the conditions under which said invention was made are such as to entitle the Government under Paragraph 1(a) of Executive Order 10096 to the entire right, title, and interest herein, both domestic and foreign; and

WHEREAS, the Government of the United States of America (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring my entire domestic and foreign right, title, and interest in and under the invention described in the patent application.

NOW, THEREFORE, for good and valuable considerations, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, I assign and transfer to the Assignee, represented by the Secretary, Department of Health and Human Services, my full and exclusive rights in and to the invention in the U.S. and every foreign country and the entire right, title, and interest in and to the patent application and other such applications (e.g., provisional applications, non-provisional applications, continuations, continuations-in-part, divisionals, reissues, reexaminations, National phase applications, including petty patent applications, and utility model applications) that may be filed in the United States and every foreign country on the invention, and the patents, extensions, or derivations thereof, both foreign and domestic, that may issue thereon, and I do hereby authorize and request the Commissioner of Patents to issue U.S. patents to the above-mentioned Assignee agreeably with the terms of this assignment document.

I HEREBY AUTHORIZE the Assignee to insert in this assignment document the filing date and application number of the application if the date and number are unavailable at the time this document is executed.

UPON SAID CONSIDERATION, I convey to the Assignee the right to make application in its own behalf for protection of the invention in the U.S. and countries foreign to the U.S. and to claim under the Patent Cooperation Treaty, the International Convention and/or other international arrangement for any such application the date of the U.S. application (or any other application on the invention) to gain priority with respect to other applications.

In re Appln. of
Attorney Docket No.

I DO HEREBY COVENANT and agree with the Assignee that I will not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with the terms of this assignment document set forth herein, and that I will at any time upon request, without further or additional consideration, but at the expense of the Assignee, execute and deliver such additional assignments and other writings and do such additional acts as the Assignee may deem necessary or desirable to perfect the Assignee's enjoyment of this assignment, and render all necessary assistance in making application for and obtaining original, continuation, continuation-in-part, divisional, reissued, reexamined, and National phase patents of the U.S. or of any and all foreign countries on the invention, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, and by executing statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind, and inure to the benefit of, the assigns and legal representatives of all parties hereto.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunder set my hand on the date shown below.

Date 4/11/2006

Thomas A. Wynn

STATE OF Maryland)
) SS:
COUNTY OF Montgomery)

On this 11 day of April, 2006, before me, a Notary Public in and for said county, appeared Thomas A. Wynn, who is personally known to me to be the same person whose name is subscribed to the foregoing assignment document, and acknowledged that he/she signed and delivered the document as his/her free and voluntary act for the uses and purposes therein set forth.

Notary Public

{SEAL}

My Commission Expires:_____

MICHAEL LUM
NOTARY PUBLIC
MONTGOMERY COUNTY
MARYLAND
MY COMMISSION EXPIRES APRIL 1, 2007

In re Appln. of
Attorney Docket No.

NIH Assignment_Appln_Co-Sole-Notary (Rev. 8/14/02)

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 448/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 11 de octubre de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

= =

Cesión a WYETH del invento titulado "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS". Certificación notarial suscrita por Julianne Decker, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM101991

DECLARACIÓN JURAMENTADA

MARIA TERESA LARA R. TRADUCTORA OFICIAL RESOLUCION No. 01016 DE MINJUSTICIA

Yo, Michelle L. McGowan de Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/671,374, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS") fechada el 26 de abril de 2006, de Deborah A. Young y Mary Collins a Wyeth y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 14 días del mes de mayo de 2007, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

(Fdo.) Michelle L. McGowan
Michelle L. McGowan

PARA USO EN COLOMBIA

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva Jersey)
)
Condado de Morris)

A los 14 días del mes de mayo de 2007, ante mi personalmente compareció Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mi haber suscrito el mismo.

(Fdo.) Julianne Decker
Notario Público

(Sello notarial
en relieve)

[Sello] JULIANNE DECKER
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
MI COMISIÓN EXPIRA EL 22 DE OCTUBRE DE 2008

...IA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
...SOLUCION NO. 0186
DE MINJUSTICIA

Expediente No: 01997.043800.PV
Solicitud de Patente Provisional No. 60/671,347

Cesión de Invento

En virtud del pago por la CESIONARIA al CEDENTE de contraprestación válida y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por la presente, el CEDENTE:

(1) Nombre Completo del Inventor: Deborah A. Young
Residencia: 39 Nelson Road, Melrose, Massachusetts 02176
Ciudadanía: E.U.A.

---

(2) Nombre Completo del Inventor: Mary Collins
Residencia: 54 Rathburn Road, Natick, Massachusetts 01760
Ciudadanía: E.U.A.

---

por la presente vende, cede y traspasa al CESIONARIO:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, Nueva Jersey 07949

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluidos todos los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR Y PREVENIR LA FIBROSIS

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

Thomas A. Wynn y Michael J. Grusby

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0000
DE NOTARIADO

y el cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los E.U. **No. 60/671,374** presentada el **14 de abril de 2005**

[ ] Yo, el suscrito CEDENTE, por la presente autorizo y solicito la inserción anterior del número de solicitud y la fecha de presentación, una vez se conozcan,

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que pueda emitirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA, y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0180
DE MINJUSTICIA

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas

y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

(Fdo.) Deborah A. Young — Abril 26, 2006
Deborah A. Young — Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Massachusetts }
ss:
Condado de Middlesex }

A los 26 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Deborah A. Young, quien me demostró mediante prueba de identidad satisfactoria en la forma de Licencia de Conducción de Massachusetts, ser la misma persona cuya firma aparece anteriormente o en el documento anterior o adjunto, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Paula M. Gaete
Notario Público

[Sello] **Paula M. Gaete, Notario Público**
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el 10/31/2008

(Fdo.) Mary Collins — Abril 26, 2006
Mary Collins — Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Massachusetts }
ss:
Condado de Middlesex }

A los 26 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01618
DE MINJUSTICIA

Mary Collins, quien me demostró mediante prueba de identidad satisfactoria en la forma de Licencia de Conducción de Massachusetts, ser la misma persona cuya firma aparece anteriormente o en el documento anterior o adjunto, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Paula M. Gaete
Notario Público

[Sello] **Paula M. Gaete, Notario Público**
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el 10/31/2008

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Julianne Decker
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Julianne Decker, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey
6. el día 23 de mayo de 2007
7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. No. A292580
9. Sello/Timbre: 10. Firma

(Sello del Estado de Nueva Jersey) (Fdo.) Bradley Abelow

= =

'RIA TERESA LARA R. TRADUCTORA OFICIAL RESOLUCION No. ... DE MINJUSTICIA

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINJUSTICIA

384

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
JULIANNE DECKER

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
JULIANNE DECKER, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 23RD DAY OF MAY 2007

7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A292580

9. SEAL/STAMP:



10. SIGNATURE

Bradley Abelow

AM101991

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan of Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/671,374 and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS") dated April 26, 2006 from Deborah A. Young and Mary Collins to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 14th day of May,2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Michelle L. McGowan

TO BE USED IN COLUMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 14th day May 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.

Notary Public

JULIANNE DECKER
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
MY COMMISSION EXPIRES OCT. 22, 2008

Docket No: 01997.043800.PV
Provisional Patent Application No. 60/671,374

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Deborah A. Young
Residence: 39 Nelson Road, Melrose, Massachusetts 02176
Citizenship: U.S.A.

---

(2) Full Name of Inventor: Mary Collins
Residence: 54 Rathbun Road, Natick, Massachusetts 01760
Citizenship: U.S.A.

---

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING AND PREVENTING FIBROSIS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

Thomas A. Wynn and Michael J. Grusby

and which is found in U.S. Provisional Application No. **60/671,374** filed on: **April 14, 2005**

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Docket No: 01997.043800.PV
Provisional Patent Application No. 60/671,374

Deborah A. Young

Deborah A. Young

April 26, 2006
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts
ss:
County of Middlesex

On the 26th day of April 2006, before me, personally appeared Deborah A. Young, proved to me through satisfactory evidence of identity which was ma license to be the person whose name is signed above or on the preceding or attached document, and acknowledged that she executed the same, of her own free will and for the purposes set forth.

Paula M Gaete
Notary Public

Paula M. Gaete, Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires 10/31/2008

Docket No: 01997.043800.PV
Provisional Patent Application No. 60/671,374

Mary Collins — April 26, 2006
Mary Collins — Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts
County of Middlesex ss:

On the 26th day of April 2006, before me, personally appeared Mary Collins, proved to me through satisfactory evidence of identity which was MA license to be the person whose name is signed above or on the preceding or attached document, and acknowledged that she executed the same, of her own free will and for the purposes set forth.

Paula M Gaeta
Notary Public

Paula M. Gaeta, Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires 10/31/2008

NY_MAIN 562169v1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-108813- -00000-0000

Fecha: 2007-10-17 09:53:42 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 389

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]
- Descripción de la invención [x]
- Dibujos de ser estos pertinentes [x]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]

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 y 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 se 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 trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia M Nieto Cortes
Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia