



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 728**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06792239 .3**

96 Fecha de presentación : **22.09.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1937838**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **Métodos de utilización de IL-21.**

30 Prioridad: **22.09.2005 US 719388 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2011

73 Titular/es: **INSERM (Institut National de la Santé et
de la Recherche Médicale)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es: **Yssel, Hans;
Gugliemi, Laurence y
Pene, Jérôme**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 360 728 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de utilización de IL-21

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] IL-21 es una citoquina derivada de células T y se ha observado que es un potente modulador de células T citotóxicas y células NK. (Parrish-Novak, et al. Nature 408:57-63, 2000; Parrish-Novak, et al., J. Leuk. Bio. 72:856-863, 2002; Collins et al., Immunol. Res. 28:131-140, 2003; Brady, et al. J. Immunol. 172(4):2048-58, 2004.) se ha observado que IL-21 coestimula la expansión de células NK y se ha demostrado que aumenta las funciones efectoras de estas células. Entre las respuestas de células T se incluyen el aumento de la respuesta de antígenos primarios como modulación de las funciones de células T de memoria (Kasaian et al., Immunity 16:559-569, 2002.) Se ha observado que IL-21, en combinación con IL-15, inducen la expresión de células NK y células T de los genes del *interferón γ* (IFN γ), *T-bet*, *IL-2R α* , *IL-12R β* , *IL-18R* y *MyD88* (Strengell et al., J. Immunol. 169:3600-3605, 2002). Se ha identificado el IFN γ como un importante regulador de respuestas inmunes innatas y adaptativas, induciendo respuestas inmunes de Th1 mediante la activación de células NK, células T y macrófagos (Farrar et al., Annu. Rev. Immunol. 11 :571-611, 1993).

[0002] La IgE juega un papel importante en la patogénesis de trastornos alérgicos, tales como asma alérgica, rinitis alérgica y dermatitis atópica, que es debido a su capacidad de unirse a IgER de alta afinidad, FcR ϵ 1, en mastocitos y basófilos, desencadenando así reacciones de hipersensibilidad inmediata que finalmente dan lugar a la liberación de mediadores farmacológicos, incluyendo histamina, leucotrienos, citoquinas y quimioquinas. Además, después de su interacción CD23, la IgE facilita la captura y captación de alérgenos por células B, conduciendo a la perpetuación y empeoramiento de las condiciones alérgicas, caracterizado y acompañado por un aumento de las concentraciones de IgE en suero (Geha, et al Nat. Rev. Immunol. 3:721, 2003). Los niveles de IgE en suero también son elevados en enfermedades parasitarias, en las que juega un papel en mecanismos de defensa inmune del huésped, así como en algunos trastornos genéticos raros del sistema inmune, incluyendo el Síndrome de Wiskott Aldrich (Derry, et al. Cell 78:635, 1994), síndrome de hiper IgE (Buckley, R. H. Clin. Rev. Allergy Immunol. 20:139, 2001) y síndrome de disfunción inmune, poliendocrinopatía y enteropatía unido a X (IPEX) (Bennett, et al. Immunogenetics 53:435, 2001). Sin embargo, bajo condiciones no patológicas, los niveles de IgE en suero son mucho más inferiores que los de otros isotipos, indicando que la síntesis de IgE está estrechamente regulada para evitar reacciones inmunes alérgicas.

[0003] Los mecanismos moleculares que subyacen la producción de IgE son similares a los de otros isotipos y están controlados por señales específicas de citoquinas, así como el miembro CD40 de la superfamilia de TNFR (Banchereau, et al. Annu. Rev. Immunol. 12:881, 1994). El cambio de isotipo a IgE implica un proceso de dos etapas de escisión de ADN y unión, seguido de una recombinación por cambio de clase (CSR) delecional (Manis, et al. Trends Immunol. 23:31, 2002.). La CRS da lugar a la deleción de ADN entre regiones de cambio (S) que se localizan en dirección 5' de cada gen de región constante (C) de la cadena pesada de Ig, excepto para δ . Un prerrequisito para CSR en la producción de IgE es la activación del promotor del exón I ϵ , localizado inmediatamente en dirección 5' de la región S ϵ , que conduce a la transcripción de un gen ϵ de la línea germinal no ordenado. Dado que la magnitud de la transcripción de la línea germinal ϵ está relacionada cuantitativamente con la eficacia de la CSR (Manis, ibid.), su modulación afecta directamente a la capacidad de las células B de producir IgE (Gauchat, et al. Int. Immunol. 4:397, 1992). Las citoquinas IL-4 e IL-13 son potentes inductores de la transcripción en la línea germinal C ϵ en células B humanas (Gauchat, et al. J. Exp. Med. 172:463, 1990; Punnonen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3730, 1993), que funcionan a través de la activación de STAT6 (Nelms, et al., Annu. Rev. Immunol. 17:701, 1999).

[0004] Recientemente, se ha descrito la asociación entre un polimorfismo de nucleótido único (T-83C) en el IL-21R y en presencia de niveles de IgE elevados en suero (Hecker, et al., Genes Immun. 4 (3):228-233, 2003), sugiriendo que la IL-21 presenta una función en la producción de este isotipo en humanos. Los efectos terapéuticos de IL-21 se están evaluando como un tratamiento para el cáncer y otras enfermedades. Por lo tanto, es útil entender cómo los polimorfismos en el receptor de IL-21 realizan las actividades biológicas asociadas con la administración de IL-21. La presente invención da a conocer métodos para predecir y evaluar la respuesta del paciente a IL-21 en base al genotipo de receptores de IL-21. Este uso, así como otros usos, deberían ser evidentes para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente invención.

[0005] J. Immunology Vol. 171 (2), 15 July 2003, páginas 608-615, describe que IL-21 activa la inmunidad tanto innata como adaptativa para generar potentes respuestas antitumorales que requieren perforina, pero son independientes de IFN-gamma.

- [0006] Rev. Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, Vol. 45(3), Abril 2005, páginas 215-217, revisa los polimorfismos genéticos y alergias.
- 5 [0007] Genes and Immunity Vol. 4(3), Abril 2003, páginas 228-233, describe una variación genética del receptor de interleuquina-21 humana asociada con niveles elevados de IgE en hembras.
- [0008] J. Immunology, Vol. 170, 2003, páginas 5464-5469 describe que IL-21 en sinergia con IL-15 o IL-18 aumenta la producción de IFN- γ en células NK y T humanas.
- 10 [0009] El documento WO 2004/032953 describe el tratamiento de condiciones alérgicas mediante la utilización de IL-21.
- [0010] La presente invención proporciona un método *in vitro* de predicción de una respuesta terapéutica diferencial a IL-21 en un individuo para un trastorno relacionado con IgE, que comprende detectar, en una muestra biológica del paciente, un alelo variante individual del gen del receptor de IL-21 del individuo, donde la variante alélica es una variante T-83C.
- 15 [0011] La presente invención también proporciona un método *in vitro* de seleccionar una pauta terapéutica diferencial de IL-21 que comprende: detectar, en una muestra biológica de un individuo, un alelo variante individual del gen del receptor de IL-21 de un individuo, donde la variante es una variante T-83C; y determinar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21; donde se incrementa la dosis de IL-21 en relación con la dosis administrada a individuos que son homocigóticos para el gen del receptor de IL-21 de tipo salvaje.
- 20 [0012] En una realización, la dosis terapéuticamente eficaz es una dosis inmunológica óptima.
- [0013] Entre las realizaciones adicionales se incluyen el uso de una dosis terapéuticamente eficaz. Realizaciones adicionales incluyen donde el genotipo del gen del receptor de IL-21 del individuo
- 25 [0014] Figuras 1A y 1B – La adición de IL-4 a células periféricas CD19+ inducía la producción de IgE.
- 35 [0015] Figura 1C- IL-21 aumentó la producción de IgE inducida por IL-4 en células B intactas CD19+CD27-.
- [0016] Figura 2A- La estimulación de células B purificadas con la combinación de mAb anti-CD40 y IL-4 dio lugar a una fuerte inducción de la transcripción de la línea germinal C ϵ .
- 40 [0017] Figura 2B-IL-21 no afectada a la transcripción de la línea germinal C ϵ inducida por IL-4 en células B derivadas de bazo o sangre periférica humana.
- [0018] Figura 3A-IL-21 inhibía la producción de IgE en cultivos de PBMC a una concentración tan baja como 3 ng/ml en diez de 16 donantes sanos analizados.
- 45 [0019] Figura 3B- En cinco donantes, los efectos inhibidores de IL-21 en la síntesis de IgE sólo se detectaron a una concentración \geq 30 ng/ml, mientras que IL-21 aumentó la producción de IgE inducida por IL-4 entre 1-10 ng/ml.
- 50 [0020] Figuras 4A y 4B- En cultivos de PBMC estimulados con IL-4 e IL-21, los niveles de producción de IgE inducidos por IL-4 se correlacionaban de manera inversa con IFN- γ en grupos sensibles de donantes.
- 55 [0021] Figuras 4C y 4D- En cultivos de PBMC estimulados con IL-4 e IL-21, los niveles de producción de IgE inducidos por IL-4 se correlacionaban de manera inversa con IFN- γ en grupos sensibles de donantes.
- 60 [0022] Figuras 4E y 4F- La adición de IL-21 a cultivos de PBMC estimulados con IL-4 en presencia de un mAb anti-CD40 dio lugar a un fuerte aumento de la producción de IgE.
- [0023] Figura 5- La adición del anticuerpo anti-R1 de IFN- γ o anticuerpo de control de isotipo emparejado no relevante al inicio de los cultivos solos no afectaba a la inhibición mediada por IL-21 de la producción de IgE.
- 65

[0024] Figura 6A- Los niveles de producción de IgE inducida por IL-4 *in vitro* no diferenciaba significativamente entre donantes sanos y alérgicos.

5 [0025] Figura 6B- Los efectos moduladores inducidos por IL-21 sobre la producción de IgE inducida por IL-4 no diferenciaba entre donantes sanos y alérgicos.

[0026] Figura 7A- Ambos donantes que eran homocigóticos o heterocigóticos para el alelo de IL-21R de tipo salvaje mostraban una síntesis *in vitro* diferencial de IgE inducida por IL-4.

10

[0027] Figura 7B- La síntesis diferencial de IgE inducida por IL-4 mediada por IL-21 se observó para donantes que eran homocigóticos y heterocigóticos para el alelo de tipo salvaje de IL-21R.

[0028] Figura 7C-IL-21 inducía niveles más elevados de la producción de IFN- γ por PBMC de individuos de tipo salvaje en comparación con los de la variante polimórfica de IL-21R.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0029] Antes de explicar la invención en detalle, puede ser de ayuda para el entendimiento de la misma definir los siguientes términos:

20

[0030] El término "variante alélica" se utiliza aquí para indica cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélicas surge de forma natural mediante una mutación y puede dar lugar a un polimorfismo fenotípico en poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se utiliza aquí para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

25

[0031] Los términos "amino terminal" y "carboxi terminal" se utilizan aquí para indicar posiciones en los polipéptidos. Cuando el contexto lo permita, estos términos se utilizan en referencia a una secuencia particular o una parte de un polipéptido para indicar la proximidad o posición relativa. Por ejemplo, cierta secuencia localizada carboxi terminal con respecto a una secuencia de referencia en un polipéptido se localiza próxima al carboxi terminal de la secuencia de referencia, pero no necesariamente en el carboxi terminal del polipéptido completo.

35

[0032] El término "cáncer" o "célula cancerosa" se utiliza aquí para indicar un tejido o célula hallados en un neoplasma que posee características que lo diferencian de tejido normal o células de tejido normal. Ente dichas características se incluyen, pero sin limitación: el grado de anaplasia, irregularidad en la forma, falta de definición de los bordes de las células, tamaño nuclear, cambios en la estructura del núcleo o citoplasma, otros cambios fenotípicos, presencia de proteínas celulares indicativas de un estado canceroso o precanceroso, aumento del número de mitosis y capacidad de metástasis. Entre las palabras relacionadas con "cáncer" se incluyen carcinoma, sarcoma, tumor, epiteloma, leucemia, linfoma, pólipo, y escirro, transformación, neoplasma y similares.

40

[0033] El término "coadministración" se utiliza aquí para indicar que un polipéptido o proteína IL-21 y por lo menos otro agente terapéutico se pueden administrar simultáneamente o en tiempos diferentes en un ciclo de tratamiento. La coadministración puede ser una coadministración única de IL-21 y el otro agente terapéutico o múltiples ciclos de coadministración, donde IL-21 y el otro agente terapéutico se administran ambos, por lo menos una vez, en un periodo de tres meses. La coadministración no necesita realizarse únicamente las veces en que IL-21 y/o el otro agente terapéutico se administran a un paciente y el agente se puede administrar solo o en combinación con agentes terapéuticos diferentes de IL-21.

50

[0034] El término "terapia de combinación" se utiliza aquí para indicar que un sujeto se administra por lo menos una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21 ("IL-21") y por lo menos un agente terapéutico adicional. La composición de IL-21 puede ser un polipéptido maduro, un fragmento del mismo, fusión o conjugado que demuestre la actividad biológica de IL-21.

55

[0035] El término "genotipo" se refiere a la composición alélica específica de una célula completa o un cierto gen, mientras que el término "genotipo" se refiere a la aparición u otras manifestaciones externas de un genotipo específico.

60

[0036] El término "haplotipo" indica una secuencia de nucleótidos hallada en uno o más sitios polimórficos en un locus en un único cromosoma de un único individuo. El haplotipo puede ser una

secuencia de nucleótidos hallada en todos o un subgrupo de sitios polimórficos en un locus en un único cromosoma de un único individuo, dando lugar a un “haplotipo completo” o un “haplotipo parcial”.

5 [0037] El término “heterocigótico” se refiere a individuos que portan dos variantes alélicas en un sitio polimórfico específico. El término “homocigótico” se refiere a individuos que portan dos copias del mismo alelo y puede incluir el alelo de tipo salvaje o variantes alélicas.

10 [0038] El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha extraído de su medio genético natural y, por tanto, está libre de otras secuencias codificantes externas o no deseadas y está en un forma adecuada para la utilización en sistemas de producción de proteínas modificadas genéticamente. Dichas moléculas aisladas son aquellas que se separan de su medio natural e incluyen ADNc, clones genómicos y amplicones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los que normalmente están asociadas, pero pueden incluir regiones 5' y 3' no traducidas naturales, tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Dynan and Tijan, Nature 316: 774-78, 1985).

20 [0039] Un polipéptido o proteína “aislada” es un polipéptido o proteína que se halla en una condición diferente de su medio nativo, tal como separados de sangre y tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir con más de un 95% de pureza, más preferiblemente, más de un 99% de pureza. Cuando se utiliza en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glicosiladas o derivadas.

25 [0040] El término “nivel” cuando se refiere a células inmunes, tales como células NK, células T, en particular células T citotóxicas, células B y similares, un nivel elevado es un mayor número de células o una mayor actividad de la función celular.

30 [0041] El término “nivel” cuando se refiere a infecciones virales se refiere a un cambio en el nivel de infección viral e incluye, pero sin limitación, un cambio en el nivel de células CTL o NK (tal como se ha descrito anteriormente), una disminución en la carga viral, un incremento en la titulación de anticuerpos antivirales, una disminución en los niveles serológicos de alanina aminotransferasa o mejora determinada mediante examen histológico de un tejido u órgano diana. La determinación de si estos cambios en el nivel son diferencias o cambios significativos se encuentra en el conocimiento de un técnico en la materia.

40 [0042] El término “neoplásico”, cuando se refiere a células, indica células que experimentan una proliferación nueva y anormal, particularmente en un tejido en el que la proliferación no está controlada y es progresiva, dando lugar a un neoplasma. Las células neoplásicas pueden ser malignas, es decir invasivas y metastásicas, o benignas.

45 [0043] El término “respuesta inmunológica óptima” se refiere a un cambio en la respuesta inmunológica después de la administración de IL-21 y puede ser (1) un incremento en el número de células T CD8 activadas o específicas de tumor, (2) un incremento en el número de células T CD8 activadas o específicas de tumor que expresan niveles más elevados de granzima B o perforina o IFN γ , (3) favorecimiento de la expresión del receptor de Fc γ (CD16, CD32, o CD64) en células NK, monocitos, o neutrófilos, (4) un incremento en CD25 soluble en el suero, (5) reducción en el nivel de proteínas en el suero liberadas por células tumorales (véase, Taro et al., J. Cell Physiol. 203 (1):1-5, 2005), por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), IgG, CA-19-9 o antígeno de cáncer de ovario (CA125), (6) un incremento en el número de células NK que expresan niveles más elevados de granzima B, perforina o IFN γ , (7) incremento en los niveles de citoquinas de activación, tales como IL-18, IL-15, IFN γ y quimioquinas que permiten la conducción de células efectoras al tumor, tales como IP-10, RANTES, IL-8, MIP1a o MIP1b, (8) un incremento en el número de macrófagos activados en la periferia o en el sitio tumoral, donde se puede detectar la activación mediante la expresión aumentada de MHC de clase I o clase II, producción de IL-15, IL-18, IFN γ , o IL-21, o (9) actividad de macrófagos indicada por la disminución en el número de glóbulos rojos (gravedad de la anemia). La dosis de IL-21 que produce la respuesta inmunológica óptima es la “dosis inmunológica óptima”.

60 [0044] El término “polimorfismo” se refiere a la coexistencia de por lo menos dos secuencias alternativas en un gen o parte del mismo. La diferencia en las secuencias puede ser un único nucleótido y puede comprender sustituciones, inserciones o deleciones, y puede dar lugar o no a diferencias detectables en la expresión génica o la función de la proteína.

65

[0045] El término “receptor” indica una proteína asociada a proteína que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando en la célula. Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura de múltiples péptidos que comprende un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular efector que está habitualmente implicado en la transducción de señal. La unión de ligando a receptor da lugar a un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y la otra u otras moléculas en la célula. Esta interacción a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los sucesos metabólicos que están unidos a interacciones receptor-ligando incluyen la transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos y la inducción de la proliferación, diferenciación o apoptosis. En general, los receptores pueden estar unidos a membrana, citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimulante de la tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6).

[0046] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad de una composición de IL-21 o composición de IL-21 en combinación con composiciones terapéuticas adicionales que da lugar a una respuesta completa, respuesta parcial o enfermedad estable con un aumento del tiempo de progresión sobre la duración de respuesta promedio para la terapia sin IL-21.

[0047] El término “antígeno asociado a tumor” se refiere a un péptido o polipéptido o complejo peptídico que tiene un perfil de expresión diferente del antígeno hallado en células no tumorales. Por ejemplo, un antígeno no tumoral se puede expresar con una mayor frecuencia o densidad por células tumorales que por células tumorales. Un antígeno tumoral puede diferir de un antígeno no tumoral estructuralmente, por ejemplo, el antígeno se podría expresar como un polipéptido truncado, presentar alguna mutación en la secuencia de aminoácidos o la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno, estar mal plegado o modificado incorrectamente después de la traducción. Los antígenos tumorales son similares a los antígenos que están presentes en células normales no tumorales en el organismo huésped y, de este modo, permiten que las células tumorales escapen de los mecanismos de vigilancia inmunológica de los huéspedes.

[0048] El término “tipo salvaje” indica un alelo que actúa normalmente y representa un tipo común hallado en poblaciones naturales en una frecuencia de por lo menos un uno por ciento.

[0049] Los pesos moleculares y longitudes de los polímeros determinados mediante métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) se entenderán que son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como “aproximadamente” X o “alrededor de X”, el valor indicado de X se entenderá que es exacto en $\pm 10\%$.

[0050] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que un polimorfismo en el receptor de IL-21 (IL-21R) está asociado con una inducción de IL-21 reducida del interferón γ (IFN- γ).

A. Descripción de IL-21.

[0051] La IL-21 humana se describe en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6.307.024, y 6.686.178 del mismo solicitante, WO 04/055168 y Parrish-Novak et al. Nature 408:57-63, 2000). El receptor de IL-21 se describe en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6.576.744 y 6.803.451 del mismo solicitante y la Patente de Estados Unidos No. 6.057.198. Tal como se describe en estas publicaciones, la secuencia del ADNc de IL-21 humana contiene un marco de lectura abierto que codifica un precursor de polipéptido de 162 aminoácidos. El polipéptido maduro presenta un peso molecular predicho de 15 Kd y consiste en un dominio de citoquina de un haz de 4 hélices de 131 aminoácidos con la mayor homología de secuencia y estructural con IL-15 e IL-2. La IL-21 es producida por células T activadas CD4+ y estimula las células efectoras inmunes. Se ha observado que IL-21 regula la activación y expansión de células B, células T y células NK. Se ha observado que IL-21 presenta una potente actividad antitumoral in vivo (Wang et al., Cancer Res. 63:9016-9022, 2003 y Brady et al., J. Immunol. 172:2048-2058, 2004.)

B. Polimorfismos del receptor de IL-21.

[0052] El IL-21R pertenece a la subfamilia de receptores de citoquina de Clase I que incluye, pero sin limitación, los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF y G-CSF (para una revisión, véase, Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" in Cytokine 5(2): 95-106, 1993). Se ha identificado el receptor de IL-21 en células NK, células T y células B, indicando que IL-21 actúa en células de linaje hematopoyético. Otras citoquinas conocidas con haces de 4 hélices que actúan en

células linfoides incluyen IL-2, IL-4, IL-7, e IL-15. Para una revisión de las citoquinas de haces de 4 hélices, véase Nicola et al., *Advances in Protein Chemistry* 52:1-65, 1999 y Kelso, A., *Immunol. Cell Biol.* 76:300-317, 1998.

- 5 [0053] El gen *IL21R* se localiza en el cromosoma humano 16p11, cerca de *IL4RA*. La comparación de nuestra secuencia de ADNc de *IL21-R* con la secuencia genómica (AC002303) reveló que el gen se organiza en 9 exones, que abarcan aproximadamente 20 kilobases (kb) de ADN genómico y se encuentra 65 kb desde el gen de *IL4RA*. La secuenciación de 12 Mb de la región cromosómica que contiene el gen *IL21R* reveló la presencia de múltiples copias de segmentos amplios duplicados que se originan en otras regiones del genoma (Loftus et al., *Genomics* 60:295-308, 1999). Los segmentos duplicados, o duplicones, están intercalados a lo largo de las regiones pericentroméricas de varios cromosomas, y pueden predisponer sus regiones diana a duplicaciones o deleciones adicionales (Eichler et al., *Genome Res.* 8:758-762, 1998). La región 16p11 parece ser una de las más propensas a acumular estos segmentos duplicados, ya que más de la mitad de los segmentos identificados están representados por lo menos una vez (Eichler *ibid.*). No está claro si estas repeticiones median en las anomalías cromosómicas que alteran el locus de *IL21R*.

- [0054] Los métodos de la presente invención se basan en el descubrimiento de que se observó que los individuos que responden con una sensibilidad diferencial con respecto a los efectos moduladores de IL-21 en la inducción de IFN- γ estaban asociados con la presencia de por lo menos un polimorfismo en el gen que codifica el IL-21R. En una realización, el polimorfismo es la consecuencia de una sustitución de nucleótido en la región flanqueante 5' del exón 1B (Heckler et al., *Genes Immun.* 4(3):228-233, 2003). Se observó que la presencia de la variante T-83C estaba asociada con mayores niveles en suero de IgE en individuos sanos, y en mayor grado en individuos (Heckler *ibid.*). Tal como se describe aquí, las células T o NK de individuos que portan un alelo de esta variante del gen *IL-21R* producen menos IFN- γ después de la estimulación con IL-21, en comparación con los de individuos que portan el gen de tipo salvaje. Por consiguiente, las células B de individuos con el alelo variante requieren mayores cantidades de IL-21 para conseguir un grado comparable de inhibición mediada por IFN- γ de la producción de IgE. Además, los niveles de producción de IgE, a concentraciones inferiores de IL-21, parecen ser más destacados en el grupo de variantes del gen *IL-21R*. Por lo tanto, es posible que debido a sus fuertes efectos inductores del crecimiento en células B asociadas con Ig (Parrish-Novak et al. *Nature* 408:57-63, 2000), la IL-21 también afecte diferencialmente en la proliferación de células B en relación con el polimorfismo de su receptor expresado en células. Sin embargo, la interacción entre el IL-21R e IL-21 en células B que expresan el IL-21R variante es objeto de una investigación posterior.

- [0055] En ambos grupos de donantes, la producción de IgE aumentada por IL-21 estaba en las concentraciones más bajas utilizadas, y en cambio, parece que concentraciones relativamente superiores de IL-21 son necesarias para estimular la producción de IFN- γ por células T o NK. Aunque no pretende unirse a ninguna teoría, una explicación para este hallazgo es que los niveles del IL-21R difieren entre los linajes celulares en que se expresa. Soporte para esta idea proviene de un estudio reciente en el ratón en que se observó que los niveles de expresión del IL-21R son sistemáticamente superiores en células B activadas, en comparación con células T y NK activadas (Jin, et al. *J Immunol* 173:657-665. 2004.) Así mismo, la disminución en la producción mediada por IL-21 de IFN- γ de individuos que portan la variante T-83C del IL-21R también podría ser debida a niveles de expresión inferiores de este receptor por células T o NK en comparación con individuos homocigóticos para el gen *IL-21R* de tipo salvaje. La disminución en la producción inducida por IL-21 de IFN- γ de individuos que portan la variante T-83C del IL-21R puede ser debida a niveles de expresión alterados de este receptor por las células T o NK en comparación con individuos homocigóticos para el gen *IL-21R* de tipo salvaje. Alternativamente, la presencia del alelo T-83C puede dar lugar a la expresión de un receptor con una afinidad inferior para su ligando.

- [0056] Se pueden identificar individuos con uno o dos alelos de IL-21R variantes (Heckler et al., *ibid.*, 2003). Se ha descrito que individuos homocigóticos para el gen de variante T-83C presentaban niveles más elevados en suero de IgE en comparación con individuos heterocigóticos, sugiriendo un efecto dosis del gen. La asociación descrita anteriormente entre la variación genética del IL-21R y la presencia de niveles de IgE elevados en suero sólo se daba en hembras (Heckler et al., *ibid.*), aunque, un posible efecto modulador de IL-21 limitado al género en la síntesis de IgE no está apoyado por el descubrimiento descrito en la presente invención.

60 C. Genotipo del receptor de IL-21 y terapia de IL-21

- [0057] Está bien establecido que se observa heterogeneidad en la eficacia y toxicidad de fármacos en las poblaciones de pacientes. Está aceptado en general que las diferencias genéticas impactan en el resultado del tratamiento en pacientes, incluyendo la variación genética en genes que codifican dianas

- para fármacos, tales como receptores (Evans, W.E and Relling, M.V., Science 286:487-491, 1999; Evans, W. E y McLeod, H.L., N. Engl. J. of Med. 348:538-549, 2003). La terapia habitual basada en la identificación de un alelo particular en un individuo es conocido como farmacogenómica. La información obtenida utilizando ensayos de diagnóstico conocidos que identifican variantes del receptor de IL-21 puede guiar a un médico en la recomendación de una pauta terapéutica para el tratamiento de enfermedades sensibles a IL-21, tales como el cáncer, la infección y trastornos autoinmunes.
- 5
- 10 **[0058]** En un aspecto, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico para predecir la respuesta terapéutica a IL-21 en un individuo con necesidad de terapia con IL-21. En particular, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico para un paciente que contempla el uso de IL-21 como tratamiento inmunoterapéutico para el cáncer, infección o trastornos autoinmunes. El método comprende obtener una muestra biológica del paciente y detectar el genotipo de un gen del receptor de IL-21 de un individuo. En base a la presente invención, la detección del genotipo del receptor de IL-21 se correlacionará con una dosis inmunológica óptima de una composición de IL-21 que conduce a un resultado terapéutico positivo. Los métodos de determinación del genotipo del receptor de IL-21 de un individuo o polimorfismo comprenden cribar una muestra biológica, tal como una muestra de células o tejido adecuada aislada del individuo. En ciertas realizaciones de la presente invención, el genotipo del gen del receptor de IL-21 del individuo comprende una variante alélica. En una realización, el genotipo del gen del receptor de IL-21 del individuo comprende dos variantes alélicas. Otra realización de la presente invención proporciona métodos para predecir la respuesta terapéutica en los que un haplotipo de IL-21 se relaciona con la variante alélica T-83C. En otra realización, la variante alélica será la variación alélica T-83C.
- 15
- 20
- 25 **[0059]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar una pauta terapéutica para la utilización de IL-21. En ciertas realizaciones, la pauta terapéutica es para la utilización de IL-21 en el tratamiento del cáncer, infección o trastornos autoinmunes en el individuo. La selección de la pauta terapéutica para la utilización de IL-21 comprende obtener una muestra biológica de un individuo; detectar el genotipo del gen del receptor de IL-21 del individuo y determinar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21, donde la dosis de IL-21 difiere de la dosis administrada a individuos que son homocigóticos para el gen del receptor de IL-21 de tipo salvaje. El método comprende además administrar al individuo una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21 que difiere de la dosis administrada a individuos en los que no se ha identificado la variación alélica en el receptor de IL-21. En ciertas realizaciones de la presente invención, el genotipo del gen del receptor de IL-21 del individuo comprende una variante alélica. En otra realización, el genotipo del gen del receptor de IL-21 del individuo comprende dos variantes alélicas. En otra realización, la variante alélica será la variación alélica T-83C.
- 30
- 35
- 40 **[0060]** El resultado terapéutico positivo se puede medir utilizando los protocolos de estado objetivos para valorar la respuesta a un tumor sólido. Entre los criterios representativos se incluyen los siguientes: (1) la Respuesta Completa (CR) definida como la desaparición completa de toda la enfermedad medible y evaluable sin nuevas lesiones y sin síntomas relacionados con la enfermedad. Sin evidencias de enfermedad no evaluable; (2) Respuesta Parcial (PR) definida como un incremento igual o superior a un 30% de la línea base en la suma de los productos de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles, sin progresión de la enfermedad evaluable, sin nuevas lesiones. Según el criterio RESIST, los pacientes con por lo menos una lesión medible; (3) Progresión definida como el 20% o un incremento del 10 cm² en la suma de productos de lesiones medibles sobre la suma más pequeña observada utilizando las mismas técnicas que en la línea base, o el empeoramiento claro de cualquier enfermedad evaluable, o reaparición de cualquier lesión que haya desaparecido o aparición de cualquier nueva lesión, o fallo en volver a evaluar debido a muerte o condición empeorada (a menos que no esté relacionada con este cáncer); (4) Estable o Sin respuesta definida como no calificada por CR, PR o Progresión (Véase, Clinical Research Associates Manual, Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, Oct. 6, 1998, actualizada Agosto 1999).
- 45
- 50
- 55 **[0061]** La detección del genotipo del receptor de IL-21 puede utilizar métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el análisis de células sanguíneas o ADN del individuo para determinar si está presente una mutación en la secuencia de ADN. En ciertas realizaciones, la mutación de T a C en la secuencia de ADN está presente en la posición -83. La posición 1 del receptor de IL-21 humano se define como el primer nucleótido del exón 1b y corresponde a la posición 36058 del clon AC004525 del cromosoma humano 16 BAC (Heckler et al., Genes and Immunity 4:228-233, 2003.) Los individuos heterocigóticos portan una copia del alelo T-83C del receptor de IL-21 y los individuos homocigóticos portan dos copias del alelo T-83C. Ambos individuos heterocigóticos y homocigóticos pueden presentar una capacidad reducida de producir una respuesta terapéutica positiva cuando se administra una dosis de IL-21 utilizada para individuos que no portan una copia del alelo mutado.
- 60
- 65

- [0062]** La presente invención también proporciona un método de predicción de la respuesta terapéutica a IL-21 en un individuo con necesidad de terapia con IL-21 que comprende obtener una muestra biológica del paciente y detectar el genotipo en el que el genotipo del gen del receptor de IL-21 comprende un haplotipo de IL-21. La presente invención proporciona adicionalmente un método de selección de una pauta terapéutica para la utilización de IL-21 que comprende obtener una muestra biológica de un individuo; detectar el genotipo en el que el genotipo del gen del receptor de IL-21 comprende un haplotipo de IL-21; y determinar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21, en el que la dosis de IL-21 difiere de la dosis administrada a los individuos que son homocigóticos para el gen del receptor de IL-21 de tipo salvaje.
- [0063]** Las técnicas de secuenciación son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las variantes alélicas y las mutaciones se pueden secuenciar directamente mediante comparación de una secuencia de la muestra con una secuencia de tipo salvaje correspondiente. Entre las técnicas conocidas se incluyen, pero sin limitación, Maxam y Gilbert (Proc. Natl. Acad. USA 74:560, 1977), Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. USA 74:5463, 1977), Patente de Estados Unidos No. 5.547.835, Patente de Estados Unidos No. 5.605.798, Cohen et al. (Adv. Chromat. 36:127-162, 1996), Griffin et al. (Appl. Biochem. Bio. 38:147-159, 1993), Patente de Estados Unidos No. 5.580.732, Patente de Estados Unidos No. 5.571.676.
- [0064]** Entre los métodos adicionales para el análisis del genotipo se incluyen amplificación en base a PCR de la región seleccionada, en presencia de sondas fluorescentes específicas de alelo; análisis de curvas de fusión de amplicones de PCR en presencia de colorantes fluorescentes intercalantes de ADN o sondas específicas de alelo marcadas; hibridación de ADN amplificado a oligonucleótidos específicos de secuencia o específicos de alelo en micro-arrays de ADN; detección de fragmentos de ADN mediante espectrometría de masas o LC/MS/MS; susceptibilidad alterada a la digestión por enzimas de restricción (polimorfismo de longitud del fragmento de restricción); movilidad alterada del ADN de cadena sencilla en geles de poliacrilamida (polimorfismo conformacional de cadena sencilla); y otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Daly, Ann K. Arch. Pharmacol. 369:133-140, 2004.)
- [0065]** Otro método para detectar el genotipo del receptor de IL-21 utiliza anticuerpos que pueden diferenciar entre formas alélicas del receptor mediante la unión de ciertas formas del receptor con especificidad o determinar los niveles relativos de expresión en células hematopoyéticas. Los glóbulos blancos (WBC) o subgrupos de WBC se aíslan de un individuo utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia. También se pueden llevar a cabo procedimientos de diagnóstico in situ en secciones de tejidos obtenidas de pacientes obtenidas de biopsias o resecciones. La medición de la unión de anticuerpos a células puede utilizar cualquier método conocido, por ejemplo, citometría de flujo cuantitativa, inmunoensayo unido a enzimas o inmunoensayo unido a fluorescencia. Dichas técnicas de medición pueden identificar un fenotipo asociado con la variación alélicas. Este fenotipo puede incluir, pero sin limitación, la conformación de proteína alterada que conduce a distintos epítomos, expresión de proteína alterada o alteraciones en las parejas de unión normales de la proteína receptora de IL-21.

[0066] La invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

45 EJEMPLOS

Ejemplo 1

A. Donantes y células

- [0067]** Se aislaron PBMC humanas de 15 donantes sanos y 17 pacientes atópicos (Service des Maladies Respiratoires, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, Francia) mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). La atopía se definió en base a niveles elevados de IgE específicas de alérgeno en suero, una prueba positiva de pinchazo en la piel y una valoración clínica positiva, como resultado de la exposición a aeroalérgenos habituales. Se obtuvieron células B de bazo CD19+ altamente purificadas (pureza > 98%) (Service de Chirurgie Digestive, CHU St Eloi, Montpellier, Francia) de fragmentos de bazo humano de donantes de órganos sanos mediante la selección positiva utilizando partículas magnéticas recubiertas de mAb específicas (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) y un separador celular magnético preparativo (Miltenyi), según las recomendaciones del fabricante. Las células B CD19+ purificadas (pureza > 98%) también se aislaron de PBMC (Etablissement Français du Sang, Montpellier) utilizando el procedimiento Rosettesep® (StemCell Technologies, Meylan, Francia), según las recomendaciones del fabricante. Se obtuvieron células B intactas después de la tinción de células B CD19+ con un mAb anti-CD27 conjugado a FITC (PharMingen, La Jolla, CA) y la clasificación de células B CD19+, CD27-, utilizando un FACS Vantage® (Becton Dickinson, San Jose, CA), según el procedimiento descrito en la literatura

(Scheffold et al. 2002. Methods in Microbiology Vol 32, ed. S. H. E. Kaufmann, y D. Kabelitz, eds. Academic Press, San Diego, CA. pp707-749). El reanálisis de las células clasificadas mostró una pureza superior al 99%.

5 B. Reactivos y condiciones de cultivo

[0068] La inducción de la producción de Ig se realizó de la siguiente manera: se cultivaron linfocitos B humanos CD19+ intactos o de memoria (10^6 /ml) con 10^6 g/ml de mAb anti-CD40 89 (Valle et al., Eur. J. Immunol. 19:1493, 1989), en presencia o ausencia de combinaciones de (r)IL-4 recombinantes (Schering-Plough, Dardilly, Francia) y rIL-21 (ZymoGenetics, Seattle, WA) en placas de cultivo de 96 pocillos de base plana (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio de Yssel (Yssel et al., J. Immunol. Methods 72:219, 1984), suplementado con FCS al 10% por sextuplicado en un volumen final de 200 μ l. Se cultivaron PBMC (10^6 /ml) con las mismas combinaciones de citoquinas en presencia o ausencia del mAb anti-CD40. Cuando se indicó, se añadieron un anticuerpo policlonal neutralizante anti-receptor 1 de IFN- γ humano de cabra (anti-R1 de IFN- γ) (R&D Systems Europe, Lille, Francia), un mAb de ratón anti-R1 de IFN- γ (Becton Dickinson) o una IgG1 de ratón purificada normal (Southern Technologies, Birmingham, Al) en una concentración de 2 μ g/ml en el inicio de los cultivos y posteriormente en los días 2 y 4, a la misma concentración. Después de 12 días de incubación a 37°C y CO₂ al 5%, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se midió el contenido de IgE. La producción de IFN- γ se determinó en los mismos sobrenadantes de cultivo recogidos en el día 12 en los cultivos paralelos. Para el análisis de los transcritos de IgE, se cultivaron células B CD19+ purificadas bajo las mismas condiciones experimentales y las células se cultivaron para el aislamiento de ARNm después de 5 días de cultivo.

25 C. Medición de IgE y producción de IFN- γ

[0069] Se determinó el contenido de IgE e IFN- γ de los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA específica de isotipo y citoquina, respectivamente, tal como se describe en Lecart et al. (Int. Immunol. 14:1351, 2002) y Lecart et al. (J. Invest. Dermatol. 117:318, 2001).

30

[0070] Se llevó a cabo una síntesis de ADNc, análisis RT-PCR y análisis de transferencia Northern de la extracción de ARN de los transcritos de Ig de la línea germinal, transcripción inversa y amplificación de ADNc (correspondiente a 1 μ g de ARN por muestra de PCR), tal como se describe en Lecart et al. (Int. Immunol. 14:1351, 2002). La secuencia de nucleótidos de los cebadores de PCR, los transcritos de la línea germinal C ϵ y β -actina fueron los siguientes:

35

[0071] Línea germinal C β

Sentido 1 ϵ 5' GAC GGG CCA CAC CAT CC (SEC ID NO: 1)

40 Antisentido C ϵ 5' CGG AAG GTG GCA TTG GAG G (SEC ID NO: 2)

[0072] β -actina

sentido β -actina: 5' GCT GCT GAC CGA GGC CCC CCT GAA C (SEC ID NO: 3)

45 antisentido β -actina: 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC (SEC ID NO: 4)

[0073] Los transcritos de ARNm de la línea germinal β y β -actina se analizaron mediante Transferencia Northern utilizando sondas de ARNc, complementarias al ARNm de C β y β -actina, tal como se describe en Gauchat et al. (J. Exp. Med. 172:463, 1990).

50

D. Obtención del genotipo del gen *IL-21R*

[0074] Se aisló ADN genómico de sangre periférica mediante la extracción estándar con fenol-cloroformo seguido de precipitación con etanol (Blin, N., y D. W. Stafford. 1976. Nucleic Acids Res. 3:2303-2308). Se amplificó un fragmento de PCR de 521 pb que incluía el polimorfismo -83T>C utilizando los cebadores: 5'-GCC TGC TGC ATC TAG TGT C-3' (en dirección 5'; SEC ID NO: 5) y 5'-CCG TGC TTC ATG AGA AAG A-3' (en dirección 3'; SEC ID NO: 6). La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l que contenían 100 ng de ADN, 0,5 μ M de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 5 μ l 10x tampón 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 10 min seguido de 32 ciclos a 94°C durante 45 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 60 s, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los fragmentos se secuenciaron utilizando el Kit de Secuenciación de ADN ABI Prism Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante y se analizaron en un Analizador Genético

ABI Prism 310 (Perkin-Elmer, Boston, MA). El cebador de secuenciación de IL21R fue: 5'-CGT GCT TCA TGA GAA AGA TG-3' (SEC ID NO: 7).

5 **[0075]** E. IL-21 aumenta la producción de IgE por células B CD19+ humanas estimuladas con anti-CD40 en presencia de IL-4.

10 **[0076]** La capacidad de rIL-21 de modular la producción de IgE inducida por la producción de rIL-4 se investigó utilizando células B CD19+ humanas derivadas de sangre periférica o bazo purificadas, obtenidas de donantes no atópicos sanos, que fueron estimuladas con mAb anti-CD40 en presencia de rIL-4 y concentraciones crecientes de rIL-21. Tal como se esperaba, la adición de rIL-4 a cultivos de estas células induce la producción de IgE (figuras 1A y 1B). El rIL-21 solo no induce la síntesis de IgE, pero aumenta fuertemente la producción de IgE inducida por IL-4, de una manera dependiente de la dosis, independientemente del origen de las células B. Además, el rIL-21 aumentaba la producción de IgG inducida por rIL-4 en células B intactas CD19+,CD27 esplénicas purificadas (Figura 1C). La capacidad óptima de aumento de la producción de IgE de rIL-21 se observó en concentraciones entre 1-10 ng/ml de citoquina.

20 F. IL-21 no afecta a la expresión inducida por IL-4 de transcritos de la línea germinal C ϵ en células B purificadas

25 **[0077]** La expresión de los transcritos de la línea germinal C ϵ se considera un suceso obligatorio que precede al cambio satisfactorio de isotipo de las células B de ratón y humanas en la producción de IgE. Para investigar si la producción de IgE aumentada por IL-21 estaba asociada con un incremento en el cambio de isotipo inducido por IL-4, se determinó la expresión del ARN de la línea germinal ϵ por mAb anti-CD40 y células B CD19+ estimuladas por IL-4 mediante análisis de transferencia Northern. En concordancia con los resultados descritos en la literatura, la estimulación de células B purificadas con la combinación de mAb anti-CD40 y rIL-4 dio lugar a una fuerte inducción de la transcripción de la línea germinal C ϵ (Figura 2A), mientras que la estimulación a través de CD40 solo no tuvo ningún efecto. La expresión de estos transcritos no se observó en células estimuladas con rIL21 y mAb anti-CD40. Además, rIL-21 no afectaba a la transcripción de la línea germinal C ϵ inducida por rIL-4, ni en células B humanas derivadas de bazo ni derivadas de sangre periférica (figura 2B). Estos resultados indican que el aumento de la síntesis de IgE por IL-21 inducida por IL-4 no es debido a un incremento en la síntesis de ARN de la línea germinal C ϵ , sino que es probablemente la consecuencia de su capacidad para inducir la expansión de células B activadas.

35 Ejemplo 2

40 La IL-21 inhibe indirectamente la producción de IgE inducida por IL-4 a través de la inducción de la producción de IFN- γ por células T y/o células NK.

45 **[0078]** Se ha observado que IL-21 aumenta la producción de IFN- γ por células T y NK humanas (Strengell et al., J. Immunol. 170: 5464, 2003). Además, se sabe que el IFN- γ inhibe fuertemente la producción de IgE por células B inducida por IL-4 (Pène et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:6880, 1988), sugiriendo que la IL-21 podría tener un papel inhibitorio en la síntesis de IgE a través del aumento de la producción de esta citoquina. Esta posibilidad se investigó mediante la comparación del efecto de rIL-21 en la producción de IgE inducida por rIL-4 entre poblaciones de células B que contenían células T y NK, o estaban desprovistas de ellas. La adición de rIL-4 a cultivos de PBMC, en los que los linfocitos últimos estaban presentes, dio lugar a la producción de niveles bajos, aunque reproducibles, de IgE. A diferencia de su efecto en las células B periféricas CD19+ purificadas (figura 1), rIL-21 inhibía la producción de IgE en cultivos de PBMC, a concentraciones bajas tales como 3 ng/ml, en diez de quince donantes sanos analizados (figura 3A). Sin embargo, a la concentración más baja de IL-21 analizada, la producción de IgE por células B inducida por IL-4 de estos donantes aumentaba significativamente y de manera reproducible. En los otros cinco donantes, los efectos inhibitorios de rIL-21 en la síntesis de IgE sólo se detectaron a concentraciones iguales o superiores a 30 ng/ml, mientras que rIL-21 aumentó la producción de IgE inducida por IL-4 a concentraciones que variaban entre 1 y 10 ng/ml (Figura 3B). Estos resultados sugieren la existencia de una sensibilidad diferencial de estos dos grupos de donantes para responder a los efectos inhibitorios de IL-21.

60 **[0079]** Con el fin de determinar si los efectos inhibitorios inducidos por IL-21 podrían explicarse por su capacidad de inducir la síntesis de IFN- γ , se midieron los niveles de producción de esta última citoquina en cultivos de PBMC estimulados con rIL-4 y rIL-21. Se observó que los niveles de producción de IgE inducida por rIL-4 se correlacionaban de manera inversa con los de IFN- γ , detectados en estos cultivos, tanto en el grupo de donantes sensibles (figuras 4A y 4B) como en el menos sensible (Figuras 4C y 4D). Cabe destacar que la adición de rIL-21 a los cultivos de PBMC

estimulados con rIL-4 en presencia de un mAb anti-CD40 daba lugar a un aumento importante de la producción de IgE (figuras 4E y 4F), reminiscente de la observada en cultivos de células B purificadas. Bajo estas condiciones experimentales, las células B experimentan una fuerte estimulación mediada por CD40 policlonal y por tanto los efectos inhibidores de IFN- γ sobre la síntesis de IgE inducida por IL-4 están completamente enmascarados por los efectos de inducción de crecimiento por las células B de IL-21. Para demostrar directamente que IL-21 inhibe la producción de IgE, a través de la inducción de la producción de IFN- γ por células no B, se añadió un anticuerpo neutralizante anti-R1 de IFN- γ de cabra o un mAb anti-R1 de IFN- γ de ratón, en varios puntos de tiempo, a cultivos de PBMC estimulados con rIL-4 y varias cantidades de rIL-21. La adición de anticuerpo anti-R1 de IFN- γ en el inicio de los cultivos solos no afectó a la inhibición de la producción de IgE mediada por IL-21, (Figura 5). Sin embargo, su adición repetida durante los primeros cuatro días de cultivo dio lugar a una neutralización completa de la producción de IFN- γ , restaurando así la producción de IgE a niveles comparables, o incluso superiores, a los observados con rIL-4 solo. La adición de un anticuerpo de control emparejado con isotipo no relevantes no presenta efectos (figura 5). A una concentración de 90 ng/ml, la IL-21 inhibía completamente la síntesis de IgE inducida por IL-4, independientemente de la presencia del anticuerpo policlonal anti-R1 de IFN- γ de cabra, indicando que bajo estas condiciones la cantidad de IFN- γ inducida por IL-21 ya no se podía neutralizar.

Ejemplo 3

La magnitud de la inhibición de la síntesis de IgE por IL-21 inducida por IL-4 se determina mediante un polimorfismo genético del IL-21R.

[0080] Se ha descrito que la presencia de un polimorfismo (T-83C) en el gen que codifica el IL-21R humano está asociado con niveles elevados en suero de IgE, tanto en individuos sanos como, en un mayor grado, en individuos atópicos (Heckler et al. *ibid.*). Debido a la sensibilidad diferencial de PBMC para responder a los efectos de rIL-21, tal como se ha descrito anteriormente, en un grupo considerable de donantes que consisten en individuos tanto sanos como atópicos, según su estado clínico, así como la presencia de este polimorfismo, podría afectar en la capacidad de IL-21 de modular la síntesis *in vitro* de IgE inducida por IL-4.

[0081] En una primera serie de experimentos se investigó si las PBMC de todos los donantes sanos y alérgicos incluidos en el estudio diferían en su capacidad de responder a los efectos de IL-4 para la inducción de la producción de IgE. Los niveles de producción *in vitro* de IgE inducida por rIL-4 no diferían significativamente ($p = 0,56$, test de Mann-Whitney) entre los donantes sanos y alérgicos (figura 6A). A continuación, la capacidad de IL-21, en una concentración de 10 ng/ml, de inhibir o aumentar la síntesis *in vitro* de IgE inducida por rIL-4, se expresó como el porcentaje de variación de respuesta en comparación con el obtenido en rIL-4 solo. Tal como se observa en la figura 6A, los niveles de producción *in vitro* de IgE inducida por rIL-4 no diferían significativamente ($p=0,56$, test de Mann-Whitney) entre donantes sanos y alérgicos. De manera similar, los efectos moduladores inducidos por rIL-21 sobre la producción de IgE inducida por rIL-4 no diferían de una manera estadísticamente significativa entre los dos grupos (figura 6B), indicando que estos últimos efectos no están unidos a la presencia de atopía. También se determinó si la sensibilidad diferencial observada con respecto a los efectos de modulación por IL-21 sobre la síntesis de IgE inducida por IL-4 estaba asociada con un polimorfismo genético en el gen *IL-21R*. Este análisis utilizó PBMC de un total de 7 donantes sanos y 17 atópicos, genotipados por la presencia o ausencia del gen *IL-21R* mutante en T-83C.

[0082] Los resultados del análisis de secuenciación mostraron que 13/24 donantes eran homocigóticos para el alelo de tipo salvaje del gen *IL-21R*, mientras que 11/24 donantes eran heterocigóticos, expresando una copia del gen mutado (tabla 1). Ninguno de los donantes, que portaba este polimorfismo, expresó dos copias del alelo mutante. De nuevo, no se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de donantes con respecto a la capacidad de IL-4 de inducir la síntesis *in vitro* de IgE (figura 7A). Sin embargo, tal como se muestra en la figuras 7B, la variación de la producción de IgE inducida por rIL4, mediada por rIL21, era significativamente diferente entre los donantes que expresan alelos de tipo salvaje y aquellos que portan una copia mutante del gen *IL-21R* ($p=0,0054$ test de Mann-Whitney). Por tanto, la síntesis *in vitro* de IgE por PBMC de 12 de los 13 donantes (92%) homocigóticos para el alelo de tipo salvaje, ya se inhibía con 10 ng/ml de rIL-21, mientras que esta concentración de rIL-21 no inhibía, sino que aumentaba la producción *in vitro* de IgE dependiente de rIL-4 en 7 de los 11 individuos (64%) que portaban una copia del gen polimórfico. Finalmente, el rIL-21 indujo niveles más elevados de producción de IFN- γ por PBMC de individuos de tipo salvaje, en comparación con los que portan la variante polimórfica de IL-21R (Figura 7C : $p=0,018$ test de Mann-Whitney). En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de por lo menos una copia de la mutación T-83C del gen *IL-21R* está asociada con una menor capacidad de IL-21 para inducir la producción de IFN- γ , dando lugar a

una sensibilidad reducida de los individuos que portan este alelo con respecto al efecto inhibitor de IL-21 en la producción de IgE.

Tabla 1

Donantes	Edad	Sexo	Atopía ^b	Gene de L-21R ^c
Sano				
1	51	M	Ninguna	Tipo salvaje
2	40	M	Ninguna	Tipo salvaje
3	27	M	Ninguna	Tipo salvaje
4	60	M	Ninguna	Tipo salvaje
5	50	M	Ninguna	Variante
6	24	F	Ninguna	Tipo salvaje
7	32	F	Ninguna	Tipo salvaje
Atópico				
1	65	F	Latex, Dp, Gr	Tipo salvaje
2	36	F	Peni, DHE	Tipo salvaje
3	44	F	Peni, Dp	Tipo salvaje
4	51	F	Peni, Dp, latex	Tipo salvaje
5	46	M	Gr	Tipo salvaje
6	29	M	Gr, AINS	Tipo salvaje
7	35	F	Peni, Dp	Tipo salvaje
8	57	M	Latex, Dp, Gr	Variante
9	35	F	Latex, Dp, Gr, Ckrh	Variante
10	45	M	Dp	Variante
11	59	M	Peni	Variante
12	44	F	Peni	Variante
13	58	F	Latex, Dp, Gr	Variante
14	26	F	Latex, peni, Dp, Gr	Variante
15	42	F	Latex, Dp, Ckrh	Variante
16	28	M	Gr	Variante
17	54	F	Latex, Gr, quinol	Variante

^a El ADN genómico se aisló de sangre periférica de 6 donantes sanos no alérgicos y 17 pacientes atópicos y el gen *IL-21R* se analizó mediante secuenciación tal como se ha descrito anteriormente

^b Dp, *Dermatophagoïdes pteronyssinus*; Gr, polen de césped; Ckrh, cucaracha; Peni, penicilina; quinol, quinolona.

^c tipo salvaje: donantes portan alelos de tipo salvaje del gen *IL-21R*; variante: donantes heterocigóticos que portan una copia del alelo T-83C.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0083]

- <110>INSERM
- 5 <120> MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE IL-21
 - <130> 05-21PC
 - <140> EP 06792239.3
 - <141> 2006-09-22
 - <150> US 60/719,388
- 10 <151> 2005-09-22
 - <160> 7
 - <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 - <210> 1
 - <211> 17
- 15 <212> DNA
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> cebador de oligonucleótidos
 - <400> 1
- 20 gacgggccac accatcc 17
 - <210> 2
 - <211> 19
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 - <223> cebador de oligonucleótidos
 - <400> 2
 - cggaaggtgg cattggagg 19
 - <210> 3
- 30 <211> 25
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> cebador de oligonucleótidos
- 35 <400> 3
 - gctgctgacc gaggccccc tgaac 25
 - <210> 4
 - <211> 24
 - <212> ADN
- 40 <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> cebador de oligonucleótidos
 - <400> 4
 - ctccttaatg tcacgcacga tttc 24
- 45 <210> 5
 - <211> 19
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
- 50 <223> cebador de oligonucleótidos
 - <400> 5
 - gcctgctgca tctagtgtc 19
 - <210> 6
 - <211> 19
- 55 <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> cebador de oligonucleótidos
 - <400> 6
- 60 ccgtgcttca tgagaaaga 19
 - <210> 7
 - <211> 20
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
- 65 <220>

<223> cebador de oligonucleótidos
<400> 7
cgtgcttcat gagaaagatg 20

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de predicción de una respuesta terapéutica diferencial a IL-21 en un individuo con necesidad de terapia con IL-21, que comprende detectar, en una muestra biológica del paciente, un
5 alelo variante individual del gen del receptor de IL-21 del individuo, en el que la variante es una variante T-83C.
2. Método *in vitro* de selección de una pauta terapéutica diferencial de IL-21 que comprende:
 - 10 detectar, en una muestra biológica de un individuo, un alelo variante individual del gen del receptor de IL-21 del individuo, en el que la variante es una variante T-83C; y
determinar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21; en el que se incrementa la dosis de IL-21 en relación con la dosis administrada a individuos que son homocigóticos para el gen del receptor de IL-21 de tipo salvaje.
 - 15
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el individuo presenta cáncer, una infección, una enfermedad autoinmune, o en el que el individuo es atópico.

Figura 1

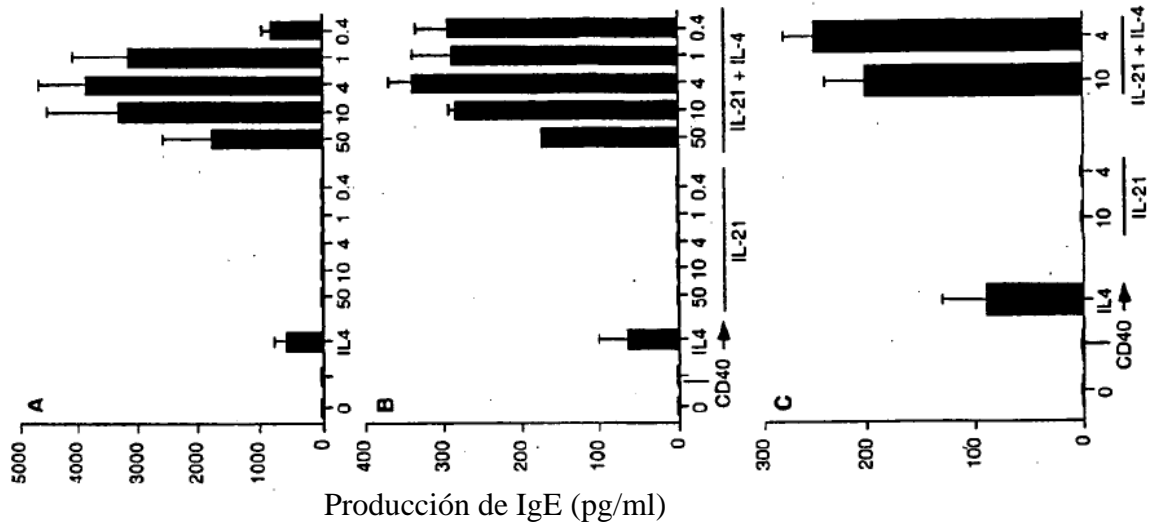


Figura 2

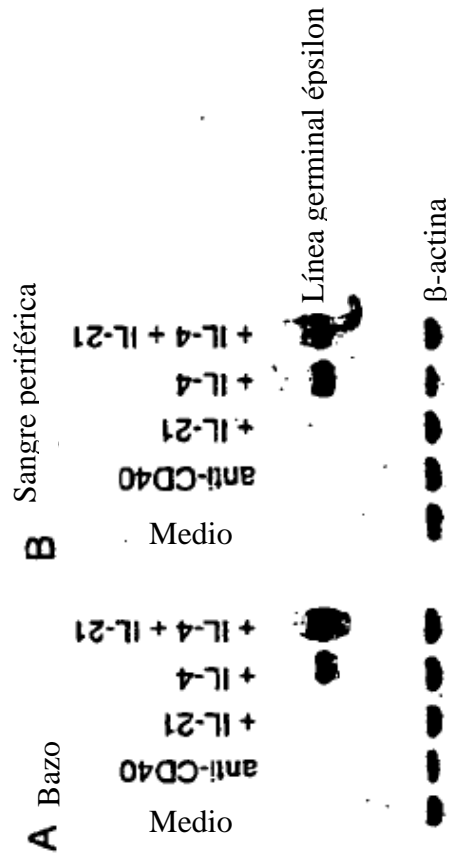


Figura 3

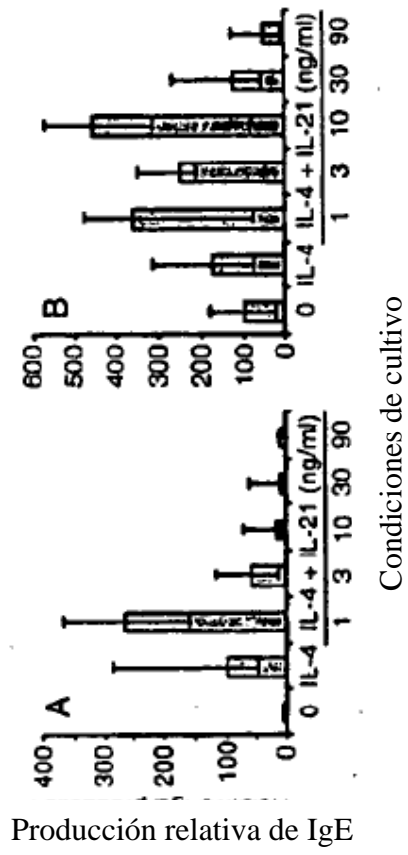


Figura 4

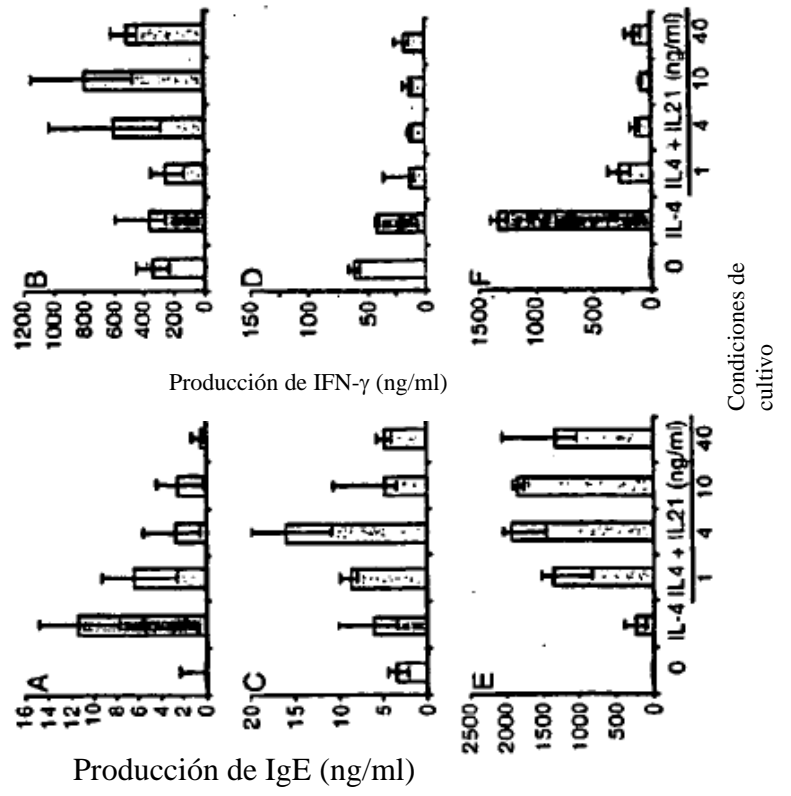


Figura 5

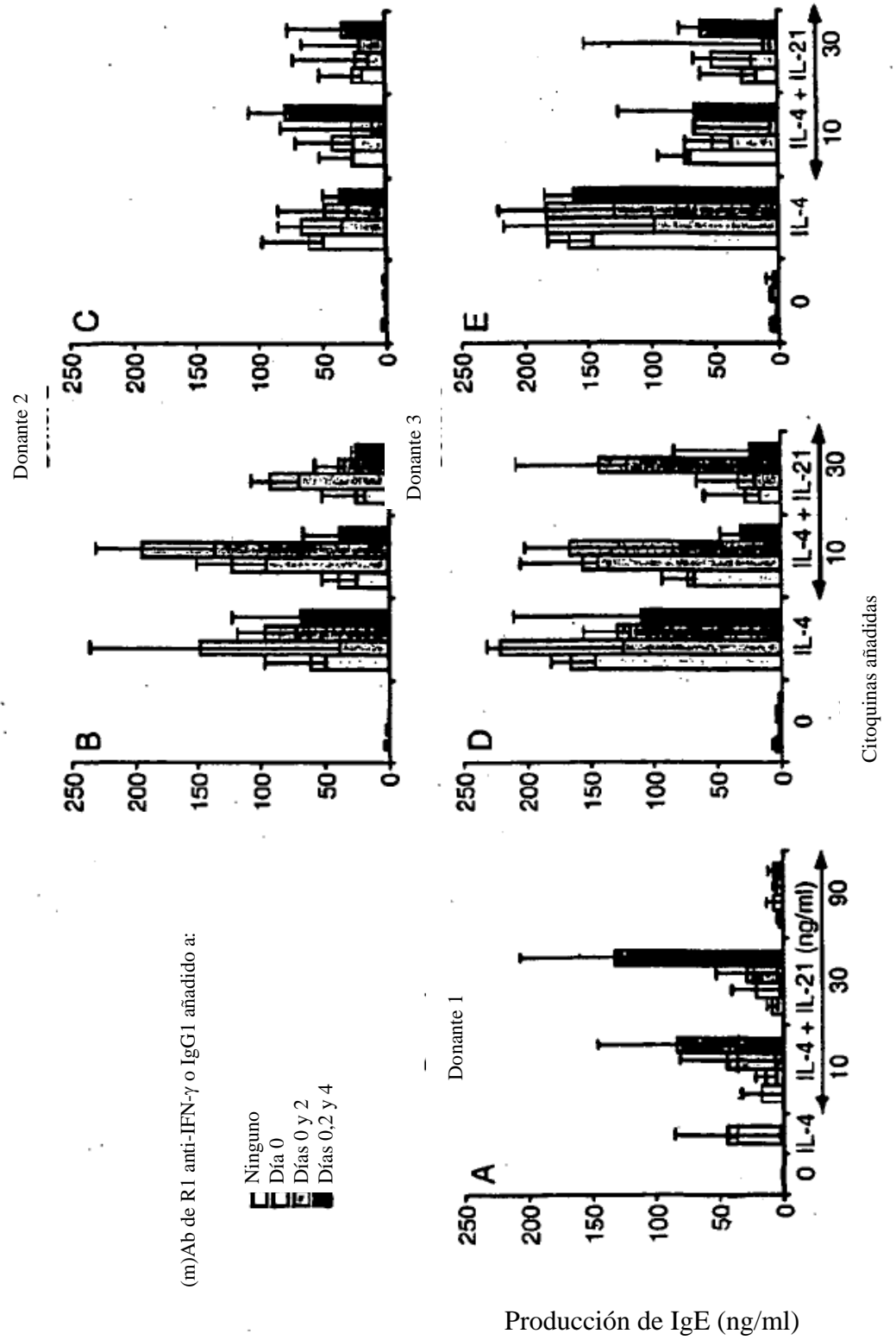


Figura 6

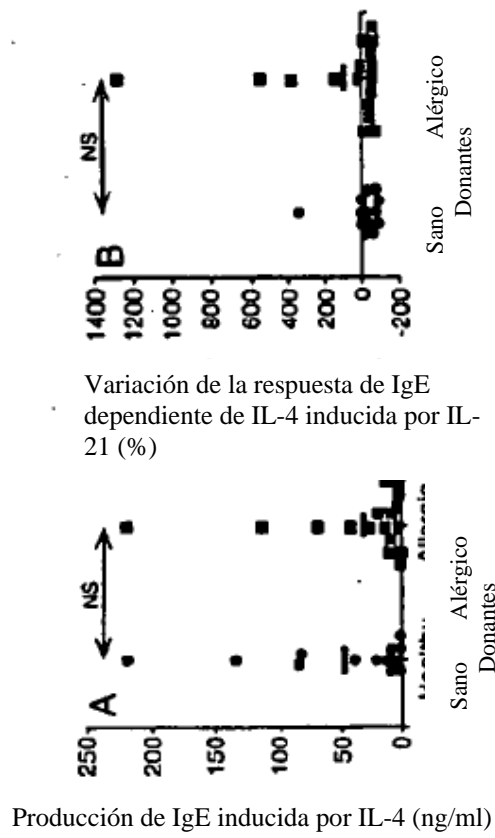
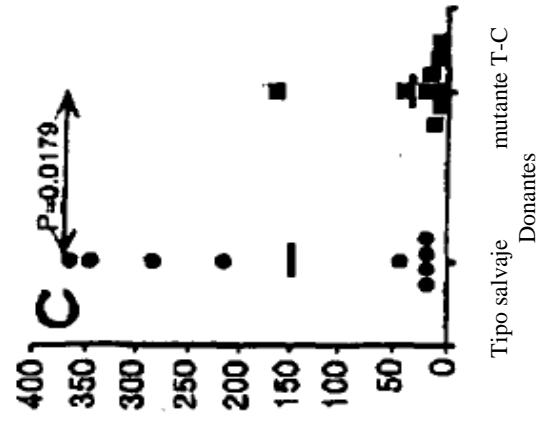
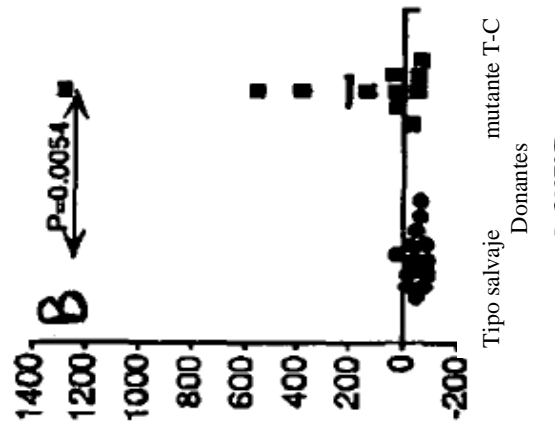


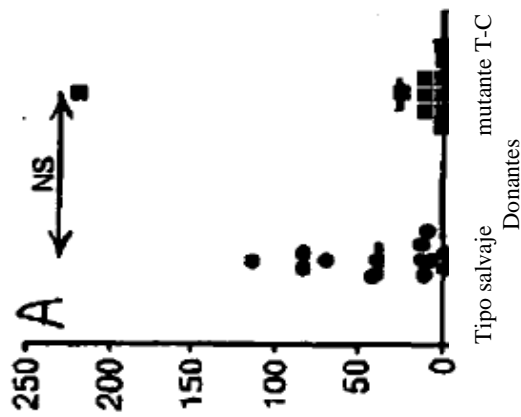
Figura 7



Producción de IFN- γ en IL-4 + IL-21 (ng/ml)



Variación de la respuesta de IgE dependiente de IL-4 inducida por IL-21 (%)



Producción de IgE inducida por IL-4 (ng/ml)