



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816915.0

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1688340A

[22] 申请日 2003.7.15 [21] 申请号 03816915.0
[30] 优先权
[32] 2002. 7. 15 [33] US [31] 60/396,160
[32] 2002. 8. 12 [33] US [31] 60/403,001
[86] 国际申请 PCT/US2003/021975 2003.7.15
[87] 国际公布 WO2004/007682 英 2004.1.22
[85] 进入国家阶段日期 2005.1.17
[71] 申请人 韦思公司
地址 美国新泽西州
共同申请人 哈佛学院董事会
[72] 发明人 迈克尔·格斯伯 安德烈·伍斯特
黛博拉·A·扬格 玛丽·柯林斯
马修·J·惠特斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书 4 页 说明书 50 页 附图 5 页

[54] 发明名称 调节 T 辅助 (T_H) 细胞发育和功能的方法和组合物

[57] 摘要

使用 IL-21, 例如人 IL-21, 的活性或水平的调节剂调节 T 辅助 (T_H) 细胞发育和功能的方法和组合物。

ISSN 1008-4274

1. 一种在 T 细胞或细胞群体中抑制干扰素 $\gamma\gamma$ (IFN $\gamma\gamma$) 水平的方法, 包括

使所述 T 细胞与 T 细胞群体与足量的能在所述 T 细胞或细胞群体中抑制 IFN $\gamma\gamma$ 的 IL-21 激动剂接触, 其中所述激动剂是含有与 SEQ ID NO:2 有至少 85% 相同性的氨基酸序列并能与 IL-21R 结合的 IL-21 多肽。

2. 权利要求 1 的方法, 进一步包括识别其中按所希望的抑制了 IFN $\gamma\gamma$ 水平的 T 细胞或细胞群体。

3. 一种促进 Th 前体 (Thp) 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的方法, 包括:

使所述 Thp 细胞或细胞群体与足量的能诱导所述 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的 IL-21 激动剂接触, 其中所述激动剂是含有与 SEQ ID NO:2 有至少 85% 相同性的氨基酸序列并能与 IL-21R 结合的 IL-21 多肽。

4. 权利要求 3 的方法, 进一步包括识别其中按所希望的分化为 Th2 细胞或细胞群体的 T 细胞或细胞群体。

5. 一种抑制 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th1 细胞或细胞群体的方法, 包括:

使所述 Thp 细胞或细胞群体与足量的能抑制所述 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th1 细胞或细胞群体的 IL-21 激动剂接触, 其中所述激动剂是含有与 SEQ ID NO:2 有至少 85% 相同性的氨基酸序列并能与 IL-21R 结合的 IL-21 多肽。

6. 权利要求 5 的方法, 进一步包括识别其中按所希望的抑制了所述 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th1 细胞或细胞群体的 T 细胞或细胞群体。
7. 权利要求 1, 3 或 5 任一项的方法, 其中所述多肽含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。
8. 权利要求 1, 3 或 5 任一项的方法, 其中所述接触步骤是在离体, 体外或体内进行的。
9. 权利要求 1, 3 或 5 任一项的方法, 其中所述接触步骤是在哺乳动物患者中进行的。
10. 权利要求 9 的方法, 其中所述哺乳动物患者是人。
11. 一种抑制 Th 前体 (Thp) 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的方法, 包括:

使所述 Thp 细胞或细胞群体与足量的能抑制所述 Thp 细胞或细胞群体分化为所述 Th2 细胞群体的白介素-21 (IL-21) /IL-21 受体 (IL-21R) 拮抗剂接触, 其中所述拮抗剂选自抗-IL21R 抗体, 抗-IL21R 抗体的抗原结合片段以及 IL-21R 的可溶性片段。
12. 权利要求 11 的方法, 进一步包括识别其中按所希望的抑制了 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的 T 细胞或细胞群体。

13. 一种在 T 细胞或细胞群体中增加干扰素 $\gamma\gamma$ (IFN $\gamma\gamma$) 水平的方法, 包括:

使所述 T 细胞或细胞群体与足量的能在所述 T 细胞或细胞群体中增加 IFN $\gamma\gamma$ 水平的 IL-21/IL-21R 拮抗剂接触, 其中所述拮抗剂选自抗-IL21R 抗体, 抗-IL21R 抗体的抗原结合片段和 IL-21R 的可溶性片段。

14. 权利要求 13 的方法, 进一步包括其中按所希望的增加了 IFN $\gamma\gamma$ 水平的 T 细胞或细胞群体。
15. 权利要求 11 或 13 的方法, 其中 IL-21R 的可溶性片段包括 IL-21 受体的胞外区域。
16. 权利要求 15 的方法, 其中所述可溶性片段含有与 SEQ ID NO:4 的第 20 到 235 位氨基酸有至少 85% 相同性的氨基酸序列并能结合 IL-21。
17. 权利要求 15 的方法, 其中所述可溶性片段含有 SEQ ID NO:4 的第 1 到第 235 位氨基酸。
18. 权利要求 15 的方法, 其中所述可溶性片段进一步包括 Fc 片段。
19. 权利要求 11 或 13 的方法, 其中所述拮抗剂是抗-IL21R 抗体或其抗原结合片段。
20. 权利要求 12 的方法, 其中所述 T 细胞群体包括至少一个 Th1 细胞。

-
21. 权利要求 11 或 13 的方法，其中所述接触步骤是在离体，体外或体内进行的。
 22. 权利要求 21 的方法，其中所述接触步骤是在哺乳动物患者中进行的。
 23. 权利要求 22 的方法，其中所述哺乳动物是人。

调节 T 辅助 (T_H) 细胞发育和功能的方法和组合物

发明领域

本发明涉及 IL-21, 例如人 IL-21, 的活性或水平的调节剂以及它们在调节 T 细胞, 例如 T 辅助 (T_H) 细胞发育和功能中的用途。

发明背景

T 辅助 (Th) 亚群是根据它们能产生不同的细胞因子模式以及能促进特异的免疫反应的能力区分的。 $Th1$ 细胞可产生 $IFN\gamma$ 并促进细胞介导的直接针对细胞内病原体的免疫反应。相反, $Th2$ 细胞可产生细胞因子 IL-4, IL-5, 和 IL-13, 激活肥大细胞和嗜伊红细胞, 并指导 B 细胞针对细胞外病原体的反应。 $Th1$ 反应的调节紊乱会导致免疫病理现象, 其中异常的 $Th1$ 反应造成组织特异性自体免疫, 而过大的 $Th2$ 反应则与变态反应性疾病有关。

由极化的 Th 细胞产生的特定的细胞因子是能够促进前体 Th 细胞分化的初级效应子, 但是这些细胞也交叉调控其它亚群的功能活性。例如 IL-4 可能是促进 Thp 细胞向 $Th2$ 效应子分化的潜在因素。此外, IL-4 可抵抗 IFN 的产生。IL-10, 另一种由 $Th2$ 细胞产生的细胞因子, 可抑制 $Th1$ 的发育和 $IFN\gamma$ 诱导的巨噬细胞的功能。相反, $Th1$ 细胞产生的 $IFN\gamma$ 可增强 $Th1$ 的发育并抑制 $Th2$ 细胞的扩增。这些细胞因子的功能是促进特定的 Th 细胞

亚群的发育，同时抑制另一种发育，这些功能导致逐渐极化的反应。

发明简述

本发明部分基于关于细胞因子白介素-21 (IL-21) 由 T 辅助 (Th) 细胞, Th2 细胞亚群表达, 并在 Th1 细胞发育过程中选择性地抑制干扰素 $\gamma\gamma$ (IFN $\gamma\gamma$) 水平的发现。更特别的是, 本文发现 IL-21 优先由体外和体内产生的 Th2 细胞表达。在一个实施方案中, 将正在发育的 Th 细胞暴露在 IL-21 中能减少发育中的 Th1 细胞的 IFN $\gamma\gamma$ 水平, 因此能增强 Th2 反应。此外, 将发育中的 Th 细胞暴露在 IL-21 中可以通过例如通过减少 Stat4 蛋白和/或 mRNA 的表达, 从而减少 Stat4 信号传导, 由此调节 Th 细胞对其它细胞因子如 IL-12 的反应性。因此, 本文公开了调节 Th 细胞发育和活性的方法和组合物。本文公开的方法和组合物, 例如 IL-21 激动剂或拮抗剂可用于治疗 (例如治愈, 改善, 延迟或预防其发作, 或者预防其反复或复发) 或预防, Th 细胞和/或 IFN γ 相关的失调或状况, 例如 Th2 相关的疾病, 例如哮喘, 变态反应, 以及与抗体组分相关的疾病 (例如风湿性关节炎, 多发性硬化和狼疮); 以及 Th1 相关的疾病, 例如自体免疫性疾病 (例如多发性硬化, 风湿性关节炎, I 型糖尿病, 克罗恩氏病, 牛皮癣和重症肌无力, 以及其它)。

一方面, 本发明描述了一种抑制, 例如减轻或消除 T 细胞或细胞群体中干扰素 $\gamma\gamma$ (IFN $\gamma\gamma$) 水平的方法。该方法包括, 例如, 在 T 细胞中, 例如 T 细胞前体细胞 (Thp 细胞) 中, 或者 Th1 细胞 (例如分化 Th1 细胞或效应子 Th 细胞) 中, 或其 T 细胞群体中抑制 IFN $\gamma\gamma$ 的活性, 表达, 分泌, 或处理。所述方法包括使 T 细胞或细胞群体与足量的能在 T 细胞或细胞群体中抑制 IFN $\gamma\gamma$ (例如减少或消除) 的 IL-21 激动剂接触, 所述激动剂是

含有与 SEQ ID NO:2 具有至少 85 % 相同性的氨基酸序列并能与 IL-21R 结合的 IL-21 多肽。在一些实施例中, 所述方法进一步包括识别其中按所希望的抑制了 IFN γ 水平的 T 细胞或细胞群体。

在另一个方面, 本发明描述了一种促进 Th 前体 (Thp) 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括使 Thp 细胞或细胞群体与足量的可以诱导 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的 IL-21 激动剂接触, 所述激动剂是具有与 SEQ ID NO:2 有至少 85 % 相同性的氨基酸序列并能与 IL-21R 结合的 IL-21 多肽。在一些实施方案中, 所述方法进一步包括识别按所希望的分化为 Th2 细胞或细胞群体的 Thp 细胞或细胞群体。

在另一个方面, 本发明描述了一种抑制 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th1 细胞或细胞群体的方法。所述方法包括使 Thp 细胞或细胞群体与足量的能抑制 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th1 细胞或细胞群体的 IL-21 激动剂接触, 所述激动剂是具有与 SEQ ID NO:2 有至少 85 % 相同性的氨基酸序列并能与 IL-21R 结合的 IL-21 多肽。在一些实施例中, 所述方法进一步包括识别其中按所希望的抑制了 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的 T 细胞群体。

在这些方法的一些实施方案中, 所述多肽包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。在这些方法的一些实施方案中, 所述接触步骤是在离体, 体外或体内实施的。适合于离体或体内方法的患者包括哺乳动物患者, 例如人。

在另一方面, 本发明描述了抑制 Th 前体 (Thp) 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的方法。所述方法包括使 Thp 细胞或细胞群体与足量的能抑制 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th2

细胞群体的白介素-21 (IL-21) /IL-21 受体 (IL-21R) 拮抗剂接触, 所述拮抗剂选自抗-IL21R 抗体, 抗-IL21R 抗体的抗原结合片段以及 IL-21R 的可溶性片段。所述方法可选择地进一步包括识别其中按所希望的抑制了 Thp 细胞或细胞群体分化为 Th2 细胞或细胞群体的 T 细胞或细胞群体。在一些实施方案中, 所述 T 细胞群体包括至少一个 Th1 细胞。

在一些实施方案中, IL-21R 的可溶性片段包括 IL-21 受体的胞外区域。例如, 所述可溶性片段可以包括与 SEQ ID NO:4 的第 20 到 235 位氨基酸具有至少 85% 相同性, 并且能够结合 IL-21 的氨基酸序列; 另外, 所述可溶性片段还可以包括 SEQ ID NO:4 的第 1 到 235 位氨基酸。在相关的实施方案中, 所述可溶性片段进一步包括 Fc 片段。在另一个实施方案中, 所述拮抗剂是抗-IL21R 抗体或者抗-IL21R 抗体的抗原结合片段。

在另一个实施方案中, 所述接触步骤是在离体, 体外或体内进行的。所述接触步骤可以在哺乳动物患者中进行, 例如所述哺乳动物患者是人。

在另一个方面, 本发明描述了一种在 T 细胞或细胞群体中增加干扰素 $\gamma\gamma$ (IFN $\gamma\gamma$) 水平的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括使 T 细胞或细胞群体与足量的能在 T 细胞或细胞群体中增加 IFN $\gamma\gamma$ 的量的 IL-21/IL-21R 拮抗剂接触, 所述拮抗剂选自抗-IL21R 抗体, 抗-IL21R 抗体的抗原结合片段以及 IL-21R 的可溶性片段。该方法的一个实施方案进一步包括识别其中按所希望的增加了 IFN $\gamma\gamma$ 水平的 T 细胞群体。

在一些实施方案中, IL-21R 的可溶性片段包括 IL-21 受体的胞外区域。例如, 在一些实施方案中, 所述可溶性片段含有与 SEQ ID NO:4 的第 20 到 235 位氨基酸具有至少 85% 相同性, 并且能

够结合 IL-21 的氨基酸序列；另外所述可溶性片段还可以包括 SEQ ID NO:4 的第 1 到 235 位氨基酸。在相关的实施方案中，所述可溶性片段进一步包括 Fc 片段。在另一个实施方案中，所述拮抗剂可以是一种抗-IL21R 抗体或者抗-IL21R 抗体的抗原结合片段。

在另一个相关的实施方案中，所述接触步骤是在离体，体外或体内进行的。所述接触步骤可以在哺乳动物患者，例如人中进行。

除非另有定义，这里所用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员的一般理解具有相同的意义。合适的方法和材料如下所述，虽然与本文中所述的类似或等同的方法和材料也可以用于实施或检验本发明。本文提及的所有出版物，专利申请，专利，以及其它参考文献都引入其全文作为参考。如果出现矛盾，以本发明的说明书，包括定义为准。此外，所述材料，方法和实施例仅仅是举例说明而并非限制本发明。

根据下述详细描述和权利要求，本发明的其它特性和优点是显而易见的。

附图简述

图 1A 显示了在实施例 1 中描述的各种 Th1 和 Th2 偏移条件下检测 IL-21，IL-4，IFN γ 和 $\gamma\gamma$ 肌动蛋白的 Northern blot 杂交分析结果。

图 1B 是进行了初次和二次刺激以后的 Th1 和 Th2 细胞中相对于 GAPDH mRNA 的 IL-21 mRNA 水平的柱状图。

图 1C 是在存在和不存在 IL-4 和 IFN γ 的条件下培养的初次和二次 Th1 和 Th2 细胞中相对于 GAPDH mRNA 的 IL-21 mRNA 水平的柱状图。

图 1D 是在硕大利什曼原虫感染的 C57BL/g 和 BALB/c 小鼠中相对于 GAPDH mRNA 的 IL-21 mRNA, IL-4 mRNA, 和 IFN γ mRNA 水平的柱状图。

图 2A 是在中性条件, 或是 Th1 偏移条件下培养的 Thp 细胞中产生 IL-4 和 IL-21 细胞因子的图示。

图 2B 是 IL-21 处理或假处理的 Thp 细胞中产生 IFN γ 的柱状图。

图 3A 是在存在和不存在 IL-22 的条件下, 在 Th1 偏移条件下培养的 Thp 细胞中产生 IL-4 和 IFN γ 的图示。

图 3B 是 IL-21 处理的或假处理的野生型和 Stat6^{-/-}小鼠的 Thp 细胞在 Th1 偏移条件下处理时产生 IL-4 和 IFN γ 的图示。

图 3C 是 IL-21 处理的或假处理的野生型和 Stat6^{-/-}小鼠的 Th1 细胞中 IFN γ , IL-2, 和 TNF α 表达的图示。

图 4A 显示了在 Th1 或 Th2 偏移条件下培养的 Thp 细胞中 T-bet 和肌动蛋白水平的 western blot 分析。

图 4B 是 IL-12R β 2 mRNA 相对于 Th1 细胞的相对水平的柱状图。

图 4C 显示了在存在 IL-21 或假上清的条件下用抗-CD3 刺激的 Thp 细胞中的磷酸化 Stat4, Stat4, Stat1, 和 IL-12 多肽水平。

图 4D 是在存在 IL-21 或假上清的条件下用抗-CD3 刺激 48 小时后假处理和 IL-21 处理的 Thp 细胞中相对于 GAPDH mRNA 的 Stat4 mRNA 水平的柱状图。IL-4 mRNA 和 IFN γ 。

图 5A 显示了在注射了 TNP-KLH 或 PBS 后 TNP-KLH-免疫的野生型和 IL21-21R^{-/-}小鼠的特异胀大图。

图 5B 显示了从抗原再刺激的 TNP-KLH-免疫的野生型和 IL21-21R^{-/-}小鼠的引流淋巴结中纯化的 CD4⁺ T 细胞中产生 IFN γ 的柱状图。

发明详述

本发明提供了通过调节 IL-21 和 IL-21 受体之间相互作用从而调节 T 辅助细胞分化, 发育和功能的方法和组合物。将 IL-21 或者能在细胞群体中增加 IL-21 或 IL-21 受体水平的试剂加入到 T 辅助细胞群体中, 以在 Thp 或 Th1 细胞群体中抑制 IFN γ 水平。IL-21, 或者能增加 IL-21 水平的试剂还可以用于促进 Th2 发育, 或者加强 Th2 介导的免疫反应和/或抑制 Th1 发育。

IL-21, 或者能增加 IL-21 水平的试剂, 也可用于抑制 IL-12 对 T 辅助细胞群体的效果。IL-21, 或是能增加 IL-21 水平或可作为 IL-21 激动剂的试剂, 可用于抑制 Th1 介导的疾病例如自体免疫性疾病, 多发性硬化, 风湿性关节炎, 和 I 型糖尿病。

在一个方面, 本发明描述了一种在细胞, 例如 T 细胞, 或细胞群体, 例如 T 细胞群体中调节, 例如增加, 或减少或抑制干扰素 γ (IFN γ) 的活性或水平的方法。例如, 本发明提供了一种在 T 细胞, 例如 T 细胞前体细胞 (Thp 细胞), 或者 Th1 细胞 (例如分化 Th1 细胞或效应子 Th 细胞), 或其 T 细胞群体中调

节下列一种或多种过程的方法：IFN γ 活性，表达，分泌，或处理。所述方法包括：

（可选择地）识别一种细胞，例如 T 细胞，或一种细胞群体，例如 T 细胞群体，其中按所期望地调节了（例如增加或减少）IFN γ 的活性或水平；使所述细胞或细胞群体与足量的能调节（例如增加或减少）所述细胞或细胞群体中的 IFN γ 的活性或水平的 IL-21 调节剂，例如一种 IL-21 激动剂或拮抗剂接触。

所述方法可以用于培养的细胞，例如在体外或是离体培养的。例如，免疫细胞，如这里所述的 T 细胞，可以在体外在培养基中培养，所述接触步骤可以通过将一种或多种 IL-21 调节剂（例如 IL-21 激动剂或拮抗剂）加入到培养基中实现。另外，所述方法可以在存在于患者中的细胞（例如这里所述的免疫或 T 细胞）上实施，例如作为体内（治疗性或预防性）方案的一部分。

在一个实施方案中，提供了在细胞，例如 T 细胞（例如 T 细胞前体细胞（Thp 细胞），或 Th1 细胞（例如分化 Th1 细胞或效应子 Th 细胞）或其细胞群体中减少或抑制 IFN γ 的活性或水平的方法。所述方法包括（可选择地）识别一种细胞，例如 T 细胞，或一种细胞群体，例如 T 细胞群体，其中按所期望地减少或抑制了 IFN γ 的活性或水平；使所述细胞或细胞群体与足量地能减少或抑制所述细胞或细胞群体中的 IFN γ 的活性或水平的 IL-21 激动剂接触。优选地，所述 IL-21 激动剂特异地抑制 IFN γ 水平或活性，例如，它不减少或抑制其它细胞因子如 IL-2 或 TNF α 的活性或水平。在一个实施方案中，所述 IL-21 激动剂抑制产生 IFN γ 的细胞，例如产生 IFN γ 的 Th1 细胞产生 IFN γ 。

在其它实施方案中，本发明提供了一种在患者中减少 IFN γ 水平或活性的方法。所述方法包括（可选择地）识别其中按所

期望的减少了 IFN γ 水平或活性的患者;给所述患者施用足量的能减少 IFN γ 水平或活性的 IL-21 激动剂。IFN γ 可以用本领域已知的方法检测,例如用胞内细胞因子染色,或用 ELISA 技术检测细胞上清中的含量。

所述 IL-21 激动剂可以是 IL-21 多肽,人 IL-21 多肽,或者其活性片段(例如含有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的,或是由 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列编码的氨基酸序列的人 IL-21 多肽,或其实质上同源的序列)。在其它实施方案中,所述 IL-21 激动剂是一种融合蛋白,其中 IL-21 多肽,例如人 IL-21 多肽,或其片段与另一种多肽,例如一种免疫球蛋白多肽或其部分(例如免疫球蛋白多肽的 Fc 区域);IL-21 受体的激动剂抗体;或一种小分子激动剂融合。在其它实施方案中,所述 IL-21 激动剂是一种能通过例如增加功能性 IL-21 的表达,处理和/或分泌从而增加 IL-21 活性或水平的试剂。

优选地,所述患者是哺乳动物,例如患有伴随着异常的,例如增加的 IFN γ 水平或活性的疾病,例如免疫疾病(例如 T 细胞介导的疾病)的人患者。

典型的可以用 IL-21 的激动剂治疗(例如改善)或预防的免疫疾病包括,例如 Th1 相关的疾病,例如自体免疫性疾病(包括但不限于多发性硬化,风湿性关节炎,1 型糖尿病,炎症性肠病(IBD),牛皮癣和重症肌无力。

本发明还描述了一种在细胞,例如 T 细胞,或细胞群体,例如 T 细胞群体中增加 IFN γ 水平或活性的方法。例如,本发明包括在 T 细胞,例如 T 细胞前体细胞(Thp 细胞),或 Th1 细胞(例如分化 Th1 细胞或效应子 Th 细胞),或其细胞群体中增加 IFN γ 活性,表达,分泌或处理的方法。所述方法包括(可选择地)

识别一种细胞,例如 T 细胞,或一种细胞群体,例如 T 细胞群体,其中按所期望的增加了 IFN γ 表达;使所述细胞与足量的能抑制 IL-21 结合或活性,例如抑制 IL-21 与 IL-21 受体结合的 IL-21 拮抗剂,从而在所述细胞中增加 IFN γ 表达水平。

所述 IL-21 拮抗剂可以是,例如 IL-21,例如人 IL-21,或 IL-21 受体,例如人 IL-21 受体多肽的抗体(例如单克隆或特异性抗体)。优选地,所述抗体是人的,人源化的,嵌合的,或是体外产生的人 IL-21 或人 IL-21 受体多肽的抗体。在另一个实施方案中,所述拮抗剂包括 IL-21 多肽的片段,例如 IL-21 多肽的 IL-21 受体结合区域。另外所述拮抗剂还可以包括 IL-21 受体多肽的片段,例如 IL-21 受体多肽的 IL-21 结合区域。在一个实施方案中,所述拮抗剂是融合蛋白,其中上述 IL-21 或 IL-21 受体多肽或其片段与第二个部分,例如多肽(例如免疫球蛋白链)融合。

在另一个方面,本发明描述了一种调节,例如增加或减少 Th2 细胞活性和/或细胞数目的方法。在一个实施方案中,提供了一种调节,例如促进或抑制下述各项中的一种或多种的方法:增殖,存活和/或分化为 Th2 细胞(例如 T 细胞前体,例如 Th 前体(Thp)的分化)。所述方法包括:

(可选择地)识别一种细胞,例如 T 细胞(例如 Thp 或 Th2 细胞),或一种细胞群体,其中按所期望的调节了增殖,存活和/或分化;并且

使所述细胞或细胞群体与足量的可调节下述各项中的一种或多种的 IL-21 调节剂,例如 IL-21 激动剂或拮抗剂接触:增殖,存活和/或分化为 Th2 细胞(例如调节所述 Thp 细胞分化为 Th2 细胞)从而调节 Th2 细胞活性和/或细胞数目。

所述方法可用于培养的细胞，例如体外或离体培养的。例如，免疫细胞，例如本文所述的 T 细胞，可以在体外在培养基中培养，所述的接触步骤可以通过将一种或多种 IL-21 调节剂（例如一种或多种 IL-21 激动剂或拮抗剂）加入到培养基中实施。另外，所述方法还可以对存在于患者中的细胞实施，例如作为体内（治疗或预防）方案的一部分。

在一个实施方案中，提供了一种减少或抑制 Th2 细胞活性和/或细胞数目的方法。例如，可以通过抑制或减少下述各项中的一种或多种来减少或抑制 Th2 细胞活性和/或细胞数目：增殖，存活和/或分化为 Th2 细胞（例如 T 细胞前体，例如 Th 前体（Thp）的分化）。所述方法包括（可选择地）识别一种细胞，例如 T 细胞（例如 Thp 或 Th2 细胞），或一种细胞群体，其中按所期望地抑制了增殖，存活和/或分化；使所述细胞或细胞群体与足量的能抑制或减少下述各项中的一种或多种的 IL-21 拮抗剂接触：增殖，存活和/或分化为 Th2 细胞（例如抑制或减少所述 Thp 细胞分化为 Th2 细胞），从而抑制或减少 Th2 细胞活性和/或细胞数目。

所述方法可用于培养的细胞，例如 T 细胞（例如 Thp 或 Th2 细胞），例如在体外或离体培养的细胞。

另外，所述方法可以在存在于患者中的细胞（例如本文所述的免疫或 T 细胞）上实施，例如作为体内（例如治疗性的或预防性的）方案的一部分。例如，所述方法可以用于治疗或预防患者的 Th2 介导的疾病，例如哮喘和变态反应。相应地，本发明提供了一种治疗（例如治愈，抑制，改善，延缓或预防其发作，或预防其反复或者复发）或预防患者的 Th2 相关疾病的方法。所述方法包括给患者施用足量的可抑制或减少 Th2 细胞活性和/或细胞数目的 IL-21 拮抗剂，从而治疗或预防 Th2 相关疾病。

优选地，所述患者是哺乳动物，例如患有伴随着异常的 Th2 细胞数目或活性的疾病，例如免疫疾病（例如 Th2 相关疾病）。足量的可抑制或减少细胞活性和/或数目的数量是足以改善或预防所述疾病的数量。

所述 IL-21 拮抗剂可以是，例如 IL-21，例如人 IL-21，或 IL-21 受体，例如人 IL-21 受体多肽的抗体（例如单克隆或特异性抗体）。优选地，所述抗体是人的，人源化的，嵌合的，或体外产生的人 IL-21 或人 IL-21 受体多肽的抗体。在其它实施方案中，所述拮抗剂包括 IL-21 多肽的片段，例如 IL-21 多肽的 IL-21 受体结合区域。另外，所述拮抗剂可包括 IL-21 受体多肽的片段，例如 IL-21 受体多肽的 IL-21 结合区域。在一个实施方案中，所述拮抗剂是融合蛋白，其中上述 IL-21 或 IL-21 受体多肽或其片段与第二部分，例如多肽（例如一种免疫球蛋白链）融合。

在另一个实施方案中，提供了一种增加 Th2 细胞活性和/或细胞数目的方法。例如，可以通过增加下述各项中的一种或多种来增加 Th2 细胞活性和/或细胞数目：增殖，存活和/或分化为 Th2 细胞（例如 T 细胞前体，例如 Th 前体（Thp）的分化）。所述方法包括（可选择地）识别一种细胞，例如一种 T 细胞（例如 Thp 或 Th2 细胞），或一种细胞群体，其中按所期望地增加了增殖，存活和/或分化；使所述细胞或细胞群体与足量的可增加下述各项中的一种或多种的 IL-21 拮抗剂接触：增殖，存活和/或分化为 Th2 细胞（例如增加所述 Thp 细胞向 Th2 细胞的分化）。

所述 IL-21 激动剂可以是 IL-21 多肽，例如人 IL-21 多肽，或其活性片段（例如含有如 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或是由 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列编码的氨基酸序列的人 IL-21 多肽，或其实质上同源的序列）。在其它实施方案中，所述 IL-21 激动剂是融合蛋白，其中 IL-21 多肽，例如人 IL-21 多肽或其片

段与另一种多肽，例如免疫球蛋白多肽或其部分（例如免疫球蛋白多肽的 Fc 区域）；IL-21 受体的激动剂抗体；或小分子激动剂融合。

在另一个方面，提供了一种调节，例如增加或减少，Th1 细胞数目和/或活性的方法。在一个实施方案中，提供了一种调节，例如促进或抑制下述各项中的一种或多种的方法：增殖，存活和/或分化为 Th1 细胞（例如 T 细胞前体，例如 Th 前体（Thp）的分化）。所述方法包括（可选择地）识别一种细胞，例如一种 T 细胞（例如 Thp 或 Th1 细胞），或一种细胞群体，其中按所期望地调节了增殖，存活和/或分化；使所述细胞或细胞群体与足量的可调节下述各项中的一种或多种的 IL-21 调节剂接触：增殖，存活和/或分化为 Th2 细胞（例如调节所述 Thp 细胞分化为 Th2 细胞），从而调节 Th1 细胞活性和/或细胞数目。

所述方法可以用于培养的细胞，例如体外或是离体培养的。例如，免疫细胞，如这里所述的 T 细胞，可以在体外在培养基中培养，所述接触步骤可以通过将一种或多种 IL-21 调节剂（例如 IL-21 激动剂或拮抗剂）加入到培养基中实现。另外，所述方法可以在存在于患者中的细胞（这里所述的免疫或 T 细胞）上实施，例如作为体内（治疗性或预防性）方案的一部分。

在一个实施方案中，提供了一种减少或抑制 Th1 细胞活性和/或细胞数目的方法。例如，可以通过抑制或减少下述各项中的一种或多种来减少或抑制 Th1 细胞活性和/或细胞数目：增殖，存活和/或分化为 Th1 细胞（例如 T 细胞前体，例如 Th 前体（Thp）的分化）。所述方法包括（可选择地）识别一种细胞，例如 T 细胞（例如 Thp，一种产生 IFN γ 的细胞，例如 Th1 细胞），或一种细胞群体，其中按所期望地抑制了增殖，存活和/或分化，使所述细胞或细胞群体与足量的能抑制或减少下述各项中的一种或

多种的 IL-21 激动剂接触：增殖，存活和/或分化为 Th1 细胞（例如抑制或减少所述 Thp 细胞分化为 Th1 细胞），从而抑制或减少 Th1 细胞活性和/或细胞数目。

所述方法可用于培养的细胞，例如 T 细胞（例如 Thp 或 Th2 细胞），例如在体外或离体培养的细胞。

另外，所述方法可以在存在于患者中的细胞（例如本文所述的免疫或 T 细胞）上实施，例如作为体内（例如治疗性的或预防性的）方案的一部分。例如，所述方法可以用于治疗或预防患者的 Th1 介导的疾病，例如自体免疫性疾病（例如多发性硬化，风湿性关节炎，I 型糖尿病，克罗恩氏病，牛皮癣和重症肌无力，以及其它）。相应地，本发明提供了一种治疗（例如治愈，抑制，改善，延缓或预防其发作，或预防其反复或者复发）或预防患者的 Th1 相关疾病的方法。所述方法包括给患者施用足量的可抑制或减少 Th1 细胞活性和/或细胞数目的 IL-21 激动剂，从而治疗或预防 Th1 相关疾病。

优选地，所述患者是哺乳动物，例如患有伴随着异常的 Th1 细胞数目或活性的疾病，例如免疫疾病（例如 Th1 相关疾病）。足量的可抑制或减少 Th1 细胞活性和/或数目的数量是足以改善或预防所述疾病的数量。

所述 IL-21 激动剂可以是 IL-21 多肽，例如人 IL-21 多肽，或者其活性片段（例如含有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的，或是由 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列编码的氨基酸序列的人 IL-21 多肽，或其同源序列）。在其它实施方案中，IL-21 激动剂是一种融合蛋白，其中 IL-21 多肽，例如人 IL-21 多肽，或其片段与另一种多肽，例如一种免疫球蛋白多肽或其部分（例如免疫球蛋白多肽的 Fc 区域）；IL-21 受体的激动剂抗体；或一种小分

子激动剂融合。在另一个实施方案中，所述 IL-21 激动剂是一种能通过例如增加功能性 IL-21 的表达，处理和/或分泌从而增加 IL-21 活性或水平的试剂。

在另一个实施方案中，提供了一种增加 Th1 细胞活性和/或细胞数目的方法。例如，可以通过增加下述各项中的一种或多种来增加 Th1 细胞活性和/或细胞数目：增殖，存活和/或分化为 Th1 细胞（例如 T 细胞前体，例如 Th 前体（Thp）的分化）。所述方法包括：

（可选择地）识别一种细胞，例如一种 T 细胞（例如 Thp 或 Th1 细胞），或一种细胞群体，其中按所期望地增加了增殖，存活和/或分化；并且

使所述细胞或细胞群体与足量的可增加下述各项中的一种或多种的 IL-21 拮抗剂接触：增殖，存活和/或分化为 Th1 细胞（例如增加所述 Thp 细胞向 Th1 细胞的分化），从而增加 Th1 细胞活性和/或细胞数目。

所述 IL-21 拮抗剂可以是，例如一种 IL-21，例如人 IL-21，或 IL-21 受体，例如人 IL-21 受体多肽的抗体（例如一种单克隆或特异性抗体）。优选地，所述抗体是人的，人源化的，嵌合的，或是体外产生的人 IL-21 或人 IL-21 受体多肽的抗体。在其它实施方案中，所述拮抗剂包括 IL-21 多肽的片段，例如 IL-21 多肽的 IL-21 受体结合区域。另外所述拮抗剂还可以包括 IL-21 受体多肽的片段，例如 IL-21 受体多肽的 IL-21 结合区域。在一个实施方案中，所述拮抗剂是融合蛋白，其中上述 IL-21 或 IL-21 受体多肽或其片段与第二个部分，例如多肽（例如免疫球蛋白链）融合。

在另一个方面，本发明描述了一种在细胞，细胞群体或患者中调节，例如减少或抑制，或增加白介素-12（IL-12）活性或水平的方法。所述方法包括：

（可选择地）识别一种细胞，例如 T 细胞，细胞群体或患者，其中按所期望的调节了 IL-12；并且

使所述细胞或细胞群体与足量的可调节细胞，细胞群体或患者中 IL-12 活性或水平的 IL-21 调节剂，例如 IL-21 激动剂或拮抗剂接触，或者给所述患者施用所述 IL-21 调节剂。

在一个实施方案中，通过使所述细胞或细胞群体与足量的可减少 IL-12 活性或水平的 IL-21 激动剂，例如本文所述的 IL-21 激动剂接触，或者给患者施用所述 IL-21 激动剂来减少 IL-12 的活性或水平。

在其它实施方案中，通过使所述细胞或细胞群体与足量的可增加 IL-12 活性或水平的 IL-21 拮抗剂，例如本文所述的 IL-21 拮抗剂接触，或者给患者施用所述 IL-21 拮抗剂来增加 IL-12 的活性或水平。

在另一个方面，本发明描述了一种在细胞，细胞群体，或患者中调节，例如减少或抑制，或增加 Stat，例如 Stat4 的活性或水平的方法。所述方法包括：

（可选择地）识别一种细胞，例如 T 细胞，细胞群体或患者，其中按所期望的调节了 Stat；并且

使所述细胞或细胞群体与足量的可调节所述细胞，细胞群体或患者中 Stat 活性或水平的 IL-21 调节剂，例如 IL-21 激动剂或拮抗剂接触，或者给所述患者施用所述 IL-21 调节剂。

在一个实施方案中，通过使所述细胞或细胞群体与足量的可减少 Stat，例如 Stat 蛋白或 mRNA 活性或水平的 IL-21 激动剂，例如本文所述的 IL-21 激动剂接触，或者给患者施用所述 IL-21 激动剂来减少 Stat 的活性或水平。

在其它实施方案中，通过使所述细胞或细胞群体与足量的可增加 Stat，例如 Stat 蛋白或 mRNA 活性或水平的 IL-21 拮抗剂，例如本文所述的 IL-21 拮抗剂接触，或者给患者施用所述 IL-21 拮抗剂来增加 Stat 的活性或水平。

在另一个方面，本发明描述了一种在患者中减少，抑制，改善，或延缓自体免疫反应（例如 Th1 介导的自体免疫反应）的方法。所述方法包括给需要的患者施用足量的可在所述患者中减少，抑制，改善，或延缓所述自体免疫反应的 IL-21 激动剂，例如本文所述的 IL-21 激动剂。

在另一个方面，本发明描述了一种在患者中减少，抑制，改善，或延缓 Th2 相关反应（例如变态反应或哮喘反应）的方法。所述方法包括给需要的患者施用足量的可在所述患者中减少，抑制，改善，或延缓所述 Th2 相关反应的 IL-21 拮抗剂，例如本文所述的 IL-21 拮抗剂。

在另一个方面，本发明描述了一种在细胞群体，例如 Th 细胞群体中选择性识别 Th2 细胞的方法，所述方法包括在检测样品，例如 Th 细胞和参考样品，例如 Th1 细胞中确定 IL-21 核酸（例如 IL-21 基因产物）或多肽的水平；比较所述检测样品中的所述 IL-21 核酸的水平和所述参考样品，例如 Th1 细胞中的所述 IL-21 核酸的水平，其中所述检测样品中所述 IL-21 核酸水平相对于所述参考样品的增加表示检测样品是 Th2 细胞。

这里所述的“Th1 相关疾病”是与参考，例如正常对照相比伴随着异常的，例如增加的或减少的 Th1 细胞活性（例如增加的或减少的 Th1 细胞反应）的疾病或状况。Th1 相关疾病的实例包括，例如自体免疫性疾病（例如多发性硬化，风湿性关节炎，I 型糖尿病，克罗恩氏病，牛皮癣和重症肌无力，以及其它）。

这里所述的“Th2 相关疾病”是与参考，例如正常对照相比伴随着异常的，例如增加的或减少的 Th2 细胞活性（例如增加的或减少的 Th2 细胞反应）的疾病或状况。Th2 相关疾病的实例包括，例如哮喘，变态反应，以及与抗体组分有关的疾病（例如风湿性关节炎，多发性硬化以及狼疮）。

本文所述方法中使用的 IL-21 多肽包括例如哺乳动物 IL-21 多肽（例如啮齿动物，人，或非人的灵长类动物）的氨基酸序列。例如，IL-21 多肽可以包括人 IL-21 多肽的氨基酸序列。一种合适的氨基酸序列是如 SEQ ID NO:2（如下所示）所示的 IL-21 多肽的氨基酸序列。

IL-21 和 IL-21 受体多肽，包括核苷酸和氨基酸序列，已在例如美国专利序列号 6,057,128, Parrish-Novak et al, Nature 408: 57-63, 2000; Vosshenrich et al., Curr. Biol. 11: R157-77, 2001, Asao et al., J. Immunol. 167:1-5, 2001; 和 Ozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11439-44, 2000 中进行了描述。IL-21 的氨基酸序列是公知的。例如，人 IL-21 的核苷酸和氨基酸序列可以从 Genbank Acc. No. X_011082 获得。在此条目中所列出的人 IL-21 核苷酸序列如下所示：

```
1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtc
61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcac ttcttgggga cactgggtcca
121 caaatcaagc tcccaagggtc aagatcgcca catgattaga atgctgcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttgggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc tttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcattg
421 tgattcttat gagaaaaaac caccctaaaga attcctagaa agattcaaatt cactttctcca
```

481 aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
 541 taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg
 601 tattccaagt ggaggag (SEQ ID NO:1)

由所公开的人 IL-21 核酸序列编码的氨基酸序列如下所示:

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEF
 LPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRL
 TPCSDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2)

人 IL-21 受体核酸的核苷酸序列如下所示:

1 gaagcagcag gtacccctc cacatcccta gggctctgtg atgtaggcag agggccgtgg
 61 gagtcagcat gccgcgtggc tgggcccgc ccttgctcct gctgctgctc cagggaggct
 121 ggggctgccc cgacctcgtc tgctacaccg attacctcca gacggtcatc tgcacctcgt
 181 aaatgtggaa cctccacccc agcacgctca cccttacctg gcaagaccag tatgaagagc
 241 tgaaggacga ggccacctcc tgcagcctcc acaggctggc ccacaatgcc acgcatgcca
 301 cctacacctg ccacatggat gtattccact tcatggccga cgacattttc agtgtcaaca
 361 tcacagacca gtctggcaac tactcccagg agtgtggcag ctttctcctg gctgagagca
 421 tcaagccggc tccccctttc aacgtgactg tgaccttctc aggacagtat aatatctcct
 481 ggcgctcaga ttacgaagac cctgccttct acatgctgaa gggcaagctt cagtatgagc
 541 tgcagtacag gaaccgggga gaccctggg ctgtgagtcg gaggagaaag ctgatctcag
 601 tggactcaag aagtgtctcc ctccctcccc tggagttccg caaagactcg agctatgagc
 661 tgcagggtgcg ggcagggccc atgcctggct cctcctacca ggggacctgg agtgaatgga
 721 gtgaccgggt catctttcag acccagtcag aggagttaaa ggaaggctgg aaccctcacc
 781 tgctgcttct cctcctgctt gtcatagtct tcattcctgc cttctggagc ctgaagaccc
 841 atccattgtg gaggctatgg aagaagatat gggccgtccc cagccctgag cgggtcttca
 901 tgcccctgta caaggcgtgc agcggagact tcaagaaatg ggtgggtgca cccttcactg
 961 gctccagcct ggagctggga ccctggagcc cagaggtgcc ctccacctg gaggtgtaca
 1021 gctgccaccc accacggagc ccggccaaga ggctgcagct cacggagcta caagaaccag
 1081 cagagctggt ggagtctgac ggtgtgccc agcccagctt ctggccgaca gccagaact
 1141 cggggggctc agcttacagt gaggagagg atcgccata cggcctggtg tccattgaca
 1201 cagtgactgt gctagatgca gaggggccat gcacctggc ctgcagctgt gaggatgacg
 1261 gctaccacag cctggacctg gatgctggcc tggagcccag ccagggccta gaggaccac
 1321 tcttggtatg agggaccaca gtccctgtct gtggctgtgt ctcagctggc agccctgggc
 1381 taggagggcc cctgggaagc ctccctggga gactaaagcc accccttgca gatggggagg
 1441 actgggctgg gggactgccc tggggtggc ggtcacctgg aggggtctca gagagtgagg
 1501 cgggctcacc cctggccggc ctggatatgg acacgtttga cagtggcttt gtgggctctg
 1561 actgcagcag ccctgtggag tgtgacttca ccagcccgg ggacgaagga ccccccgga
 1621 gctacctcgg ccagtgggtg gtcattcctc cgccactttc gagccctgga cccagggcca
 1681 gctaatacag ctgactggat gtccagagct ggccaggcca ctgggcccct agccagagac
 1741 aaggtcacct gggctgtgat gtgaagacac ctgcagcctt tggctcctg gatgggcctt
 1801 tgagcctgat gtttacagt tctgtgtgtg tgtgtgcata tgtgtgtgtg tgcataatgca
 1861 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc ttaggtgcgc agtggcatgt ccacgtgtgt gtgtgattgc
 1921 acgtgcctgt gggcctggga taatgccc atgactccat gcattcacct gccctgtgca
 1981 tgtctggact cacggagctc acccatgtgc acaagtgtgc acagtaaacg tgttttgtgt
 2041 caacagatga caacagccgt cctccctcct agggctctgt gttgcaagtt ggtccacagc
 2101 atctccgggg ctttgtggga tcagggcatt gcctgtgact gaggcggagc ccagccctcc
 2161 agcgtctgcc tccaggagct gcaagaagtc catattgttc cttatcacct gccaacagga
 2221 agcgaaaggg gatggagtga gcccatgggt acctcgggaa tggcaatttt ttgggcggcc
 2281 cctggacgaa ggtctgaatc ccgactctga taccttctgg ctgtgtacc tgagccaagt
 2341 cgccctccct ctctgggcta gagtttcctt atccagacag tggggaaggc atgacacacc
 2401 tgggggaaat tggcgatgtc acccgtgtac ggtacgcagc ccagagcaga ccctcaataa
 2461 acgtcagctt ccttccttct gcggccagag ccgaggcggg cgggggtgag aacatcaatc
 2521 gtcagcgaca gcctgggcac ccgcgggggt gtcccgcctg cagagggcca ctcggggggg
 2581 tttccaggct taaaatcagt ccgtttcgtc tcttggaac agctccccac caaccaagat
 2641 ttctttttct aacttctgct actaagtttt taaaaattcc ctttatgcac ccaagagata
 2701 ttatttaaac accaattacg tagcaggcca tggctcatgg gaccacccc ccgtggcact

2761 catggagggg gctgcaggtt ggaactatgc agtgtgctcc ggccacacat cctgctgggc
 2821 cccctaccct gcccgaattc aatcctgcca ataaatcctg tcttatttgt tcatcctgga
 2881 gaattga (SEQ ID NO:3)

所公开的 IL-21 受体核酸序列编码具有如下所示氨基酸序列的多肽:

MPRGWAAPLLLLLLQGGWGCPDLVCYTDYLQTVICILEMWNLHPSTLTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHAT
 YTCHMDVFHFMAADDIFSVNITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNIWSRSDYEDPAFYMLKGKLQY
 ELQYRNRGDPWAVSPRRKLI SVDSRSVSLPLEFRKDSSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVI FQTQSEELKEGW
 NPHLLLLLLLVI VFI PAFWSL KTHPLWRLWKKI WAVSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPS
 TLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTW
 PCSCEDDGYPALDL DAGLEPSPGLEP LLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLDLRLKPPLADGEDWAGGLPWGGR
 SPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVI PPPLSSPGPQAS (SEQ ID
 NO: 4)

核酸序列的同源性可以根据两个核苷酸或氨基酸序列之间的相同程度确定。可以用本领域已知的计算机程序,例如由 GCG 程序包提供的 GAP 软件来确定。参见 Needleman and Wunsch 1970 J Mol Biol 48: 443-453。用如下所设置的 GCG GAP 软件进行核酸序列比较: GAP creation penalty 为 5.0, GAP extension penalty 为 0.3, 根据上述条件相似核酸序列的编码区优选与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 所示的 DNA 序列的 CDS (编码) 部分具有至少 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 或 99% 的相同程度。类似地, 根据上述条件氨基酸序列优选与 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列具有至少 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 或 99% 的相同程度。

术语“序列相同性”指两个多核苷酸或多肽序列在比较的特定区域中碱基对碱基比较的相同程度。术语“序列相同性的百分数”是这样计算的: 将两个在所比较区域上具有最佳排列的序列进行比较, 确定核酸碱基 (例如对于核酸来说是 A, T, C, G, U 或 I) 在两个序列中都相同的位点的数目以得到匹配位点的数目, 用匹配位点的数目除以所比较区域的位点总数 (即窗口大小), 然后将结果乘以 100 得到序列相同性的百分数。这里所说的术语“实质相同”是指多核苷酸序列的一个特征, 其中所述多

核苷酸所含有的序列与参考序列在比较区域上具有至少 80% 的相同性, 优选具有至少 85% 的相同性, 通常是具有 90% 到 95% 的相同性, 更通常是具有至少 98% 或 99% 的相同性。术语“确定残基百分数”是这样计算的: 将两个在所比较区域上具有最佳排列的序列进行比较, 按上述方法确定在两个序列中相同的或是保守性取代的氨基酸的位点的数目以得到匹配位点的数目, 用匹配位点的数目除以所比较区域的位点总数 (即窗口大小), 然后将结果乘以 100 得到确定残基的百分数。

能在细胞或细胞群体中增加 IL-21 或 IL-21 受体水平的试剂还包括 IL-21 激动剂或 IL-21 受体激动剂。这种激动剂可以通过识别能行使一种或多种 IL-21 对 T 辅助细胞群体行使的功能的检测化合物来辨别。

所述患者可以是哺乳动物, 例如人, 非人的灵长类动物, 狗, 猫, 牛, 马, 猪或啮齿动物 (包括大鼠或小鼠)。可以使用任何所希望的 IL-21 的给药方式。合适的方式包括静脉内 (包括丸药和输注), 腹膜内的, 皮下的或肌肉内的方式, 所有使用的方式都是药学领域的普通技术人员所公知的。注射剂可以用传统方法制备, 用溶液或是悬液。

肠胃外的注射给药方式通常用于皮下, 肌肉内或静脉内注射和输注。

IL-21 拮抗剂

为了抑制 IL-21 介导的 T 辅助细胞的效果, 可以向 T 细胞或 T 细胞群体, 例如 T 辅助细胞中加入能阻断或抑制 IL-21 和 IL-21 受体相互作用的试剂。为方便起见, 在本文中这些抑制剂称为“IL-21 拮抗剂”。IL-21 拮抗剂的实例包括, 例如 IL-21 或 IL-21

受体的可溶性片段，含有这些片段的融合蛋白，以及这些片段的抗体。IL-21 拮抗剂可用于在 Th2 介导的疾病，包括抗体介导的疾病中阻断 IL-21。这些疾病包括哮喘，变态反应，风湿性关节炎，多发性硬化，和狼疮。

IL-21 和 IL-21 受体融合蛋白

IL-21，或 IL-21 受体，或者这些蛋白的活性片段，可与载体分子例如免疫球蛋白融合以用于本文所述的方法。例如，IL-21 受体的可溶形式可以通过“连接子”序列与免疫球蛋白的 Fc 部分或免疫球蛋白的 Fc 部分融合。也可以使用其它融合蛋白，例如 GST（即谷胱甘肽 S-转移酶），LexA，或 MBP（即麦芽糖结合蛋白）融合蛋白。

在一个实施方案中，IL-21 或 IL-21 受体融合蛋白可以与一个或多个附加部分相连。例如，IL-21 或 IL-21 受体融合蛋白可以另外与 GST 融合蛋白相连，其中 IL-21 受体融合蛋白序列与 GST 序列的 C 末端融合。这种融合蛋白可以使 IL-21 或 IL-21 受体融合蛋白的纯化更为方便。

在另一个实施方案中，所述融合蛋白包括一个 N 末端的异源信号序列（即不存在于天然的由 IL-21 或 IL-21 受体核酸编码的多肽中的多肽序列）。例如，可以除去天然的 IL-21 或 IL-21 受体信号序列或者用另一种蛋白的信号序列取代。

本发明的嵌合或融合蛋白可以用标准重组 DNA 技术制备。例如，根据传统技术将编码不同多肽序列的 DNA 片段连接在一起，所述传统技术例如使用平末端或交错末端连接，用限制性酶消化提供合适的末端，添加合适的粘性末端，用碱性磷酸酶处理以避免不希望的连接，以及用酶连接。在另一个实施方案中，融

合基因可以用传统方法例如自动 DNA 合成仪来合成。另外，也可以用锚定引物进行基因片段的 PCR 扩增，锚定引物可以在两个连续基因片段之间产生互补的突出端，可以随后进行退火和再扩增得到嵌合基因序列（参见，例如，Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992）。而且，许多编码融合部分（例如免疫球蛋白重链的 Fc 区域）的表达载体都是商业可获得的。IL-21 或 IL-21 受体编码核酸可以克隆到这种表达载体中，使得融合部分与免疫球蛋白按符合读框的方式连接。

在一些实施方案中，所述 IL-21 或 IL-21 受体多肽分子是在天然的 IL-21 或 IL-21 受体序列(野生型)上具有突变的变体 IL-21 受体多肽，突变导致改变的 IL-21 与 IL-21 受体的结合具有更强的亲和力(相对于非突变的序列)，或者导致改变的 IL-21 受体与 IL-21 的结合具有更强的亲和力(相对于非突变的序列)。

在一些实施方案中，所述 IL-21 或 IL-21 受体多肽分子是在天然的 IL-21 或 IL-21 受体序列(野生型)上具有突变的变体 IL-21 受体多肽，突变导致 IL-21 或 IL-21 受体序列具有更强的抵抗蛋白质水解的能力(与非突变序列相比)。

融合蛋白中可以包含信号肽 MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:5)。如果需要，可以在含有 IL-21 或 IL-21 受体部分的第一种多肽部分和第二种多肽部分之间另外插入一个或多个氨基酸。

第二种多肽优选是可溶的。在一些实施方案中，所述第二种多肽可增加与之连接的多肽的半衰期（例如血清半衰期）。在一些实施方案中，所述第二种多肽包括一种能促进融合蛋白与第二种 IL-21 受体多肽结合的序列。在优选的实施方案中，所述第二种多肽包括至少一个免疫球蛋白多肽的区域。免疫球蛋白融合多

肽是本领域公知的,在例如美国专利序列号 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; 和 5,455,165 中有描述。

在一些实施方案中,所述第二种多肽包括全长免疫球蛋白多肽。另外所述第二种多肽还可以包括小于全长的免疫球蛋白多肽,例如重链,轻链, Fab, Fab₂, Fv, 或 Fc。优选地,所述第二种多肽包括免疫球蛋白多肽的重链。更优选地,所述第二种多肽包括免疫球蛋白多肽的 Fc 区域。

在一些实施方案中,所述第二种多肽的效应子功能比野生型免疫球蛋白重链的 Fc 区域的效应子功能更弱。Fc 效应子功能包括,例如, Fc 受体结合,补体固定和 T 细胞衰竭活性。(参见例如,美国专利序列号 6,136,310)检测 T 细胞衰竭活性, Fc 效应子功能,和抗体稳定性的方法是本领域公知的。在一个实施方案中,所述第二种多肽与 Fc 受体亲和性较低或没有亲和性。在另一个实施方案中,所述第二种多肽与补体蛋白 C1q 亲和性较低或没有亲和性。

优选的第二种多肽序列包括 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列。该序列包括 Fc 区域。具有下划线的氨基酸是与野生型免疫球蛋白序列中相应位点的氨基酸不同的氨基酸:

HTCPPCPAPEALGAPSVFLFPKP~~K~~DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

IL-21 和 IL-21 受体抗体

这里所说的术语“抗体”指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即含有能特异结合(发生免疫反应)抗原的抗原结合位点的分子。这种抗体包括,例如多克隆,单克隆,嵌合,单链, Fab, Fab'和 F(ab')₂ 片段,以及 Fab 表达文库。通

常来自人的抗体分子涉及 IgG, IgM, IgA, IgE 和 IgD 中的任何一类, 它们在分子的重链性质上彼此各不相同。某些类别还具有亚类, 例如 IgG₁, IgG₂ 等。进一步地, 在人中, 轻链可以是κ链或 λ链。这里所说的对抗体的参照包括对所有类, 亚类和所有人抗体类型的参照。IL-21 或 IL-21 受体多肽的抗体还包括含有 IL-21 或 IL-21 受体多肽或 IL-21 或 IL-21 受体多肽的片段的融合蛋白的抗体。

IL-21 多肽或 IL-21 受体多肽, 或其部分或片段可用作抗原, 还可用作免疫原以产生能与抗原免疫特异结合的抗体, 用标准的制备多克隆和单克隆抗体的方法制备。用作免疫原的抗原的抗原肽片段包括, 例如氨基末端区域的氨基酸序列, 例如 SEQ ID NO:1 或 3 所示的氨基酸序列的至少 7 个氨基酸残基, 并包括其表位, 以使所述肽的抗体与全长蛋白或者与任何包含所述表位的片段形成特异的免疫复合体。优选地, 所述抗原肽含有至少 10 个氨基酸残基, 或者至少 15 个氨基酸残基, 或者至少 20 个氨基酸残基, 或者至少 30 个氨基酸残基。优选抗原肽包含的表位是位于蛋白表面的区域, 通常是亲水区域。

在一些实施方案中, 至少一个抗原肽所包含的表位是位于 IL-21 或 IL-21 受体多肽表面的区域, 例如亲水区域。IL-21 或 IL-21 受体多肽的疏水性分析可以表明 IL-21 或 IL-21 受体蛋白的哪个区域是特别亲水的, 从而有可能编码可用于靶定抗体生成的表面残基。作为靶定抗体生成的一种方法, 可用本领域熟知的任何方法绘制可显示亲水和疏水区域的亲水性图, 包括, 例如, the Kyte Doolittle 或是 the Hopp Woods 方法, 可使用傅立叶变换也可以不使用傅立叶变换。参见, 例如 Hopp and Wood (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-142。本发明还提供了与抗原蛋白, 或其衍生物,

或其片段，类似物或同源物的一个或多个区域特异性结合的抗体。

本发明的蛋白，或其衍生物，片段，类似物，同源物或直向同源物均可以用做免疫原来产生可与这些蛋白免疫特异结合的抗体。

可用本领域公知的各种方法产生本发明的蛋白，或其衍生物，片段，类似物，同源物或直向同源物的多克隆或单克隆抗体。参见，例如，ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY。下面将会对其中一些抗体进行讨论。

多克隆抗体

可以使用各种合适的宿主动物（例如兔，羊，鼠或其它哺乳动物），用天然蛋白，其合成变体，或上述物质的衍生物的一种或多种注射剂进行免疫，从而制备多克隆抗体。合适的免疫原性制备物可以含有，例如天然存在的免疫原性蛋白，作为免疫原性蛋白的化学合成的多肽，或者重组表达的免疫原性蛋白。进一步，所述蛋白还可以与已知对被免疫的哺乳动物具有免疫原性的第二种蛋白相连。这种免疫原性蛋白的实例包括但不限于钥孔血蓝素，血清清蛋白，牛甲状腺球蛋白，和大豆胰蛋白酶抑制剂。

所述制备物可以进一步包含佐剂。各种用于增强免疫反应的佐剂包括但不限于弗氏佐剂（完全和不完全的），矿物胶（例如氢氧化铝），表面活性物质（例如溶血卵磷脂，复合多元醇，多聚阴离子，肽，油乳剂，二硝基酚等），可用于人的佐剂例如卡介苗和小棒状杆菌，或类似的免疫刺激试剂。还可以使用的其它

佐剂包括 MPL-TDM 佐剂（单磷酸脂 A，合成海藻糖 dicorynomycolate）。

免疫原性蛋白的多克隆抗体可以从哺乳动物（例如从血液中）中分离，进一步可以用公知的技术纯化，例如用蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析，这一步骤初步提供了免疫血清的 IgG 级分。然后，或者另外，将作为免疫球蛋白靶的特异性抗原，或其表位，固定在层析柱上，通过免疫亲和层析纯化免疫特异的抗体。免疫球蛋白的纯化在例如 Wilkinson (2000) *The Scientist*, 14: 25-28 中有描述。

单克隆抗体

这里所说的术语“单克隆抗体”（Mab）或“单克隆抗体组分”指只含有由单独的轻链基因产物和单独的重链基因产物组成的一种抗体分子的抗体分子群落。特别地，在该群落中的所有分子中的单克隆抗体的互补决定区（CDR）都是相同的。因此 Mab 含有能与抗原的特定表位发生免疫反应的抗原结合位点，并与其具有独特的结合亲和力。

单克隆抗体可以用杂交瘤方法制备，例如 Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256: 495 中所述的。在杂交瘤方法中，小鼠，仓鼠，或其它合适的宿主动物通常用免疫试剂进行免疫，以使淋巴细胞产生或能够产生能与免疫试剂特异性结合的抗体。另外，淋巴细胞也可以在体外免疫。

所述免疫试剂通常可以包括蛋白质抗原，其片段或其融合蛋白。通常，如果需要使用人源细胞可以使用外周血淋巴细胞，如果需要使用非人的哺乳动物来源的细胞可使用脾细胞或淋巴结细胞。淋巴细胞可以用合适的融合试剂，例如聚乙二醇和无限增

殖的细胞系融合，形成杂交瘤细胞。Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, (1986) pp. 59-103。无限增殖细胞系通常是转化的哺乳动物细胞，特别是啮齿动物，牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常使用大鼠或小鼠的骨髓瘤细胞系。可在适当的培养基中培养杂交瘤细胞，培养基优选含有一种或多种能抑制未融合无限增殖细胞的生长或存活的物质。例如，如果母细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（HGPRT 或 HPRT），杂交瘤的培养基可含有次黄嘌呤，氨蝶呤，和胸腺嘧啶核苷（“HAT 培养基”），这些物质可防止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

优选的无限增殖细胞系是那些有效融合的，支持所选择的产生抗体的细胞稳定地表达高水平的抗体的细胞系，并且对培养基例如 HAT 培养基敏感。更优选的无限增殖细胞系是鼠骨髓瘤细胞系，它可以从例如 the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California 和美国典型培养物保藏中心，马纳萨斯，弗吉尼亚获得。人骨髓瘤和鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也可用于产生人单克隆抗体（Kozbor (1984) J. Immunol., 133:3001; Brodeur et al., MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp.51-63）。

然后可以检测培养杂交瘤细胞的培养基是否存在所述抗原的单克隆抗体。优选地，杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀反应，或者通过体外结合检测，例如放射性免疫检测（RIA）或酶联免疫吸附检测（ELISA）进行测定。这些技术和检测方法都是本领域公知的。单克隆抗体的结合亲和力可以，例如通过 Munson and Pollard (1980) Anal.Biochem., 107:220 所述的斯卡查德分析进行测定。优选地分离对靶抗原具有高度特异性和高度结合亲和力的抗体。

在识别了所需的杂交瘤细胞之后，用有限稀释步骤将所述克隆进行亚克隆，并用标准方法培养。用于此目的的合适的培养基包括，例如 Dulbecco Modified Eagle's 培养基和 RPMI-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞也可以在哺乳动物的腹水中进行体内培养。

亚克隆分泌的单克隆抗体可以用传统的免疫球蛋白纯化步骤，例如蛋白 A-琼脂糖凝胶，羟基磷灰石层析，凝胶电泳，透析，或亲和层析从培养基或腹水液中分离或纯化出来。

也可以通过重组 DNA 方法制备单克隆抗体，例如美国专利序列号 4,816,567 中所述的方法。编码本发明的单克隆抗体的 DNA 可以容易地分离出来并用传统方法（例如使用能与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）进行测序。本发明的杂交瘤细胞是这种 DNA 的优选来源。所述 DNA 在分离之后可以置于表达载体之中，然后转染宿主细胞例如猿 COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，或者骨髓瘤细胞等不另外产生免疫球蛋白的细胞，以在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。所述 DNA 也可以通过用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列（美国专利序列号 4,816,567；Morrison (1994) Nature 368, 812-13），或者将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列连接起来，从而进行修饰。这种非免疫球蛋白多肽可以用本发明的抗体的恒定区取代，也可以用本发明的抗体的一个抗原结合位点的可变区取代，生成嵌合二价抗体。

人源化抗体

本发明的蛋白抗原的抗体可以进一步含有人源化抗体或人抗体。这些抗体适用于给人施用，而不会造成人对所施用的免疫球蛋白产生免疫反应。抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白，免疫球蛋白链或其片段（例如 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 或其它抗体

的抗原结合亚序列), 它们基本由人免疫球蛋白组成, 并含有来自于非人免疫球蛋白的基本序列。人源化反应可以根据 Winter 和他的同事的方法 (Jones et al. (1986) Nature, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science, 239:1534-1536) 进行, 用人抗体的相应序列取代啮齿动物的 CDR 序列。(还可参见美国专利序列号 5,225,539)。在一些实施例中, 人免疫球蛋白的 Fv 构架残基被相应的非人残基取代。人源化抗体还可以含有既不存在于受体抗体中, 也不存在于输入 CDR 或构架序列中的残基。通常, 人源化抗体含有所有至少一个, 通常是两个可变区, 其中所有或实际上所有的相应于那些非人免疫球蛋白的 CDR 区域, 以及所有或实际上所有的构架区域都是与人免疫球蛋白相同的序列。人源化抗体最好含有至少一个免疫球蛋白的恒定区 (Fc) 部分, 典型地是人免疫球蛋白的恒定区部分 (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; and Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596)。

人抗体

完全的人抗体涉及的抗体分子其轻链和重链, 包括 CDR 的全部序列都是来自于人基因。这种抗体即是这里所说的术语“人抗体”或“完全人抗体”。人单克隆抗体可以用 trioma 技术; 人 B 细胞杂交瘤技术 (参见 Kozbor, et al. (1983) Immunol Today 4:72) 和 EBV 杂交瘤技术制备, 产生人单克隆抗体 (参见 Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)。人单克隆抗体可以用于本发明, 并且可以用人杂交瘤 (参见 Cote, et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) 或者在体外用 Epstein Barr 病毒转化人 B 细胞 (参见 Cole, et al. (1985) In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R.Liss, Inc., pp. 77-96) 来制备。

此外，人抗体还可以用其它技术，包括噬菌体展示文库来制备。参见 Hoogenboom and Winter (1991) *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581。类似地，人抗体可以通过将人免疫球蛋白基因座引入到转基因动物，例如其内源免疫球蛋白基因部分或全部失活的小鼠中制备。通过激发观察到人抗体的产生，其在所有方面都与在人中非常相似，包括基因重排，装配，以及抗体的所有组成部分。这种方法在例如美国专利序列号 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 以及 Marks et al. (*Bio/Technology* 10, 779-783(1992)); Lonberg et al. (*Nature* 368 856-859 (1994)); Morrison (*Nature* 368, 812-13 (1994)); Fishwild et al., (*Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996)); Neuberger (*Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)); 和 Lonberg and Huszar (*Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995))有描述。

人抗体还可以用转基因的非人动物产生，所述动物经修饰，在受到抗原激发的时候可以产生全长人抗体，而不是动物的内源抗体。参见 PCT 公开号 WO94/02602。在非人的宿主中编码重链和轻链免疫球蛋白的内源基因被失活，编码人重链和轻链免疫球蛋白的活性基因座被插入到宿主基因组中。人基因包含在例如含有所需的人 DNA 片段的酵母人工染色体中。通过将中间的含有少于全部修饰的转基因动物进行杂交育种培育后代得到能提供所有所需修饰的动物。优选的非人动物的实施方案是鼠，称为 XenomouseTM，在 PCT 公开号 WO96/33735 和 WO96/34096 中公开。这种动物产生能分泌全长人免疫球蛋白的 B 细胞。所述抗体可以直接通过将所述动物用所感兴趣的免疫原，例如多克隆抗体的制备物进行免疫之后获得，或者另外可通过来自动物的无限增殖的 B 细胞，例如能产生单克隆抗体的杂交瘤获得。除此之外，编码具有人可变区的免疫球蛋白的基因可回收并表达，以直接得

到抗体，或者可以被进一步修饰，以得到抗体的类似物，例如单链 Fv 分子。

美国专利序列号 5,939,598 公开了一种产生非人宿主的方法，是一种小鼠，不表达内源免疫球蛋白重链。可以通过下述方法获得：包括在胚胎干细胞中的至少一个内源重链基因座上删除 J 区段的基因，以防止该基因座重排，并且防止形成重排免疫球蛋白重链基因座的转录物，通过含有编码选择性标记的基因的靶定载体实现删除；由胚胎干细胞产生转基因小鼠，其体细胞和生殖细胞都含有编码选择性标记的基因。

美国专利序列号 5,916,771 公开了一种产生所感兴趣抗体，例如人抗体的方法。包括将含有一种编码重链的核苷酸序列的表达载体引入培养的哺乳动物宿主细胞，将含有一种编码轻链的核苷酸序列的表达载体引入另一种哺乳动物细胞，将这两种细胞融合形成杂交细胞。杂交细胞表达含有重链和轻链的抗体。

作为对该方法的一个改进，PCT 公开号 WO99/53049 公开了一种识别免疫原上的临床相关表型的方法，以及一种选择能与所述相关表型以高亲和力免疫特异结合的抗体的相关方法。

Fab 片段和单链抗体

根据本发明，可以用许多技术产生对本发明的抗原蛋白特异性的单链抗体（参见，例如美国专利序列号 4,946,778）。此外，可以采用多种方法构建 Fab 表达文库（参见例如，Huse, et al. (1989) Science 246: 1275-1281），使得可以快速有效地识别具有预期的对蛋白或其衍生物，片段，类似物或同源物的特异性的单克隆 Fab 片段。含有蛋白抗原的独特型的抗体片段可以用本领域公知的技术制备，包括但不限于：（i）用胃蛋白酶消化抗体分子得

到 $F(ab')_2$ 片段；(ii) 通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥键得到 Fab 片段；(iii) 用木瓜蛋白酶和还原试剂处理抗体分子得到 Fab 片段，以及 (iv) F_v 片段。

双特异性抗体

双特异性抗体是单克隆，优选是人的或人源化的抗体，与至少两种不同的抗原都具有结合特异性。在本发明中，其中一种结合特异性是针对本发明的抗原蛋白。第二种结合靶是任何其它抗原，较优的是细胞表面蛋白或受体或受体亚基。

制备双特异性抗体的方法是本领域公知的。按传统方法，产生双特异性抗体的重组方法是共表达两种免疫球蛋白的重链/轻链对，其中所述两种重链具有不同的特异性。(Milstein and Cuello (1983) *Nature*, 305:537-539。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交细胞（四杂交细胞）可能产生十种不同的抗体分子的混合物，其中只有一种是正确的双特异性结构。通常是通过亲和层析步骤纯化正确的分子。类似的方法在 WO93/08829，以及 Traunecker et al. (1991) *EMBO J.*, 10: 3655-3659 中有描述。

具有预期的结合特异性的抗体可变区域（抗体-抗原结合位点）可以与免疫球蛋白的恒定区序列融合。这种融合优选是与免疫球蛋白重链恒定区融合，包括至少部分铰链区，CH2，和 CH3 区域。优选在至少一种融合体中具有含有轻链结合所必需位点的第一种重链恒定区（CH1）。编码免疫球蛋白重链融合体的 DNA 和如果需要的话，免疫球蛋白的轻链，可插入到单独的表达载体中，并且共转染合适的宿主生物体。产生双特异性抗体的进一步的详细内容可参见，例如，Suresh et al. (1986) *Methods in Enzymology*, 121:210。

根据 WO96/27011 中所述的另一种方法，可以对一对抗体分子之间的接触面进行改造，使得从重组细胞培养基中回收的杂二聚体的百分比达到最大。优选的接触面至少含有抗体恒定区的一部分 CH3 区域。在此方法中，第一种抗体分子接触面上的一个或多个小氨基酸侧链被大氨基酸侧链（例如酪氨酸或色氨酸）取代。通过将大的氨基酸侧链替换为小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）在第二种抗体分子的接触面上产生与大的侧链尺寸相同或类似的补偿“空洞”。这提供了一种增加杂二聚体产量使之超过其它不希望的终产物例如同型二聚体产量的方法。

双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段（例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体）。文献中已有关于用抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如，可以用化学连接制备双特异性抗体。Brennan et al. (1985) *Science* 229:81 描述了一种方法，其中完整抗体经蛋白水解切割产生 $F(ab')_2$ 片段。这些片段在存在二硫醇络合试剂亚砷酸钠的条件下被还原，以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。所产生的 Fab' 片段然后转化为硫代硝基苯甲酸盐（TNB）衍生物。然后将一种 Fab' -TNB 衍生物用巯基乙胺还原重新转化为 Fab' -硫醇，并与等当量的其它 Fab' -TNB 衍生物混合形成双特异性抗体。所产生的双特异性抗体可用于作用于选择性固定酶的试剂。

除此之外， Fab' 片段可以直接从大肠杆菌中回收，经化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175: 217-225 描述了产生完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。每一个 Fab' 片段都是单独从大肠杆菌中分离出来的，直接在体外进行化学偶联形成双特异性抗体。所形成的双特异性抗体能够结合过表达 ErbB2 受体的细胞和正常的人 T 细胞，还能够引发人细胞毒性淋巴细胞对人乳腺肿瘤靶的溶解反应。

现有技术中已描述了各种直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的方法。例如，可以用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的 Fab' 部分通过基因融合连接起来。抗体同型二聚体在铰链区被还原形成单聚体，然后再次被氧化形成异型二聚体。这种方法也可以用于产生抗体同型二聚体。Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 中描述的“微型双功能抗体”技术提供了另一种制备双特异性抗体片段的方法。所述片段含有一个重链可变区 (V_H)，与一个轻链可变区 (V_L) 通过连接子相连，连接子足够的短使得在同一条链的两个区域之间可以配对。相应地，强制地使一个片段中的 V_H 和 V_L 区域和另一个片段中互补的 V_L 和 V_H 区域配对，从而形成两个抗原结合部位。另一种制备双特异性抗体片段的策略是使用单链 Fv (sFv) 二聚体。参见 Gruber et al. (1994) *J. Immunol.* 152:5368。

还可以制备二价以上的抗体。例如，可以制备三特异性抗体。Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147:60。

典型的双特异性抗体可以与两种不同的表位结合，其中至少一种来源于本发明的蛋白抗原。另外，免疫球蛋白分子的抗-抗原臂与能结合白细胞上的触发分子例如 T 细胞受体分子（例如 CD2，CD3，CD28，或 B7），或 IgG 的 Fc 受体 (Fc R)，例如 Fc RI (CD64)，Fc RII (CD32) 和 Fc RIII (CD16) 的臂组合，以使细胞防御机制集中针对能表达特定抗原的细胞。双特异性抗体还可以用于将细胞毒性试剂指向能表达特定抗原的细胞。这些抗体具有抗原结合臂和能结合细胞毒性试剂或放射性核素螯合剂，例如 EOTUBE，DPTA，DOTA，或 TETA 的臂。另一种所感兴趣

的双特异性抗体可结合本文所述的蛋白抗原，并进一步结合组织因子（TF）。

药物组合物

本文所述的 IL-21 调节剂可以方便地以药物组合物的形式提供。所述组合物优选适用于内服，包括单独的有效量的本发明的药理学活性化合物，或其与一种或多种药学可接受的载体的组合。所述化合物如果有毒性，也是非常低的毒性，因此特别有用。

所述化合物或它们的药学可接受的盐，可以足以产生所希望的变化，即增加或减少 IL-21 水平的量给药，以药物形式使用最适合于此目的。

例如，为了以片剂或胶囊（例如明胶胶囊）的方式进行口服给药，所述活性药物组分可与能口服的，无毒的药学可接受的惰性载体，例如乙醇，甘油，水等结合。而且，如果希望或者必需的时候，可以在组合物中含有合适的粘合剂，润滑剂，崩解剂和着色剂。合适的粘合剂包括淀粉，硅酸镁铝，淀粉糊，明胶，甲基纤维素，羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮，天然糖如葡萄糖或 -乳糖，玉米甜味剂，天然和合成树胶如阿拉伯树胶，黄芪胶或海藻酸钠，聚乙二醇，蜡等等。可在这些剂型中使用的润滑剂包括油酸钠，硬脂酸钠，硬脂酸镁，苯甲酸钠，醋酸钠，氯化钠，二氧化硅，滑石粉，硬脂酸，其镁盐或钙盐和/或聚乙二醇等等。崩解剂包括但不限于淀粉，甲基纤维素，琼脂，膨润土，黄原胶淀粉，琼脂，海藻酸或其钠盐，或泡腾剂混合物等等。稀释剂包括，例如乳糖，右旋糖，蔗糖，甘露醇，山梨醇，纤维素和/或甘氨酸。

可注射用组合物优选是等渗水溶液或是悬液，栓剂较好地是用脂肪乳剂或悬液制备的。所述组合物可以进行灭菌和/或含有佐剂，例如防腐剂，稳定剂，湿润剂或乳化剂，溶液促进剂，调节渗透压的盐和/或缓冲液。此外，还可以含有其它有治疗作用的物质。所述组合物可分别用传统的混合，粒化或涂层方法制备，含有大约 0.1%到 75%，优选大约 1%到 50%的活性成分。

本发明的化合物还可以以口服剂型给药，如定时释放和持续释放的片剂或胶囊，丸剂，粉末，微粒，酏剂，酊剂，悬液，浆液和乳剂。

液体，特别是可注射用的组合物可以，例如通过溶解，分散来制备。活性化合物在药学纯溶剂中溶解或与之混合，所述药学纯溶剂例如水，盐水，右旋糖水溶液，甘油，乙醇等，从而形成可注射用的溶液或悬液。此外，还可以配制在注射之前用于溶解于液体中的固体形式。可注射用的组合物优选是等渗水溶液或悬液，所述组合物可以灭菌和/或含有佐剂，例如防腐剂，稳定剂，湿润剂或乳化剂，溶液促进剂，调节渗透压的盐和/或缓冲液。此外，还可以含有其它有治疗作用的物质。

本发明的化合物可以进行静脉内（丸药或是输注），腹膜内，皮下或肌肉内形式的给药，所有使用的形式都是药学领域的普通技术人员熟知的。注射剂可用传统方法制备，制成溶液或悬液。

肠胃外注射给药通常用于皮下，肌肉内或静脉内注射或输注。此外，还有一种肠胃外给药的方式是植入缓释或持续释放的系统，这可以确保维持恒定的剂量水平，如美国专利序列号 3,710,795 所述，在此引入该文献作为参考。

进一步，优选本发明的化合物可以通过局部使用合适的鼻内载体进行鼻内给药，或者通过经皮方式，使用本领域普通技术人员公知的经皮的皮肤贴剂。当以经皮递送系统的方式给药的时候，在整个给药方案中，给药剂量是连续的而不是断续的。其它优选的局部制剂包括霜剂，软膏，乳液，气溶胶喷雾和凝胶，其中活性成分的浓度为 0.1%到 15%，w/w 或 w/v。

对于固体组合物，可以使用包括药物等级的甘露醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，滑石粉，纤维素，葡萄糖，蔗糖，碳酸钠等在内的赋形剂。上述定义的活性化合物也可以用例如，聚亚烷基二醇，例如丙二醇作为载体配制成栓剂。在一些实施方案中，栓剂较好地是用脂肪乳剂或悬液配制的。

本发明的化合物还可以以脂质体递送系统的方式给药，例如小的单层载体，大的单层载体和多层载体。脂质体可以用各种磷脂制备，包括胆固醇，十八胺或磷脂酰胆碱。在一些实施方案中，将一薄层脂质与药物水溶液化合形成封装药物的脂质层，如美国专利序列号 5,262,564 所述。

本发明的化合物还可以用化合物分子与之偶联的作为单个载体的单克隆抗体递送。本发明的化合物还可以与作为靶定药物载体的可溶性聚合物偶联。这种聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮，吡喃共聚物，聚羧丙基-甲基丙烯酰胺-苯酚，聚羧乙基天冬酰胺苯酚，或者被棕榈酰残基取代的聚环氧乙烷聚赖氨酸。进一步，本发明的化合物还可以和一类可用于实现药物控释的生物可降解的聚合物偶联，所述生物可降解的聚合物例如聚乳酸，聚 ϵ -己内酯，聚羧基丁酸，聚原酸酯，聚缩醛，聚二氢吡喃，聚氰基丙烯酸酯和交联或水凝胶的两性阻断共聚物。

本发明的核酸分子可以插入到载体中用做基因治疗载体。基因治疗载体可以通过例如静脉内注射，局部给药（参见，例如，美国专利序列号 5,328,470）或者定向注射（参见，例如，Chen, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057）递送给患者。基因治疗载体的药物制剂可以在可接受的稀释剂中含有基因治疗载体，或者可以含有基因递送载体嵌入在其中的缓慢释放的基质。另外，如果重组细胞能够完整产生全部的基因递送载体，例如逆转录病毒载体，那么所述药物制剂可以包括能产生基因递送系统的一种或多种细胞。

如果需要，进行给药的所述药物组合物还可以含有少量的非毒性辅助物质，例如湿润剂或乳化剂，pH 缓冲液，以及其它物质例如乙酸钠，油酸三乙醇胺等。

所述化合物的给药方案是根据各种因素选择的，所述因素包括患者的类型，种属，年龄，体重，性别和医疗条件；所治疗疾病的严重程度；给药的方式；患者的肾功能和肝功能；所使用的特定化合物或其盐。普通医师和兽医可以很容易地确定并开出预防，治疗或延缓疾病发展所需要的药物的有效量。

当用于达到给定效果时，本发明的内服量在口服大约 0.05 到 1000mg/天。所述组合物优选是含有 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 和 1000.0mg 活性成分的带刻痕片剂。本发明的化合物的有效血浆水平是每天每公斤体重从 0.002mg 到 50mg。

本发明的化合物可以是每天单次给药，或者是将每天的总剂量分为两次，三次或四次给药。

任何上述药物组合物都可以含有 0.1-99%，优选 1-70%的 IL-21，IL-21 受体，IL-21 激动剂，或 IL-21 拮抗剂。

如果需要，所述药物组合物可以和佐剂一起使用。佐剂如上所述。在一些实施方案中，佐剂可以用于增加免疫反应，这取决于宿主的种属，佐剂包括弗氏佐剂（完全和不完全的），矿物胶例如氢氧化铝，表面活性物质例如溶血卵磷脂，Pluronic 多聚醇，聚阴离子，肽，油乳剂，钥孔血蓝素，二硝基酚，和可能有用的人佐剂例如 BCG（卡介苗）和小棒状杆菌。通常，给动物注射抗原是分几次连续注射，优选包括至少三次加强注射。

本发明将进一步在下面的非限制性实施例中进行举例说明。实施例 1-8 是用下述材料进行的。

实施例

小鼠

除非另外指出，在所有实验中都是用 6-8 周龄的 C57BL/6 小鼠。在 C57BL/6 缺陷背景上产生 Stat6 缺陷型小鼠的方法参见 Kaplan, M.H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996。

淋巴细胞的制备和培养

淋巴细胞在如文献所述（Kaplan, M.H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996）的加入添加剂的 RPMI 1640 中培养。用抗-CD4 和抗 CD26L 进行细胞分选，从淋巴结和脾中纯化初始 Thp 细胞（Pharmingen; BD Life Sciences, San Diego, CA）至 95-98%纯。

抗体和细胞因子

T-bet 特异的抗血清根据文献制备 (Szabo, S.J. et al., Cell 100: 655-69, 2000)。Stat4, Stat1, 和肌动蛋白特异的抗体得自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。磷酸化 Stat4 特异的抗体得自 Zymed (South San Francisco, CA)。Th 分化培养物中所使用的抗-CD3, 抗-CD28, IL-4, 和 IFN γ 得自 Pharmingen。重组 IL-4 得自 Preprotech。重组 IL-2 是由 Chiron (Emeryville, CA) 提供的。重组 IL-12 是由 Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ) 提供的。制备在 COS 上清中表达的鼠 IL-21 并浓缩。1 单位活性定义为诱导 IL-21R 转染的 BAF3 细胞最大增殖的 50%所需要的上清浓度。假转染的 COS 上清与 IL-21 转染的上清同时制备并浓缩, 作为对照。

体外 T 辅助细胞的分化

在存在 10ng/ml IL-4, 10 μ g/ml 抗 IFN γ (Th2 条件) 或 1ng/ml IL-12, 10 μ g/ml 抗 IL-4 (Th1 条件) 的条件下, 将初始 T 细胞置于涂覆有抗-CD3, 抗-CD28 (1mg/ml) 的盘上, 浓度为 1-2 X 10⁶/ml。三天后细胞在 IL-2 (100U/ml) 中扩增。培养一周后, 用 PMA/吸湿霉素刺激细胞, 产生的细胞因子用文献所述的 (Bird, J.J. et al., Immunity 9: 229-37, 1998) 胞内细胞因子染色法测定。

RNA 分析

用 Rneasy (Qiagen; Valencia, CA) 提取总 RNA。将 RNA 在 1.5% 琼脂糖/6% 甲醛凝胶上分离并转至 GeneScreen 膜 (New England Nuclear) 上进行 northern 分析。该膜与放射性标记的 IL-21, IL-4, IFN γ , γ -肌动蛋白的 cDNA 探针杂交。将 1 μ g RNA 用寡聚(dT)引发, 用 Superscript (Invitrogen Life Technologies;

Carlsbad, CA) 将其转化为 cDNA, 然后进行 RealTime PCR。用 25ng cDNA 作为 PCR 反应的模板, 用 SYBR Green 2X 或 TaqMan 2X PCT 混合液 (Applied Biosystems; Foster City, CA) 并在 ABI Prism 7700 序列监测仪 (Applied Biosystems) 上分析, 引物如下:

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

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

IL-21 TaqMan 探针: 5'ttcccgaggactgaggagacgcc-3' (SEQ ID NO:9)

IL-12Rg2 正向: 5'tttccatttttgcacatcaagttctc3' (SEQ ID NO:10)

IL-12Rg2 反向: 5'ccgatctagagtcagccgct3' (SEQ ID NO:11)

Stat4 正向: 5'aaacctgagcccaacgacaa3' (SEQ ID NO:12)

Stat4 反向: 5'agtgtccgtttgcaccgtc3' (SEQ ID NO:13)

IL-4, IFN γ , 和 GAPDH 的引物和 TaqMan 探针在文献中已经公开 (Overbergh, L., et al., Cytokine 11: 305-12 1999)。

免疫杂交分析

在 50mM Tris, 0.5% NP40, 5mM EDTA, 50mM NaCl 中溶解细胞, 通过离心除去溶解产物中的杂质, 得到全细胞提取物。在 8-10%聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白质提取物, 然后将其转至 Optitran 膜 (Schleicher and Schuell; Keene, NH) 上。在室温在含有 5%牛奶的 TBST(50mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 0.03%Tween 20) 中进行免疫杂交一小时, 然后与给定抗体在 4 摄氏度培育过

夜。用 TBST 洗脱杂交膜，然后与抗-兔 HRP-结合抗体（Zymed）在室温培育。用 TBST 洗脱杂交膜后，用增强的化学发光（Amersham; Piscataway, NJ）进行检测，根据制造商的说明书操作。

实施例 1. 在体外 IL-21 优先在被诱导向着 Th2 途径发育的 Th 细胞中表达

测定了 IL-21 在 Th 亚群中的表达。对分化为 Th1 或 Th2 细胞一周的初始 Thp（Th 前体）细胞进行 Northern 分析，并重新刺激 4 小时以诱导细胞因子产生，结果如图 1A-1D 所示。在图 1A 所示的结果中，Thp 细胞在 Th1 和 Th2 偏移条件培养 6 天。使细胞保持静止（-）或用 PMA/吸湿霉素（P+I）再刺激 4 小时。纯化 RNA，用 Northern blot 检测细胞因子的表达。所示结果代表了三次独立实验的结果。仅在刺激的 Th2 细胞中发现了编码 IL-21 的信息，相反在 Th1 培养物中没有发现 IL-21 的信息。这些结果说明 IL-21 是 Th2 特异的细胞因子。

为了确定当细胞沿着 Th2 途径发育的时候表达 IL-21 的能力是否增加，将初次刺激的 Thp 细胞中的 IL-21 表达与二次刺激的 Th2 细胞中的 IL-21 信息表达进行比较。结果如图 1B 所示。在所示的结果中，Thp 细胞在中性，Th1 和 Th2 偏移的条件下培养。在进行初次和二次抗-CD3 刺激之后 24 小时纯化 RNA。用 RealTime PCR 一式两份地检测细胞因子的表达，并表示为相对于 GAPDH 的值。观察到在初次刺激之后在 Thp 细胞中 IL-21 的信息，与 IL-4 同样，都是相对较低。相反，在细胞沿着 Th2 途径分化以后 IL-21 的表达显著增加。这些结果证明 IL-21 基因表达的调节类似于其它 Th2 特异性细胞因子。

测定了分化细胞中细胞因子环境对于 IL-21 表达的影响。在第二次刺激之前, Th1 和 Th2 细胞分别在存在 IL-4 和 IFN γ 的条件下培养。IL-4 和 IFN γ 对 Stat6 和 Stat1 的激活证明了细胞对于这些细胞因子具有反应性。

测定了 IL-4 恢复 IL-21 表达的能力。结果如图 1C 所示。细胞在 Th1 和 Th2 偏移条件下培养 5 天。在用抗-CD3 进行二次刺激前 24 小时将 IL-4 或 IFN γ 加入到所述培养物中。进行二次刺激后 24 小时纯化 RNA, 用 RealTime PCR 一式两份地相对于 GAPDH 测定 IL-21 的表达。向 Th1 细胞中加入 IL-4 不能将 IL-21 的表达恢复到 Th2 细胞中的水平。而且, 向 Th2 培养物中加入 IFN γ 对 IL-21 的表达没有抑制作用。这些结果证明 Th2 细胞中 IL-21 的表达是在 Th2 分化的早期阶段, 而且不直接被 IL-4 或 IFN γ 调节。

实施例 2. Th2 细胞在体内 Th2 免疫反应过程中表达 IL-21

在致病原生动物模型系统中测定体内免疫反应过程中 Th2 细胞的 IL-21 表达。用原生动物硕大利什曼原虫感染提供了一种已进行了详细表征的模型用以研究 Th 细胞的体内反应(Reiner, S.L., et al., Annu Rev Immunol 13: 151-77, 1995)。一些近亲交配的鼠种, 如 C57BL/6, 用硕大利什曼原虫感染会产生对于病原体的保护性的和有效的 Th1 反应。相反的, 其它一些近亲交配的鼠种, 例如 BALB 鼠种, 首先产生 Th2 反应, 并且不能清除感染。

将 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠都用硕大利什曼原虫感染。8 个 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠在后脚垫上感染了硕大利什曼原虫。6 周后, 从引流淋巴结中纯化 CD4⁺ T 细胞, 用抗-CD3 刺激。刺激 6 小时后纯化 RNA, 用 RealTime PCR 测定相对于 GAPDH 的细胞因子表达。

结果如图 1D 所示。正如所料, C57BL/6 感染小鼠的 CD4+ 细胞比 BALB/c 感染小鼠表达更多的 IFN γ 。与主要的 Th2 反应相同, 感染的 BALB/c 小鼠的 CD4+ T 细胞产生的 IL-4 比 C57BL/6 小鼠的 T 细胞显著地多。与体外 Th2 偏移条件下观察到的现象类似, 在 BALB/c 小鼠中 IL-21 也优先在体内 Th2 反应的过程中表达。这些结果, 与体外实验结果 (实施例 1) 一起证明了 IL-21 是一种 Th2 细胞因子。

实施例 3. IL-21 在发育的 Th 细胞中特异地抑制 IFN γ 的产生。

由于 IL-21 在 Th 细胞中的表达模式和结构都与 IL-4 类似, 因此测定了 IL-21 是否与 IL-4 同样地具有影响 Th 分化的能力。

为了测定 IL-21 对于 Thp 分化的影响, Thp 细胞在中性, Th1 和 Th2 偏移条件下培养。

纯化的初始 Thp 细胞在中性, Th1 和 Th2 偏移条件下, 在存在和不存在 IL-21 的条件下接触抗原。培养一周以后用胞内细胞因子染色测定这些细胞产生细胞因子的能力。

结果如图 2A 和图 2B 所示。在图 2A 所示的结果中, 在存在 IL-21 或假上清的条件下将细胞培养一周。用 PMA/吸湿霉素再刺激 4 小时后用胞内细胞因子染色测定细胞因子的产生。结果代表了至少十次实验的结果。

与 IL-4 相同, 将 IL-21 加入到中性和 Th1 培养物中导致产生 IFN γ 的细胞的数目显著减少 (图 2A, 中性和 Th1 条件)。Th1 培养物中产生 IFN 的细胞的数目的减少通过 ELISPOT 分析证实。但是, 与 IL-4 不同, IL-21 自身不能够增强产生 IL-4 的 Th2 细胞

的产生（图 2A，中性条件）。在 Th2 偏移条件下，IL-21 处理对于产生 IL-4 的细胞的产生没有刺激或抑制作用（图 2A，Th2）。

测定了 IL-21 影响新刺激的 Thp 细胞产生 IFN γ 的能力。在存在和不存在 IL-21 的条件下，在中性和 Th1 条件下培养初始 Thp 细胞 48 小时。用 ELISA 检测所得到的培养物上清中产生的 IFN γ 。发现 IL-21 减少了分化培养物早期产生的 IFN 的量（图 2B）。因此在 Th 引发过程中存在 IL-21 会影响分化的 Th1 细胞和效应子细胞产生 IFN γ 的能力。

实施例 4. IL-21 不直接抑制 Th1 效应子细胞产生 IFN

为了测定 IL-21 是否直接抑制 IL-21 的产生，或者影响 IFN γ 细胞的分化，在 Th1 偏移条件下培养初始 Thp 细胞。在培养开始的时候（第 0 天）或再刺激和分析前 24 小时（第 5 天）加入 IL-21 或假上清。用胞内细胞因子染色测定细胞因子的产生。结果如图 3A 所示。

与第 0 天加入 IL-21 观察到的现象不同，在分化期末期向 Th1 培养物中加入 IL-21 对 IFN γ 没有影响，虽然 Th1 细胞表达 IL-21R 并且对 IL-21 具有反应性。这个发现证明了 IL-21 可破坏 Thp 细胞分化为产生 IFN γ 的 Th1 细胞的能力，但是不直接抑制 Th1 效应子细胞产生 IFN γ 。

实施例 5. IL-21 对 IFN γ 的抑制和 Stat6 无关

IL-4 抑制 Th1 细胞分化的能力依赖于 Stat6 的表达（Kaplan, M.H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996, Takeda, K. et al., Nature 380: 627-30 1996, and Shimoda, K. et al., Nature 380: 630-3, 1996）。

为了测定 IL-21 介导的对 IFN γ 产生的抑制是否依赖于 Stat6。测定了 IL-21 在缺乏 Stat6 的细胞中影响 Th1 分化的能力。在 Th1 偏移条件下,在存在 IL-21 或假上清的条件下,将从野生型或 Stat6 缺陷型小鼠中纯化的 Thp 细胞培养一周。用胞内细胞因子染色测定细胞因子的产生。

结果如图 3B 所示。在缺乏 Stat6 的情况下,IL-21 与存在 Stat6 的情况下同样能有效防止产生 IFN γ 的细胞的产生。因此,与 IL-4 不同,IL-21 不依赖于 Stat6 信号传导就可以防止产生能产生 IFN γ 的 Th1 细胞。此外,这些结果还证明了 IL-21 诱导的 IFN γ 的抑制不直接通过 IL-4 的作用介导。

实施例 6. IL-21 不抑制其它 Th1 细胞因子

为了确定 IL-21 除了抑制 IFN γ 的产生之外是否影响 Th1 的发育,测定了 IL-21 处理的 Th1 细胞产生其它 Th1 相关细胞因子的能力。

在 Th1 偏移条件下,在存在 IL-21 或假上清的条件下培养 Thp 细胞,然后在二次刺激之后用胞内细胞因子染色测定细胞因子的产生。

结果如图 3C 所示。令人惊讶的是,虽然当引发条件中含有 IL-21 的时候,产生 IFN γ 的细胞的数目显著减少,但是相同细胞群体具有正常数目的 IL-2 和 TNF α 产生细胞。这些结果证明虽然 IL-21 有效抑制了 Th1 细胞产生 IFN γ 的能力,但相同细胞保留了产生 Th1 细胞的能力,而并不是默认产生 Th2 细胞因子。

实施例 7. T-bet 表达不受 IL-21 的影响

T-bet 是最近识别的一种转录因子，在分化的 Th1 细胞中特异表达，也能有效诱导 IFN γ 。为了确定 IL-21 对分化的 Th1 细胞的处理是否影响 Th 细胞中 T-bet 表达的诱导，在 Th1 或 Th2 偏移条件下培养 Thp 细胞。在初始阶段（初始）和培养 48 小时后（Th1 和 Th2）收集蛋白质提取物。用 Western blot 测定 T-bet 和肌动蛋白的表达。

结果如图 4A 所示。在所述的培养物中含有 IL-21 或假上清。正如所料，T-bet 表达在 Th1 培养物中被诱导，而在 Th2 条件下仍然很低。加入 IL-21 对于 T-bet 在 Th1 细胞中的表达没有影响。这个结果表明 IL-21 介导的 IFN γ 表达并不是 T-bet 表达减少的结果。

实施例 8. IL-21 抑制了 IL-12 的信号传导

据报道，IL-12 信号传导在 Th1 细胞的发育中具有重要的作用。缺少 IL-12R 的 Th 细胞其产生 IFN 的能力受到严重破坏 (Wu, C., et al., J Immunol 159: 1658-65, 1997)。此外，在发育的 Th2 细胞中特异地不表达 IL-12R β 2 链，这是 IL-4 介导的作用 (Szabo, S.J., et al., J Exp Med 185: 817-24, 1997)。为了确定 IL-21 是否像 IL-4 一样影响 IL-12 β 2 链在 Th1 细胞中的表达，用 RealTime PCR 分析在 Th1 和 Th2 偏移条件下存在和不存在 IL-21 的条件下培养的初始 Thp 细胞的 RNA 中 IL-12R β 2 的表达。Thp 细胞在 Th1 或 Th2 偏移条件下培养一周。在所述培养物中含有 IL-21 或假上清。用抗-CD3 进行二次刺激后 24 小时收集 RNA，然后用 RealTime PCR 分析 IL-12R β 2 的表达。

结果如图 4B 所示。该结果代表了三个独立实验的结果。正如所料, 在 Th1 细胞中 IL-12R β 2 的表达与 Th2 细胞相比较高。但是, 在 Th1 培养物中加入 IL-21 不影响 IL-12R β 2 的表达。因此, 与 IL-4 报道的结果不同, IL-21 不会引起 IL-12R β 2 表达量的减少。而且, 高的 IL-12R β 2 表达伴随着高的 TNF α 和 IL-2 水平, 表明 IL-21 处理的 Th1 细胞保持着许多 Th1 的特征, 除了 IFN γ 产生的减少。

Stat4 特别地可被 IL-12 激活, 据报道它是能产生 IFN γ 的 Th1 细胞产生的重要的调节剂 (Wurster, A.L., et al., Oncogene 19: 2577-84, 2000)。为了确定 IL-21 是否影响 IL-12 激活 STAT-4 的能力, 在存在或不存在 IL-21 的条件下将初始 Thp 细胞激活 48 小时。然后用 IL-12 刺激细胞, 用 western blot 分析测定 Stat4 磷酸化的程度。在存在 IL-21 或假上清的条件下用抗-CD3 刺激 Thp 细胞 48 小时。用 western blot 测定蛋白质提取物中的磷酸化 Stat4 (p-Stat4), Stat4 和 Stat1。结果代表了四次独立的实验结果。

结果如图 4C 所示。虽然 IL-21 处理的细胞可表达正常水平的 IL-12R β 2, 但是在 IL-21 处理的细胞中响应 IL-12 刺激的 Stat4 磷酸化减少。磷酸化 Stat4 水平的减少还反映在总 Stat4 蛋白水平的降低上。比较而言, Stat1 蛋白并不受 IL-21 处理的影响。

还检测了 Stat4 RNA 的水平。如图 4C 所示培养 Thp 细胞, 然后收集 RNA, 用 RealTime PCR 一式两份地测定 Stat4 的表达。

结果如图 4D 所示。结果代表了三次独立实验的结果。检测到较低水平的 Stat4 RNA。IL-21 诱导的 Stat4 蛋白水平的降低可能是由于 Stat4 mRNA 的减少。这个发现表明 IL-21 通过减少 Stat4 基因表达阻碍了发育的 Th1 细胞对 IL-12 的反应性。

实施例 9. 在体内限制 Th1 反应需要 IL-21 信号传导

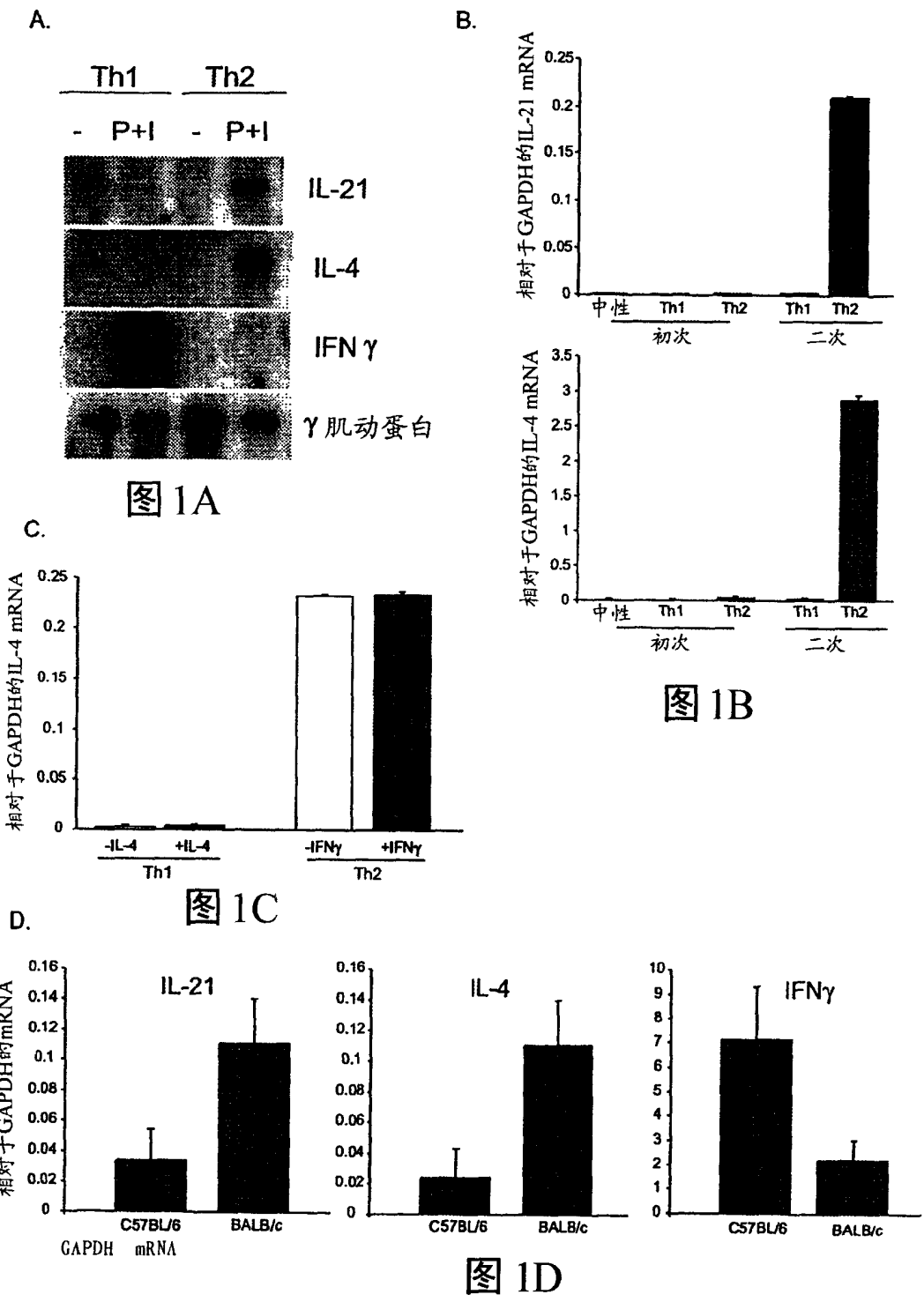
为了确定内源产生的 IL-21 在体内是否对限制 Th1 细胞功能起作用,在 IL-21R 缺陷型的小鼠中测定了迟发型超敏反应(DTH)的程度。DTH 是一种典型的 Th1 细胞介导的炎症反应。制备在 C57BL/6 背景上逆代杂交的 IL-21R 缺陷型小鼠,如 Kasian et al., Immunity 16: 559-60, 2002 所述。八周龄的雄性小鼠用在 DFA 中乳化的 100mg TNP-KLH (2,4,6-三硝基苯基-钥孔血蓝素; Biosearch Technologies, Novato, CA) 在尾根处经皮下免疫。六天后小鼠用 50mg TNP-KLH 在一个后脚垫上进行激发,用 PBS 在对侧的后脚垫上进行激发。激发后 24 小时测量脚垫厚度。

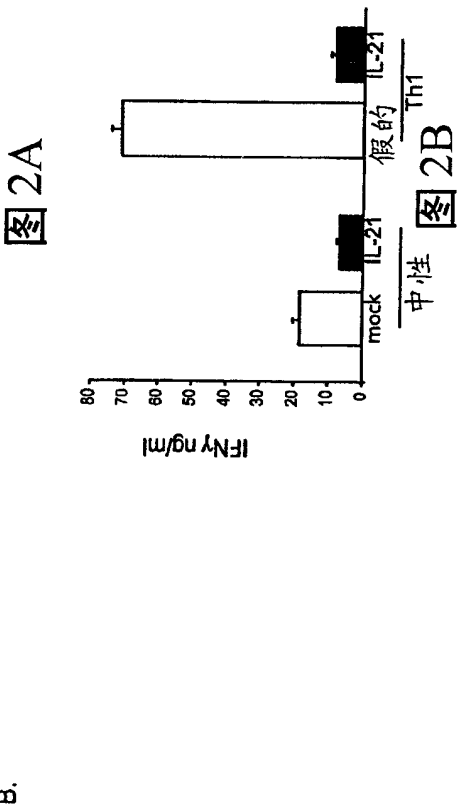
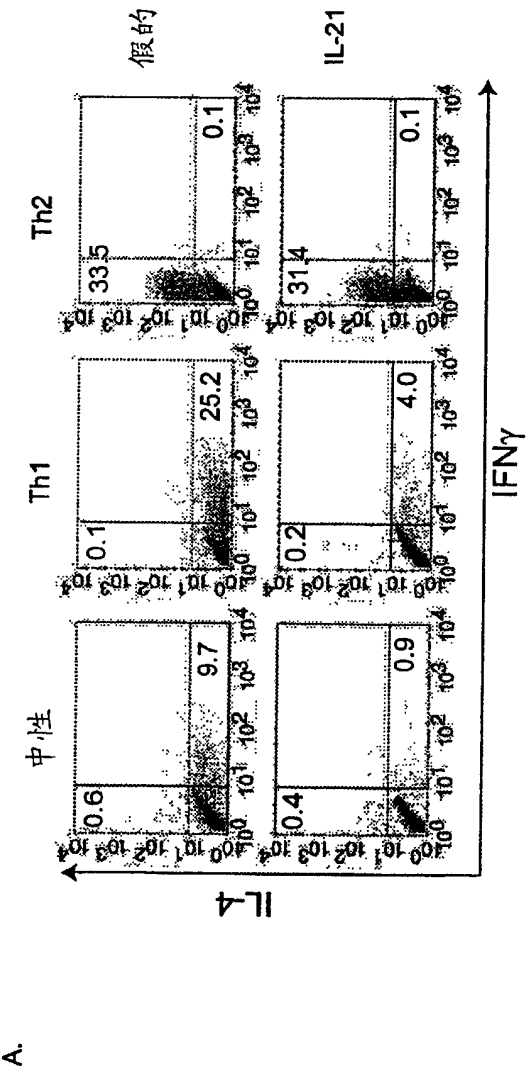
结果如图 5A 所示。从 TNP-KLH 诱导的胀大中减去 PBS 注射的脚垫的非特异性胀大得到野生型和 IL-21R 缺陷型 (IL-21R^{-/-}) 小鼠的特异性脚垫胀大。每个数据点都代表一只小鼠。水平线代表平均值。结果是两次独立实验的合并结果。结果证明野生型动物对抗原激发表现更强的脚垫胀大。令人惊讶地是, IL-21R 缺陷型小鼠具有更强的 DTH 反应, 导致两次胀大的平均。

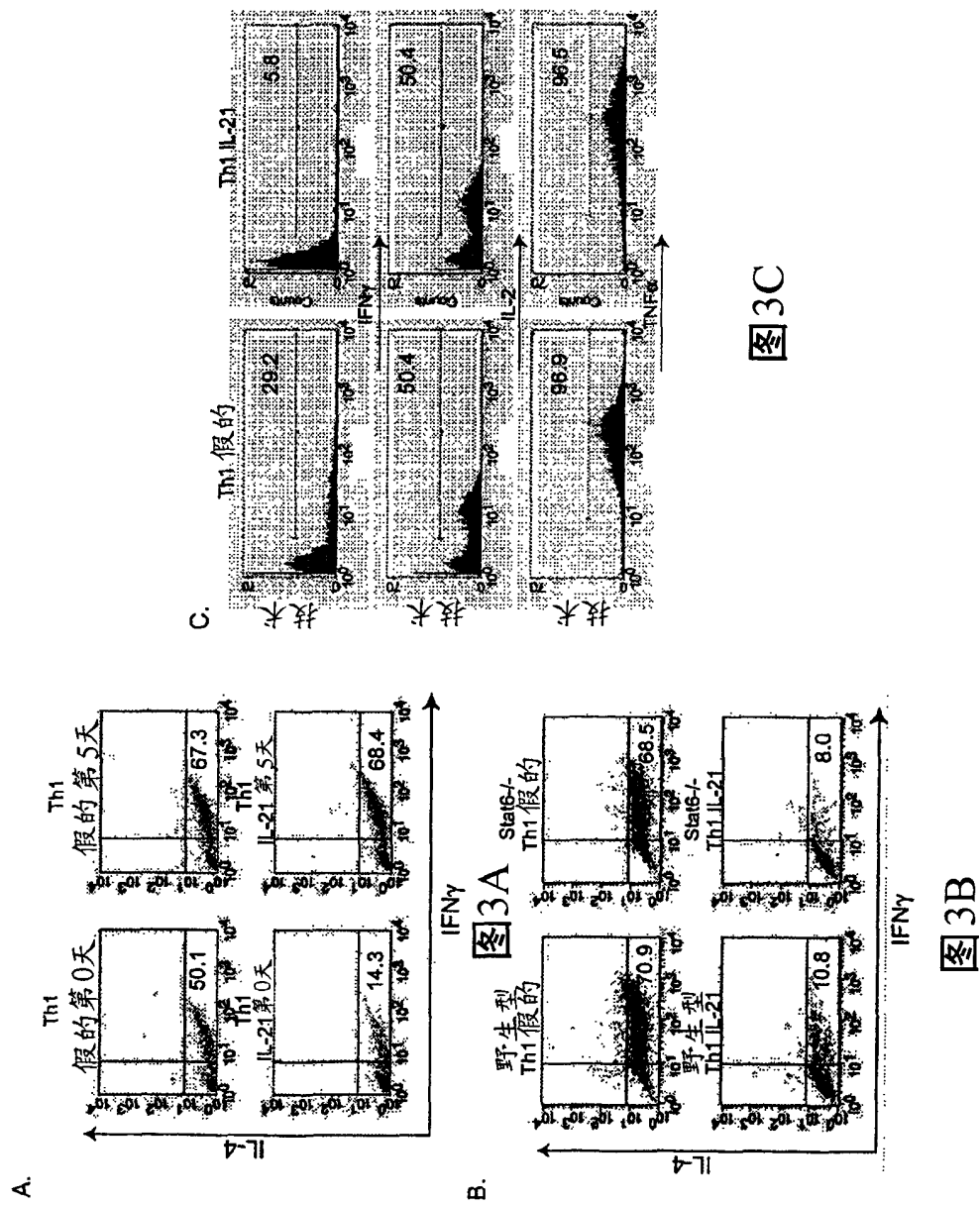
还检测了免疫小鼠中 IFN γ 的产生。结果如图 5B 所示。从免疫小鼠的引流淋巴结中纯化的 CD4⁺ T 细胞在体外用 250mg/ml TNP-KLH 刺激。用 ELISA 分析上清中 IFN 的水平。显示的结果是一式两份的每个基因型的两个小鼠的数据的平均值。在 IL-21R 缺陷型动物中 DTH 反应的增加与引流淋巴结中纯化的并且在体外被抗原再刺激的 CD4⁺ T 细胞的 IFN γ 产生的显著增加有关。

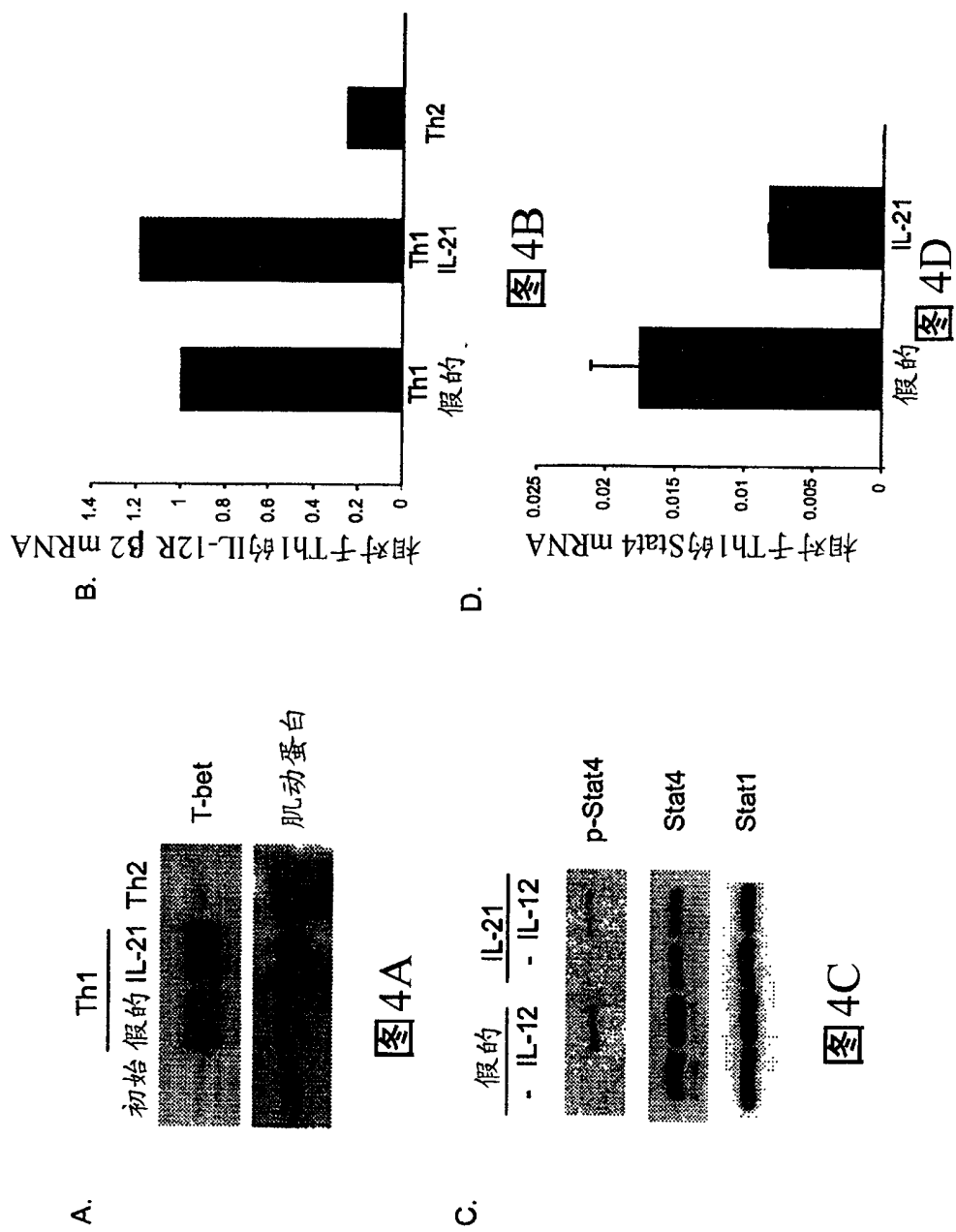
这些结果证明 IL-21 与限制 TH1 细胞反应有关,其是通过抑制 IFN γ 的产生。

其它实施方案都在权利要求范围之内。









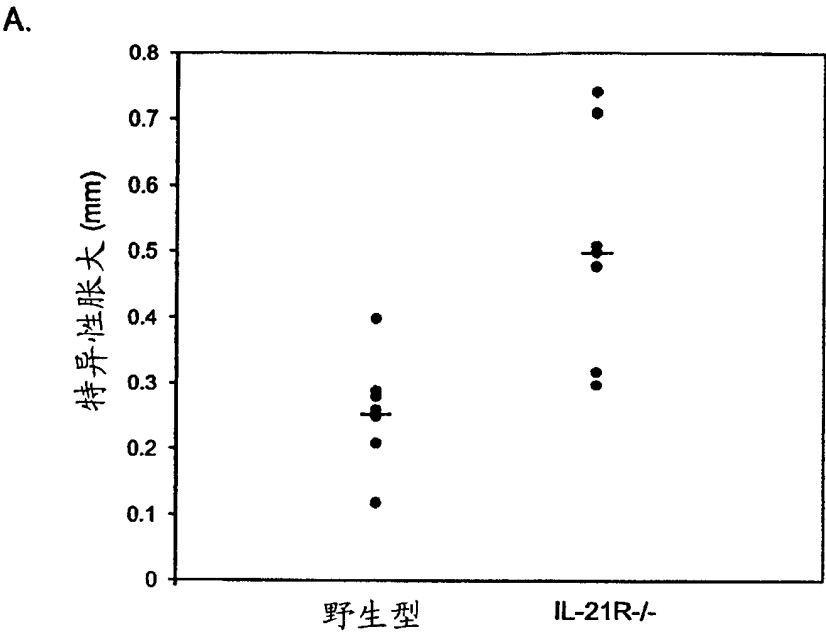


图 5A

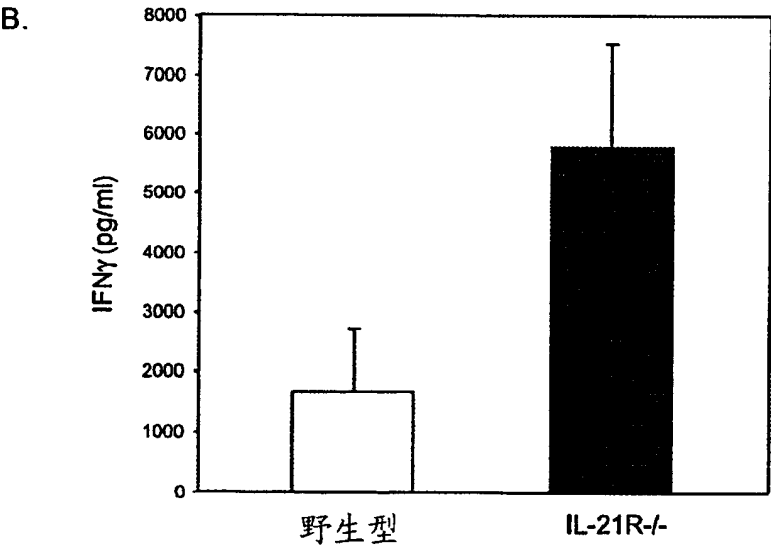


图 5B