

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 265**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03757366 .4**
96 Fecha de presentación: **06.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1531850**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Uso de IL-21 y anticuerpo monoclonal para tratar cánceres sólidos**

30 Prioridad:
07.06.2002 US 387127 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
**ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WA 98102, US**

72 Inventor/es:
**NELSON, Andrew, J.;
HUGHES, Steven, D.;
HOLLY, Richard, D. y
KINDSVOGEL, Wayne, R.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 381 265 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

Uso de IL-21 y anticuerpo monoclonal para tratar cánceres sólidos

Antecedentes de la invención

5 Las citocinas generalmente estimulan la proliferación o diferenciación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmune e inflamatoria del cuerpo. Son ejemplos de citocinas que afectan a la hematopoyesis la eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de glóbulos rojos; la trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células en el linaje megacariocítico; y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos. Estas citocinas son útiles para restaurar los niveles normales de células sanguíneas en pacientes que padecen anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciban quimioterapia para un cáncer.

10 Las interleucinas son una familia de citocinas que median respuestas inmunológicas. Son fundamentales para una respuesta inmune los linfocitos T, que producen muchas citocinas e inmunidad adaptativa a los antígenos. Las citocinas producidas por los linfocitos T se han clasificado como de tipo 1 y de tipo 2 (Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76:300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- γ , LT- α y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad viral, inmunidad de parásitos intracelulares y rechazo de aloinjertos. Las citocinas de tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y están implicadas en respuestas humorales, inmunidad a helmintos y respuestas alérgicas. Las citocinas compartidas entre el Tipo 1 y el Tipo 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- α . Hay algunos indicios que sugieren que las poblaciones de linfocitos T productores de Tipo 1 y de Tipo 2 preferentemente migran al interior de diferentes tipos de tejidos inflamados.

15 Los linfocitos T maduros pueden activarse, por ejemplo, por un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citocinas, moléculas de señalización bioquímicas o receptores que influyen adicionalmente sobre el destino de la población de linfocitos T.

20 Los linfocitos B pueden activarse a través de receptores presentes en su superficie celular incluyendo el receptor de linfocitos B y otras moléculas auxiliares para realizar funciones celulares auxiliares, tales como la producción de citocinas.

25 Las células destructoras naturales (NK) tienen una célula progenitora común con los linfocitos T y los linfocitos B, y juegan un papel en la vigilancia inmune. Las células NK, que constituyen hasta el 15 % de los linfocitos sanguíneos, no expresan receptores de antígenos y por lo tanto no usan el reconocimiento del MHC como requisito para la unión a una célula diana. Las células NK están implicadas en el reconocimiento y destrucción de ciertas células tumorales y células infectadas por virus. *In vivo*, se cree que las células NK requieren activación, sin embargo, *in vitro*, se ha mostrado que las células NK destruyen algunos tipos de células tumorales sin activación.

30 Los linfomas son malignidades del sistema linfático, que son heterogéneos en etiología, morfología y curso clínico. Los linfomas generalmente se clasifican como enfermedad de Hodgkin o linfomas no Hodgkin. La enfermedad de Hodgkin se caracteriza por histiocitos gigantes, mientras que la ausencia de estas células incluye todos los linfomas no Hodgkin. Los linfocitos, que son el componente principal de la linfa, pueden ser linfocitos B o linfocitos T. En general, cuando aparece un linfoma en las primeras fases de la maduración celular, la malignidad es más agresiva que las malignidades que se producen a partir de células maduras. La quimioterapia normalmente es más eficaz para tratar el linfoma agresivo, mientras que los linfomas indolentes no pueden tratarse tan fácilmente y por lo tanto es probable que nunca se curen mientras que la enfermedad permanezca indolente. Como estudio de la información relacionada con el linfoma véase, por ejemplo, Lymphoma Treatments and Managing Their Side Effects, Lymphoma Res. Found. Of Amer., Los Ángeles, 2001.

35 En particular, las interleucinas son una familia de citocinas que median respuestas inmunológicas. Es fundamental para una respuesta inmune el linfocito T, que produce muchas citocinas y realiza una inmunidad adaptativa a los antígenos. Los linfocitos T maduros pueden activarse, por ejemplo, por un antígeno u otro estímulo para producir, por ejemplo, citocinas, moléculas de señalización bioquímica o receptores que influyen adicionalmente en el destino de la población de células T.

40 Las infecciones virales pueden clasificarse de diversas formas. Por ejemplo, los virus pueden clasificarse filogenéticamente, de acuerdo con la célula y órgano diana infectado, o por el estado de enfermedad que inducen. Sin embargo, no todos los virus y enfermedades virales se tratan de forma idéntica porque otros factores, tales como si una infección es aguda o crónica y la salud subyacente del paciente, influyen en el tipo de tratamiento que se recomienda. En general, el tratamiento de infecciones agudas en pacientes inmunocompetentes reduciría la gravedad de la enfermedad y las complicaciones y reduciría la tasa de transmisión, haciendo que la seguridad, el coste y la conveniencia sean consideraciones esenciales para recomendar un agente antiviral. Los tratamientos para infecciones crónicas prevendrían lesiones virales en órganos tales como el hígado, pulmones, corazón, sistema nervioso central y sistema gastrointestinal, lo cual hace que la eficacia sea la consideración principal.

45 Hay pocos tratamientos eficaces para la hepatitis. Para el tratamiento del virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC), la FDA ha aprobado la administración de interferón alfa recombinante (IFN- α). Sin embargo, el

- 5 IFN- α está asociado con varios efectos adversos dependientes de la dosis, incluyendo trombocitopenia, leucopenia, infecciones bacterianas y síntomas parecidos a los de la gripe. Otros agentes usados para tratar el VHB o VHC crónico incluyen el análogo de nucleósido RIBAVIRIN™ y el ácido ursodesoxicólico; sin embargo, ninguno ha resultado ser muy eficaz. La terapia de combinación de RIBAVIRIN™ + IFN produce una tasa de eliminación viral sostenida del 47% (Lanford, R. E. y Bigger, C. *Virology* 293: 1-9 (2002). (Véase, *Medicine*, (D. C. Dale y D. D. Federman, eds.) (Scientific American, Inc., Nueva York), 4:VIII:1-8 (1995)).
- 10 La enfermedad hepática crónica progresiva como resultado de infecciones crónicas, tales como VHC y VHB, y la tumorigénesis asociada con el VIH son tres ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con terapia de intervención y terapia preventiva usando los procedimientos de la presente invención. La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de infecciones, particularmente infecciones virales, mediante la administración de IL-21 al sujeto. En ciertas realizaciones, la IL-21 puede administrarse junto con otros compuestos antivirales.
- 15 La presente invención permite tratar tumores sólidos como se definen en las reivindicaciones mediante la administración de composiciones de IL-21 que pueden usarse como una monoterapia o en combinación con quimioterapia, radioterapia u otros agentes biológicos. Estos y otros usos deberían ser evidentes para los expertos en la materia por las enseñanzas del presente documento.
- El documento US 6307024 describe el ligando de citocina zalfa11.
- El documento WO 03/082212 describe un procedimiento para tratar cáncer en seres humanos.
- El documento WO 03/028630 describe procedimientos y composiciones para modular la actividad del receptor de IL-21.
- 20 Nelson A. y col., *Blood*, Vol. 100(11), Abstract No. 593 (16 de noviembre de 2002), describe efectos antitumorales de IL-21.
- 25 Dentro de un aspecto, la presente memoria descriptiva describe el tratamiento del linfoma no Hodgkin que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21. En ciertos casos, se ha mostrado que el polipéptido no provoca la proliferación de células cancerosas aisladas antes de la administración al sujeto.
- 30 La presente invención proporciona un polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21, y un anticuerpo monoclonal, para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo de carcinoma de células renales, cáncer de mama, glioma y cáncer de colon; y en el que el primer polipéptido tiene una identidad de al menos un 80% con un polipéptido IL-21 que comprende los restos 41 (Gln) a 148 (Ile) de la SEC ID N°: 2 o los restos 32 (Gln) a 162 (Ser) de la SEC ID N°: 2.
- En una realización, hay una respuesta tumoral. En otra realización, la respuesta tumoral se mide como respuesta completa, respuesta parcial o reducción en tiempo hasta la progresión.
- 35 La presente memoria descriptiva describe el tratamiento del linfoma no Hodgkin que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21 y un segundo polipéptido. En otras realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo de carcinoma de células renales, carcinoma epitelial, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de colon. En una realización, hay una respuesta tumoral. En otro aspecto, la respuesta tumoral se mide como respuesta completa, respuesta parcial o reducción en el tiempo hasta la progresión.
- 40 La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de una infección que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21, en el que la infección se selecciona entre el grupo de virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana, síndrome respiratorio agudo severo producido por un coronavirus, virus Herpes Simplex, virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus; Poxvirus; Papilomavirus; Adenovirus, Poliovirus; Ortomixovirus, Paramixovirus, virus de la gripe; calicivirus; virus de la rabia y virus de la peste bovina.
- 45 La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de una infección viral en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21, en el que la infección viral produce una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en Inmunodeficiencia Adquirida; Hepatitis; Gastroenteritis; enfermedades Hemorrágicas; Enteritis; Carditis; Encefalitis; Parálisis; Bronquiolitis; Enfermedad respiratoria superior o inferior; Papilomatosis Respiratoria; Artritis; enfermedad
- 50 Diseminada, Meningitis y Mononucleosis.
- 55 La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de una infección que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21 y un segundo polipéptido, en el que la infección se selecciona entre el grupo de virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana, síndrome respiratorio agudo severo producido por un coronavirus, virus Herpes Simplex, virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus; Poxvirus; Papilomavirus; Adenovirus,

Poliovirus; Ortomixovirus, Paramixovirus, virus de la gripe; calicivirus; virus de la rabia y virus de la peste bovina.

En los procedimientos para tratar infecciones virales usando polipéptidos y proteínas de fusión que tienen una actividad funcional de IL-21, puede reducirse el nivel de infección viral. La reducción en el nivel de infección viral puede medirse como una reducción en la carga viral, un aumento de los anticuerpos específicos del virus, reducción en el nivel de alanina aminotransferasa (ALT) o una mejora histológica en

La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21, en el que la infección bacteriana es una infección por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *chlamydiae*, *listeriae*, *Helicobacter pylori*, *mycobacterium*, *mycoplasma salmonella* y *shigella*. *helicobacter pylori*, *mycobacterium*, *mycoplasma salmonella* y *shigella*

La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que tiene la actividad funcional de IL-21 y un segundo polipéptido, en el que la infección bacteriana es una infección por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *chlamydiae*, *listeriae*, *Helicobacter pylori*, *mycobacterium*, *mycoplasma salmonella* y *shigella*.

Para todos los aspectos y realizaciones de la presente invención, el polipéptido puede comprender un polipéptido que tiene al menos un 80%, 90% o 95% de identidad o una identidad completa con un polipéptido IL-21 que comprende los restos 41 (Gln) a 148 (Ile) de la SEC ID N°: 2 o los restos 32 (Gln) a 162 (Ser) de la SEC ID N°: 2.

Descripción de la invención

Antes de exponer la invención con detalle, puede ser útil para su comprensión definir los siguientes términos:

La expresión “marcador de afinidad” se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse a un segundo polipéptido para permitir la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, puede usarse cualquier péptido o proteína para la que se dispone de un anticuerpo u otro agente de unión específico como marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson y col., Methods Enzymol. 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67:31, 1988), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp y col., Biotechnology 6:1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina, u otro epítipo o dominio de unión antigénico. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. Se dispone de ADN que codifican marcadores de afinidad en proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

La expresión “variante alélica” se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce de forma natural mediante mutación, y puede dar como resultado un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Las expresiones “amino-terminal” y “carboxilo-terminal” se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando lo permite el contexto, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o parte particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada en posición carboxi-terminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está localizada próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

El término “cáncer” o “célula cancerosa” se usa en el presente documento para indicar un tejido o célula encontrada en un neoplasma que posee características que la diferencian de los tejidos o células de tejidos normales. Entre dichas características se incluyen, pero sin limitación: el grado de anaplasia, irregularidad en la forma, poca definición del contorno de la célula, tamaño nuclear, cambios en la estructura del núcleo o citoplasma, otros cambios fenotípicos, presencia de proteínas celulares indicativas de un estado canceroso o precanceroso, número aumentado de mitosis y capacidad de metastatizar. Las palabras relacionadas con “cáncer” incluyen carcinoma, sarcoma, tumor, epiteloma, leucemia, linfoma, pólipo y cirros, transformación, neoplasma y similares.

La expresión “par complemento/anti-complemento” indica restos no idénticos que forman un par no asociado covalentemente, estable en condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anti-complemento. Otros pares complemento/anti-complemento ejemplares incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos con sentido/antisentido y similares. Cuando es deseable una disociación posterior del par complemento/anti-complemento, el par complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión de $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

La expresión “complementos de una molécula de polinucleótido” indica una molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia.

5 La expresión “secuencia de nucleótidos degenerada” indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, cada uno de los tripletes GAU y GAC codifica Asp).

10 La expresión “vector de expresión” se usa para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que permiten su transcripción. Dichos segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras, y también pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión generalmente proceden de un ADN plasmídico viral, o pueden contener elementos de ambos.

15 El término “aislado/a” cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha retirado de su medio genético natural y por lo tanto carece de otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas modificadas por ingeniería genética. Dichas moléculas aisladas son las que se separan de su medio natural e incluyen clones de ADNc y genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención carecen de otros genes con los que están asociados normalmente, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' naturales tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316:774-78, 1985).

20 Un polipéptido o proteína “aislada” es un polipéptido o proteína que se encuentra en un estado distinto del que está en su medio nativo, tal como aparte de la sangre y un tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir, con una pureza mayor del 95 %, más preferentemente mayor del 99 %. Cuando se usa en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas tales como dímeros o, como alternativa, formas glicosiladas o derivatizadas.

25 El término “nivel”, cuando hace referencia a células inmunes, tales como células NK, linfocitos T, en particular linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y similares, un nivel aumentado es un número aumentado de células o una actividad aumentada de la función celular.

30 El término “nivel cuando hace referencia a infecciones virales se refiere a un cambio en el nivel de la infección viral e incluye, pero sin limitación, un cambio en el nivel de CTL o células NK (como se ha descrito anteriormente), una reducción en la carga viral, un aumento en el título de anticuerpos antivirales, una reducción en los niveles serológicos de alanina aminotransferasa o una mejora como se determina por examen histológico de un tejido u órgano diana. La determinación de si estos cambios en el nivel son diferencias o cambios significativos está dentro de la experiencia de un experto en la materia.

35 El término “neoplásico”, cuando se refiere a células, indica una célula que experimenta una proliferación nueva y anómala, particularmente en un tejido en el que la proliferación está incontrolada y es progresiva, dando como resultado un neoplasma. Las células neoplásicas pueden ser malignas, es decir, invasivas y metastásicas, o benignas.

La expresión “unido operativamente”, cuando hace referencia a segmentos de ADN, indica que los segmentos se disponen de tal manera que funcionan de forma coordinada para los fines para los que están destinados, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

40 Un “polinucleótido” es un polímero mono- o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado como “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando lo permite el contexto, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se usa para indicar la longitud total y se considerará equivalente a la expresión “pares de bases”. Los expertos en la materia reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden ser escalonados como resultado de la escisión enzimática; de esta manera, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar emparejados.

45 Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, tanto si se ha producido de forma natural como si se ha producido de forma sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan comúnmente “péptidos”.

El término "promotor" se usa en el presente documento por su significado reconocido en la técnica para indicar una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que permiten la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras comúnmente, pero no siempre, se encuentran en las regiones 5' no codificantes de los genes.

5 Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras del esqueleto de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero
10 sin embargo pueden estar presentes.

El término "receptor" indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva (es decir un ligando) y media el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura multipéptidica que comprende un dominio de unión al ligando extracelular y un dominio efector intracelular que típicamente está implicado en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor da como resultado un
15 cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y la otra u otras moléculas presentes en la célula. Esta interacción, a su vez, conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que están asociados con las interacciones de receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de
20 fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, pueden ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimuladora del 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).

La expresión "secuencia señal de secreción" indica una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido de secreción") que, como componente de un polipéptido de mayor tamaño, dirige el polipéptido de mayor tamaño a través de una ruta de secreción de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido de mayor tamaño comúnmente se escinde para retirar el péptido de secreción durante el tránsito a través de la ruta de secreción.
25

Los pesos moleculares y longitudes de polímeros determinados por procedimientos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) deberán considerarse valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como "aproximadamente" X o "alrededor de" X, se entenderá que el valor indicado de X es exacto en $\pm 10\%$.
30

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-21 da como resultado la inhibición de la proliferación de ciertas células neoplásicas o cancerosas, directa o indirectamente, limitando de esta manera los efectos patológicos causados por el cáncer. Las células neoplásicas incluyen ciertas células linfocíticas y células metastásicas procedentes de tumores sólidos, como se define en las reivindicaciones. La presente invención también se basa en el descubrimiento de que la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-21 específica para tumores sólidos da como resultado una respuesta tumoral. En los ejemplos que se proporcionan más adelante, en modelos animales y en ensayos *in vitro* se demuestra la actividad de IL-21 en muestras biológicas, en particular tumores sólidos, linfocitos B neoplásicos y linfocitos T.
35

La presente memoria descriptiva describe el descubrimiento de que IL-21 tiene actividad antiviral contra infecciones agudas específicas tales como gripe e infecciones crónicas específicas tales como hepatitis. Estos efectos antivirales pueden estar mediados por células del sistema inmune, tales como linfocitos T citotóxicos y células NK. En la descripción y ejemplos que se proporcionan más adelante, los modelos animales y los ensayos *in vitro* demuestran las actividades antivirales de IL-21.
40

45 A. Descripción de IL-21 y su receptor.

La IL-21 humana (SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2) se denominó IL-21, y se describe en la Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° 6.307.024.

El receptor de IL-21 (previamente denominado $\alpha 11$), ahora denominado IL-21R (SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6), y el receptor heterodimérico IL-21R/IL-2R γ se describen en las Publicaciones WIPO del mismo solicitante N° WO 0/17235 y WO 01/77171.
50

Como se describe en estas publicaciones, IL21 se aisló a partir de una biblioteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humana (hPBC) activadas, que se seleccionaron por CD3. CD3 es un marcador de la superficie celular único para las células de origen linfoide, particularmente los linfocitos T.

La secuencia de aminoácidos para IL-21R indicó que el receptor codificado pertenecía a la subfamilia de receptores de citocinas 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 (como revisión, véase Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" en Cytokine 5(2): 95-106,1993). La distribución tisular del receptor sugiere que una diana para IL-21 son las células del linaje
55

hematopoyético, en particular las células progenitoras linfoides y células linfoides. Otras citocinas de cuatro haces helicoidales conocidas que actúan sobre las células linfoides incluyen IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Como revisión de citocinas de cuatro haces helicoidales, véase, Nicola y col., *Advances in Protein Chemistry* 52:1-65, 1999 y Kelso, A., *Immunol. Cell Biol.* 76:300-317, 1998.

5 En el caso de IL-21, la secuencia señal de secreción comprende los restos de aminoácido 1 (Met) a 31 (Gly), y el polipéptido maduro comprende los restos de aminoácido 32 (Gln) a 162 (Ser) (como se muestra en la SEC ID N°: 2). En general, se predice que las citocinas tienen una estructura de cuatro hélices alfa, siendo las hélices A, C y D las más importantes en las interacciones de ligando-receptor, y son miembros muy conservados de la familia. Haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos de IL-21 humana mostrada en la SEC ID N°: 2, un alineamiento de las
10 secuencias de aminoácidos de IL-21 humana, IL-15 humana, IL-4 humana y GM-CSF humano predice que la hélice A de IL-21 se define por los restos de aminoácido 41-56; la hélice B por los restos de aminoácido 69-84; la hélice C por los restos de aminoácido 92-105; y la hélice D por los restos de aminoácido 135-148; como se muestra en la SEC ID N°: 2. El análisis estructural sugiere que el bucle A/B es largo, el bucle B/C es corto y el bucle C/D es largo y paralelo. Esta estructura de bucle da como resultado una organización helicoidal arriba-arriba-abajo-abajo. Los
15 restos de cisteína están absolutamente conservados entre IL-21 e IL-15. Los restos de cisteína que están conservados entre IL-15 e IL-21 corresponden a los restos de aminoácido 71, 78, 122 y 125 de la SEC ID N°: 2. También se observa la conservación de algunos de los restos de cisteína en IL-2, IL-4, CM-GSF e IL-21 correspondientes a los restos de aminoácido 78 y 125 de la SEC ID N°: 2. La colocación constante de la cisteína es una confirmación adicional de la estructura de cuatro haces helicoidales. También está muy conservada en la familia
20 que comprende IL-15, IL-2, IL-4, GM-CSF e IL-21 la secuencia Glu-Phe-Leu como se muestra en la SEC ID N°: 2 en los restos 136-138. Un análisis adicional de IL-21 basado en múltiples alineamientos predice que los restos de aminoácido 44, 47 y 135 (como se muestra en la SEC ID N°: 2) juegan un papel importante en la unión de IL-21 a su receptor afín. Además, la secuencia de aminoácidos predicha de la IL-21 murina (SEC ID N°: 4) muestra un 57 % de identidad con la proteína humana predicha. Basándose en la comparación entre secuencias de de IL-21 humana y
25 murina, se encontraron restos conservados en las regiones predichas que codificaban alfa hélices A y D.

Los polinucleótidos correspondientes que codificaban las regiones, dominios, motivos, restos y secuencias del polipéptido IL-21 humano descritas en el presente documento son como se muestran en la SEC ID N°: 1. En la Tabla 1 se muestran los restos de aminoácido que constituyen las hélices A, B, C y D, y los bucles A/B, B/C y C/D para IL-21, IL-2, IL-4, IL-15 y GM-CSF.

30 Tabla 1

	Hélice A	Bucle A/B	Hélice B	Bucle B/C	Hélice C	Bucle C/D	Hélice D	
Restos de IL-21	41-56	57-68	69-84	85-91	92-105	106-134	135-148	SEC ID N°: 2
Restos de IL-2	36-46	47-52	53-75	76-86	87-99	100-102	103-121	SEC ID N°: 7
Restos de IL-4	29-43	44-64	65-83	84-94	95-118	119-133	134-151	SEC ID N°: 8
Restos de IL-15	45-68	69-83	84-101	102-106	107-119	120-133	134-160	SEC ID N°: 9
Restos de GM-CSF	30-44	45-71	72-81	82-90	91-102	103-119	120-131	SEC ID N°: 10

Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia desvelada en la SEC ID N°: 1 representa un solo alelo de IL-21 humana y que es de esperar que se produzca variación alélica y cortes y empalmes alternativos. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse mediante el sondeo de bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes
35 individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID N°: 1 incluyen las que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos. También se describen proteínas que son variantes alélicas de la SEC ID N°: 2. Dentro del alcance de la presente invención se incluyen ADNc generados a partir de ARNm con cortes y empalmes alternativos, que conservan las propiedades del polipéptido IL-21, así como polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y variantes de corte y empalme de estas
40 secuencias pueden clonarse mediante el sondeo de bibliotecas de ADNc o genómicas procedentes de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

La presente invención también proporciona polipéptidos IL-21 aislados que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar con los polipéptidos de la SEC ID N°: 2, o sus ortólogos. La expresión "identidad de secuencia sustancialmente similar" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que comprenden al
45 menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, o más de un 95% de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en la SEC ID N° 2, o sus ortólogos, como se define en las reivindicaciones. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o más de un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de restos

de aminoácidos 1 a 162 o 33 a 162 de SEC ID N°: 2. A continuación se describen procedimientos para determinar el porcentaje de identidad.

5 El porcentaje de identidad de secuencia se determina por procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603 (1986), y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992). En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1, y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (ibid.) como se muestra en la Tabla 2 (los aminoácidos se indican por los códigos convencionales de una letra).

10 **Número total de emparejamientos idénticos**
 _____ x 100
[longitud de la secuencia más larga más el
número de huecos introducidos en la secuencia
más larga para alinear las dos secuencias]

15 Tabla 2

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

20 Los expertos en la materia apreciarán que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una supuesta

variante de IL-21. El algoritmo FASTA se describe por Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), y por Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

5 Los polipéptidos IL-21 variantes o polipéptidos con una identidad de secuencia sustancialmente similar se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios preferentemente son de una naturaleza minoritaria, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas (véase la Tabla 3) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o actividad del polipéptido; deleciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un resto de metionina amino-terminal, un péptido de engarce pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos o una señal de afinidad. De esta manera, la presente invención incluye polipéptidos de aproximadamente 108 a 216 restos de aminoácido que comprenden una secuencia que es idéntica en al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a la región correspondiente de la SEC ID N°: 2, como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos que comprenden marcadores de afinidad pueden comprender además un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido IL-21 y el marcador de afinidad. Estos sitios preferidos incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión del factor Xa.

Tabla 3

Sustituciones de aminoácidos conservativas

Básico:	arginina lisina histidina
Ácido:	ácido glutámico ácido aspártico
Polar:	glutamina asparagina
Hidrófobo:	leucina isoleucina valina
Aromático:	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeño:	glicina alanina serina treonina metionina

20 Puede realizarse la determinación de restos de aminoácido que comprenden regiones o dominios que son críticos para mantener la integridad estructural. Dentro de estas regiones, se pueden determinar restos específicos que serán más o menos tolerantes de cambios y mantener la estructura terciaria global de la molécula. Los procedimientos para analizar estructuras de secuencia incluyen, pero sin limitación, alineamiento de múltiples secuencias con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos, tendencias de estructuras secundarias, patrones binarios, empaquetamiento complementario e interacciones polares escondidas (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5:372-376, 1995 y Cordes y col., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones para moléculas o se identifican fragmentos específicos, la determinación de la estructura irá acompañada de la evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

30 Se realizan cambios en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos IL-21 para minimizar la ruptura de la estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el polipéptido IL-21 comprende una o más hélices, se realizarán cambios en los restos de aminoácido para no alterar la geometría de hélices y otros componentes de la molécula, cuando los cambios en la conformación reducen alguna función crítica, por ejemplo, unión de la molécula a sus compañeros de unión, por ejemplo, hélices A y D, restos 44, 47 y 135 de la SEC ID N°: 2. Los efectos de los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden predecirse, por ejemplo, por creación de modelos informáticos como se ha analizado anteriormente o puede determinarse por análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Laphorn y col., Nat. Struct. Biol. 2:266-268, 1995). Otras técnicas que son bien conocidas en este campo comparan el plegamiento de una proteína variante con una molécula convencional (por ejemplo, la proteína nativa). Por ejemplo, puede realizarse la comparación del patrón de cisteínas en una variante y en moléculas convencionales. La espectrometría de masas y la modificación química usando reducción y alquilación proporcionan procedimientos para determinar restos de cisteína que están asociados con puentes disulfuro o están libres de dichas asociaciones (Bean y col., Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993; y Patterson y col., Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994). Generalmente se cree que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón de cisteínas que la molécula convencional resultaría afectado el plegamiento. Otro procedimiento bien conocido y aceptado para medir el plegamiento es el dicroísmo circular (CD). La medición y

comparación de los espectros de CD generados por una molécula modificada y una molécula convencional es rutinaria (Johnson, *Proteins*, 7: 205-214, 1990). La cristalografía es otro procedimiento bien conocido para analizar el plegamiento y la estructura. La resonancia magnética nuclear (RMN), el mapeo de péptidos digestivo y el mapeo de epítopos también son procedimientos conocidos para analizar el plegamiento y la similitudes estructurales entre proteínas y polipéptidos (Schaanan y col., *Science* 257: 961-964, 1992).

Puede generarse un perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la secuencia de la proteína IL-21 como se muestra en la SEC ID N°: 2 (Hopp y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986 y Triquier y col., *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis restos deslizante. Se ignoraron los restos de G, S y T escondidos y los restos de H, Y y W expuestos. Por ejemplo, en IL-21, las regiones hidrófilas incluyen los restos de aminoácido 114-119 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 101-105 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 126-131 de la SEC ID N°: 2, los restos de aminoácido 113-118 de la SEC ID N°: 2 y los restos de aminoácido 158-162 de la SEC ID N°: 2.

Los expertos en la materia reconocerán que la hidrofilia o hidrofobia se tendrá en cuenta cuando se diseñen modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-21, de forma que no se altere el perfil biológico y estructural global. Son de un interés particular para el reemplazo restos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu e Ile o del grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, los restos tolerantes de sustitución podrían incluir los restos 100 y 103 como se muestra en la SEC ID N°: 2. Los restos de cisteína en las posiciones 71, 78, 122 y 125 de la SEC ID N°: 2 serán relativamente intolerantes de sustitución.

Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir del análisis de similitud de secuencia entre IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF con IL-21. Usando procedimientos tales como el análisis "FASTA" descrito previamente, se identifican regiones de alta similitud dentro de una familia de proteínas y se usan para analizar la secuencia de aminoácidos de regiones conservadas. Un enfoque alternativo para identificar un polinucleótido variante de IL-21 basándose en la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen variante de IL-21 potencial puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, como se ha analizado anteriormente.

Otros procedimientos para identificar aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención son procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081 (1989), Bass y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 4498 (1991), Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," en *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En la última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada resto de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se ensayan con respecto a la actividad biológica o bioquímica como se analiza más adelante para identificar restos de aminoácido que sean críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton y col., *J. Biol. Chem.* 271: 4699 (1996).

La presente invención también incluye el uso de moléculas que tienen la actividad funcional de IL-21, como se define en las reivindicaciones. De esta manera, la administración de fragmentos funcionales y polipéptidos modificados funcionales de polipéptidos IL-21 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales y polipéptidos modificados. Una IL-21 "funcional" o fragmento de la misma como se define en el presente documento se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad de inducir o inhibir funciones celulares especializadas, en particular para células efectoras inmunes tales como células NK, linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas. La IL-21 funcional también incluye la capacidad de presentar efectos anticancerosos y antivirales *in vitro* o *in vivo*, o la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-IL-21 o receptor de IL-21 (soluble o inmovilizado). Como se ha descrito previamente en el presente documento, la IL-21 se caracteriza por una estructura de cuatro haces helicoidales que comprende hélice A (restos de aminoácido 41-56), hélice B (restos de aminoácido 69-84), hélice C (restos de aminoácido 92-105) y hélice D (restos de aminoácido 135-148), como se muestra en la SEC ID N°: 2. De esta manera, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que incluyen: (a) moléculas de polipéptido que comprenden una o más de las hélices descritas anteriormente; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. La otra parte polipeptídica de la proteína de fusión puede aportarse por otra citocina de cuatro haces helicoidales tales como IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF, o por un péptido señal de secreción no relacionado y/o no nativo que facilita la secreción de la proteína de fusión.

Pueden realizarse análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-21. Como ilustración, pueden digerirse moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 o fragmentos de la misma, con la nucleasa *Ba131* para obtener una serie de delecciones anidadas. Estos fragmentos de ADN después se insertan en vectores de expresión en la fase de lectura apropiada, y los polipéptidos expresados se aíslan y se ensayan con respecto a la actividad de IL-21, o con respecto a la capacidad de unirse a anticuerpos anti-IL-21 o el receptor $\alpha 11$. Una alternativa a la digestión con exonucleasas en el uso de mutagénesis dirigida a oligonucleótido para introducir delecciones o codones de terminación para la producción específica de un fragmento de IL-21 deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un gen de IL-21 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los procedimientos convencionales para identificar dominios funcionales son bien conocidos por los expertos en la

- materia. Por ejemplo, se han resumido estudios sobre el truncamiento en cualquiera o los dos extremos de interferones por Horisberger y Di Marco *Pharmac. Ther.* 66: 507 (1995). Además, se describen técnicas convencionales para el análisis funcional de proteínas por, por ejemplo, Treuter y col., *Molec. Gen. Genet.* 240: 113 (1993); Content y col., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," en *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIRTNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "the EGF Receptor," en *Control of Animal Cell Proliferation 1*, Boynton y col., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Coumilleau y col., *J. Biol. Chem.* 270: 29270 (1995); Fukunaga y col., *J. Biol. Chem.* 270: 25291 (1995); Yamaguchi y col., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295 (1995); y Meisel y col., *Plant Molec. Biol.* 30: 1 (1996).
- 5 Pueden realizarse múltiples sustituciones de aminoácidos y ensayarse usando procedimientos conocidos de mutagénesis y exploración, tales como los desvelados por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53 (1988)) o Bowie y Sauer (*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 2152 (1989)). En resumen, estos autores desvelan procedimientos para la aleatorización simultánea de dos o más posiciones en un polipéptido, la selección del polipéptido funcional y después la secuenciación de polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles
- 10 en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen presentación en fagos (por ejemplo, Lowman y col., *Biochem.* 30: 10832 (1991), Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.223.409, Huse, publicación internacional N° WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a regiones (Derbyshire y col., *Gene* 46: 145 (1986) y Ner y col., *DNA* 7: 127, (1988)).
- 15 También pueden generarse variantes de las secuencias polipeptídicas y de nucleótidos de IL-21 desveladas mediante barajado de ADN como se desvela por Stemmer, *Nature* 370: 389 (1994), Stemmer, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 10747 (1994) y publicación internacional N° WO 97/20078. En resumen, se generan moléculas de ADN variantes por recombinación homóloga *in vitro* por fragmentación aleatoria de un ADN parental seguido de reensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de moléculas de ADN parentales, tales como variantes alélicas o moléculas
- 20 de ADN de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional al procedimiento. La selección o exploración de la actividad deseada, seguida de iteraciones de mutagénesis y ensayos adicionales proporciona una rápido "desprendimiento" de las secuencias por selección de mutaciones deseables mientras que se selecciona simultáneamente contra los cambios perjudiciales.
- 25 Los procedimientos de mutagénesis desvelados en el presente documento pueden combinarse con procedimientos de exploración automáticos de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados en células huésped. Pueden recuperarse moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos biológicamente activos, o polipéptidos que se unen con anticuerpos anti-IL-21 o el receptor $\alpha 11$ soluble, a partir de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando un equipo moderno. Estos procedimientos permiten la rápida determinación de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden
- 30 aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.
- Además, las proteínas de la presente invención (o fragmentos polipeptídicos de las mismas) pueden unirse a otras moléculas bioactivas, particularmente otras citocinas, para proporcionar moléculas multifuncionales. Por ejemplo, una o más hélices de IL-21 pueden unirse a otras citocinas para aumentar sus propiedades biológicas o
- 35 De esta manera, la presente memoria descriptiva describe una serie de nuevas moléculas híbridas en las que un segmento que comprende una o más de las hélices de IL-21 se fusiona a otro polipéptido. La fusión preferiblemente se realiza por corte y empalme a nivel del ADN para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinantes. Las moléculas resultantes después se ensayan con respecto a propiedades tales como una mejor solubilidad, mejor estabilidad, semivida de eliminación prolongada, mejor expresión y niveles de secreción y farmacodinámica. Dichas moléculas híbridas pueden comprender además otros restos de aminoácido (por
- 40 ejemplo, un engarce polipeptídico) entre las proteínas o polipéptidos componentes.
- Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxioprolina, *trans*-4-hidroxioprolina, N-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperólico, ácido tiazolidina carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios procedimientos para incorporar restos de aminoácido no naturales
- 50 en las proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando ARNt supresores aminoacilados químicamente. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar el ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido típicamente se realiza en un sistema sin célula que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles en el mercado. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson y col., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722 (1991), Ellman y col.; *Methods Enzymol.* 202:301 (1991), Chung y col., *Science* 259:806 (1993) y Chung y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90: 10145 (1993).
- 55 En un segundo procedimiento, la traducción se realiza en oocitos de *Xenopus* por microinyección del ARNm mutado y ARNt supresores aminoacilados químicamente (Turcatti y col., *J. Biol. Chem.* 271: 19991 (1996)). Dentro de un tercer procedimiento, se cultivan células *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que se va a reemplazar (por
- 60

ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos no naturales deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide y col., *Biocheman.* 33: 7470 (1994). Los restos de aminoácido naturales pueden convertirse en especies no naturales por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida para expandir adicionalmente la serie de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2: 395 (1993). Puede ser ventajoso estabilizar IL-21 para prolongar la semivida de la molécula, particularmente para prolongar la persistencia metabólica en un estado activo. Para conseguir una semivida prolongada, las moléculas de IL-21 pueden modificarse químicamente usando procedimientos descritos en el presente documento. La PEGilación es un procedimiento usado comúnmente que se ha demostrado que aumenta la semivida en plasma, aumenta la solubilidad y reduce la antigenicidad e inmunogenicidad (Nucci y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* 6: 133-155, 1991 y Lu y col., *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 127-138, 1994).

Los restos de aminoácido de IL-21 pueden sustituirse por un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no se codifican por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales.

La presente invención también proporciona fragmentos polipeptídicos o péptidos (como se definen en las reivindicaciones) que comprenden una parte que lleva el epítipo de un polipéptido IL-21 descrito en el presente documento. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo inmunogénico", que forma parte de una proteína que induce una respuesta de anticuerpos cuando se usa la proteína entera como inmunógeno. Los péptidos que llevan epítipos inmunogénicos pueden identificarse usando procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Geysen y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81: 3998 (1983)).

Por el contrario, los fragmentos polipeptídicos o péptidos pueden comprender un "epítipo antigénico", que es una región de una molécula de proteína a la que se puede unir específicamente un anticuerpo. Ciertos epítipos consisten en un tramo lineal o contiguo de aminoácidos, y la antigenicidad de dicho epítipo no se altera por agentes desnaturizantes. En la técnica se sabe que pueden usarse péptidos sintéticos relativamente cortos que pueden imitar a los epítipos de una proteína para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe y col., *Science* 219: 660 (1983)). Por consiguiente, los péptidos y polipéptidos que llevan epítipos antigénicos son útiles para inducir anticuerpos que se unen con los polipéptidos descritos en el presente documento. Pueden usarse perfiles de hidrofilia de Hopp/Woods para determinar regiones que tienen el mayor potencial antigénico (Hopp y col., 1981, *ibid.* y Hopp, 1986, *ibid.*). Por ejemplo, en la IL-21 humana, estas regiones incluyen los restos de aminoácido 114-119, 101-105, 126-131, 113-118 y 158-162 de la SEC ID N°: 2.

Los péptidos y polipéptidos que llevan el epítipo antigénico preferentemente contienen al menos de cuatro a diez aminoácidos, al menos de diez a catorce aminoácidos, o de aproximadamente catorce a aproximadamente treinta aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 4. Dichos péptidos y polipéptidos que llevan el epítipo pueden producirse por fragmentación de un polipéptido IL-21, o por síntesis química de péptidos, como se describe en el presente documento. Además, pueden seleccionarse epítipos por presentación en fagos de bibliotecas de péptidos aleatorias (véase, por ejemplo, Lane y Stephen, *Curren. Opin. Immunol.* 5: 268 (1993); y Cortese y col., *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 616 (1996)). Se describen procedimientos convencionales para identificar epítipos y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítipo, por ejemplo, por Mole, "Epitope Mapping," en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter y Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), y Coligan y col. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, páginas 9.3.1 - 9.3.5 y páginas 9.4.1 - 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

Independientemente de la secuencia de nucleótidos particular de un polinucleótido de IL-21 variante, el polinucleótido codifica un polipéptido que se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, su capacidad de inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-IL-21 o receptor α 11. Más específicamente, los polinucleótidos de IL-21 variantes codificarán polipéptidos que presentan al menos un 50 %, y preferentemente más de un 70 %, 80 % o 90 % de la actividad del polipéptido como se muestra en la SEC ID N°: 2.

Para cualquier polipéptido IL-21, incluyendo variantes y proteínas de fusión, un experto en la materia puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica completamente degenerada que codifique esa variante usando el código genético y procedimientos conocidos en la técnica.

La presente memoria descriptiva describe una diversidad de fusiones de polipéptidos distintas (y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos). Por ejemplo, un polipéptido IL-21 puede prepararse como una fusión con una proteína de dimerización como se desvela en las Patentes de Estados Unidos N° 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas de dimerización preferidas a este respecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido IL-21 pueden expresarse en células modificadas por ingeniería genética (para producir una diversidad de análogos multiméricos de IL-21). Pueden fusionarse dominios auxiliares a polipéptidos IL-21 para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicas. Por ejemplo, un polipéptido o proteína IL-21 podría dirigirse a un tipo celular predeterminado por fusión

de un polipéptido IL-21 a un ligando que se une específicamente a un receptor en la superficie de esa célula diana. De esta forma, pueden fijarse como dianas polipéptidos y proteínas para fines de diagnóstico o terapéuticos. Un polipéptido IL-21 puede fusionarse a dos o más restos, tales como un marcador de afinidad para la purificación y un dominio de dirección. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan y col., *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996.

Usando los procedimientos analizados en el presente documento, un experto en la materia puede identificar y/o preparar una diversidad de polipéptidos que tienen identidad de secuencia sustancialmente similar con los restos 1-162 o 33-162 de la SEC ID N°: 2, o fragmentos funcionales y fusiones de los mismos, en los que dichos polipéptidos o fragmentos o fusiones conservan las propiedades de la proteína de tipo silvestre tal como la capacidad de estimular la proliferación, diferenciación, inducir la función celular especializada o unirse al receptor IL-21 o anticuerpos contra IL-21.

Los polipéptidos IL-21 usados en la presente invención pueden producirse en células huésped modificadas por ingeniería genética de acuerdo con técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son los tipos celulares que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y cultivarse, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Se describen técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en una diversidad de células huésped por Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Inc., NY, 1987.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido IL-21 se une operativamente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, que incluyen generalmente un promotor y terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores de selección y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la materia reconocerán que dentro de ciertos sistemas pueden proporcionarse marcadores de selección en vectores separados, y puede proporcionarse la replicación del ADN exógeno por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores de selección, vectores y otros elementos es una materia de diseño rutinario dentro de la experiencia en la técnica. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido IL-21 o un fragmento del mismo a la ruta de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal de secreción puede ser la de IL-21, o puede proceder de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o sintetizarse *de novo*. La secuencia señal de secreción está unida operativamente a la secuencia de ADN de IL-21, es decir, las dos secuencias están unidas en la fase de lectura correcta y colocadas para dirigir el polipéptido recién sintetizado a la ruta de secreción de la célula huésped. Las secuencias señal de secreción comúnmente se colocan en posición 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal de secreción pueden colocarse en otros sitios en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., Patente de Estados Unidos N° 5.037.743; Holland y col., Patente de Estados Unidos N° 5.143.830).

Son huéspedes adecuados dentro de la presente invención células de mamífero cultivadas. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler y col., *Cell* 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973), electroporación (Neumann y col., *EMBO J.* 1: 841-5, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel y col., *ibid.*) y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson y col., *Focus* 15: 73, 1993; Ciccarone y col., *Focus* 15: 80, 1993), y vectores virales (Miller y Rosman, *Bio-Techniques* 7: 980-90, 1989; Wang y Finer, *Nature Med.* 2: 714-6, 1996).

Una amplia diversidad de células huésped recombinantes adecuadas incluye, pero sin limitación, organismos huésped procariotas gram-negativos. Las cepas adecuadas de *E. coli* incluyen W3110, cepas derivadas de K12 MM294, TG-1, JM-107, BL21 y UT5600. Otras cepas adecuadas incluyen: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF, DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, ER1647, *E. coli* K12, *E. coli* K12 RV308, *E. coli* K12 C600, *E. coli* HB101, *E. coli* K12 C600 R.sub.k-M.sub.k-, *E. coli* K12 RR1 (véase, por ejemplo, Brown (ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Otros huéspedes procariotas gram-negativos pueden incluir *Serratia*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*. Los huéspedes procariotas pueden incluir organismos gram-positivos tales como *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, y *B. thuringiensis* var. *israelensis*, así como *Streptomyces*, por ejemplo, *S. lividans*, *S. ambofaciens*, *S. fradiae*, y *S. griseofuscus*. Las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120 y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods," en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (ed.) (IRL Press 1985)). Las técnicas convencionales para propagar vectores en huéspedes procariotas son bien conocidas para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición (John Wiley & Sons 1995); Wu y col., *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, Inc. 1997)). En una realización, los procedimientos de la presente invención usan IL-21 expresada en la cepa W3110, que se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos

Tipo (ATCC) como ATCC N° 27325.

5 Cuando se requiere la producción a gran escala de IL-21 usando el sistema de expresión de la presente invención, puede usarse la fermentación discontinua. En general, la fermentación discontinua comprende una primera fase en la que se prepara un matraz de siembra cultivando cepas de *E. coli* que expresan IL-21 en un medio adecuado en cultivo de matraz de agitación para permitir el crecimiento a una densidad óptica (DO) comprendida entre 5 y 20 a 600 nm. Un medio adecuado contendría nitrógeno de una o más fuentes tales como sulfato amónico, fosfato amónico, cloruro amónico, extracto de levadura, proteínas animales hidrolizadas, proteínas vegetales hidrolizadas o caseínas hidrolizadas. El fosfato se suministrará a partir de fosfato potásico, fosfato amónico, ácido fosfórico o fosfato sódico. Otros componentes serían cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, sulfato ferroso o cloruro ferroso y otros oligoelementos. El medio de crecimiento puede suplementarse con carbohidratos tales como fructosa, glucosa, galactosa y glicerol para mejorar el crecimiento. Como alternativa, se usa un cultivo alimentado para generar un alto rendimiento de proteína IL-21. Las cepas de *E. coli* que producen IL-21 se cultivan en condiciones similares a las descritas para el recipiente de la primera fase usado para inocular una fermentación discontinua.

15 Después de la fermentación, las células se recogen por centrifugación, se resuspenden en tampón de homogeneización y se homogeneizan, por ejemplo, en un homogeneizador APV-Gaulin (Invensys APV, Tonawanda, Nueva York) u otro tipo de equipo de rotura de células, tal como molinos de bolas o sonicadores. Como alternativa, las células se recogen directamente del fermentador y se homogeneizan en un homogeneizador APV-Gaulin. La preparación de cuerpos de inclusión lavada puede solubilizarse usando clorhidrato de guanidina (5-8 M) o urea (7-8 M) que contiene un agente reductor tal como beta mercaptoetanol (10-100 mM) o ditioneitol (5-50 mM). Las soluciones pueden prepararse en Tris, fosfato, HEPES u otros tampones apropiados. Los cuerpos de inclusión también pueden solubilizarse con urea (2-4 M) que contiene lauril sulfato sódico (0,1-2%). En el procedimiento para recuperar IL-21 a partir de cepas huésped de *E. coli* transformadas en las que se acumula IL-21 como cuerpos de inclusión refringentes, las células se rompen y los cuerpos de inclusión se recuperan por centrifugación. Los cuerpos de inclusión después se solubilizan y se desnaturalizan en clorhidrato de guanidina 6 M que contiene un agente reductor. La IL-21 reducida después se oxida en una etapa de renaturalización controlada. La IL-21 replegada puede pasarse a través de un filtro para la clarificación y retirada de la proteína insoluble. La solución después se pasa a través de un filtro para la clarificación y retirada de la proteína insoluble. Después de que la proteína IL-21 se haya replegado y concentrado, la proteína IL-21 replegada se captura en tampón diluido en una columna de intercambio catiónico y se purifica usando cromatografía de interacción hidrófoba.

20 Se prefiere purificar los polipéptidos de la presente invención hasta una pureza ≥ 80 %, más preferentemente hasta una pureza ≥ 90 %, incluso más preferentemente hasta una pureza ≥ 95 %, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, es decir, con una pureza mayor del 99,9 % con respecto a las macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y sin agentes infecciosos y pirogénicos. Preferentemente, un polipéptido purificado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

25 Puede utilizarse una diversidad de ensayos conocidos por los expertos en la materia para detectar anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos IL-21. Se describen ensayos ejemplares con detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ensayo de transferencia puntual (dot blot) o transferencia de Western, inhibición o ensayo competitivo, y ensayo de tipo sándwich. Además, los anticuerpos pueden explorarse con respecto a la unión a la proteína o polipéptido IL-21 de tipo silvestre frente al mutante.

30 La presente invención también contempla el uso de composiciones de IL-21 modificada químicamente, en las que un polipéptido IL-21 está unido a un polímero. Los polipéptidos IL-21 ilustrativos son polipéptidos solubles que carecen de un dominio transmembrana funcional, tales como un polipéptido IL-21 maduro. Típicamente, el polímero es soluble en agua de forma que el conjugado de IL-21 no precipita en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado de manera que tiene un solo grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De este modo, puede controlarse el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es polietilenglicol propionaldehído, o mono-alcoxi (C1-C10), o derivados ariloxi del mismo (véase, por ejemplo Harris, y col., Patente de Estados Unidos N° 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Además, puede usarse una mezcla de polímeros para producir conjugados de IL-21.

35 Los conjugados de IL-21 usados para terapia pueden comprender restos poliméricos solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi (C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidona)PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, *bis*-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. Un PEG adecuado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado de IL-21 también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua.

B. El uso de IL-21 para tratar cáncer

La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que empieza con células madre pluripotentes y termina con células diferenciadas terminalmente. Las células madre pluripotentes que pueden regenerarse sin entregarse a un linaje expresan una serie de marcadores de diferenciación que se pierden cuando se entregan a un linaje celular. Las células progenitoras expresan una serie de marcadores de diferenciación que pueden o no seguir expresándose según progresan las células a la ruta del linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que se expresan exclusivamente por las células maduras normalmente son propiedades funcionales tales como productos celulares, enzimas para producir productos celulares y receptores. La etapa de diferenciación de una población celular se supervisa por la identificación de marcadores presentes en la población celular.

- 5
- 10 Hay indicios que sugieren que factores que estimulan tipos celulares específicos de una ruta hacia la diferenciación o desdiferenciación terminal afectan a la población celular entera que procede de un precursor o célula madre común. De esta manera, la presente invención incluye la estimulación o inhibición de la proliferación de células linfoides, células hematopoyéticas y células epiteliales.

15 IL-21 se aisló a partir de un tejido que se sabe que tiene una función inmunológica importante y que contiene células que intervienen en el sistema inmune. IL-21 se expresa en células de sangre periférica activadas, seleccionadas por CD3+ y se ha mostrado que la expresión de IL-21 aumenta después de la activación de linfocitos T. Además, los resultados de experimentos descritos en la sección de Ejemplos del presente documento sugieren que los polipéptidos de la presente invención tienen un efecto sobre el crecimiento/expansión y/o el estado diferenciado de células NK o los progenitores de NK. Generalmente se conocen factores que estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos y activan las células maduras. Las células NK responden a IL-2 sola, pero la proliferación y activación generalmente requiere factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha mostrado que se requerían IL-7 y el Factor de Steel (ligando de c-kit) para la formación de colonias de progenitores de NK. La IL-15 + IL-2 en combinación con IL-7 y Factor de Steel era más eficaz (Mrózek y col., Blood 87:2632-2640, 1996). Sin embargo, pueden ser necesarias citocinas no identificadas para la proliferación de subseries específicas de células NK y/o progenitores de NK (Robertson y col., Blood 76:2451-2438, 1990). Una composición que comprende IL-21 e IL-15 estimula progenitores de NK y células NK, con indicios de que esta composición es más potente que los factores y combinaciones de factores descritos previamente. Además, la IL-21 promueve la expansión de células NK, y la IL-21 puede superar en gran medida los efectos inhibidores de la IL-4 sobre el crecimiento de células NK, sinérgica con la IL-2 para promover el crecimiento de células NK, y la IL-21 promueve selectivamente la expresión de IFN- γ y reduce la expresión de IL-13. Estos datos sugieren que la IL-21 tiene un papel indirecto en el tratamiento de tumores sólidos, tumores metastásicos y linfomas mediante la estimulación de las células efectoras inmunes dando como resultado una actividad anti-linfoma. Además, para ciertas células cancerosas en las que se expresa el receptor de IL-21, el efecto anticanceroso de IL-21 puede ser directo.

20

25

30

Otros indicios demuestran que la IL-21 afecta a la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T y linfocitos B *in vivo*. Se muestra que la IL-21 puede inhibir o aumentar la proliferación de linfocitos B normales dependiendo de la naturaleza del coestímulo proporcionado en las células. La IL-21 inhibe la proliferación de algunas líneas de linfocitos B, pero no de otras, aunque la mayoría de las líneas celulares no respondedoras expresan IL-21R como se mide por unión específica a IL-21. Muchas líneas de linfocitos B humanos crecerán y matarán ratones SCID Bonnefoix y col., Leukemia and Lymphoma 25: 169-178, 1997). Los ejemplos del presente documento describen tres líneas de linfocitos B que se inhiben por IL-21 y tres líneas de linfocitos B que no responden a IL-21. Todas las líneas celulares eran IL-21R positivas, y se pusieron en ratones SCID para determinar si IL-21 podía prolongar la supervivencia de animales portadores de linfomas. La IL-21 presentaba una eficacia significativa contra las tres líneas celulares cuya proliferación se inhibía *in vitro*. En un experimento separado, la reducción de células NK de los ratones SCID no pudo anular el efecto de IL-21 en el modelo IM-9, lo que sugiere que no se requieren células NK para la eficacia de IL-21 en este modelo.

35

40

45

Los ensayos que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores celulares asociados con la expresión específica de etapa de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; todos incorporados en el presente documento por referencia). Como alternativa, el propio polipéptido IL-21 puede servir como un marcador secretado o de la superficie celular adicional asociado con la expresión específica de etapa de un tejido. Como tal, la medición directa del polipéptido IL-21 o sus receptores expresados en células cancerosas, o su pérdida de expresión en un tejido según se diferencia, puede servir como marcador de diferenciación de tejidos.

50

La clasificación de linfomas usada más comúnmente es el sistema de clasificación REAL (Ottensmeier, Chemo-Biological Interactions 135-136: 653-664, 2001). Se han identificado marcadores inmunológicos específicos para la clasificación de linfomas. Por ejemplo, los marcadores de linfomas foliculares incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5-; los marcadores de linfomas linfocíticos pequeños incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; los marcadores de linfomas de linfocitos B de zona marginal incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD23-; los marcadores de linfomas difusos de linfocitos B grandes incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD23-; los marcadores de linfomas de células del manto incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; los marcadores de linfomas de linfocitos T periféricos incluyen CD20-, CD3+; los marcadores de linfomas mediastinales primarios de linfocitos B grandes incluyen CD20+, CD3-, los marcadores de

55

60

linfomas linfoblásticos incluyen CD20-, CD3+, Tdt+, y los marcadores del linfoma de Burkitt incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5- (Decision Resources, Non-Hodgkins Lymphoma, Waltham, MA., Feb. 2002).

Las muestras de linfomas primarios se adquieren rutinariamente por biopsia de tumores ganglionares o extraganglionares en el diagnóstico de linfomas. Para algunos neoplasmas linfoides, en particular la leucemia linfocítica crónica (LLC), las células malignas pueden adquirirse a partir de la sangre del paciente. Un procedimiento para ensayar si un linfoma o paciente específico es susceptible de tratamiento con IL-21 es cultivar células de linfoma. Pueden prepararse muestras de biopsia o de sangre para el cultivo de tejidos por una combinación de procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las muestras pueden prepararse por trituración, separación con la ayuda de agujas (teasing), digestión enzimática o centrifugación en gradiente de densidad (ficoll) (Jacob y col., Blood 75(5): 1154-1162, 1990). Las células tumorales después se marcan con un colorante fluorescente de ADN tal como succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) y se cultivan en IL-21. La distribución de células tumorales que han experimentado una o más vueltas de división celular puede cuantificarse por citometría de flujo, perdiendo las células la mitad de su intensidad de CFSE con cada vuelta de replicación. También se analizan la proporción de células inviables y el número de células apoptóticas con respecto al efecto de IL-21 usando tinción con 7-AAD y anexina-V. El número de células supervivientes, la distribución de tinción con CFSE y el porcentaje de células que son apoptóticas pueden usarse para determinar si IL-21 promueve o inhibe el crecimiento y la supervivencia de una muestra maligna dada. En dicho análisis, las células de linfoma se distinguen de las células normales que contaminan la muestra por una combinación de un marcador específico de linaje de linfocitos B, anticuerpo específico de cadena ligera lambda y kappa de inmunoglobulina y propiedades de dispersión de luz. Para las muestras de LLC también puede utilizarse tinción con CD5 como ayuda para definir las células malignas. Como la proporción de células que proliferan *in vitro* probablemente será muy baja, es esencial que las células tumorales se distingan de las células normales. Se prefiere un procedimiento de análisis de datos, tal como citometría de flujo, que pueda medir múltiples parámetros en células individuales.

Un procedimiento ejemplar para la determinación de la sensibilidad de un linfoma específico a IL-21 usa biopsias o células sanguíneas cultivadas en medio sin suero o en medio que contiene suero o plasma, preferentemente suero bovino fetal o suero humano, a dosis variables de IL-21, generalmente en un intervalo de 0,1 a 10 nM, e incluyendo un control negativo. A diversos puntos de tiempo, por ejemplo 1, 2, 4 y 7 días, las células se recogen y se someten a procedimientos de citometría de flujo para determinar la distribución de células que se han dividido una o más veces (intensidad de CFSE), la proporción de células inviables (tinción con 7AAD; Hausner y col., J. Immunol. Methods 247 (1-2): 175-186, 2001) y el número de células apoptóticas (tinción con anexina-V; Lagneaux y col., Br. J. Hematol. 112 (2): 344-352, 2001). El número de células supervivientes, la distribución de tinción con CFSE y el porcentaje de células que son apoptóticas pueden usarse para determinar si IL-21 promueve o inhibe el crecimiento y la supervivencia de una muestra maligna dada. En dicho análisis, las células de linfoma se distinguen de las células normales que contaminan la muestra por una combinación de marcadores específicos de linaje de linfocitos B, anticuerpo específico de cadena ligera gamma y kappa de inmunoglobulina y propiedades de dispersión de luz. Para las muestras de LLC también puede utilizarse tinción con CD5 como ayuda para definir las células malignas. Como la proporción de células que proliferan *in vitro* puede ser muy baja, es crítico que las células tumorales se distingan de las células normales en el análisis de datos y ésta es la razón por la que es útil un procedimiento tal como citometría de flujo que puede medir múltiples parámetros en células individuales.

Dicho ensayo de muestras de tumores individuales proporcionará una base para elegir los pacientes con probabilidad de responder a IL-21 favorablemente y los pacientes para los que puede estar contraindicada la IL-21. Los pacientes cuyos linfocitos malignos proliferan más lentamente en respuesta a IL-21 que en cultivos de control o mueren más rápidamente que los cultivos de control se considerarían candidatos para la terapia con IL-21. De forma similar, un paciente cuya velocidad de proliferación o supervivencia de células malignas se aumenta por IL-21 *in vitro*, en general, no sería candidato para la terapia con IL-21 (excepto por lo que se indica más adelante). Una vez que se han acumulado datos que demuestran una fuerte correlación entre un tipo particular de linfoma (por ejemplo, linfoma folicular o LLC) y la sensibilidad a la IL-21 *in vitro*, puede evitarse la necesidad de ensayar todos los pacientes dentro de dicho subgrupo con respecto a su respuesta a IL-21, siempre que no se encuentren pacientes dentro del grupo que presenta una mayor proliferación en respuesta a IL-21 *in vitro*.

De forma similar, la medición directa del polipéptido IL-21, o su pérdida de expresión en un tejido, puede determinarse en un tejido o en células según experimentan progresión tumoral. Los aumentos en la invasividad y motilidad de las células, o el aumento o pérdida de expresión de IL-21 en un estado precanceroso o canceroso, en comparación con el tejido normal, pueden servir como diagnóstico para la transformación, invasión y metástasis en la progresión tumoral. Como tal, el conocimiento del estado de progresión o metástasis de un tumor ayudará al médico a elegir la terapia más apropiada, o la agresividad del tratamiento, para un paciente individual con un cáncer dado. Los procedimientos para medir el aumento y pérdida de expresión (de un ARNm o proteína) son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento y pueden aplicarse a la expresión de IL-21. Por ejemplo, puede usarse la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad celular para ayudar al diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (Banyard, J. y Zetter, B.R., Cancer and Metast. Rev. 17:449-458, 1999). Como un efector de la motilidad celular, el aumento o pérdida de expresión de IL-21 puede servir como diagnóstico para cánceres linfoides.

Como se ha analizado anteriormente, el modelo de ratón IM-9 para cáncer demostró que la actividad antitumoral no es dependiente de células NK. Hay varios modelos de ratón singénico que se han creado para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre la progresión tumoral. En estos modelos, se implantan células tumorales sometidas a pases en cultivo en ratones de la misma cepa que el donante del tumor. Las células desarrollarán tumores con características similares en los ratones receptores, y también se producirá metástasis en algunos de los modelos. Los modelos tumorales apropiados para los estudios de los presentes inventores incluyen el carcinoma de pulmón de Lewis (ATCC N° CRL-1642) y el melanoma B16 (ATCC N° CRL-6323), entre otros. Estas son dos líneas tumorales usadas comúnmente, singénicas para el ratón C57BL6/J, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores resultantes de la implantación de cualquiera de estas líneas celulares pueden producir metástasis en el pulmón en ratones C57BL6/J. El modelo de carcinoma de pulmón de Lewis se ha usado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly MS, y col. Cell 79: 315-328, 1994). Se tratan ratones C57BL6/J con un agente experimental mediante una inyección diaria de proteína recombinante, agonista o antagonista o una inyección de una vez de adenovirus recombinante. Tres días después de este tratamiento, se implantan de 10^5 a 10^6 células por debajo de la piel dorsal. Como alternativa, las propias células pueden infectarse con adenovirus recombinante, tal como el que expresa IL-21, antes de la implantación de forma que la proteína se sintetice en el sitio del tumor o intracelularmente, en lugar de sistémicamente. Los ratones normalmente desarrollan tumores visibles en 5 días. Los tumores se dejan crecer durante un periodo de hasta 3 semanas, durante el cual pueden alcanzar un tamaño de 1500 - 1800 mm³ en el grupo tratado de control. El tamaño del tumor y el peso corporal se supervisan cuidadosamente a lo largo de todo el experimento. En el momento del sacrificio, se retira el tumor y se pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha mostrado que el peso del pulmón se correlaciona bien con la carga tumoral metastásica. Como medida adicional, se cuentan las metástasis de la superficie del pulmón. El tumor resecado, los pulmones y el hígado se preparan para el examen histopatológico, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. De esta manera puede ensayarse la influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo, IL-21, sobre la capacidad del tumor de adquirir sistema vascular y experimentar metástasis. Además, aparte de usar adenovirus, las células implantadas pueden transfectarse de forma transitoria con IL-21. El uso de transfectantes de IL-21 estables así como el uso de promotores inducibles para activar la expresión de IL-21 *in vivo* se conocen en la técnica y pueden usarse en este sistema para evaluar la inducción de metástasis por zcytor17lig. Además, puede inyectarse directamente IL-21 purificado o medio acondicionado de IL-21 en este modelo de ratón, y por lo tanto usarse en este sistema. Como referencia general, véase O'Reilly MS, y col. Cell 79:315-328, 1994; y Rusciano D, y col. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis 14:349-361,1995.

La actividad de IL-21 y sus derivados (conjugados) sobre el crecimiento y diseminación de células tumorales procedentes de malignidades hematológicas humanas puede medirse *in vivo*. Se han creado varios modelos de ratón en los que se implantan células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes (denominados colectivamente modelos de xenoinjerto); véase, por ejemplo Cattan AR, Douglas E, Leuk. Res. 18: 513-22, 1994 y Flavell, DJ, Hematological Oncology 14: 67-82, 1996. Las características del modelo de enfermedad varían con el tipo y cantidad de células administradas al ratón, y en la técnica se conocen varios modelos de enfermedad. En un ejemplo de este modelo, se someterían a pases células tumorales (por ejemplo, células Raji (ATCC N° CCL-86)) en cultivo y se inyectarían aproximadamente 1×10^6 células por vía intravenosa en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Dichas células tumorales proliferan rápidamente dentro del animal y pueden encontrarse circulando en la sangre y poblando numerosos sistemas de órganos. Las terapias diseñadas para destruir o reducir el crecimiento de células tumorales usando IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes pueden ensayarse mediante la administración de compuestos de IL-21 a ratones que llevan las células tumorales. La eficacia del tratamiento se mide y se evalúa estadísticamente como un aumento de la supervivencia dentro de la población tratada con respecto al tiempo. La carga tumoral también puede supervisarse a lo largo del tiempo usando procedimientos bien conocidos tales como citometría de flujo (o PCR) para cuantificar el número de células tumorales presentes en una muestra de sangre periférica. Por ejemplo, las estrategias terapéuticas apropiadas para ensayar dicho modelo incluyen tratamiento directo con IL-21 o conjugados relacionados o toxicidad inducida por anticuerpo basada en la interacción de IL-21 con su receptor o receptores, o para terapias basadas en células, la utilización de IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes. Este último procedimiento, denominado comúnmente inmunoterapia adoptiva, implicaría el tratamiento del animal con componentes del sistema inmune humano (es decir, linfocitos, células NK, médula ósea) y puede incluir incubación *ex vivo* de células con IL-21 con o sin otros agentes inmunomoduladores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

La actividad de IL-21 sobre la destrucción de células tumorales mediada por células inmunes (efectoras) puede medirse *in vivo*, usando la forma murina de la proteína IL-21 (SEC ID N°: 2) en modelos de tumor de ratón singénico. Se han creado varios de estos modelos para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre el crecimiento de células tumorales y la interacción con su huésped natural, y pueden servir como modelos para productos terapéuticos en la enfermedad humana. En estos modelos, se implantan en ratones de la misma cepa que el donante del tumor células tumorales sometidas a pases en cultivo o en ratones. Las células desarrollarán tumores con características similares en el ratón receptor. Por ejemplo, por referencia, véase van Elsas y col., J. Exp. Med. 190: 355-66, 1999; Shrikant y col., Immunity 11: 483-93, 1999; y Shrikant y col., J. Immunol. 162: 2858-66, 1999. Los modelos de tumor apropiados para estudiar la actividad de IL-21 sobre la destrucción de células tumorales mediada por células inmunes (efectoras) incluyen el melanoma B16-F10 (ATCC N° CRL-6457) y el timoma EG.7 (ATCC N° CRL-2113), descritos en el presente documento, entre otros. Estas son dos

líneas de células tumorales usadas comúnmente, singénicas para el ratón C57BL6, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*.

En un ejemplo de un modelo *in vivo*, las células tumorales (por ejemplo, melanoma B16-F10 (ATCC N° CRL-6475) se someten a pases en cultivo y se inyectan aproximadamente 100.000 células por vía intravenosa en ratones C57BL6. En este modo de administración, las células B16-F10 colonizarán selectivamente los pulmones. Se establecen pequeños focos tumorales y se desarrollarán dentro de los pulmones del ratón huésped. Las terapias diseñadas para destruir o reducir el crecimiento de células tumorales usando IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes pueden ensayarse mediante la administración de compuestos a ratones que llevan las células tumorales. La eficacia del tratamiento se mide y se evalúa estadísticamente por cuantificación de la carga tumoral en la población tratada en un punto de tiempo discreto, dos o tres semanas después de la inyección de las células tumorales. Las estrategias terapéuticas apropiadas para el ensayo en dicho modelo incluyen tratamiento directo con IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes, o terapias basadas en células que utilizan IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes. El último procedimiento, denominado comúnmente inmunoterapia adoptiva, implicaría el tratamiento del animal con componentes del sistema inmune (es decir, linfocitos, células NK, células dendríticas o médula ósea o similares) y puede incluir la incubación *ex vivo* de células con IL-21 con o sin otros agentes inmunomoduladores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

Puede usarse otra línea de células tumorales de ratón singénico para ensayar la eficacia anticancerosa de IL-21 y para identificar la población de células inmunes (efectoras) responsables de la mediación de este efecto. EG.7ova es una línea celular de timoma que se ha modificado (transfectado) para expresar ovoalbúmina, un antígeno extraño al huésped. Se dispone de ratones que llevan un receptor de linfocitos T transgénico específico para EG.7ova (transgénicos OT-I, Jackson Laboratory). Se ha demostrado que linfocitos T CD8 aislados a partir de estos animales (linfocitos T OT- I) destruyen las células EG.7 *in vivo* y promueven el rechazo del tumor *in vivo*. Las células EG.7ova pueden someterse a pases en cultivo y pueden inyectarse aproximadamente 1.000.000 células por vía intraperitoneal en ratones C57BL6. Se establecen múltiples sitios tumorales y se desarrollan dentro de la cavidad peritoneal. Las terapias diseñadas para destruir o reducir el crecimiento de células tumorales usando IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes pueden ensayarse mediante la administración de compuestos a ratones que llevan las células tumorales. Pueden administrarse linfocitos T OT-1 a los ratones para determinar si su actividad se aumenta en presencia de IL-21. La eficacia del tratamiento se mide y se evalúa estadísticamente por tiempo de supervivencia en las poblaciones tratadas. Las estrategias terapéuticas apropiadas para el ensayo en tales modelos incluyen el tratamiento directo con IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes, o terapias basadas en células que utilizan IL-21 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes. También podría usarse el tratamiento *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos (CTL) para ensayar la IL-21 en la estrategia basada en células.

El análisis de la eficacia de IL-21 para tratar ciertos tipos específicos de cánceres preferentemente se realiza usando animales que se ha demostrado que se correlacionan con enfermedades de otros mamíferos, particularmente enfermedades humanas. Después de administrar IL-21, en estos modelos se realiza la evaluación de los efectos sobre las células cancerosas o los tumores. Se usan xenoinjertos para la mayor parte del trabajo preclínico, usando ratones inmunodeficientes. Por ejemplo, un modelo de ratón singénico para carcinoma de ovario utiliza una línea celular de carcinoma de ovario murino C57BL6 que sobreexpresa de manera estable la isoforma VEGF16 y un nivel aumentado de proteína fluorescente verde (Zhang y col., *Am. J. Pathol.* 161: 2295-2309, 2002). Se ha mostrado que los modelos de ratón de carcinoma de células renales que usan inyecciones de células Renca establecen tumores metastásicos de células renales que responden al tratamiento con inmunoterapia tal como IL-12 e IL-2 (Wigginton y col., *J. of Nat. Cancer Inst.* 88: 38-43, 1996). Se ha establecido un modelo de ratón de carcinoma colorrectal implantando células MC-26 de tumor de colon de ratón en la subcápsula esplénica de ratones BALB/c (Yao y col., *Cancer Res.* 63 (3): 586-586-592, 2003). Se ha desarrollado un modelo de ratón que responde a la inmunoterapia para el cáncer de mama usando un ratón que desarrolla espontáneamente tumores en la glándula mamaria y demuestra tolerancia periférica y central a MUC1 (Mukherjee y col., *J. Immunotherapy* 26: 47-42, 2003). Para ensayar la eficacia de IL-21 en el cáncer de próstata, se han creado modelos animales que imitan la enfermedad humana. El modelo singénico usado más comúnmente es un adenocarcinoma transgénico del modelo de próstata de ratón (TRAMP) (Kaplan-Lefko y col., *Prostate* 55 (3): 219-237, 2003; Kwon y col., *PNAS* 96: 15074-15079, 1999; Arap y col., *PNAS* 99: 1527-1531, 2002).

La IL-21 será útil en el tratamiento de la tumorigénesis, aumentando la actividad de CTL y NK, y por lo tanto es útil en el tratamiento del cáncer. Además de los efectos directos e indirectos sobre los CTL y células NK, como se muestra en varios modelos tumorales descritos en el presente documento, la IL-21 inhibe la proliferación estimulada por IL-4 de linfocitos B normales estimulados anti-IgM y se observa un efecto similar en líneas tumorales de linfocitos B que sugieren que puede haber un efecto terapéutico beneficioso en el tratamiento de pacientes con la IL-21 para inducir las células tumorales de linfocitos B a un estado menos proliferativo.

El ligando podría administrarse en combinación con otro agente que ya está en uso incluyendo agentes quimioterapéuticos convencionales así como moduladores inmunes tales como interferón alfa. Se ha mostrado que los interferones alfa/beta con eficaces en el tratamiento de algunas leucemias y modelos de enfermedades animales, y los efectos inhibidores del crecimiento del IFN- α e IL-21 son aditivos para al menos una línea celular derivada de

tumores de linfocitos B. El establecimiento del nivel y el programa de dosificación óptimo para IL-21 se realiza por una combinación de medios, que incluyen la farmacocinética y farmacodinámica de IL-21, la sensibilidad de líneas de linfocitos B humanos y muestras de linfoma primario a IL-21 *in vitro*, dosis eficaces en modelos animales y la toxicidad de IL-21. Óptimamente, para tener un efecto antitumoral directo, la concentración de IL-21 en plasma debería alcanzar un nivel que *in vitro* sea máximamente activo contra líneas celulares de linfoma de linfocitos B y linfomas primarios. Además, los tiempos óptimo y mínimo de exposición a IL-21 para inducir una respuesta inhibidora del crecimiento o apoptótica pueden modelarse *in vitro* con líneas celulares y células tumorales primarias. Después, las mediciones farmacocinéticas directas realizadas en primates y ensayos clínicos pueden usarse para predecir dosis teóricas en pacientes que alcanzan niveles plasmáticos de IL-21 que son de suficiente magnitud y duración para conseguir una respuesta biológica en pacientes. Además, la IL-21 estimula una diversidad de respuestas en linfocitos normales, de tal manera que pueden emplearse marcadores sustitutos para medir la actividad biológica de IL-21 en células efectoras en pacientes.

Como los pacientes con linfoma se tratan con una diversidad de fármacos quimioterapéuticos y combinaciones de fármacos, el desarrollo de un protocolo para integrar IL-21 en un régimen de tratamiento convencional existente puede producir un resultado terapéutico mejorado. El efecto de la combinación de fármacos de quimioterapia e IL-21 principalmente se modela con líneas de linfocitos B humanos sensibles a IL-21 *in vitro*, midiendo la proliferación celular, la viabilidad celular y la apoptosis. Se establecen curvas de respuesta dependiente del tiempo y la dosis para los fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, clorambucilo, etopóxido o fludarivina) para líneas celulares individuales. Después se ensaya IL-21 en un amplio intervalo de concentraciones en condiciones subóptimas de cada fármaco de quimioterapia. El orden de exposición de las células a IL-21 frente a un agente de quimioterapia puede afectar significativamente al resultado de la interacción con la línea celular ensayada. Como tal, la IL-21 debe introducirse en los cultivos de varias maneras para encontrar el modo óptimo de tratamiento. Esto debe incluir, por ejemplo, el tratamiento previo con IL-21 durante varias horas a varios días (0, 4, 24, 48 y 72 horas), seguido de una eliminación de IL-21 y la adición de una dosis/tiempo de exposición subóptimo de un fármaco de quimioterapia. Después de 1-3 días, se realiza el análisis del cultivo con respecto a la viabilidad, proliferación y apoptosis celular. En una variación del experimento anterior, la IL-21 no se elimina antes de la adición del fármaco de quimioterapia. La serie completa de condiciones a ensayar también incluiría el tratamiento simultáneo de células con IL-21 y un fármaco de quimioterapia con un tiempo variable de eliminación de IL-21, así como la adición retrasada (de algunas horas a varios días) de IL-21 hasta después de la exposición a un fármaco de quimioterapia. El programa de tiempo y concentración de exposición a IL-21 que proporciona una reducción máxima en el crecimiento/viabilidad de las células diana o un aumento máximo en la respuesta apoptótica entonces se considerará óptimo para un ensayo adicional en modelos animales o el diseño de un protocolo clínico. Podría realizarse la combinación de IL-21 con fármacos quimioterapéuticos *in vitro* usando líneas celulares cuyo crecimiento se estimula por IL-21, tales como RPMI-1788, para identificar fármacos que eliminen los efectos adversos potenciales de la IL-21 que podrían aparecer en una subserie de pacientes. Dichos fármacos se identificarían a partir de los que se sabe que tienen actividad contra linfomas y se seleccionarían basándose en su capacidad *in vitro* de prevenir un aumento del crecimiento y/o supervivencia de RPMI-1788 o líneas celulares que responden a IL-21 de forma similar. De esta manera, la terapia con IL-21, cuando se combina con regímenes quimioterapéuticos seleccionados, sería beneficiosa para los pacientes cuya malignidad es sensible a la supresión del crecimiento mediada por IL-21, y al mismo tiempo protegería a cualquier paciente que pudiera responder de manera desfavorable a la monoterapia con IL-21.

Los pacientes con linfoma también se tratan con agentes biológicos tales como RITUXAN™, IL-2 e interferón. Los agentes biológicos que tienen un efecto inhibitor directo sobre el tumor y ya no dependen en gran medida de las células efectoras para su actividad pueden modelarse de una manera similar a la de los experimentos *in vitro* anteriores para su interacción con IL-21. Por ejemplo, RITUXAN™ se une a células de linfoma y puede inducir la apoptosis directamente *in vitro*, pero también es capaz de inducir una diversidad de mecanismos de efectos tales como citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Por lo tanto, es posible definir condiciones *in vitro* en las que IL-21 y RITUXAN™ interactúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento del linfoma o estimular la apoptosis. El uso de un modelo de linfoma humano xenogénico en ratones SCID proporciona la posibilidad de medir un intervalo más amplio de interacciones potenciales que implican mecanismos efectoras del huésped entre RITUXAN™ (o algún otro agente biológico) e IL-21. Para determinar si hay una sinergia significativa entre IL-21 y otro agente biológico antitumoral en un modelo de ratón SCID de linfoma xenogénico, IL-21 y el otro agente biológico se ensayan en condiciones que producen resultados terapéuticos marginales con cualquier agente solo.

IL-21 e IL-2 presentan sinergia en sus efectos sobre células NK *in vitro* con respecto a la producción de IFN- γ y la proliferación. Además, una terapia de alta dosis de IL-2 es muy tóxica y requiere una hospitalización considerable. Se han ensayado muchos regímenes de baja dosis de IL-2 y se ha descubierto que se toleran bien, pero proporcionan pocos indicios de eficacia antitumoral (Atkins, Semin. Oncol. 29 (3 Suppl. 7): 12, 2002). La combinación de una baja dosis de IL-2 con IL-21, por lo tanto, puede ser clínicamente útil al aumentar la estimulación del sistema inmune por la IL-2 de baja dosis mientras proporciona un efecto antilinfoma directo. Los efectos de la combinación de IL-2 e IL-21 se estudian en modelos de linfoma singénico de ratón o en modelos de linfoma humano xenogénico de ratón SCID como se describe en el presente documento. Los efectos relativos sobre la activación de células efectoras y la toxicidad de la combinación de IL-2 e IL-21 a diferentes dosis pueden

determinarse en primates normales para optimizar el nivel y el programa de dosificación para evitar la necesidad de hospitalizar a los pacientes.

Para los pacientes cuyos linfocitos malignos están estimulados para proliferar *in vitro* en respuesta a IL-21, podría estar contraindicado un curso de IL-21 (en ausencia de combinación con otros fármacos como se ha analizado anteriormente) a menos que las células malignas tengan una velocidad de renovación muy baja *in vivo*, tal como LLC. El estado relativamente quiescente de las células LLC puede estar relacionado con la resistencia de esta enfermedad a la quimioterapia. En dichos casos, los pacientes podrían tratarse con pulsos con IL-21 justo antes de la administración del fármaco o fármacos quimioterapéuticos. El programa de tiempos óptimos de dosificación de IL-21 y quimioterapia podría modelarse *in vitro* para predecir cuanto tiempo después de la exposición a IL-21, las células malignas se vuelven máximamente sensibles a fármacos quimioterapéuticos específicos.

La presente memoria descriptiva describe la reducción de la proliferación de linfocitos B o T neoplásicos, que comprende administrar a un mamífero con un linfoma de linfocitos B o T una cantidad de una composición de IL-21 suficiente para reducir la proliferación de las células de linfoma B o T. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citocina seleccionada entre el grupo que consiste en IL-2, IL-15, IL-4, IL-18, GM-CSF, ligando Flt3, interferón o un factor de células madre.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la reducción de la proliferación de linfocitos B o T neoplásicos, que comprende administrar a un mamífero con un neoplasma de linfocitos B o T una cantidad de una composición de antagonista de IL-21 suficiente para reducir la proliferación de los linfocitos B o T neoplásicos. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-15, IL-4, IL-18, GM-CSF, ligando Flt3, interferón o factor de células madre. Además, el antagonista de IL-21 puede ser una proteína de fusión de ligando/toxina.

Puede emplearse una IL-21-toxina de fusión saporina, u otra fusión de IL-21-toxina, contra una serie similar de leucemias y linfomas, ampliando la gama de leucemias que pueden tratarse con IL-21. Además, dichas fusiones de IL-21-toxina pueden emplearse contra otros cánceres en los que la IL-21 se une a sus receptores. La activación mediada por la toxina de fusión del receptor de IL-21 proporciona dos formas independientes para inhibir el crecimiento de las células diana, siendo la primera idéntica a los efectos observados por el ligando solo, y debiéndose la segunda a la liberación de la toxina a través de la internalización del receptor. El patrón de expresión restringido del receptor de IL-21 sugiere que el conjugado de ligando-saporina puede tolerarse por los pacientes.

Cuando el tratamiento de malignidades incluye médula ósea alogénica o trasplante de células madre, la IL-21 puede ser valiosa para aumentar el efecto del injerto frente al tumor. La IL-21 estimula la generación de células NK líticas a partir de progenitores de médula y estimula la proliferación de linfocitos T después de la activación de los receptores de antígeno. Por lo tanto, cuando los pacientes reciben trasplantes de médula alogénica, la IL-21 aumentará la generación de respuestas anticancerosas, con o sin la infusión de linfocitos del donante.

Los procedimientos modernos para la inmunoterapia del cáncer se basan en el principio de que el sistema inmune puede detectar y defender contra tumores espontáneos. Los indicios que respaldan el concepto de "vigilancia inmunológica" (véase, Burnet FM Lancet 1: 1171-4, 1967) proceden, en parte, de estudios epidemiológicos que indican que la incidencia de cáncer aumenta en pacientes que están inmunocomprometidos por una enfermedad, tal como una infección (véase, Klein G. Harvey Lect. 69: 71-102, 1975; y Kuper y col., J. Intern. Med. 248:171-83, 2000), o después de intervenciones médicas tales como extirpación de médula ósea (véase, Birkeland y col., Lancet 355: 1886-7, 2000; y Penn I, Cancer Detect Prev. 18: 241-52, 1994). Los experimentos realizados en ratones con dirección génica también muestran que el sistema inmune modula la susceptibilidad a tumores espontáneos en ratones de edad avanzada (véase, Smyth, M. y col., J. Exp. Med. 192: 755-760, 2000; y Davidson, W. y col., J. Exp. Med. 187: 1825-1838, 1998) o después de la exposición a carcinógenos químicos (véase, Peng, S y col., J. Exp. Med. 184: 1149-1154, 1996; Kaplan, D. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 7556-7561, 1998; y Shankaran V. y col., Nature 410: 1107-1111, 2001). La prueba de que en huéspedes portadores de tumores se produce frecuentemente el reconocimiento inmune de tumores procede de la identificación de linfocitos T que son reactivos a una amplia serie de antígenos asociados a tumores incluyendo antígenos de diferenciación, antígenos mutacionales, antígenos específicos de tejido, antígenos de cáncer de testículos, autoantígenos que se sobreexpresan en tumores y antígenos virales (Boon T. y col., Immunol. Today 18: 267-8, 1997.). Además, se sabe que los linfocitos B producen altos títulos de anticuerpos IgG circulantes que reconocen estas mismas clases de antígenos tumorales (Stockert E. y col., J. Exp. Med. 187: 1349-54, 1998; Sahin U y col., Curr. Opin. Immunol. 9: 709-16, 1997; y Jager, E. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 97: 12198-12203, 2000), y se han aislado células NK que pueden reconocer y destruir células tumorales que expresan diversos genes relacionados con el estrés (Bauer, S y col., Science 285: 727-729, 1999).

El concepto de que la inmunoterapia puede ser un procedimiento eficaz para tratar cánceres se establece firmemente en modelos animales experimentales, y aunque las metodologías están mucho menos avanzadas para seres humanos, hay fuertes indicios de que el sistema inmune puede estimularse para rechazar la enfermedad establecida. El primer intento en la inmunoterapia del cáncer se notificó por William Coley en 1893 que, usando extractos de bacterias pirogénicas, consiguió respuestas anticancerosas muy probablemente mediante la inducción

de inflamación sistémica e inmunidad mediada por células (Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893, Clin Orthop. 262: 3-11, 1991). En tiempos más modernos se han empleado cinco estrategias generalizadas para aumentar el número de células efectoras y/o modular su actividad anticancerosa (revisado en Rosenberg, SA. (Ed.), Principles and practice of the biologic therapy of cancer., 3ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000): terapia con citocinas, terapia de transferencia celular, terapia con anticuerpos monoclonales, vacunas contra cánceres y terapia génica. Hasta la fecha, cada procedimiento ha mostrado eficacia en la mediación de una respuesta anticancerosa aunque la duración de estas respuestas, con unas pocas excepciones, es principalmente temporal. Este hecho refleja nuestra comprensión limitada de la inmunología tumoral y alega que las mejoras en la tecnología esperan la utilización de elementos no reconocidos previamente de la respuesta anticancerosa. La presente invención proporciona uno de estos elementos para mejorar la comprensión de la inmunología tumoral así como para proporcionar polipéptidos que sean terapéuticamente útiles en el tratamiento y prevención de cánceres humanos.

Un requisito para conseguir inmunidad sostenida y respuestas clínicas duraderas es la amplificación en el nivel, es decir, en los números y actividad de las células que median la destrucción tumoral. De esta manera, los nuevos factores que median sus efectos sobre los linfocitos incluyendo linfocitos T citotóxicos (CTL), células NK y linfocitos B, así como células mieloides tales como neutrófilos y células monocíticas, mejorarán la actividad anticancerosa. La IL-21 es un producto de linfocitos T "auxiliares" CD4+ que se requieren tanto para la inmunidad humoral como para la inmunidad mediada por células y para mantener la memoria a largo plazo para la reexposición al antígeno (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024; Parrish-Novak J y col., Nature 408: 57-63, 2000). El receptor para IL-21 se expresa en células que median respuestas anticancerosas y los experimentos previos han mostrado que la IL-21 puede estimular la proliferación de estos tipos celulares *in vitro* (Publicaciones WIPO de propiedad común Nº WO 01/17235 y WO 01/77171). Otros experimentos afirman estas actividades de IL-21 *in vivo*.

Se muestra que los polipéptidos IL-21 para uso en la presente invención estimulan células CTL y NK contra tumores *in vitro* en modelos animales, dando como resultado la reducción de la carga tumoral y de células tumorales, y un aumento de la supervivencia. Por lo tanto, la IL-21 puede usarse en aplicaciones terapéuticas contra el cáncer en seres humanos. Como tal, la actividad anticancerosa de IL-21 es útil en el tratamiento y prevención de cánceres humanos. Estas indicaciones pueden incluir las siguientes: carcinomas (tejidos epiteliales), sarcomas de tejidos blandos y hueso (tejidos mesodérmicos), Adenomas (tejidos glandulares), cánceres de todos los sistemas de órganos, tales como hígado (hepatoma) y riñón (carcinomas de células renales), SNC (gliomas, neuroblastoma) y cánceres hematológicos, cánceres asociados con virus (por ejemplo, asociado con infecciones retrovirales, VPH, hepatitis B y C, y similares), cánceres de pulmón, cánceres endocrinos, cánceres gastrointestinales (por ejemplo, cáncer del tracto biliar, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de estómago y cáncer colorrectal), cánceres genitourinarios (por ejemplo cáncer de próstata, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales), cánceres ginecológicos (por ejemplo cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de ovario), cáncer de mama y otros cánceres del sistema reproductor, cánceres de cabeza y cuello y otros. Son de un interés particular los cánceres hematopoyéticos, incluyendo pero sin limitación leucemia linfocítica, leucemia mieloide, linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica y otras leucemias y linfomas. Además, la IL-21 puede usarse terapéuticamente en cánceres de diversos estadios no metastásicos así como de estadios metastásicos tales como "Estadio 1" Localizado (limitado al órgano de origen); "Estadio 2" Regional; "Estadio 3" Extensivo y "Estadio 4" Cánceres diseminados ampliamente. Además, la IL-21 puede usarse en diversas aplicaciones para cánceres, inmunoterapia y junto con quimioterapia y similares.

La administración de IL-21 usando la presente invención dará como resultado una respuesta tumoral. Aunque cada protocolo puede definir las evaluaciones de respuesta tumoral de forma diferente, pueden encontrarse pautas ejemplares en Clinical Research Associates Manual, Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, 6 de octubre de 1998, actualizado en agosto de 1999. De acuerdo con el Manual CRA (véase, el capítulo 7 "Response Assessment"), la respuesta tumoral significa una reducción o eliminación de todas las lesiones o metástasis medibles. La enfermedad generalmente se considera medible si comprende lesiones medibles bidimensionalmente con márgenes claramente definidos por fotografía médica o rayos X, tomografía axial computerizada (TAC), imágenes de resonancia magnética (IRM) o palpación. La enfermedad evaluable significa que la enfermedad comprende lesiones medibles unidimensionalmente, masas con márgenes no definidos claramente, lesión con los dos diámetros menores de 0,5 cm, lesiones en exploración con cualquier diámetro menor que la distancia entre los cortes, lesiones palpables con diámetro menor de 2 cm, o enfermedad ósea. La enfermedad no evaluable incluye efusiones pleurales, ascitis y enfermedad documentada por pruebas indirectas. Las lesiones radiadas previamente que no han progresado generalmente también se consideran no evaluables.

Se requieren criterios del estado objetivo para los protocolos para acceder a la respuesta del tumor sólido. Un criterio representativo incluye lo siguiente: (1) Respuesta Completa (RC) definida como desaparición completa de toda la enfermedad medible y evaluable. Sin nuevas lesiones. Sin síntomas relacionados con la enfermedad. Sin pruebas de enfermedad no evaluable; (2) Respuesta Parcial (RP) definida como una reducción mayor o igual al 50% desde el nivel basal en la suma de productos de diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles. Sin progresión de enfermedad evaluable. Sin nuevas lesiones. Se aplica a pacientes con al menos una lesión medible; (3) progresión definida como un 50% o un aumento de 10 cm² en la suma de productos de lesiones medibles con respecto a la menor suma observada usando la misma técnica que en el punto basal, o un claro empeoramiento de cualquier enfermedad evaluable, o reaparición de cualquier lesión que había desaparecido, o aparición de cualquier

nueva lesión, o incapacidad de retorno para la evaluación debido a muerte o a un estado deteriorado (a menos que no esté relacionado con este cáncer); (4) Estable o Sin Respuesta definido como no cualificación para RC, RP o Progresión. (Véase Clinical Research Associates Manual, supra.)

Los ejemplos del uso de IL-21 en el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

- 5 1) La IL-21 puede usarse como un solo agente para la actividad inhibidora directa contra tumores que expresan el receptor de IL-21 (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024; Publicaciones WIPO Nº WO 0/17235 y WO 01/77171). Dicha actividad se muestra en el presente documento. La administración en un vehículo farmacéutico para uso terapéutico puede conseguirse usando procedimientos de la técnica y descritos en el presente documento.
- 10 2) La IL-21 puede conjugarse con un compuesto tóxico que se une y destruye las células tumorales que expresan el receptor de IL-21 tales como linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T y linfomas de células NK. El compuesto tóxico puede ser un fármaco de molécula pequeña tal como caliqueamicina usado de una manera similar al conjugado de anticuerpo anti-CD33 + fármaco, MYLOTARG™, que se usa para tratar la leucemia mielógena aguda (por ejemplo, Véase Sievers EL y col., J Clin Oncol. 19: 3244-54, 2001; y Bernstein ID Clin. Lymphoma Suppl 1: S9-S11, 2002); o un radioisótopo tal como ¹²⁵I (Kaminski MS, y col., J. Clin. Oncol. 19: 3918-28, 2001) o ⁹⁰Y (Revisado en Gordon LI y col., Semin. Oncol. (1 Suppl 2): 87-92, 2002) que se ha unido a un anticuerpo anti-CD20 usado para el tratamiento del linfoma No Hodgkin; o una toxina de proteína natural tal como Ricina A (Lynch TJ Jr, y col., J. Clin. Oncol. 15: 723-34, 1997) o toxina B diftérica que se obtuvo como una proteína de fusión con IL-2 para el tratamiento del linfoma de linfocitos T cutáneo (Talpur R y col., Leuk. Lymphoma 43: 121-6, 2002). La unión de estos compuestos tóxicos a IL-21 podría producirse mediante conjugación química (Rapley R. Mol. Biotechnol. 3: 139-54, 1995) o recombinación genética (Foss FM. Clin. Lymphoma Suppl 1: S27-31, 2000). Se ha mostrado que dichos conjugados de toxina con IL-21, por ejemplo conjugados de IL-21-saporina, destruyen diversos tumores *in vivo* e *in vitro* (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024; y descrito en el presente documento).
- 15 3) La IL-21 puede usarse como un agente inmunoestimulador para la monoterapia del cáncer. Se sabe que una diversidad de citocinas tales como IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15 e interferón estimulan respuestas anticancerosas en modelos animales mediante la estimulación del sistema inmune (revisado en Rosenberg, SA *ibid.*). Además, se muestra que la IL-21 también estimula el sistema inmune (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024; y descrita en el presente documento). La monoterapia con citocinas es una práctica aceptada para pacientes humanos con cáncer. Por ejemplo, la IL-2 y el IFN- α se usan para el tratamiento del melanoma metastásico y el carcinoma de células renales (por ejemplo, véase Atkins MB y col., J. Clin. Oncol. 17: 2105-16, 1999; Fyfe G y col., J. Clin. Oncol. 13: 688-96, 1995; y Jonasch E, y Haluska FG, Oncologist 6: 34-55, 2001). El mecanismo de acción de estas citocinas incluye, pero sin limitación, un aumento de las respuestas Th1 mediadas por células incluyendo destrucción directa de las células tumorales por linfocitos T CD8+ y células NK. Se muestra que la IL-21 aumenta de forma similar las respuestas Th1 mediadas por células incluyendo la destrucción directa de las células tumorales por CTL, por ejemplo, linfocitos T CD8+, y células NK *in vivo* e *in vitro* como se describe en el presente documento. De esta manera, la IL-21 de la presente invención puede usarse terapéutica o clínicamente para destruir activamente células tumorales en la enfermedad humana, y para regular estas actividades, así como en respuestas anticancerosas adicionales.
- 20 4) La IL-21 puede usarse como un agente inmunoestimulador en combinación con quimioterapia, radiación y mieloablación. Además de actuar individualmente para reforzar la inmunidad anticancerosa en pacientes, la IL-21 puede actuar sinérgicamente con tipos convencionales de quimioterapia o radiación. Por ejemplo, en modelos preclínicos de linfoma y carcinoma de células renales, la combinación de IL-2 con doxorubicina (Ehrke MJ y col., Cancer Immunol. Immunother. 42: 221-30, 1996), o las combinaciones de IL-2 (Younes E y col., Cell Immunol. 165: 243-51, 1995) o IFN- α (Nishisaka N y col., Cytokines Cell Mol Ther. 6: 199-206, 2000) con radiación proporcionó resultados superiores con respecto al uso de los agentes individuales. En esta situación, la IL-21 puede reducir adicionalmente la carga tumoral y permitir una destrucción más eficaz por el agente quimioterapéutico. Además, dosis letales de quimioterapia o radiación seguidas de trasplante de médula ósea o reconstitución de células madre podrían reducir la carga tumoral a un nivel suficientemente pequeño (es decir enfermedad mínima residual) para obtener un efecto anticanceroso mediado por IL-21. Los ejemplos de este tipo de régimen de tratamiento incluyen los usos de IL-2 e IFN- α para modificar respuestas anticancerosas después de mieloablación y trasplante (Porrata LF y col., Bone Marrow Transplant. 28: 673-80, 2001; Slavin S, y Nagler A. Cancer J. Sci. Am. Suppl 1: S59-67, 1997; y Fefer A y col., Cancer J. Sci. Am. Suppl 1: S48-53, 1997). En el caso del linfoma y otros cánceres, dependiendo de cuando se use IL-21 con respecto a los agentes quimioterapéuticos, la IL-21 puede emplearse para sinergizar directamente con el agente o agentes quimioterapéuticos los efectos sobre las células tumorales o, como alternativa, puede emplearse después de la quimioterapia para estimular el sistema inmune. Los expertos en la materia diseñarían un protocolo para aprovechar las dos posibilidades.
- 25 5) La IL-21 puede usarse como agente protector de tejidos en combinación con formas convencionales de quimioterapia o procedimientos que extirpan la médula ósea. La IL-21 regula la proliferación y diferenciación de las células. Como resultado, la IL-21 puede proteger diversos tejidos y órganos de las toxicidades asociadas con quimioterapias y radiación usadas comúnmente. Como ejemplo, el epitelio del intestino expresa el receptor de IL-15 y ciertos experimentos en modelos animales muestran que la IL-15

protege el epitelio intestinal de la toxicidad inducida por la quimioterapia y previene la morbilidad (Shinohara H y col., Clin. Cancer Res. 5: 2148-56, 1999; Cao S y col., Cancer Res. 58: 3270-4, 1998; y Cao S y col., Cancer Res. 58: 1695-9, 1998). Además de proteger contra las lesiones, los efectos proliferativos de la IL-21 pueden acelerar la regeneración de tejidos después de una toxicidad inducida por fármacos. Los ejemplos relevantes de este tipo de actividad incluyen la mayor reconstitución del sistema inmune estimulada por IL-7 después de un trasplante de médula ósea (Alpdogan O y col., Blood 98: 2256-65, 2001; y Mackall CL y col., Blood 97: 1491-7, 2001) y el uso de G-CSF para tratar la neutropenia después de una quimioterapia (Lord, BI y col., Clin. Cancer Res. 7: 2085-90, 2001; y Holmes FA y col., J. Clin. Oncol. 20: 727-31, 2002). Como se muestra que la IL-21 aumenta la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfoides, la IL-21 de la presente invención puede usarse terapéutica o clínicamente para ayudar a la recuperación además de mejorar los esquemas de dosificación quimioterapéutica tras la administración de agentes quimioterapéuticos en la enfermedad humana.

6) La IL-21 puede usarse en combinación con otros compuestos inmunomoduladores incluyendo diversas citocinas y moléculas coestimuladoras/inhedoras. La actividad inmunoestimuladora de IL-21 en la mediación de una respuesta anticancerosa puede aumentarse en pacientes cuando la IL-21 se usa con otras clases de moléculas inmunomoduladoras. Éstas podrían incluir, pero sin limitación, el uso de citocinas adicionales. Por ejemplo, el uso combinado de IL-2 e IL-12 muestra efectos beneficiosos en el linfoma de linfocitos T; carcinoma de células escamosas y cáncer de pulmón (Zaki MH y col., J. Invest. Dermatol. 118: 366-71, 2002; Li D y col., Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 127: 1319-24, 2001; e Hiraki A y col., Lung Cancer 35: 329-33, 2002). Además, la IL-21 podría combinarse con reactivos que coestimulan diversas moléculas de la superficie celular encontradas en células efectoras basadas en el sistema inmune, tal como la activación de CD137 (Wilcox RA y col., J. Clin. Invest. 109: 651-9, 2002) o la inhibición de CTLA4 (Chambers CA y col., Ann. Rev. Immunol. 19: 565-94, 2001). Como alternativa, la IL-21 podría usarse con reactivos que inducen la apoptosis de células tumorales por interacción con receptores relacionados con TRAIL (Takeda K y col., J. Exp. Med. 195: 161-9, 2002; y Srivastava RK, Neoplasia 3: 535-46, 2001). Dichos reactivos incluyen el ligando TRAIL, fusiones de ligando TRAIL-Ig, anticuerpos anti-TRAIL y similares.

7) La IL-21 puede usarse en combinación con terapia de anticuerpos monoclonales. El tratamiento del cáncer con anticuerpos monoclonales se está convirtiendo en una práctica convencional para muchos tumores incluyendo el linfoma No Hodgkin (RITUXAN™), formas de leucemia (MYLOTARG™), carcinoma de células de mama (HERCEPTIN™) y carcinoma de colon (ERBITUX™). Un mecanismo mediante el cual los anticuerpos median un efecto anticanceroso es mediante un proceso denominado citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en el que células basadas en el sistema inmune que incluyen células NK, macrófagos y neutrófilos destruyen las células que están unidas al complejo de anticuerpo. Debido a su actividad inmunomoduladora, la IL-21 puede usarse para aumentar la eficacia de la terapia de anticuerpos. Los ejemplos de este tipo de paradigma de tratamiento incluyen el uso combinado de RITUXAN™ e IL-2, IL-12, o IFN- α para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y el linfoma No Hodgkin (Keilholz U y col., Leuk. Lymphoma 35: 641-2., 1999; Ansell SM y col., Blood 99: 67-74, 2002; Carson WE y col., Eur. J. Immunol. 31: 3016-25, 2001; y Sacchi S y col., Haematologica 86: 951-8., 2001). De forma similar, como se muestra que la IL-21 aumenta la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfoides, así como células NK, la IL-21 de la presente invención puede usarse terapéutica o clínicamente para aumentar la actividad y eficacia de la terapia de anticuerpos en la enfermedad humana.

8) La IL-21 puede usarse en combinación con terapia adoptiva de células. Un procedimiento usado para tratar el cáncer es aislar células efectoras anticancerosas directamente a partir de los pacientes, expandirlas en cultivo a números muy altos y después reintroducir estas células de nuevo en los pacientes. El crecimiento de estas células efectoras, que incluye células NK, células LAK y linfocitos T específicos de tumor, requiere citocinas tales como IL-2 (Dudley ME y col., J. Immunother. 24: 363-73, 2001). Dadas sus propiedades estimuladoras del crecimiento sobre los linfocitos, la IL-21 también podría usarse para propagar estas células en cultivo para la reintroducción posterior en pacientes que necesiten dichas células. Después de la transferencia de las células de nuevo a los pacientes, se emplean procedimientos para mantener su viabilidad mediante el tratamiento de los pacientes con citocinas tales como IL-2 (Bear HD y col., Cancer Immunol. Immunother. 50: 269-74, 2001; y Schultze JL y col., Br. J. Haematol. 113: 455-60, 2001). De nuevo, la IL-21 puede usarse después de una terapia adoptiva para aumentar la función y supervivencia de células efectoras.

9) La IL-21 puede usarse en combinación con vacunas para tumores. El objetivo principal de la vacunación contra el cáncer es inducir una respuesta inmune activa contra antígenos expresados por el tumor. Se han empleado numerosos procedimientos para inmunizar pacientes con antígenos de cáncer, y se están usando una diversidad de técnicas para amplificar la intensidad de la respuesta inmune después de la liberación del antígeno (revisado en Rosenberg, SA *ibid*). Los procedimientos en los que la IL-21 puede usarse en combinación con una vacuna para tumores incluyen, pero sin limitación, la liberación de células tumorales autólogas y alogénicas que expresan el gen de IL-21 o en las que se libera IL-21 en el contexto de una proteína adyuvante. De forma similar, la IL-21 puede liberarse en combinación con inyección de una proteína de antígeno tumoral purificada, antígeno tumoral expresado a partir de ADN inyectado o péptidos de antígeno tumoral que se presentan a las células efectoras usando terapias basadas en células dendríticas. Los ejemplos de estos tipos de terapias incluyen el uso de citocinas tales como IL-2 en el contexto de vacunación con células tumorales modificadas (Antonia SJ y col., J. Urol. 167: 1995-2000,

2002; y Schrayner DP y col., Clin. Exp. Metastasis 19: 43-53, 2002), ADN (Niethammer AG y col., Cancer Res. 61: 6178-84, 2001), y células dendríticas (Shimizu K y col., Proc. Nat. Acad. Sci U S A 96: 2268-73, 1999). De forma similar, la IL-21 puede usarse como un adyuvante de vacuna contra el cáncer.

10) La IL-21 puede usarse en el contexto de terapia génica. La terapia génica puede definirse en líneas generales como la transferencia de material genético a una célula para alterar de forma transitoria o permanente el fenotipo celular. Se están desarrollando numerosos procedimientos para la liberación de citocinas, antígenos tumorales y moléculas coestimuladoras adicionales mediante terapia génica en localizaciones específicas dentro de pacientes con tumores (revisado en Rosenberg, SA *ibid*). Estas metodologías podrían adaptarse para usar ADN o ARN de IL-21, o la IL-21 podría usarse como un adyuvante de proteína para aumentar la inmunidad en combinación con un enfoque de terapia génica como se describe en el presente documento.

La distribución tisular de un receptor para una citocina dada ofrece una fuerte indicación de los sitios potenciales de acción de esa citocina. El análisis de Northern del receptor de IL-21 reveló transcritos en bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea y leucocitos de sangre periférica humana. Se identificaron tipos celulares específicos como tipos que expresaban receptores de IL-21, y se observaron señales fuertes en una reacción de linfocitos mixtos (RLM) y en el linfoma de Burkitt Raji. Las dos líneas celulares monocíticas THP-1 (Tsuchiya y col., Int. J. Cancer 26: 171-176, 1980) y U937 (Sundstrom y col., Int. J. Cancer 17: 565-577, 1976), fueron negativas.

El receptor de IL-21 se expresa a niveles relativamente altos en la RLM, en la que se mezclan células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) de dos individuos, dando como resultado una activación mutua. La detección de altos niveles de transcrito en la RLM pero no en las poblaciones de linfocitos T o B en reposo sugiere que la expresión del receptor de IL-21 puede inducirse en uno o más tipos celulares durante la activación. La activación de poblaciones aisladas de linfocitos T y B puede conseguirse artificialmente estimulando las células con PMA e ionomicina. Cuando las células clasificadas se sometieron a estas condiciones de activación, los niveles de transcrito de receptor de IL-21 aumentaron en los dos tipos celulares, confirmando un papel de este receptor e IL-21 en respuestas inmunes, especialmente en expansiones de linfocitos T y B autocrinas y paracrinas durante la activación. La IL-21 también puede jugar un papel en la expansión de progenitores más primitivos implicados en la linfopoyesis.

Se observó que el receptor de IL-21 estaba presente a bajos niveles en células T y B en reposo, y se regulaba positivamente durante la activación en los dos tipos celulares. De forma interesante, los linfocitos B también regulan negativamente el mensajero más rápidamente que los linfocitos T, lo que sugiere que la amplitud de la señal y el momento de inactivación de la señal son importantes para la regulación apropiada de las respuestas de linfocitos B.

La IL-21 conjuntamente con IL-15 expande las células NK a partir de los progenitores de médula ósea y aumenta la función efectora de las células NK. La IL-21 también coestimula linfocitos B maduros estimulados con anticuerpos anti-CD40, pero inhibe la proliferación de linfocitos B frente a señales mediante IgM. La IL-21 aumenta la proliferación de linfocitos T junto con una señal mediante el receptor de linfocitos T, y la sobreexpresión en ratones transgénicos conduce a linfopenia y una expansión de monocitos y granulocitos, como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos y proteínas IL-21 también pueden usarse *ex vivo*, tal como en un cultivo de médula autólogo. En resumen, se retira médula ósea de un paciente antes de la quimioterapia o trasplante de órganos y se trata con IL-21, opcionalmente en combinación con una o más citocinas adicionales. La médula tratada después se devuelve al paciente después de la quimioterapia para acelerar la recuperación de la médula o después del trasplante para suprimir la enfermedad de injerto contra huésped. Además, las proteínas de la presente invención también pueden usarse para la expansión *ex vivo* de células progenitoras de sangre periférica (PBPC) o de médula. Antes del tratamiento, la médula puede estimularse con factor de células madre (SCF) para liberar las células progenitoras en sus primeras fases en la circulación periférica. Estos progenitores pueden recogerse y concentrarse a partir de sangre periférica y después tratarse en cultivo con IL-21, opcionalmente en combinación con una o más citocinas adicionales, incluyendo pero sin limitación SCF, IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-18 o interferón, para diferenciar y proliferar cultivos linfoides de alta densidad, que después pueden devolverse al paciente después de la quimioterapia o trasplante.

La presente memoria descriptiva describe la expansión de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de IL-21 suficiente para producir un aumento en el número de células linfoides en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con las células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia de IL-21. En otras realizaciones, las células hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, las células linfoides son células NK o linfocitos T citotóxicos. Además, la composición también puede comprender al menos otra citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando Flt3 y factor de célula madre.

Para uso farmacéutico, las proteínas de la presente invención se formulan para administración parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, de acuerdo con procedimientos convencionales. El polipéptido bioactivo o conjugados con anticuerpos descritos en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa,

intraarterial o intraductal, o pueden introducirse localmente en el sitio de acción deseado. La administración intravenosa será mediante una inyección en embolada o infusión durante un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína IL-21 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para prevenir la pérdida de proteína en superficies de los viales, etc. Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª ed., 1995. Las dosis terapéuticas generalmente estarán en el intervalo de 0,1 a 100 µg/kg de peso del paciente al día, preferentemente de 0,5 a 20 µg/kg al día, determinándose la dosis exacta por el médico de acuerdo con patrones aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad de la afección a tratar, características del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Las proteínas pueden administrarse para el tratamiento agudo durante una semana o menos, con frecuencia durante un periodo de uno a tres días, o pueden usarse en el tratamiento crónico, durante varios meses o años.

La presente memoria descriptiva describe composiciones de IL-21 modificadas químicamente, en las que un polipéptido de IL-21 está unido a un polímero. Los polipéptidos de IL-21 ilustrativos son polipéptidos solubles que carecen de un dominio transmembrana funcional, tal como un polipéptido de IL-21 maduro. Típicamente, el polímero es soluble en agua de forma que el conjugado de IL-21 no precipite en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para tener un solo grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De esta manera puede controlarse el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es polietilenglicol propionaldehído o mono-alcoxi (C1-C10) o derivados ariloxi del mismo (véase, por ejemplo, Harris, y col., Patente de Estados Unidos 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Además, puede usarse una mezcla de polímeros para producir conjugados de IL-21.

Los conjugados de IL-21 usados para terapia pueden comprender restos de polímeros solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi (C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidona)PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. El PEG adecuado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado de IL-21 también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua.

La PEGilación de IL-21 puede realizarse por cualquier de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan y Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 (1994), y Francis y col., Int J Hematol 68: 1 (1998)).

La presente invención contempla el tratamiento de cánceres usando composiciones que comprenden un polipéptido de IL-21 o un polipéptido como se define en las reivindicaciones. Dichas composiciones pueden comprender además un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

IL-21 de ratón está activa en ensayo de médula ósea de ratón

A. Aislamiento de células de médula de baja densidad no adherentes:

Se obtuvieron aspirados de fémur de ratón nuevos (médula) de ratones de 6-10 semanas de edad macho Balb/C o C57BL/6. La médula se lavó después con RPMI+FBS al 10 % (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) y se suspendió en RPMI+FBS al 10 % como una suspensión de células de médula completa. La suspensión de células de médula completa se sometió después a un gradiente de densidad (Nycoprep, 1,077, Animal; Gibco BRL) para enriquecer con respecto a células de baja densidad, principalmente mononucleares, como sigue: La suspensión de células de médula completa (aproximadamente 8 ml) se pipeteó cuidadosamente sobre aproximadamente 5 ml de solución de gradiente de Nycoprep en un tubo cónico de 15 ml y después se centrifugó a 600 X g durante 20 minutos. La capa de interfaz, que contenía las células mononucleares de baja densidad, se retiró después, se lavó con RPMI+FBS al 10 % en exceso, y se sedimentó por centrifugación a 400 X g durante 5-10 minutos. Este sedimento se resuspendió en RPMI+FBS 10 % y se sembró en un matraz T-75 a aproximadamente 10⁶ células/ml y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante aproximadamente 2 horas. Las células resultantes en suspensión fueron Células de Médula de Baja Densidad No Adherentes (NA LD).

B. Ensayo de 96 pocillos

Se sembraron Células de Médula de Ratón NA LD de 25.000 a 45.000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en RPMI+FBS 10 % + Factor de Células Madre de ratón 1 ng/ml (mSCF) (R&D Systems, Minneapolis, MN), más medio acondicionado 5 % de uno de los siguientes: (1) células BHK 570 que expresan IL-21 de ratón (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024), (2) células BHK 570 que expresan IL-21 humana (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024) o (3) células BHK 570 de control que contienen vector y no expresan ningún ligando. Estas células se sometieron después a una diversidad de tratamientos con citocina para ensayar con respecto a expansión o diferenciación de células hematopoyéticas de la médula ósea. Para ensayar, las células de médula de ratón NA LD sembradas se sometieron a Interleucina-15 humana (hIL-15) (R&D Systems) o una de un panel de otras citocinas (R&D Systems). Se ensayaron diluciones en serie de hIL-15, o las otras citocinas, con dilución seriada 2 veces de aproximadamente de 50 ng/ml hasta aproximadamente 6025 ng/ml de concentración. Después de 8 a 12 días los ensayos de 96 pocillos se puntuaron con respecto a proliferación celular por ensayo de azul de Alamar como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024.

C. Resultados del ensayo de médula de ratón NA LD de 96 pocillos

Los medios condicionados de las células BHK que expresaban IL-21 tanto humana como de ratón actuaron de forma sinérgica con hIL-15 para promover la expansión de una población de células hematopoyéticas en la médula de ratón NA LD. Esta expansión de células hematopoyéticas no se mostró con medio condicionado de BHK de control más IL-15. La población de células hematopoyéticas se expandió por la IL-21 de ratón con hIL-15, y las células hematopoyéticas expandidas por la IL-21 humana con hIL-15, se propagaron adicionalmente en cultivo celular. Estas células hematopoyéticas se tiñeron con un anticuerpo anti-linfocitos Pan NK marcados con Ficoeritrina (Pharmingen) y se sometieron a análisis de citometría de flujo, que demostró que las células expandidas se tiñían de forma positiva para este marcador de linfocito citolítico natural (NK).

El mismo ensayo de 96 pocillos se procesó, usando células de médula humanas nuevas compradas de Poietic Technologies, Gaithersburg, MD. De nuevo, junto con IL-15, la IL-21 humana y de ratón expandió una población de células hematopoyéticas que se tiñeron positivamente para el marcador de linfocitos NK usando el anticuerpo desvelado anteriormente.

Ejemplo 2

Ratones transgénicos con IL-21

A. Generación de ratones transgénicos que expresan IL-21 humana y de ratón

Se prepararon fragmentos de ADN de vectores transgénicos (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024) que contenían secuencias flanqueantes 5' y 3' del promotor respectivo (promotor específico de hígado MT-1) (IL-21 de ratón (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.042)) o promotor de LCK específico linfoide (IL-21 humano y de ratón (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.042)), el intrón de insulina de rata II, ADNc de IL-21 y la secuencia de poli A de la hormona del crecimiento humana y se usaron para microinyección en oocitos murinos B6C3f1 fertilizados (Taconic, Germantown, NY), usando un protocolo de microinyección convencional. Véase, Hogan, B. y col., Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Se identificaron ocho ratones transgénicos que expresaban IL-21 humana a partir del promotor de E μ LCK específico linfoide entre 44 crías. Cuatro de éstas fueron crías que murieron y 4 llegaron a la adultez. Los niveles de expresión fueron bastante bajos en estos animales. Se identificaron veinte ratones transgénicos que expresaban IL-21 de ratón del promotor E μ LCK específico linfoide entre 77 crías. Los 20 llegaron a la adultez. Los niveles de expresión fueron bastante bajos en estos animales. Se identificaron tres ratones transgénicos que expresaban IL-21 de ratón a partir del promotor MT-1 específico de hígado entre 60 crías. Dos de estas crías murieron y 1 llegó a la adultez. Los niveles expresión fueron bastante bajos en estos animales. Se prepararon tejidos y se examinaron histológicamente como se describe posteriormente.

B. Evaluación microscópica de tejidos de ratones transgénicos

Se recogieron bazo, timo y ganglios linfáticos mesentéricos y se prepararon para examinación histológica a partir de animales transgénicos que expresaban IL-21 humano y de ratón (Ejemplo 2A). Otros tejidos que se recogieron de forma rutinaria incluían los siguientes: Hígado, corazón, pulmón, riñón, piel, glándula mamaria, páncreas, estómago, intestino delgado y grueso, cerebro, glándula salivar, tráquea, esófago, glándula suprarrenal, hipófisis, tracto reproductor, glándulas sexuales masculinas accesorias, músculo esquelético incluyendo nervios periféricos, y fémur con médula ósea. Los tejidos se recogieron de una cría neonatal que murió inesperadamente, y varios ratones transgénicos adultos, como se describe posteriormente. Las muestras se fijaron en formalina tamponada al 10 %, se procesaron de forma rutinaria, se incluyeron en parafina, se seccionaron a 5 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los portaobjetos se examinaron y se puntuaron con respecto a gravedad de cambios tisulares (0=ninguno, 1=leve, 2=moderado, 3=grave) por un patólogo veterinario acreditado ciego al tratamiento.

La cría y los 2 ratones adultos hembra que expresaban la IL-21 humana, y 3 de los 6 ratones adultos macho que

expresaban la IL-21 de ratón mostraron infiltraciones inflamatorias en muchos de los tejidos examinados. Los órganos afectados variaron en cierta medida entre ratones. La infiltración inflamatoria estaba compuesta principalmente de neutrófilos y macrófagos en diversos números y proporciones y fue generalmente de gravedad de grado leve a moderado. Además, estos animales mostraron cambios en órganos linfoides, incluyendo linfopenia de moderada a grave en el bazo y el timo (transgénicos de IL-21 humana y de ratón); y linfopenia grave (transgénicos de IL-21 humana) o purulenta de leve a grave para linfadenitis piogranulomatosa (transgénicos de IL-21 de ratón) en ganglios linfáticos. Además, fue manifiesto un aumento de hematopoyesis extramedular en los bazos. Estos cambios no se observaron en ratones de control de edad coincidente.

C. Análisis citométrico de flujo de tejidos de ratones transgénicos que sobreexpresan IL-21

- 10 Los animales transgénicos que sobreexpresaban ligando zalfa11 de ratón o humano (Ejemplo 2A) se sacrificaron para análisis de citometría de flujo de sangre periférica, timo, ganglio linfático, médula ósea y bazo.

Se realizaron suspensiones celulares a partir de bazo, timo y ganglios linfáticos separando el órgano con fórceps en medio de cultivo helado (500 ml de Medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS); 5 ml de L-glutamina 100x (Gibco BRL, Grand Island, NY); 5 ml de Piruvato Sódico 100x (Gibco BRL); 5 ml de Penicilina 100X, Estreptomicina, Neomicina (PSN) (Gibco BRL) y pasando suavemente las células a través de un filtro celular (Falcon, VWR Seattle, WA). Se recogió sangre periférica (200 ml) en tubos heparinizados y se diluyó a 10 ml con HBSS que contenía 10 U de Heparina/ml. Los eritrocitos se retiraron del bazo y las preparaciones de sangre periférica por lisis hipotónica. Se realizaron suspensiones celulares de médula ósea lavando abundantemente la médula de fémures con medio de cultivo helado. Las células se contaron y se ensayaron con respecto a viabilidad usando Azul de Tripano (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Las células se resuspendieron en medio de tinción helado (HBSS, suero bovino fetal al 1 %, azida sódica 0,1 %) a una concentración de diez millones por mililitro. Se consiguió bloqueo del receptor de Fc y unión no específica de anticuerpo a las células añadiendo suero de cabra normal 10 % y Fc Block (PharMingen, La Jolla, CA) a la suspensión celular.

Las suspensiones celulares se mezclaron con volúmenes iguales de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo (PharMingen), se incubaron en hielo durante 60 minutos y después se lavaron dos veces con tampón de lavado helado (PBS, suero bovino fetal 1 %, azida sódica 0,1 %) antes de resuspender en 400 ml de tampón de lavado que contenía 7-AAD 1 mg/ml (Molecular Probes, Eugene, OR) como un marcador de viabilidad en algunas muestras. Se adquirieron datos de flujo en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, San José, CA). Se realizaron tanto adquisición como análisis usando software CellQuest (BD Immunocytometry Systems).

Los animales transgénicos que expresaban la IL-21 humana o de ratón a los mayores niveles tenían poblaciones celulares drásticamente alteradas en todos los órganos linfoides analizados. Los cambios vistos incluían pérdida completa de celularidad tímica, ausencia completa de linfocitos B positivos para CD45R y tamaño aumentado y celularidad de bazos. Tanto el bazo como la médula ósea tuvieron mayores números de células de tamaño mielóide, lo que se explicaba por aumentos tantos de monocitos como de neutrófilos. El marcador de linfocitos pan NK (DX5) aumentó en muchas poblaciones. Los fundadores que se expresaban de forma moderada tuvieron cambios menos drásticos pero aún significativos coherentes con el fenotipo visto en los de expresión alta. Los ratones con el menor nivel de expresión no tuvieron un aumento significativo de células mieloides ni reducción de los números de linfocitos B. Estos mostraron cambios significativos en las poblaciones de timocitos con reducciones de células dobles positivas CD4+CD8+ y aumentos de células positivas sencillas tanto para CD4 como para CD8.

Ejemplo 3

Proteína humana recombinante purificada IL-21

Estudio de respuesta a dosis en ratones normales

A. Sumario

45 Se trataron ratones hembra de seis semanas de edad normales C57Bl/6 (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) por inyección intraperitoneal una vez al día durante cuatro u ocho días con uno de cuatro niveles de dosis de IL-21 humana purificada recombinante (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) a 0,1, 0,5, 5 o 50 µg/ratón/día o con vehículo como un control. Los pesos corporales y las temperaturas corporales se controlaron diariamente. El día cuatro o el día nueve, se sacrificaron cuatro de los ocho ratones de cada grupo de tratamiento con proteínas y cinco de los diez ratones del grupo de control de vehículo. Se recogió sangre, médula ósea y tejidos y se analizaron. Se examinaron perturbaciones potenciales en los tejidos linfoides, así como parámetros fisiológicos y toxicológicos generales.

No hubo pruebas de toxicidad de la proteína IL-21 humana a ninguna de las dosis ensayadas. Los pesos y temperaturas corporales no cambiaron. No hubo cambios evidentes de los parámetros químicos clínicos. Sin embargo, hubo hallazgos coherentes en relación con porcentajes aumentados de células de linaje mielóide en médula ósea, bazo y sangre periférica en ratones tratados con la dosis más alta de IL-21 en comparación con el control de vehículo. Hubo un aumento estadísticamente significativo de las células de tamaño de linaje mielóide

identificadas por análisis de citometría de flujo de homogeneizado de bazo en el grupo de dosis alta. Los bazos de los dos grupos de dosis más alta fueron estadísticamente significativamente mayores que los otros grupos. En el examen histopatológico, sin embargo, solo se vio un aumento marginal de la hematopoyesis extramedular en el grupo de dosis más alta. Hubo un aumento estadísticamente significativo en la relación de mieloides a eritroides de la médula ósea en el grupo de dosis más alta en comparación con los otros grupos. Finalmente, hubo aumentos vistos en la sangre periférica tanto en conteos de glóbulos blancos totales como en el porcentaje de monocitos del mismo grupo.

B. Preparación de solución de dosificación

Se diluyó IL-21 humana recombinante purificada (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024) en solución salina tamponada con fosfato estéril (GibcoBRL, Grand Island, NY) a concentraciones para suministrar 50, 5, 0,5 o 0,1 microgramos de proteína en 0,1 ml de vehículo de PBS. Las dosis para los primeros cuatro días se realizaron el día 0 y se congelaron en un congelador a -20 °C antes de su uso. Las dosis durante los días cinco a ocho se realizaron el día cinco y se congelaron como anteriormente. Se congelaron alícuotas del mismo PBS de forma similar para el grupo de control tratado con vehículo. El día de la administración las alícuotas apropiadas se descongelaron y se inyectó 0,1 ml de solución por vía intraperitoneal al ratón cada día durante cuatro u ocho días.

C. Diseño del estudio

Los ratones tenían seis semanas de edad al comienzo del estudio. Cada grupo de tratamiento consistía en ocho ratones, excepto para el grupo de control de vehículo que incluía diez ratones. La mitad de los ratones de cada grupo de tratamiento se sacrificó después de cuatro días de tratamiento y la otra mitad después de ocho días.

Antes del tratamiento cada día, cada ratón se pesó y su temperatura corporal se registró usando el Sistema de Ordenador Portátil Programable (BMDS, Inc, Maywood, NJ), explorando el ratón con respecto al número de identificación y temperatura corporal de transpondedores implantados por vía subcutánea (IPTT-100, BMDS, Maywood, NJ).

En el sacrificio, los tejidos recogidos para evaluar poblaciones de glóbulos blancos por análisis de citometría de flujo incluían médula ósea, timo y bazo. El análisis de FACS de los órganos linfoides y médula ósea se realizó con el FACS-Calibur (Becton Dickinson, Mansfield, MA). Los tejidos recogidos para examen histológico con respecto a señales de toxicidad de la proteína incluyeron: bazo, timo, hígado, riñón, glándula suprarrenal, corazón y pulmones. Todos los tejidos fijados para histología se mantuvieron a 4 °C durante una noche en Solución Salina Tamponada Normal 10 % (NBF) (Surgipath, Richmond, IL). Al día siguiente la NBF se reemplazó con 70 % de etanol y los tejidos se devolvieron a 4 °C hasta su procesamiento para histología.

Los tejidos se procesaron y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina de forma interna, después se enviaron a un patólogo contratado para análisis histopatológico. Se recogió sangre para conteos de células sanguíneas completos (CBC) y perfiles de química del suero. Los CBC se analizaron de forma interna con el Analizador de Hematología Cell Dyn 3500 Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, IL) y los conteos de glóbulos blancos diferenciales manuales se analizaron en Phoenix Central Laboratory, (Everett, WA). El suero se mantuvo congelado a -20 °C hasta su presentación a Phoenix Central Laboratory para paneles de química de suero completos. Para evaluar las relaciones de mieloides:eritroides, la médula ósea de un fémur se aplicó a portaobjetos CytoSpin (CYTOSPIN 3 CYTOCENTRIFUGE y CYTO SLIDES, Shandon, Pittsburgh,PA) y se enviaron a Phoenix Central Laboratories para análisis.

D. Resultados del estudio

No hubo indicios clínicos evidentes de efectos fisiológicos o de toxicidad de IL-21 humana a dosis de 50 µg/día o menores. Los pesos corporales y temperaturas permanecieron normales durante el transcurso de los tratamientos. Los parámetros de química del suero estuvieron en intervalos normales. Los conteos de plaquetas y glóbulos rojos parecían normales. En los ratones que recibieron 50 µg/día durante 8 días, los conteos de glóbulos blancos diferenciales manuales mostraron que el porcentaje de monocitos era elevado en la sangre periférica y un aumento evidente de los conteos de glóbulos blancos totales. En médula ósea extraída de un fémur, las relaciones de mieloides y eritroides aumentaron en el grupo de dosis de 50 µg y en menor grado el grupo de dosis de 5 µg a partir del conjunto de dosis de 8 días. En una comparación de columna múltiple no paramétrica usando InStat (InStat MAC; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), esta diferencia fue estadísticamente significativa (p= 0,0049). La diferencia entre el grupo de dosis más alta y el vehículo también fue significativa (p= 0,0286). El aumento de glóbulos blancos en la sangre periférica y el aumento significativo de precursores mieloides en la médula pueden por lo tanto estar relacionados.

La evaluación histológica de los siguientes tejidos no mostró pruebas evidentes de cambios citológicos o estructurales, acontecimientos mitóticos o necrosis: timo, hígado, riñón, glándula suprarrenal, duodeno, páncreas, yeyuno, ciego, colon, ganglios linfáticos mesentéricos, útero, ovario, glándula salivar, corazón, traquea, pulmón y cerebro. No hubo diferencias evidentes entre los grupos de tratamiento en los pesos del timo, riñón, hígado o cerebro. De todos los tejidos examinados, solo los pesos del bazo se vieron significativamente afectados.

El peso del bazo de cada ratón se normalizó con el peso de su cerebro. En el grupo de tratamiento de 50 µg/día en comparación con los grupos de tratamiento con vehículo, 0,1 µg y 0,5 µg, la media de los pesos de los bazos fue casi 50 % mayor después de cuatro días de tratamiento y casi 100 % después de ocho días que los pesos medios de los bazos de los otros tres grupos. En el conjunto de cuatro días, el grupo de 5 µg/día también tendía a tener bazos mayores que el control y grupos de dosis baja. La diferencia en los pesos del cerebro/bazo con datos de los conjuntos de cuatro días y ocho días combinados por grupos de tratamiento fue estadísticamente significativa (p = 0,0072) por ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, ensayo de comparación de columna múltiple usando el programa InStat (GraphPad Software).

Se vio un aumento marginal de hematopoyesis extramedular, especialmente en la médula roja en bazos de ratones del grupo de dosis más alta, incluso en los ratones tratados durante cuatro días. Los análisis citométricos de flujo de los bazos mostraron un aumento significativo de la proporción de células de tamaño mielóide en el grupo de dosis más alta (p= 0,01, ensayo de t Student), lo que representa aumentos tanto en monocitos como en neutrófilos. Este efecto puede relacionarse con el aumento del porcentaje de células mononucleares de sangre periférica, así como el aumento evidente de precursores mieloides en la médula ósea, descrito anteriormente. Además, los ratones transgénicos derivados de inserción del gen zalfa11 humano tenían hematopoyesis extramedular aumentada en sus bazos en comparación con crías de la misma camada no transgénicas.

Se observaron varios cambios en el grupo de dosis de 50 µg por día en comparación con el grupo de control que implican el IL-21 en la producción o desarrollo de células del linaje mielóide. Tomados juntos, los cambios observados sugieren que zalfa11 puede ser útil como una proteína terapéutica en tales especialidades médicas como trastornos inmunológicos y cáncer descritos en el presente documento.

Ejemplo 4

Eliminación preliminar y estudio de distribución tisular de proteína IL-2 humana recombinante purificada

A. Sumario

Para dilucidar la distribución tisular y patrones de eliminación de la rhIL-21 purificada, se realizó un estudio farmacocinético preliminar. Se proporcionó a ratones de nueve semanas de edad macho C57Bl/6 proteína IL-21 humana recombinante purificada marcada con ¹¹¹Indio (¹¹¹In) (NEN, Boston, MA) por una de tres vías. Se proporcionó una inyección de embolada sencilla a cada ratón por vía intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC). Los ratones inyectados por la vía subcutánea o intraperitoneal se sacrificaron a las una o las tres horas después de la inyección. Los ratones inyectados por vía intravenosa se sacrificaron después de diez minutos o una hora después de la inyección. Se recogieron sangre, plasma y tejidos seleccionados en diversos puntos temporales y se contaron por un contador gamma para estimar la semivida aproximada y distribución tisular de la proteína marcada exógena. Los tejidos que se recogieron para conteo así como los intervalos de sacrificio se seleccionaron basándose en informes de la distribución de otras citocinas marcadas con radionúclidos.

En el sacrificio, los tejidos recogidos para conteo de radiactividad incluyeron timo, bazo, riñón, un lóbulo del hígado, un lóbulo del pulmón y vejiga urinaria. En el grupo que recibió la inyección por vía intraperitoneal, también se contó el intestino para evaluar la incidencia de inyección en el intestino, y en los ratones dosificados por vía subcutánea, se contó la piel con estructuras subyacentes en el área de inyección. La cpm para hígado completo y pulmón se calculó a partir de una sección que se contó y un porcentaje del peso del órgano completo representado por la sección.

Después del final del estudio los tejidos recogidos, sangre completa y plasma se contaron en un contador gamma COBRA II AUTO-GAMMA® (Packard Instrument Company, Meriden, CT). También se contó una alícuota de la solución de dosificación marcada original al final del estudio con los tejidos. Esto permitió el cálculo del porcentaje total de radiactividad inyectada para cada ratón y la corrección simultánea de todas las cuentas para desintegración radioactiva. Las aproximaciones de volumen de sangre restante y pesos de los órganos indicaron que la mayoría de las cuentas administradas estaban explicadas, y por lo tanto el porcentaje de cuentas por tejido era una representación razonable de la distribución de las cuentas después de administración de IL-21 marcada por cada vía.

B. Marcaje con ¹¹¹Indio de IL-21

Se conjugó IL-21 humana recombinante purificada (Patente de Estados Unidos Nº 6.307.024) con un exceso molar 10 veces de DTPA (Pierce, Rockford, Il) incubando a 30 minutos a temperatura ambiente en PBS. Se retiraron los hidrolizados y DTPA que no han reaccionado por intercambio de tampón en un Biomax-5k NMWL (Ultrafree-15, Millipore, Bedford, MA). El pico de proteína de volumen hueco se concentró a 5 mg/ml y se tomó una alícuota para ensayar en un bioensayo (estimulación anti-CD40 de linfocitos B murinos (Ejemplo 10)). Tras confirmar que el conjugado de DTPA aún tenía la bioactividad completa el conjugado se diluyó a 0,5 mg/ml con acetato sódico 1 M pH 6,0. Se recogieron dos mCi de ¹¹¹Indio en 0,5 ml de acetato sódico 1 M pH 6,0 y se mezclaron con la IL-21 humana-DTPA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el ¹¹¹Indio no incorporado durante el intercambio de tampón a PBS en una columna PD-10 (Pharmacia, Piscataway, NJ). El material radiomarcado se

diluyó con IL-21 humana no marcada para proporcionar una actividad específica de 100 mCi/mg, se esterilizó por filtración y se almacenó a 4 °C durante una noche. Se retuvo el 100 % de la proteína marcada en una membrana Biomax-5k NMWL (Millipore). Se administró IL-21 humana marcada con ¹¹¹In a ratones en los estudios de eliminación y farmacocinética. Se administraron 50 µg de proteína IL-21 humana marcada con 5 µCi de IL-21 humana marcada en 0,1 ml de vehículo de PBS a cada animal.

C. Resultados de estudio de distribución preliminar

Después de una y tres horas tras la administración por las tres vías, se encontró la mayor concentración de IL-21 humana-¹¹¹In en el riñón y la segunda mayor estaba en orina y vejiga urinaria, como se demuestra porque estos tejidos tienen la mayor cpm. Las cuentas medias recuperadas de riñones fueron de 3 a 8 veces mayores que las cuentas de hígado completas, dependiendo de la vía de inyección y el punto temporal de sacrificio. Por ejemplo, la cpm de riñón media a los 60 minutos después de la inyección IV fue de 4,5 veces mayor que las cuentas medias calculadas para hígado completo del mismo grupo. En el grupo que se sacrificó 10 minutos después de la administración intravenosa, la cpm más alta estuvo de nuevo en el riñón, y la segunda acumulación más alta fue equivalente en el hígado, vejiga urinaria y orina.

D. Estudio farmacocinético preliminar

Se realizaron recogidas de sangre y plasma a los 10, 30 y 60 minutos después de la inyección por las tres vías. Después de la inyección por la vía IV, se tomaron muestras de sangre y plasma de un conjunto separado de ratones a los dos, cinco y diez minutos. Se tomaron muestras de sangre de otro conjunto de ratones que recibieron sus inyecciones por vía IP o SC a las una, dos y tres horas. Para los grupos de tratamiento véase Tabla 4. Los tiempos de recogida cortos agrupan la semivida indicada de IL-2 después de inyección intravenosa. La T½ presentada estaba en el intervalo de 2,5 a 5,1 minutos. Para referencia a administración *in vivo* a IL-2, véase Donohue JH y Rosenberg SA J Immunol, 130: 2203, 1983. Los puntos temporales largos se seleccionaron para perfilar la fase de eliminación anticipada.

Tabla 4

Vía de inyección	Tiempos de Extracción de Sangre (minutos)	Tiempo de Sacrificio
Grupo Intravenoso 1	2, 5, 10	10 min.
Grupo Intravenoso 2	10, 30, 60	60 min.
Grupo Intraperitoneal 1	10, 30, 60	60 min.
Grupo Intraperitoneal 2	60, 120, 180	180 min.
Grupo Subcutáneo 1	10, 30, 60	60 min.
Grupo Subcutáneo 2	60, 120, 180	180 min.

Se ha mostrado que IL-2 no marcada se elimina del suero con una semivida de aproximadamente tres minutos en ratones después de inyección IV. Para referencia véase Donahue, JH y Rosenberg mencionado anteriormente. Después de inyección IP y SC de cantidades similares de IL-2, la duración de persistencia de actividad IL-2 en suero se prolongó de 2 unidades/ml durante menos de 30 minutos después de inyección IV a más de 2 unidades/ml durante 2 horas después de IP y 6 horas después de inyección SC. La vía principal de eliminación de IL-2 parece ser el riñón. Se ha mostrado que IL-21 es estructuralmente similar a IL-2, como se analiza en el presente documento. La evaluación preliminar de la eliminación de IL-21 parece ser coherente con la eliminación evidente de IL-2 por los riñones, basándose en la acumulación de cpm predominantemente en los riñones, seguido de la vejiga urinaria y la orina en el presente estudio.

Se realizaron estimaciones de parámetros farmacocinéticos basándose en análisis no compartimental de los datos de cpm obtenidos del plasma, usando el programa de análisis de PK WinNonLin, Versión 1,1, (Scientific Consulting Inc., Cary, NC). Las semividas en plasma de IL-21 se estimaron usando las constantes de tasa de eliminación terminal predichas para administración intravenosa, subcutánea e intraperitoneal de una dosis de 50 µg. Los resultados farmacocinéticos fueron estimaciones debido a puntos de datos limitados en la región de eliminación terminal de los perfiles de concentración de plasma frente al tiempo. Además, el ajuste de la fase de eliminación terminal para dosificación SC e IP requirió el uso de datos de puntos temporales durante los que aparentemente aún se producía absorción de la IL-21 humana-¹¹¹In. Sin embargo, las estimaciones de las semividas después de dosificación intravenosa, subcutánea e intraperitoneal fueron 13,6 minutos, 18,8 minutos y 34,3 minutos, respectivamente. Puesto que no se evaluó un intervalo de dosificación, no fue evidente si se estaba produciendo eliminación saturable o activa (cinética de Michaelis-Menten). Por lo tanto, estos cálculos de semividas son estimaciones.

Se realizaron estimaciones de la biodisponibilidad de la proteína marcada basándose en el área bajo la curva (AUC) después de dosificación subcutánea o intraperitoneal en comparación con la de dosificación intravenosa. La biodisponibilidad estimada después de inyección subcutánea e intraperitoneal fue 35,8 % y 63,9 % respectivamente. Debido a que se estudió solamente una dosis proteica, la biodisponibilidad no se evaluó en función de la dosis. La

eliminación estimada y el volumen de distribución (basándose en los datos de la inyección intravenosa) fueron 0,48 ml/min y 6,1 ml, respectivamente.

Aunque los datos son preliminares, el destino de IL-21 administrada IV fue similar al notificado para IL-2, otra citocina de 4 haces de hélice (Donahue, JH y Rosenberg, SA mencionado anteriormente). Como IL-2, IL-21 administrada IV tuvo una semivida en plasma de solamente minutos con la eliminación principal en el riñón. Tres horas después de la inyección, la mayoría del material marcado extraído del riñón aun se conservaba en una membrana Biomax 5K NMLW (Millipore). Puesto que se ha notificado previamente que el indio permanece asociado a la proteína incluso durante la degradación lisosomal (Staud, F. y col., J. Pharm. Sciences 88: 577-585, 1999) IL-21 se acumula y puede degradarse en el riñón. El presente estudio también mostró, como se observa con muchas otras proteínas, incluyendo IL-2 (Donahue, JH y Rosenberg, SA, mencionado anteriormente.), que la administración IP y SC prolongó significativamente los niveles en plasma de IL-21.

Ejemplo 5

Aislamiento y expansión de fracción CD34+ de MNC de médula ósea humana nuevas usando IL-21 para evaluación de la actividad de NK

15 A. Selección y aislamiento de células CD34+ de médula ósea humana

Se prepararon células mononucleares de médula ósea humana nuevas (MNC) para enriquecer con respecto a células que tuvieran actividad de linfocitos NK. Las MNC humanas nuevas se obtuvieron de Poetic Technologies (Gaithersburg, MD). Se añadieron 10 ml de MEM alfa (JRH, Lenexa, KS) que contenía HIA FBS 10 % (Hyclone, Logan, UT) y el antibiótico PSN 1 % (Gibco, BRL, Grand Island, NY) a la suspensión celular y las células se pasaron a través de un tamiz de 100 µm. Las células se contaron después, se sedimentaron, se lavaron con 10 ml de PBS que contenía FBS al 2 %, después se sedimentaron de nuevo y se resuspendieron en 1 ml de PBS que contenía FBS al 2 %. Las células que tenían un marcador de superficie celular CD34 (células CD34+) se separaron de forma magnética usando un kit Detachabead con Dynabeads M-450 CD34 (Dyna, Oslo, Noruega), según las instrucciones del fabricante. Las fracciones tanto de células CD34+ como las de células CD34- se analizaron adicionalmente a continuación.

B. Expansión de células CD34+ usando IL-21

Se sembró una fracción de células CD34+ en una placa de 24 pocillos. Se sembraron 50.000 células seleccionadas de forma positiva suspendidas en 1 ml de MEM Alfa (JRH) que contenía HIA FBS 10 % (Hyclone) y PSN 1 % (Gibco/BRL), más las diversas citocinas descritas posteriormente en cada uno de los 4 pocillos (1-4). Se usaron diversos reactivos para ensayar con respecto a expansión inducida por IL-21 de las MNC de médula ósea seleccionadas CD34+: los reactivos incluían flt3 humana (R&D, Minneapolis, MN); IL-21 humana purificada (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024); IL-15 humana (R&D). Los reactivos se combinaron como sigue el día 0: en el pocillo N° 1, se añadió flt3 humana 2 ng/ml. En el pocillo N° 2, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml e IL-21 humana purificada 15 ng/ml. En el pocillo N° 3, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml e IL-15 humana 20 ng/ml. En el pocillo N° 4, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml, IL-21 humana purificada 15 ng/ml e IL-15 humana 20 ng/ml. Después de incubar durante 18 días, las células de suspensión de cada pocillo se sedimentaron y se resuspendieron después en 0,5 ml de MEM Alfa (JRH) que contenía HIA FBS 10 % (Hyclone) y PSN 1 % (Gibco/BRL) y se contaron para evaluar la proliferación de la fracción de células CD34+. Se vio un nivel bajo de proliferación en presencia de flt3 solo (pocillo de control N° 1), pero la presencia de IL-15 o IL-21 además de flt3 no tuvo efecto significativo en la expansión (pocillos N° 2 y N° 3). Sin embargo, la expansión más allá del control de flt3 resultó evidente en el pocillo N° 4 que contenía IL-15 e IL-21 además de flt3. Este resultado sugirió que IL-21 e IL-15 actúan de forma sinérgica para expandir la población de células CD34+ humanas. Además, los resultados de este experimento apoyaron los resultados vistos con la IL-21 de ratón en el ensayo de BM de ratón (Ejemplo 1).

Todas las poblaciones celulares se ensayaron después con respecto a actividad de NK y se sometieron a análisis de citometría de flujo, como se muestra posteriormente (Ejemplo 7).

C. Expansión de células CD34+ o CD34- usando IL-21 con adición retardada de IL-15

Se sembraron por separado fracciones tanto positivas como negativas (CD34-) para CD34 en seis pocillos de placa de 12 pocillos (1-6). Cada uno de los seis pocillos contenía 100.000 células seleccionadas de forma positiva o negativa en 2 ml de MEM alfa que contenía HIA FBS 10 % y PSN, descrito anteriormente. Los reactivos usados fueron como se ha descrito anteriormente. En el pocillo n° 1, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml el día 0. En el pocillo n° 2, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml el día 0, y después de 5 días de incubación se añadió IL15 humana 20 ng/ml. En el pocillo n° 3, se añadieron añadió flt3 humana 2 ng/ml e IL-21 humana 15 ng/ml el día 0. En el pocillo n° 4, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml e IL-21 humana 15 ng/ml el día 0 y después de 5 días de incubación se añadió IL15 humana 20 ng/ml. En el pocillo n° 5, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml e IL15 humana 20 ng/ml el día 0. En el pocillo n° 6, se añadieron flt3 humana 2 ng/ml, IL-21 humana 15 ng/ml e IL15 humana 20 ng/ml el día 0. Después de incubar durante un total de 15 días desde el inicio del experimento, las células de cada pocillo se recogieron y contaron.

En la población CD34+ se vio un nivel bajo de proliferación en presencia de flt3 sola (pocillo de control nº 1), pero la presencia de IL-15 o IL-21 añadida el día 0 además de flt3 no tuvo efecto significativo en la expansión (pocillos, nº 3 y nº 5). La adición de IL-15 después de 5 días tuvo algo de efecto proliferativo en comparación con el control de flt3 (pocillo nº 2, en comparación con el pocillo nº 1) y un efecto proliferativo en presencia de zalfa11 (pocillo nº 4 en comparación con el pocillo nº 3). Sin embargo, la mayor expansión fue evidente en el pocillo nº 6 que contenía IL-15 e IL-21 además de flt3 el día 0.

En la población CD34-, no se vio proliferación en presencia de flt3 sola (pocillo de control nº 1) y de hecho resultó evidente una reducción de la población celular. La presencia de zalfa11 añadida el día 0 además de flt3 (pocillo nº 3) fue similar al control de flt3. La presencia de IL-15 añadida el día 5 aumentó el efecto de proliferación de las células en presencia (pocillo nº 4) o ausencia (pocillo nº 2) de IL-21. De nuevo, la mayor expansión fue evidente en el pocillo nº 6 que contenía IL-15 e IL-21 además de flt3 el día 0.

Todas las poblaciones celulares se ensayaron después con respecto a actividad NK y se sometieron a análisis de FACS, como se muestra posteriormente (Ejemplo 7).

Ejemplo 6

15 Aislamiento y expansión de células de ratón nuevas usando IL-21 humana y de ratón para evaluación de actividad de NK y marcadores de linfocitos NK

A. Aislamiento y expansión de células de médula ósea de baja densidad de ratón nuevas usando IL-21 humana y de ratón

Se aislaron células de médula de ratón nuevas por recorte en ambos extremos de los fémures de ratón y lavando con dos o tres mililitros de medio de crecimiento (véase posteriormente) a través del interior del hueso a un tubo de recogida. El medio de crecimiento fue 500 ml de Medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS); 5 ml de L-glutamina 100x (Gibco BRL, Grand Island, NY); 5 ml de Piruvato Sódico 100x (Gibco BRL); 5 ml de Penicilina 100X, Estreptomicina, Neomicina (PSN) (Gibco BRL); y 50 ml de Suero Bovino Fetal inactivado por calor (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Las células de médula se rompieron después por pipeteo del medio arriba y abajo varias veces. Las células se sedimentaron después y se lavaron una vez con medio de crecimiento y se pasaron a través de un tamiz de 70 micrómetros. Las células mononucleares de baja densidad se aislaron después sometiendo a las células de médula a un gradiente de densidad. Las células de médula en cinco a ocho mililitros de medio de crecimiento se pipetearon cuidadosamente sobre de cinco a ocho mililitros de NycoPrep 1.077 Animal (Nycomed, Oslo, Noruega) en un tubo de centrífuga. Este gradiente se centrifugó después a 600 X g durante 20 minutos. Las células mononucleares de baja densidad se recogieron de la capa de interfaz entre NycoPrep y el medio. Estas células se diluyeron después a aproximadamente 20 mililitros en medio de crecimiento, se sedimentaron y se lavaron. Las células se sembraron después a aproximadamente $0,5-1,5 \times 10^6$ células por mililitro en medio de crecimiento en un matraz de cultivo tisular convencional y se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % durante dos horas.

Las células de médula de baja densidad no adherentes (NA LD) se recogieron después y se sembraron a $0,5-2,0 \times 10^5$ células por mililitro en medio de crecimiento más 2,5 nanogramos por mililitro de flt3 de ratón (R and D Systems, Minneapolis, MN) más 25 a 50 nanogramos por mililitro de interleucina humana 15 (IL-15) (R and D Systems) con o sin 50 a 150 nanogramos por mililitro de IL-21 humana; o con o sin de 0,12 a 10 nanogramos por mililitro de IL-21 de ratón.

No hubo expansión significativa sin la adición de la IL-21 humana o de ratón. Se expandieron células no adherentes en los cultivos que contenían IL-21 de ratón tan baja como 0,12 ng/ml y en los cultivos que contenían IL-21 tan baja como 22 ng/ml. En los cultivos que contenían la IL-21 tanto humana como de ratón, aumentó la expansión de células no adherentes con aumento de la dosis de IL-21, con la respuesta de saturación de ligando de ratón a aproximadamente 5-10 ng/ml y no alcanzando el humano una respuesta de saturación incluso a la dosis más alta de 200 ng/ml. IL-21 humana parecía ser aproximadamente de 20 a 100 veces menos potente en células de ratón que la IL-21 de ratón. Después de aproximadamente cinco a diez días las células de ratón expandidas con IL-21 se recogieron y se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson, Mansfield, MA) para determinar qué porcentaje de ellas eran positivas para antígenos de linfocitos NK, en las que el 46 % eran positivas para el marcador Pan linfocitos NK DX5 (Pharmingen).

B. Aislamiento y expansión de células de médula de ratón empobrecidas de linaje nuevo

50 Se aislaron células de médula empobrecidas de linaje de ratón nuevo (lin-) de células de médula de ratón nuevas incubando primero las células con los siguientes anticuerpos: TER119, Gr-1, B220, MAC-1, CD3e e I-Ab (Pharmingen, San Diego, CA). Las células lin+ se retiraron después con IgG anti-rata de oveja M-450 Dynabeads (Dyna, Lake Success, NY) según las instrucciones del fabricante.

55 Las células de médula lin- seleccionadas de forma negativa se sembraron después en placas como anteriormente en medio de crecimiento más flt3 2,5 ng/ml (R&D Systems) e IL-15 25 ng/ml (R&D Systems); o flt3, IL-15 e IL-21 de ratón, medio acondicionado para IL-21 de ratón BHK de 2 a 5 %. Después de seis días de crecimiento, los cultivos se recogieron, contaron y sometieron a un ensayo de actividad de linfocitos NK (Ejemplo 7). Las células cultivadas

con IL-21 de ratón fueron de aproximadamente dos a tres veces más eficaces en la lisis de células diana de linfocitos NK (células YAC-1) que las células cultivadas sin IL-21.

C. Aislamiento y expansión de timocitos CD4- CD8- (Doble negativo o DN)

5 Se aislaron timocitos de ratón nuevos cortando y tamizando timos de ratones de tres a ocho semanas de edad. Las células CD4- CD8- (DN) se seleccionaron de forma negativa después incubando los timocitos con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (PharMingen), retirando después las células CD4+ CD8+ con IgG anti-rata de oveja M-450 Dynabeads (Dyna) según las instrucciones del fabricante.

10 Se dejaron crecer después los timocitos de ratón DN en medio de crecimiento más flt3 2,5 ng/ml (R&D Systems), IL-15 25 ng/ml (R&D Systems) e IL-7 10 ng/ml (R&D Systems) con o sin IL-21 de ratón como anteriormente. Seis días después las células se recogieron, contaron, analizaron por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente, y también se sometieron a un ensayo de actividad de linfocitos NK (Ejemplo 7).

15 El cultivo cultivado con IL-21 de ratón produjo aproximadamente 480.000 células mientras que el cultivo sin IL-21 produjo solamente aproximadamente 160.000 células. Se descubrió que el cultivo cultivado con IL-21 era aproximadamente 16,2 % positivo para el antígeno de linfocitos NK Pan NK, DX5 (PharMingen). El cultivo crecido sin IL-21 fue 14,6 % positivo para DX5. Las células cultivadas con IL-21 lisaron células diana de linfocitos NK, YAC-1, aproximadamente dos veces mejor que las células cultivadas sin IL-21. Las células expandidas no lisaron significativamente una línea celular diana de control negativo, EL4. Estos resultados sugirieron que IL-21 expande selectivamente linfocitos NK líticos.

Ejemplo 7

20 Actividad de células expandidas con IL-21 humanas y de ratón y linfocitos NK murinos maduros en ensayos de citotoxicidad de linfocitos NK

A. Ensayo de linfocitos NK

25 Se examinó la citólisis de diana mediada por linfocitos NK por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional. Las células diana (células K562 (ATCC N° CCL-243)) en ensayos humanos y células YAC-1 (ATCC N° TIB-160) en ensayos de ratón carecen de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), haciéndolas susceptibles a lisis mediada por linfocitos NK. Una línea celular de control negativo en ensayos de ratón es la EL4 de timoma MHC⁺ (ATCC N° TIB-39). Los inventores cultivaron células K562, EL4 y YAC-1 en medio RP10 (RPMI 1640 convencional (GibcoBRL, Grand Island, NY) complementado con FBS 10 % (Hyclone, Logan, UT), así como glutamina 4 mM (GibcoBRL), penicilina +100 I.U./ml + estreptomycin 100 MCG/ml (GibcoBRL), β-mercaptoetanol 50 μM (Gibco/BRL) y tampón HEPES 10mM (GibcoBRL). El día del ensayo, se recogieron 1-2x10⁶ células diana y se resuspendieron a 2,5-5x10⁶ células/ml en medio RP10. Los inventores añadieron 50-100 μl de cromato sódico-⁵¹Cr 5 mCi/ml (NEN, Boston, MA) directamente a las células y las incubaron durante 1 hora a 37 °C, después las lavaron dos veces con 12 ml de PBS y las resuspendieron en 2 ml de medio RP10. Después de contar las células en un hemacitómetro, las células diana se diluyeron a 0,5-1x10⁵ células/ml y se mezclaron 100 μl (0,5-1x10⁴ células) con células efectoras como se describe posteriormente.

35 En ensayos humanos, se prepararon células efectoras a partir de células BM CD34⁺ humanas expandidas y seleccionadas (Ejemplo 5B) que se recogieron, lavaron, contaron, mezclaron a diversas concentraciones con células diana marcadas con ⁵¹Cr en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después de co-incubación de las células efectoras y las células diana marcadas, la mitad del sobrenadante de cada pocillo se recogió y se contó en un contador gamma durante 1 min/muestra. El porcentaje de liberación de ⁵¹Cr específico se calculó a partir de la fórmula 100 x (X-Y)/(Z-Y), en la que X es la liberación de ⁵¹Cr en presencia de células efectoras, Y es la liberación espontánea en ausencia de efectores y Z es la liberación de ⁵¹Cr total a partir de células diana incubadas con Tritón X-100 0,5 %. Los datos se representaron como el % de lisis específica frente a la relación de efector y diana en cada pocillo.

45 B. Actividad de células expandidas con IL-21 humana

HPC humanas CD34⁺ aisladas cultivadas con flt3 +/- IL-21 y flt3 +IL-15 +/- IL-21 (Ejemplo 5), se recogieron las células el día 15 para evaluar su capacidad para lisar K562 MHC- en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional como se ha descrito anteriormente, y para analizar su fenotipo superficial por citometría de flujo. Como se esperaba a partir de informes anteriores (Mrozek, E y col., Blood 87: 2632-2640, 1996; y Yu, H y col., Blood 92: 3647-3657, 1998), la adición simultánea de IL-15 y flt3L indujo el crecimiento de una población pequeña de células CD56⁺. Resulta interesante que, aunque las células BM cultivadas simultáneamente con IL-21 y flt3L no se expandieron significativamente, hubo un aumento significativo de los números de células totales en cultivos que contienen una combinación de flt3L, IL-21 y IL-15 (véase, Ejemplo 5).

55 Para una evaluación del fenotipo superficial de estos cultivos de BM humanos, los inventores tiñeron pequeñas alícuotas de las células para análisis citométrico de flujo de 3 colores con mAb anti-CD3-FITC, anti-CD56-PE y anti-CD16-CyChrome (todos de PharMingen, San Diego, CA) y los analizaron en un FACSCalibur usando software

CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Este análisis citométrico de flujo confirmó que las células que crecían de estos cultivos eran linfocitos NK diferenciados, puesto que eran grandes y granulares y expresaban tanto CD56 como CD16, y eran CD3⁻ (Lanier, LL Annu. Rev. Immunol. 16: 359-393, 1998). Además, estas células mostraron función efectora significativamente más alta que las células cultivadas con IL-15 y flt3. Más específicamente, las células cultivadas en las tres citocinas lisaron más del 40 % de las dianas K562 a una relación de efector y diana (E:T) de 1,5, mientras que las células cultivadas en IL-15+flt3L lisaron menos del 5 % de las dianas a una E:T de 2. Estos datos demuestran que, en combinación con IL-15, IL-21 estimula la diferenciación de linfocitos NK a partir de células BM CD34⁺.

C. Actividad de células expansores de IL-21 de ratón

10 Para ensayar los efectos de IL-21 en células progenitoras hematopoyéticas murinas, se expandieron células de médula ósea negativas para Linaje purificado (Lin⁻) a partir de ratones C57B1/6 en flt3+IL-15+/- IL-21, como se describe en el Ejemplo 6B. El día 6 de cultivo, las células ("efectoras") se recogieron y contaron, después se resuspendieron en 0,4 ml de RP10 (Ejemplo 7A). Se diluyeron dos alícuotas (0,15 ml cada una) de cada muestra expandida con o sin IL-21 (Ejemplo 7A) de forma seriada 3 veces por duplicado en placas de fondo redondo de 96 pocillos, para un total de 6 pocillos de 100 µl cada uno. Los 100 µl restantes de células se tiñeron con respecto a marcadores de superficie celular NK con mAb FITC-anti-2B4 y PE-anti-DX5 (PharMingen) y se analizaron por citometría de flujo. Cada grupo de células expuesto a flt3+IL-15 con o sin la presencia de IL-21 tuvo fracciones similares de células 2B4+DX5⁺, que variaban de 65 a 75 % positivas para ambos marcadores NK.

15 Para el ensayo de lisis de NK, se marcaron células diana (YAC-1 y EL4) con ⁵¹Cr como se ha descrito anteriormente. Después de contar las células diana en un hemacitómetro, las células diana se diluyeron a 0,5-1x10⁵ células/ml y se mezclaron 100 µl de YAC-1 o EL4 (0,5-1x10⁴ células) con 100 µl de células efectoras y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Se determinó la lisis específica para cada pocillo como se ha descrito anteriormente.

20 Los inventores descubrieron que las células cultivadas en presencia de flt3+IL-15+IL-21 mostraron actividad lítica potenciada (aproximadamente 2 veces) contra las dianas de YAC-1 (pero no destruyeron la línea celular de control MHC⁺ EL4). A una relación de efector y diana (E:T) de 5, los linfocitos NK generados en presencia de las 3 citocinas (IL-21+flt3+IL-15) lisaron el 12 % de las células YAC-1, mientras que los linfocitos NK expandidos con flt3+IL-15 lisaron el 6 % de las dianas YAC-1. Los experimentos posteriores confirmaron esta tendencia.

25 En un segundo enfoque para determinar la actividad biológica de IL-21 en linfocitos NK murinos, los inventores aislaron timocitos de ratón CD4⁺CD8⁻ inmaduros ("doble negativo", DN) como se describe en el Ejemplo 6C y los cultivaron con IL-15+flt3+IL-7 o IL-15+flt3+IL-2, con o sin IL-21. El día 6 del cultivo, las células se recogieron y se ensayaron con respecto a actividad lítica de NK en células YAC-1 y EL4 como se ha descrito anteriormente. Los inventores descubrieron que las células cultivadas en presencia de IL-21 tenían la actividad lítica mayor en este ensayo, con actividad lítica potenciada frente a las células cultivadas en presencia de las otras citocinas. Específicamente, los timocitos DN cultivados con IL-15+flt3+IL-7 destruyeron el 18 % de las células YAC-1 a E:T de 24 mientras que las células cultivadas en presencia de IL-15+flt3+IL-7 más IL-21 destruyeron el 48 % de las dianas a la misma E:T. Los timocitos DN cultivados en IL-15+flt3+IL-2 destruyeron el 15 % de las dianas de YAC-1 a una E:T de 6, mientras que las células cultivadas con estas 3 citocinas e IL-21 destruyeron el 35 % de las células YAC-1 a una E:T de 9. Se realizó citometría de flujo en las células cultivadas un día antes del ensayo de lisis de NK. Al igual que para los cultivos de médula ósea, a pesar del efecto proliferativo de IL-21 (los números de células aumentan aproximadamente 2 veces cuando se añade IL-21), este no potenció significativamente la fracción de células DX5⁺ (17-20 % de células totales en los cultivos con IL-7 y 35-46 % del total en cultivos con IL-2). Estos datos implican que IL-21, en combinación con IL-15 y flt3, potencian la actividad lítica de linfocitos NK generados a partir de médula ósea murina o timo.

D. Actividad de IL-21 de ratón en los linfocitos NK murinos maduros

45 Para ensayar los efectos de IL-21 de ratón en linfocitos NK maduros, los inventores aislaron bazo de cuatro ratones de 5 semanas de edad C57B1/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) y los trituraron con portaobjetos de vidrio con extremos esmerilados para crear una suspensión celular. Se retiraron los glóbulos rojos por lisis hipotónica como sigue: se sedimentaron las células y el sobrenadante se retiró por aspiración. Los inventores rompieron el sedimento con agitación en vórtex suave, después añadieron 900 µl de agua estéril en agitación, seguido rápidamente (menos de 5 s después) por 100 µl de HBSS 10X (Gibco/BRL). Las células se resuspendieron después en 10 ml de HBSS 1X y los residuos se retiraron pasando las células sobre un tamiz celular revestido de malla de nailon (Falcon). Estas células de bazo empobrecidas para RBC se sedimentaron después y se resuspendieron en tampón MACS (PBS+BSA 1 % + EDTA 2 mM) y se contaron. Los inventores tiñeron 300x10⁶ de las células con perlas magnéticas revestidas anti-DX5 (Miltenyi Biotec) y se seleccionaron de forma positiva linfocitos NK DX5⁺ sobre una columna de separación MACS VS+, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, lo que condujo a la recuperación de 8,4x10⁶ células DX5⁺ y 251x10⁶ células DX5⁻. Cada uno de estos grupos de células se cultivó en placas de 24 pocillos (0,67x10⁶ células/pocillo, 2 pocillos por condición de tratamiento) en medio RP10 (Ejemplo 7A) solo o con 1) IL-21 de ratón 30 ng/ml, 2) IL-2 de ratón recombinante 30 ng/ml (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), 3) IL-15 humana recombinante 30 ng/ml (R&D), 4) 30 ng/ml de cada una de IL-21 y hIL-15 de ratón o 5) 30 ng/ml de cada una de mL-2 y hIL-15. Las células se recogieron después de 21 horas, se lavaron y se resuspendieron en

medio RP10 y se contaron. Las células se ensayaron después con respecto a su capacidad para lisar células diana EL4 o YAC-1 marcadas con ^{51}Cr , como se ha descrito en el Ejemplo 7A.

En general, hubo poca actividad NK de los grupos DX5^- (células no NK), pero las células DX5^- cultivadas con IL-21 y hIL-15 lisaron el 25 % de las células diana YAC-1 a una E:T de 82. Por comparación, las células DX5^- cultivadas con hIL-15 solamente lisaron el 14 % de las dianas YAC-1 a una E:T de 110. Esto sugiere que IL-21 e IL-15 actúan juntas en los linfocitos NK NK1.1^+ residuales en esta preparación celular. Con respecto a la preparación de células DX5^+ , el tratamiento con IL-21 de ratón solo no aumentó significativamente su función efectora (su lisis de células YAC-1 fue similar a la del grupo no tratado). Como se esperaba, tanto IL-2 como IL-15 mejoraron significativamente la actividad de NK. El mayor nivel de lisis, sin embargo, se detectó en el grupo tratado con IL-21 y hIL-15 (65 % de lisis de células YAC-1 a una E:T de 3,3, frente al 45 % de lisis a una E:T de 4 para el grupo de tratamiento con hIL-15). Tomados juntos, estos resultados sugieren que aunque IL-21 solo no puede aumentar la actividad de lisis de linfocitos NK, sí aumenta la actividad de lisis de NK de linfocitos NK maduros, cuando se administra con IL-15.

Ejemplo 8

Proliferación por IL-21 de linfocitos T humanos y de ratón en un ensayo de proliferación de linfocitos T

15 A. Proliferación por IL-21 murina de linfocitos T de ratón

Se aislaron linfocitos T de ratones C57B1/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) a partir de esplenocitos agrupados y linfocitos, ganglios linfáticos axilares, braquiales, inguinales, cervicales y mesentéricos (LN). Los bazo se trituraron con portaobjetos de vidrio de extremos esmerilados para crear una suspensión celular. Los LN se separaron con fórceps y se pasaron a través de un tamiz celular para retirar los residuos. Los esplenocitos agrupados y las células de LN se separaron en subconjuntos CD8^+ y CD4^+ usando dos columnas de separación magnética MACS sucesivas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se recogieron timocitos completos de los mismos ratones.

Las células se cultivaron a 3×10^5 células/pocillo (timocitos) o 10^5 células/pocillo (linfocitos T maduros) con concentraciones crecientes de IL-21 murina purificada (0-30 ng/ml) (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) en placas de fondo plano de 96 pocillos previamente revestidas durante una noche a 4°C con diversas concentraciones de mAb anti-CD3 2C11 (PharMingen) durante 3 días a 37°C . El anticuerpo anti-CD3 actuó para activar los linfocitos T murinos a través del receptor de linfocitos T. Cada pocillo se pulsó con $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina el día 2 y las placas se recogieron y se contaron 16 horas después para evaluar la proliferación.

Cuando los inventores ensayaron IL-21 en ensayos de proliferación de linfocitos T, descubrieron que coestimulaba timocitos murinos activados por anti-CD3, lo que conduce a un crecimiento acelerado de células $\text{CD8}^+\text{CD4}^-$ (la mayoría de los timocitos cultivados con anti- $\text{CD3}^+\text{IL-21}$ fueron $\text{CD8}^+\text{CD4}^-$ el día 3 de cultivo, mientras que las células cultivadas con anti-CD3 solamente no se sesgaron significativamente a este fenotipo hasta el día 5). Los inventores no observaron niveles significativos de proliferación de timocitos para IL-21 en ausencia de anti-CD3.

Resulta interesante que cuando los inventores ensayaron linfocitos T murinos periféricos maduros con respecto a su capacidad para responder a IL-21 + anti-CD3, descubrieron que solamente el subconjunto CD8^+ , pero no el subconjunto CD4^+ , respondía de una manera dependiente de dosis a IL-21. Los inventores también observaron proliferación débil pero reproducible de células CD8^+ (pero no células CD4^+) en respuesta a IL-21 solamente. Resulta interesante que esto no se observó para linfocitos T humanos (véase Ejemplo 8B, posteriormente).

B. Proliferación por IL-21 humana de linfocitos T humanos

Se aislaron linfocitos T CD4^+ y CD8^+ humanos de PBMC como se ha descrito en el Ejemplo 9 (posteriormente). Las células se cultivaron a aproximadamente 10^5 células/pocillo con concentraciones crecientes de IL-21 (0-50 ng/ml) (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) en placas de fondo plano de 96 pocillos previamente revestidas durante una noche a 4°C con diversas concentraciones de mAb anti-CD3 humano UCHT1 (PharMingen) durante 3 días a 37°C . Cada pocillo se pulsó con $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina el día 2 y las placas se recogieron y se contaron 16 horas después. A diferencia de los resultados de los inventores con los linfocitos T de ratón, sus datos preliminares sugieren que IL-21 humana coestimula linfocitos T humanos CD4^+ , pero no CD8^+ , de una manera dependiente de dosis.

En otros experimentos, los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ murinos maduros se enriquecieron a partir de células de LN y bazo C57B1/6 agrupadas por reducción del número de linfocitos B CD19^+ usando una columna de perlas magnéticas. Las poblaciones celulares resultantes se ensayaron con respecto a proliferación para mAb anti-CD3e de ratón unido a placa en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de IL-21 murina, como se ha indicado. Los datos mostrados son representativos de resultados de 4 experimentos.

Se aislaron linfocitos T de ratones C57B1/6 de esplenocitos agrupados y linfocitos de LN auxiliares, braquiales, inguinales, cervicales y mesentéricos. Los bazo se trituraron con portaobjetos de vidrio de extremos esmerilados para crear una suspensión celular. Los LN se separaron con fórceps y se pasaron a través de un tamiz celular para retirar los residuos. Los esplenocitos agrupados y las células de LN se separaron en subconjuntos CD8^+ y CD4^+

5 usando dos columnas de separación magnética MACS sucesivas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células se cultivaron a 10^5 /pocillo con concentraciones crecientes de IL-21 murina (0-30 ng/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos previamente revestidas durante una noche a 4 °C con diversas concentraciones de mAb anti-CD3ε 2C11 (PharMingen) durante 3 días a 37 °C. Cada pocillo se pulsó con 1 μCi de 3 H-timidina el día 2 y las placas se recogieron y se contaron 16 horas después.

La Tabla 5 ilustra que mL-21 coestimula la proliferación de linfocitos T CD8⁺ murinos. Los valores representan la CPM incorporada de 3 H-timidina (media +/- desviación típica de pocillos por triplicado).

Tabla 5

	mIL-21 ng/ml	mAb Anti-CD3 (ug/ml)				
		0	0,11	0,33	1,0	3,0
CD4 ⁺	0	405 +/- 101	67895 +/- 18752	141175 +/- 6733	202251 +/- 35571	246626 +/-45106
	1,2	247 +/- 86	80872 +/- 23598	126487 +/- 7472	178863 +/- 33583	205861 +/-14675
	6	302 +/- 106	75192 +/- 5323	102005 +/- 20059	191598 +/- 15881	218718 +/-12142
	30	364 +/- 126	86164 +/- 8065	141065 +/- 4921	186089 +/- 17585	266650 +/-39839
CD8 ⁺	0	168 +/- 47	40198 +/- 4557	70272 +/- 4141	84771 +/- 9450	97869 +/-3368
	1,2	268 +/- 117	50095 +/- 3959	84319 +/- 6373	105176 +/- 10828	113394 +/-3657
	6	323 +/- 159	78113 +/- 6967	108461 +/- 2175	132301 +/- 13386	178551 +/-16373
	30	2007 +/- 470	132238 +/-1915	182485 +/- 4991	272229 +/- 9325	330434 +/-47185

Ejemplo 9

10 La PCR a tiempo real muestra expresión de IL-21 en células CD4⁺ humanas

A. Linfocitos T humanos purificados como una fuente primaria usada para evaluar la expresión de IL-21 humana

15 Se recogió sangre completa (150 ml) de un donante humano sano y se mezcló 1:1 con PBS en tubos cónicos de 50 ml. Se reforzaron después treinta ml de sangre diluida con 15 ml de Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Estos gradientes se centrifugaron 30 min a 500 g y se permitió que se detuvieran sin frenado. Las células empobrecidas para RBC en el interfaz (PBMC) se recogieron y se lavaron 3 veces con PBS. El rendimiento de PBMC humanas aisladas fue de 200×10^6 antes de la selección descrita posteriormente.

20 Las PBMC se suspendieron en 1,5 ml de tampón MACS (PBS, EDTA 0,5 %, EDTA 2 mM) y se separaron 3×10^6 células para ARN de control y para análisis de citometría de flujo. A continuación los inventores añadieron 0,25 ml de microperlas CD80 antihumanas (Miltenyi Biotec) y la mezcla se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Estas células marcadas con perlas CD8 se lavaron con 30 ml de tampón MACS y después se resuspendieron en 2 ml de tampón MACS.

25 Se prepara una columna VS+ (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se colocó después en un campo magnético VarioMACS (Miltenyi). La columna se equilibró con 5 ml de tampón MACS. Las células de ratón primarias aisladas se aplicaron después a la columna. Se permitió que las células negativas para CD8 la atravesaran. La columna se aclaró con 9 ml (3 X 3 ml) de tampón MACS. La columna se retiró después del imán y se colocó sobre un tubo Falcon de 15 ml. Se eluyeron células CD8⁺ añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y las células unidas se extraen usando el pistón proporcionado por el fabricante. El rendimiento de linfocitos T periféricos humanos seleccionados CD8⁺ fue de aproximadamente 51×10^6 células totales. Las células de flujo continuo negativas para CD8 se recogieron, contaron, tiñeron con perlas revestidas con CD4 antihumano, después se incubaron y se pasaron sobre una nueva columna VS+ a las mismas concentraciones que se ha descrito anteriormente. El rendimiento de linfocitos T periféricos humanos seleccionados CD4⁺ fue de 42×10^6 células totales.

35 Se retiró una muestra de cada uno de los linfocitos T humanos seleccionados CD8⁺ y CD4⁺ para tinción y clasificación en una separación de células activada por fluorescencia (FACS) para evaluar su pureza. Se usaron un anticuerpo anti-CD4 humano conjugado con PE, un Ab anti CD8-FITC humano y un Ab anti-CD19 humano - CyChrome (todos de PharMingen) para teñir las células seleccionadas CD8⁺ y CD4⁺. Las células seleccionadas por CD8 en este primer experimentos fueron 80 % CD8⁺ y las células seleccionadas por CD4 fueron 85 % CD4⁺. En 2 experimentos posteriores (Ejemplo 9B), las células purificadas CD8⁺ fueron 84 % y 81 % puras y las células CD4⁺ fueron 85 % y 97 % puras, respectivamente. En un experimento, los inventores tiñeron las células no unidas (flujo

continuo) con perlas revestidas con CD19 antihumano (Miltenyi) y las procesaron sobre una tercera columna de perlas magnéticas para aislar linfocitos B CD19⁺ (estos fueron 92 % puros).

5 Las células seleccionadas CD8⁺, CD4⁺ y CD19⁺ humanas se activaron incubando 0,5 X 10⁶ células/ml en RPMI + ultrasuero humano 5 % (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) + PMA 10 ng/ml e ionomicina 0,5 µg/ml (Calbiochem) durante aproximadamente 4, 16 o 24 horas a 37 °C. Los linfocitos T (2,5 x 10⁶/pocillo) se estimularon
 10 alternativamente en placas de 24 pocillos previamente revestidas durante una noche con mAb anti-CD3 UCHT1 unido a placa 0,5 µg/ml (PharMingen) con o sin mAb anti-CD28 soluble (PharMingen) a 5 µg/ml. En cada punto temporal, las células se recogieron, se sedimentaron, se lavaron una vez con PBS y se sedimentaron de nuevo. El sobrenadante se retiró y los sedimentos se congelaron de forma instantánea en un baño de etanol helado, después se almacenaron a -80 °C para preparación de ARN en un momento posterior.

Se realizó PCR en tiempo real en estas células seleccionadas CD8⁺, CD4⁺ y CD19⁺ humanas como se describe en el Ejemplo 9B y Ejemplo 9C posteriormente para evaluar IL-21 humana y expresión del receptor.

B. Cebadores y sondas para RT-PCR cuantitativa para expresión de IL-21 humana

15 Se ha descrito previamente RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) (véase, Heid, CA y col., Genome Research 6: 986-994, 1996; Gibson, UEM y col., Genome Research 6: 995-1001, 1996; y Sundaresan, S y col., Endocrinology 139: 4756-4764, 1998). Este procedimiento incorpora el uso de una sonda específica de gen que contiene colorantes tanto
 20 indicadores como interruptores. Cuando la sonda está intacta la emisión del colorante indicador se anula debido a la proximidad del colorante interruptor. Durante la extensión de PCR usando cebadores directos e inversos específicos de genes adicionales, la sonda se escinde por actividad nucleasa 5' de Taq polimerasa que libera el colorante indicador dando como resultado un aumento de la emisión de fluorescencia.

25 Las sondas y cebadores usados para análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express™ (PE Applied Biosystems). Se diseñaron cebadores para IL-21 humana que abarcaban un punto de unión intrón-exón para eliminar la amplificación de ADN genómico. El cebador directo, ZC22,281 (SEC ID N°: 11) y el cebador inverso, ZC22,279 (SEC ID N°: 12) se usaron ambos a concentración 300 nM para sintetizar un producto de 80 pb. La sonda de IL-21 TaqMan correspondiente ZG32 (SEC ID N°: 13) se sintetizó por PE Applied Biosystems. La sonda se marcó con un colorante fluorescente indicador (6-carboxifluoresceína) (FAM) (PE Applied Biosystems) en el extremo 5' y un colorante fluorescente interruptor (6-carboxi-tetrametil-rodamina) (TAMRA) (PE Applied Biosystems) en el extremo 3'. Para ensayar la integridad o
 30 calidad de todas las muestras de ARN, estas se exploraron con respecto a ARNr usando el conjunto de cebador y sonda encargado a PE Applied Biosystems (cat N° 4304483). El colorante fluorescente indicador para esta sonda es VIC (PE Applied Biosystems). Los resultados de ARNr permitirán la normalización de los resultados de IL-21.

35 Se preparó ARN a partir de los sedimentos proporcionados en el Ejemplo 9A, usando el Kit RNeasy Miniprep™ (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se preparó ARN control a partir de aproximadamente 10 millones de células BHK que expresaban IL-21 humana.

C. Cebadores y sondas para RT-PCR cuantitativa para expresión de receptor zalfa11 humano

40 Se realizó PCR en tiempo real para evaluar la expresión de receptor de IL-21 según el Ejemplo 9B y el Ejemplo 9D, usando las células preparadas en las condiciones detalladas en 43A, y las sondas específicas para el receptor de IL-21. El cebador directo, ZC22,277 (SEC ID N°: 14) y el cebador inverso, ZC22,276 (SEC ID N°: 15) se usaron en una reacción de PCR (anteriormente) a concentración de aproximadamente 300 nM para sintetizar un producto de 143 pb. La sonda de IL-21 TaqMan® correspondiente, designada ZG31 (SEC ID N°: 16) se sintetizó y se marcó por PE Applied Biosystems. Se usó ARN de células BaF3 que expresaban receptor de IL-21 humano para generar control apropiado para curvas patrón para la PCR en tiempo real descrita en el Ejemplo 9D a continuación.

D. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

45 Se determinaron los niveles relativos de ARN de IL-21 por análisis de muestras de ARN totales usando el procedimiento de RT-PCR de una etapa (PE Applied Biosystems). Se usó ARN de células BHK que expresaban IL-2 humana para generar una curva patrón. La curva consistía en diluciones en serie que variaban de 2,5-2,5 x 10⁻⁴ ng para la exploración de ARNr y 25-0,0025 ng para la exploración de IL-21 con cada punto analizado por triplicado. Las muestras de ARN totales también se analizaron por triplicado con respecto a niveles de transcrito de IL-21
 50 humana y con respecto a niveles de ARNr como un control endógeno. Cada reacción de RT-PCR de una etapa consistió en 25 ng de ARN total en tampón A (KCL 50 mM, Tris-HCL 10 mM y el colorante de patrón interno, ROX (PE Applied Biosystems)), cebadores apropiados (50 nM para muestras de ARNr, 300 nM para muestras de IL-21) y sonda (50 nM para ARNr, 100 nM para IL- 21), MgCl₂ 5,5 mM, 300 µM de cada d-CTP, d-ATP y d-GTP y 600 µM de d-UTP, transcriptasa inversa (0,25 U/µl), ADN polimerasa AmpliTaq (0,025 U/µl) e inhibidor de RNasa (0,4 U/µl) en un volumen total de 25 µl. Las condiciones de termociclación consistieron en una etapa de RT inicial a 48 °C durante 30 minutos, una etapa de activación de AmpliTaq Gold de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación durante 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Los niveles de ARN de IL-21 relativos se
 55

determinaron por el Procedimiento de Curva Patrón como se describe en User Bulletin N° 2 (PE Biosystems; User Bulletin N° 2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, 11 de diciembre de 1997) usando las mediciones de ARNr para normalizar los niveles de IL-21. Las muestras se compararon en relación con el calibrador dentro de cada experimento. El calibrador se seleccionó de forma arbitraria basándose en ARN de buena calidad y un nivel de expresión con el que podrían compararse otras muestras de forma significativa. Los resultados de los experimentos que analizan la expresión de la IL-21 y el receptor de IL-21 en células estimuladas y no estimuladas (Ejemplo 9A) son como se describe en el Ejemplo 9E a continuación.

E. Expresión de receptor de IL-21 humano y ligando en células CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺

El primer experimento usó RT-PCR, descrito anteriormente, para evaluar expresión del receptor zalfa11 en muestras CD4⁺ y CD8⁺ no estimuladas y estimuladas anti-CD3 en los puntos temporales de 0 h (células no estimuladas ("en reposo")) y a las 4 h, 15,5 h y 24 h, después de estimulación. La muestra de CD4⁺ en reposo se seleccionó de forma arbitraria como el calibrador y se le dio un valor de 1,00. Hubo un aumento de aproximadamente 4 veces de la expresión del receptor en células CD4⁺ no estimuladas de 4 h a 24 h de cultivo y un aumento de aproximadamente 8 veces durante el mismo periodo de tiempo en células CD4⁺ estimuladas anti-CD3. Las células CD8⁺ mostraron un aumento de 7 veces en la expresión del receptor de IL-21 que alcanzó un pico a las 4 horas y se redujo a lo largo del tiempo. Con estimulación anti-CD3, las células CD8⁺ tuvieron un aumento de 8 veces constante de la expresión del receptor.

Este primer experimento también usó RT-PCR para evaluar la expresión de IL-21 en las mismas muestras CD4⁺ y CD8⁺ no estimuladas y estimuladas anti-CD3. La muestra CD8⁺ estimulada anti-CD3 de 4 horas se seleccionó de forma arbitraria como el calibrador y se le dio un valor de 1,00. Los resultados mostraron que las células CD4⁺ y CD8⁺ no estimuladas no expresan IL-21. Los inventores observaron una elevación significativa de la expresión en las células CD4⁺ estimuladas anti-CD3 a las 4 horas, con un aumento de aproximadamente 300 veces de la señal observada a las 15,5 horas. Las células CD8⁺ expresaron una cantidad pequeña de ligando tras estimulación anti-CD3, sin embargo esto se debe probablemente a contaminación de la población CD8⁺ con un pequeño número de células CD4⁺.

El segundo experimento usó RT-PCR para evaluar la expresión del receptor de IL-21 en muestras CD4⁺ y CD8⁺ estimuladas anti-CD3, estimuladas con PMA + ionomicina y no estimuladas en los puntos temporales de 0 h y a las 3,5 h, 16 h y 24 h después de la activación. La muestra CD8⁺ en reposo se seleccionó de forma arbitraria como el calibrador y se le dio un valor de 1,00. Las células CD4⁺ y CD8⁺ en reposo no tuvieron cantidades significativas de expresión del receptor. La expresión fue aproximadamente 3 veces mayor en las muestras CD4⁺ estimuladas con PMA + ionomicina a las 3,5 horas, 16 horas y 24 horas después de la estimulación. La expresión en células CD4⁺ activadas anti-CD3 alcanzaron un pico a 10 veces por encima de los niveles de fondo a las 3,5 horas después de estimulación, después volvió a caer a niveles 4 veces por encima del fondo a las 16 horas después de la estimulación. Las células CD8⁺ mostraron un aumento de la expresión 4 veces a las 3,5 horas después de estimulación con PMA + ionomicina, reduciendo la expresión en puntos temporales posteriores. Como en el primer experimento, las células CD8⁺ estimuladas anti-CD3 mostraron de nuevo una inducción 8 veces por encima del fondo de la expresión del receptor.

Estas muestras del segundo experimento también se usaron para evaluar la expresión de IL-21. La muestra CD4⁺ estimulada con PMA + ionomicina de 24 h se seleccionó de forma arbitraria como el calibrador y se le dio un valor de 1,00. Los resultados mostraron que de nuevo ninguna de las células no estimuladas expresó IL-21. Hubo una inducción de aproximadamente 30 veces de la expresión de ligando en las células CD4⁺ estimuladas con anti-CD3 a las 3,5 h, como se ha visto en el experimento anterior (a las 4 h). Sin embargo, hubo solamente una inducción de aproximadamente 5 veces con estimulación con PMA + ionomicina a las 3,5 horas que se redujo en puntos temporales posteriores. De nuevo, las células CD8⁺ expresaron una cantidad muy pequeña de IL-21 que probablemente se atribuyó a células CD4⁺ contaminantes.

El experimento final usó RT-PCR, para evaluar la expresión del receptor de IL-21 en muestras CD4⁺ y CD8⁺ no estimuladas y estimuladas anti-CD3 y anti-CD3/anti-CD28 en los puntos temporales de 0 h y a las 2 h, 4 h y 16 h después de estimulación. Las células CD19⁺ activadas con PMA + ionomicina también se exploraron con respecto a expresión del receptor en los mismos intervalos temporales. La muestra CD4⁺ en reposo se seleccionó de forma arbitraria como el calibrador y se le dio un valor de 1,00. Las células CD4⁺ estimuladas anti-CD3 de 2 h solo tuvieron una inducción de 4 veces del receptor, en comparación con la inducción de 10 veces vista a las 3,5 h en el experimento anterior. La combinación de anti-CD23 y anti-CD28 aumentó la expresión del receptor de IL-21 a 8 veces por encima del fondo. Las células CD8⁺ estimuladas anti-CD3/anti-CD28 de 16 h tuvieron niveles de expresión de receptor de IL-21 muy bajos, como se ha visto en las células CD8⁺ en experimentos anteriores (anteriormente). Las células CD19⁺ estimuladas con PMA + ionomicina tuvieron la expresión de receptor de IL-21 más significativa con un aumento de 19 veces a las 2 horas, pero los niveles de expresión se redujeron de nuevo a los de células en reposo a las 16 horas.

Estas muestras del experimento final también se usaron para evaluar la IL-21 por RT-PCR. La muestra CD8⁺ estimulada anti-CD3/anti-CD28 de 16 horas se seleccionó de forma arbitraria como el calibrador y se le dio un valor de 1,00. Los resultados mostraron que a las 2 horas las células CD4⁺ tenían una inducción de aproximadamente 2

veces de la expresión de IL-21 con estimulación anti-CD3 y una inducción 5 veces con estimulación anti-CD3 más anti-CD28. Estas condiciones de estimulación indujeron la expresión de ligando a lo largo del tiempo, mostrando las células CD4⁺ estimuladas de 16 horas niveles de expresión de ligando 70 veces por encima del fondo. Las células CD8⁺ y CD19⁺ no mostraron expresión de IL-21.

- 5 Se esperaba una cierta cantidad de variación entre estas extracciones de sangre (es decir múltiples muestras en diferentes momentos del mismo paciente y entre múltiples pacientes). Por lo tanto, las tendencias de los datos se analizaron dentro de cada estudio o a partir de una muestra sanguínea sencilla y los tres experimentos anteriores se compararon para una conclusión global. La tendencia de los experimentos de PCR en tiempo real descritos anteriormente es la de todos los tipos celulares ensayados, los linfocitos B CD19⁺ activados con PMA + ionomicina expresaron los niveles más altos de ARN del receptor de IL-21. Las células CD4⁺ y CD8⁺ también pueden estimularse para expresar receptor, pero a niveles más bajos que en linfocitos B. IL-21 se expresó casi exclusivamente en linfocitos T CD4⁺ estimulados (y no por linfocitos T CD8⁺ o por linfocitos B CD19⁺). Aunque la estimulación con PMA + ionomicina indujo una buena señal de IL-21 en este ensayo, se obtuvo una señal significativamente más alta de linfocitos T CD4⁺ estimulados con mAb anti-CD3 o una combinación de mAb anti-CD3 y anti-CD28, condiciones que imitan mejor un encuentro con antígeno *in vivo*.

Ejemplo 10

Proliferación dependiente de IL-21 de linfocitos B estimulados anti-CD40 o anti-IgM A. Purificación de linfocitos B humanos

20 Se descongeló rápidamente un frasco que contenía 1×10^8 células mononucleares de sangre periférica humana sometidas a aféresis congeladas (PBMC) en un baño de agua a 17 °C y se resuspendieron en 25 ml de medio de linfocitos B (Medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS), suero bovino fetal inactivado por calor 10 %, L-glutamina 5 %, Pen/Strep 5 %) (Gibco BRL) en un tubo de 50 ml (Falcon VWR, Seattle, WA). Las células se ensayaron con respecto a viabilidad usando Azul de Tripiano (Gibco BRL). Se estratificaron 10 ml de Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) bajo la suspensión celular y se centrifugaron durante 30 minutos a 1800 rpm y se permitió que se detuviera sin frenado. La interfaz se retiró después y se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 50 ml, se llevó hasta un volumen final de 40 ml con PBS y se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm con frenado. La viabilidad de las células aisladas se ensayó de nuevo usando Azul de Tripiano. Alternativamente se diluyó sangre humana recién extraída 1:1 con PBS (Gibco BRL) y se estratificó sobre Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia), se centrifugó y se lavó como anteriormente. Las células aisladas de fuentes nuevas o congeladas proporcionaron resultados equivalentes.

Se purificaron linfocitos B de las células de sangre periférica flotadas en Ficoll de donantes humanos normales (anteriormente) con perlas magnéticas anti-CD19 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las preparaciones resultantes se controló por análisis citométrico de flujo con Ab anti-CD22 FITC (Pharmingen, San Diego, CA). Las preparaciones de linfocitos B fueron típicamente >90 % puras.

35 B. Purificación de linfocitos B murinos

Se preparó una suspensión de esplenocitos murinos separando bazo de ratón adulto C57B1/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con agujas dobladas en medio de linfocitos B. Los RBC se retiraron por lisis hipotónica. Las células positivas para CD43 se retiraron con perlas magnéticas CD43 (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las preparaciones resultantes se controló por análisis citométrico de flujo con Ab anti-CD45R FITC (Pharmingen). Las preparaciones de linfocitos B fueron típicamente >90 % puras.

C. Proliferación de linfocitos B estimulados anti-CD40 en presencia de IL-21 humana o murina

45 Los linfocitos B de la fuente humana o de ratón se resuspendieron a una concentración final de 1×10^6 células/ml en medio de linfocitos B y se sembraron a 100 µl/pocillo en una placa de fondo en U de 96 pocillos (Falcon, VWR) que contenía diversas condiciones de estimulación hasta llevar el volumen final a 200 µl/pocillo. Para estimulación anti-CD40 los cultivos humanos se complementaron con CD40 antihumano 1 µg/ml (Genzyme, Cambridge, MA) y los cultivos de ratón se complementaron con CD40 antimurino 1 µg/ml (Serotec, Reino Unido). Se añadió IL-21 humana o murina a diluciones que variaban de 1 pg/ml a 100 ng/ml. La especificidad del efecto de IL-21 se confirmó por inhibición de IL-21 con zalfa11CEE humano soluble 25 mg/ml (Ejemplo 10A). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las células se incubaron después a 37 °C en un incubador humidificado durante 120 horas (humano) o 72 horas (ratón). Dieciséis horas antes de la recogida, se añadió 1 µCi de ³H-timidina (Amersham, Piscataway, NJ) a todos los pocillos para evaluar si habían proliferado los linfocitos B. Las células se recogieron en una placa de filtro de 96 pocillos (UniFilter GF/C, Packard, Meriden, CT) usando un recolector celular (Packard) y se recogieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se secaron a 55 °C durante 20-30 minutos y el fondo de los pocillos se selló con un sellante de placas opaco. A cada pocillo se le añadieron 0,25 ml de fluido de centelleo (Microscint-O, Packard) y la placa se leyó usando un contador de centelleo de microplacas TopCount Microplate Scintillation Counter (Packard).

La incubación con IL-21 a concentraciones de 3 ng/ml o más potenció la proliferación inducida por anti-CD40 soluble de una manera dependiente de dosis en linfocitos B tanto murinos como humanos hasta 30 veces. Los linfocitos B murinos y humanos respondieron igual de bien a sus IL-21 respectivas. En ambas especies, la estimulación fue específica de IL-21, puesto que se revertía por la presencia de receptor de IL-21 soluble en el cultivo.

5 D. Proliferación de linfocitos B estimulados anti-IgM en presencia de IL-21 humana o murina

Los linfocitos B de fuente humana o de ratón como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 10A y Ejemplo 10B) se sembraron en placas como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 10C). Para estimulación anti-IgM de células humanas las placas se revistieron previamente durante una noche con Ab anti-IgM humana F(ab')₂ 10 mg/ml (Southern Biotech Associates, Birmingham, Alabama) y se lavaron con medio estéril justo antes de su uso. Los cultivos se complementaron con hu rIL-4 0-10 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN). Para estimulación anti-IgM de células murinas se añadió anti-IgM soluble (Biosource, Camarillo, CA) a los cultivos a 10 mg/ml. A cada una de las condiciones precedentes anti-IgM/IL-4, se añadió IL-21 humana o murina a diluciones que variaron de 1 pg/ml a 100 ng/ml como se ha descrito anteriormente. La especificidad del efecto de IL-21 se confirmó por inhibición con receptor zalfa11 humano soluble como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 10C). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las células se incubaron, se marcaron con ³H-timidina, se recogieron y se analizaron como se ha descrito en el Ejemplo 10C.

La incubación con IL-21 a concentraciones de 0,3 ng/ml o más inhibió la proliferación inducida por anti-IgM (ratón) insoluble o anti-IgM e IL-4 (humana) de una manera dependiente de dosis. Esta inhibición fue específica para IL-21 puesto que se revirtió por la presencia de receptor de IL-21 soluble en el cultivo.

20 **Ejemplo 11**

Efecto de IL-21 humana en linfocitos B y fusión de saporina tóxica de IL-21

Los efectos de IL-21 humana se ensayaron en las siguientes líneas de linfocitos B y humanos: líneas celulares de linfoma de Burkitt humano Raji (ATCC N° CCL-86), y Ramos (ATCC N° CRL-1596); línea celular de linfoma de linfocitos B por VEB humana RPMI 1788 (ATCC N° CRL-156); línea celular de mieloma/plasmacitoma humano IM-9 (ATCC N° CRL159); y línea de linfocitos B transformados por VEB humana DAKIKI (ATCC N° TIB-206) y células HS Sultan (ATCC N° CRL-1484). Después de aproximadamente 2-5 días de tratamiento con IL-21, se descubrieron cambios en la expresión del marcador de superficie en las líneas celulares IM-9, Raji, Ramos y RPMI1788, lo que muestra que estas células pueden responder a IL-21. Las líneas de linfocitos B humanos tratadas con IL-21 crecieron mucho más lentamente que las células no tratadas cuando se volvieron a sembrar en placas de cultivo celular. Estas células también tuvieron un aumento de la expresión de ligando de FAS, como se evaluó por citometría de flujo (Ejemplo 11D y Ejemplo 11E) y aumentó moderadamente su sensibilidad a un anticuerpo de FAS de activación (Ejemplo 11A). Este resultado indica que IL-21 podría controlar algunos tipos de neoplasias de linfocitos B induciéndolas a diferenciarse a un estado menos proliferativo y/o más sensible a ligando de FAS. Además, el receptor zalfa11 se expresa en la superficie de varias de estas líneas celulares (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024). Por ejemplo, JL-21 y el conjugado de inmunotoxina saporina-IL-21 humana (Ejemplo 11B, posteriormente) u otra fusión de toxina-IL-21 podría usarse terapéuticamente en leucemias y linfomas de linfocitos B.

A. El efecto de IL-21 humana en líneas de linfocitos B.

Se sembraron células IM-9 a aproximadamente 50.000 células por ml +/- IL-21 humana purificada 50 µg/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024). Después de 3 días de crecimiento las células se recogieron, se lavaron y se contaron, después se volvieron a sembrar a aproximadamente 2500 células/ml en placas de 96 pocillos en pocillos con anticuerpo anti-FAS 0, 0,033, 0,1 o 0,33 µg/ml (R&D Systems, Minneapolis). Después de 2 días se analizó un ensayo de fluorescencia de azul de Alamar (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) para evaluar la proliferación de las células.

Las células IM-9 tratadas con IL-21 crecieron hasta solamente el 27 % de la densidad de las células no tratadas en ausencia de anticuerpo anti-FAS. En presencia de anticuerpo anti-FAS 0,33 µg/ml, las células tratadas con IL-21 se inhibieron el 52 % adicional mientras que las células no tratadas se inhibieron solamente el 30 %. La inhibición global del crecimiento celular con tratamiento tanto de IL-21 como de anticuerpo anti-FAS 0,33 µg/ml fue del 86 %.

Cuando las células IM-9 se pretrataron durante tres días con o sin IL-21 y después se volvieron a sembrar a 100 células por pocillo y se dejaron crecer con o sin anticuerpo anti-FAS durante 6 días, el crecimiento de células no tratadas evaluadas por ensayo con Azul de Alamar (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) se inhibió solamente el 25 % por anticuerpo anti-FAS mientras que el crecimiento de células tratadas con IL-21 se inhibió al 95 % en relación con el crecimiento de células no tratadas en anticuerpo anti-FAS cero.

B. El efecto de inmunotoxina saporina-IL-21 humana en líneas de linfocitos B

La construcción y purificación de conjugado de inmunotoxina saporina-IL-21 humana (zalfa11L-sap) se describe en el Ejemplo 12. El sap-zalfa11L humano es mucho más potente que la saporina por sí sola en la inhibición del crecimiento celular. Cuando la célula tratada se vuelve a sembrar después de un tratamiento de tres o cuatro días

las células tratadas con sap-zalfa11L humano crecieron muy poco.

Se sembraron células IM-9, Ramos y K562 (ATCC N° CCL-243) a aproximadamente 2500 células/pocillo en placas de 96 pocillos con conjugado sap-zalfa11L humano de cero a 250 ng/ml o saporina 0-250 ng/ml (Stirpe y col., Biotechnology 10: 405-412, 1992) solamente como un control. Las placas se incubaron durante 4 días, después se realizó un ensayo de proliferación de Azul de Alamar (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024). A la concentración máxima de conjugado de sap-zalfa11 humano, el crecimiento de las células IM-9 y células RAMOS se inhibió en 79 % y 65 %, respectivamente. Las células K562 que eran bajas/negativas por flujo con respecto a expresión del receptor de IL-21 no se vieron afectadas por el sap-zalfa11, mostrando de este modo la especificidad del efecto del conjugado.

Se sembraron células IM-9 a 50.000 células/ml en placas de 6 pocillos con conjugado sap-zalfa11L humano a cero y 50 ng/ml. Después de 3 días las células se recogieron y se contaron, después se volvieron a sembrar de 100 a 0,8 células por pocillo en diluciones seriadas dos veces, y 12 pocillos por dilución celular sin la inmunotoxina saporina-IL-21 humana. Después de 6 días el número de pocillos con crecimiento en cada dilución celular se puntuó de acuerdo con los resultados de un ensayo de proliferación de azul de Alamar (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024).

Cuando se evaluó el número de células, por ensayo de azul de Alamar (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024), después de 6 días de crecimiento las células de control sembradas a aproximadamente 12,5 y 6,25 células por pocillo tuvieron crecimiento equivalente a células tratadas con sap-zalfa11 sembradas a 100 y 50 células/pocillo respectivamente. Por lo tanto, el crecimiento de las células IM-9 tratadas supervivientes se alteró notablemente incluso después de la retirada, por nueva siembra, de la inmunotoxina sap-zalfa11.

La distribución tisular limitada del receptor de IL-21 humano (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024 y Publicaciones de WIPO N° WO 0/17235 y WO 01/7717) y especificidad de acción del zalfa11-sap para líneas celulares que expresan receptor sugiere que este conjugado puede tolerarse *in vivo*.

C. El efecto de inmunotoxina saporina-IL-21 humana en la viabilidad de líneas de linfocitos B.

Se sembraron células HS Sultan (ATCC N° CRL-1484) a aproximadamente 40.000 células por ml en placas de 12 pocillos y se dejaron crecer durante cinco días sin citocinas añadidas o con IL-21 humana purificada 40 ng/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024), conjugado sap-zalfa11L humano 25 ng/ml (Ejemplo 12, posteriormente), con IFN-alfa 20 ng/ml (RDI) o IL-21 e IFN-alfa. IL-21 inhibió el crecimiento de células Hs Sultan en 63 %. IFN-alfa inhibió el crecimiento en 38 %. IL-21 más IFN-alfa inhibieron el crecimiento en 78 %, lo que indica que los efectos inhibidores del crecimiento de IL-21 humana e IFN-alfa pueden ser aditivos. El sap-zalfa11L humano inhibe el crecimiento de las HS Sultan en 92 %.

Los resultados anteriores apoyan el posible uso de IL-21 o sap-zalfa11L en el tratamiento de tumores malignos u otras enfermedades que expresan el receptor zalfa11, particularmente los de origen de linfocitos B. La combinación de IL-21 con IFN-alfa se sugiere especialmente por su efecto aditivo en la inhibición de células HS Sultan. Algunos otros tipos de tumores malignos linfoides y enfermedades también pueden expresar el receptor de IL-21, puesto que los linfocitos T activados también expresan el ARNm del receptor (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024 y Publicación de WIPO N° WO 0/17235 y WO 01/7717) y algunas de estas enfermedades también pueden ser sensibles a IL-21 de terapia de fusión tóxica IL-21.

D. La expresión de FAS (CD95) en líneas de linfocitos B humanos aumenta por estimulación de IL-21 humana

Todas las líneas de linfocitos B humanas HS Sultan (ATCC N° CRL-1484), IM-9 (ATCC N° CRL159), RPMI 8226 (ATCC N° CCL- 155), RAMOS (ATCC N° CRL-1596), DAKIKI (ATCC N° TIB-206) y RPMI 1788 (ATCC N° CRL-156), se trataron con o sin IL-21 humana purificada de 10 a 50 ng/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) durante 2 a 8 días. Las células se tiñeron después con anticuerpo conjugado con PE anti-CD95 (PharMingen, San Diego, CA), según el protocolo del fabricante, y se analizaron en un FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA). En todas las líneas celulares, aumentó la tinción anti-CD95 (FAS o APO-1), en algunos casos más de dos veces, tras el tratamiento con IL-21 humana.

E. La expresión de FAS (CD95) en linfocitos B de bazo de ratón primarios se aumenta por estimulación con IL-21 humana

Se obtuvieron esplenocitos de ratón primarios picando bazos de ratones C57/BL6 de 8 a 12 semanas de edad. Los eritrocitos se lisaron tratando la preparación durante 5 segundos con agua, después se pasaron a través de un tamiz de 70 µm. Los esplenocitos restantes se lavaron y se sembraron en placas en RPMI (JRH Bioscience) más HIA-FBS 10 % (Hyclone, Logan, UT), IL-2 (R & D Systems) con o sin IL-21 humana, como se ha descrito anteriormente. Se incubaron después a 37 °C, en CO₂ 5 % durante 5 días. Los esplenocitos se recogieron y se tiñeron con anticuerpo conjugado con PE anti-CD95 (PharMingen) y anticuerpo conjugado con FITC anti-CD19 (PharMingen) según el protocolo del fabricante. Las células se analizaron por citometría de flujo en un FACScalibur (Becton Dickinson). Después de selección en los linfocitos B de ratones CD19⁺, se descubrió que la tinción anti-CD95 aumentó en linfocitos B tratados con IL-2 más IL-21 humana en comparación con los de IL-2 solo. La tinción anti-CD95 fue de 37

unidades de fluorescencia relativas (UFR) en los linfocitos B en IL-2 solo y 55 UFR en los linfocitos B cultivados en IL-2 e IL-21 humana.

Ejemplo 12

Construcción y purificación de fusión tóxica de IL-21

5 Bajo un contrato de suministro, se enviaron 10 mg de IL-21 humana (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) a Advanced Targeting Systems (ATS, San Diego, CA) para conjugación con la toxina vegetal saporina (Stirpe y col., Biotechnology 10: 405-412, 1992). ZymoGenetics recibió de ATS 1,3 mg de un conjugado proteico que comprendía 1,1 moléculas de saporina por molécula de IL-21 humana, formulado a una concentración de 1,14 mg/ml en fosfato sódico 20 nM, cloruro sódico 300 nM, pH 7,2.

Ejemplo 13

Fusión tóxica de IL-21 *in vivo*

A. Ensayos de conjugado de IL-21-saporina en ratones

15 Se administró conjugado de IL-21-saporina (Ejemplo 11) a ratones C57BL6 (hembra, 12 semanas de edad, obtenidos de Taconic) a dos dosificaciones diferentes: 0,5 y 0,05 mg/kg. Se proporcionaron inyecciones i.v. en vehículo que consistía en BSA 0,1 % (ICN, Costa Mesa, CA). Se proporcionaron tres inyecciones durante un periodo de una semana (día 0, 2 y 7). Se tomaron muestras de sangre de los ratones el día 0 (preinyección) y los días 2 y 8 (después de la inyección). Se recogió sangre en tubos heparinizados (Bectin Dickenson, Franklin Lakes, NJ) y se determinaron recuentos celulares usando un analizador hematológico automático (Abbot Cell-Dyn modelo n° CD-3500CS, Abbot Park, IL). Se sacrificaron los animales y se realizaron necropsias el día 8 después de la recogida de sangre. Se recogieron bazo, timo, hígado, riñón y médula ósea para histopatología. Se pesaron el bazo y el timo y se recogió una muestra de sangre adicional en tubos separadores de suero. El suero se envió a Pheonix Central Labs, Everett, WA, para ensayar en un panel químico convencional. Las muestras también se recogieron para análisis citométrico de flujo como se describe en el presente documento.

25 Las mediciones de recuentos de células sanguíneas en circulación y química de suero no difirieron significativamente entre ratones tratados con conjugado de IL-21 y ratones tratados con una dosis equivalente de toxina no conjugada (saporina). El análisis histológico de tejidos en ratones tratados con saporina-IL-21 no mostró cambios significativos en relación con ratones tratados con una dosis equivalente de toxina no conjugada. Estos resultados indicaron que el conjugado de saporina no era tóxico *in vivo*.

B. Ensayos de fusión de saporina tóxica con IL-21 en tumores derivados de linfocitos B *in vivo*

30 Los efectos de IL-21 humana y la fusión de saporina tóxica con IL-21 humana (Ejemplo 12) en células tumorales humanas se ensayaron *in vivo* usando un modelo de xenotrasplante de tumor de ratón descrito en el presente documento. Los modelos de xenotrasplantes se ensayaron inicialmente usando líneas celulares seleccionadas basándose en experimentos *in vitro*, tales como los descritos en el Ejemplo 11. Estas líneas celulares incluyen pero sin limitación: líneas celulares de linfoma de Burkitt humano Raji (ATCC N° CCL-86) y Ramos (ATCC N° CRL-1596); 35 línea celular humana RPMI 1788 (ATCC N° CRL-156); línea celular de mieloma/plasmacitoma humano IM-9 (ATCC N° CRL159); línea celular humana DAKIKI (ATCC N° TIB-206) y células HS Sultan (ATCC N° CRL-1484). También pueden usarse células derivadas directamente de tumores humanos en este tipo de modelo. De esta manera, puede usarse exploración de muestras de pacientes con respecto a sensibilidad a tratamiento con IL-21 o con una fusión de saporina tóxica con IL-21 para seleccionar las indicaciones óptimas para uso de zalfa11 en terapia 40 antineoplásica.

Después de la selección del modelo *in vivo* de xenotrasplante apropiado, descrito anteriormente, se evalúa la actividad inducida por IL-21 de células citolíticas naturales y/o efectos de IL-21 en tumores derivados de linfocitos B *in vivo*. La IL-21 humana se ensaya con respecto a su capacidad para generar células efectoras citotóxicas (por ejemplo linfocitos NK) con actividad contra tumores derivados de linfocitos B usando modelos de xenotrasplante de tumor de ratón descritos en el presente documento. Además, pueden evaluarse efectos directos de IL-21 humana en los tumores. Los modelos de xenotrasplante que van a llevarse a cabo se seleccionan como se ha descrito anteriormente. Se desarrolla un protocolo que usa células humanas estimuladas por IL-21 y se ensaya con respecto a eficacia en la reducción del número de células tumorales y la promoción de la supervivencia en ratones a los que se han inoculado líneas celulares o tumores primarios.

Ejemplo 14

Evaluación preliminar de la estabilidad acuosa de IL-21 humana

Se realizaron estudios preliminares para evaluar las características de estabilidad acuosa de IL-21 humana que apoyan el bioprocésamiento, formulación y administración *in vivo*. Los objetivos fueron: 1) verificar la estabilidad y recuperación de Minibombas Alzet y almacenamiento y manipulación general, 2) determinar la naturaleza indicadora

de estabilidad de varios procedimientos analíticos incluyendo HPLC de intercambio catiónico (CX-HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) y bioensayo (proliferación de BaF3/ α 11R (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.307.024)) y 3) determinar las rutas de degradación limitantes de estabilidad y sus dependencias cinéticas.

- 5 Se prepararon alícuotas de IL-21 humana purificada (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) por dilución a 2 mg/ml en PBS (pH 7,4) y se almacenaron en cryovials de polietileno de baja densidad (LDPE) (Nalgene, 1,8 ml) a -80 °C (control), 5 °C, 30 °C y 37 °C. Las muestras se ensayaron de forma intermitente durante 29 días por CX-, RP-, SEC-HPLC y bioensayo. También se almacenaron alícuotas a -80 °C y se sometieron a ciclos de congelación-descongelación (f/t) (-80 °C/RT; f/t 5X, f/t 10X). La recuperación de IL-21 humana se determinó en relación con el control a -80 °C (1 f/t) en todos los ensayos.

10 La solución de IL-21 restante de las muestras de control a -80 °C se volvió a congelar (-80 °C) después del análisis. Esta alícuota (2 f/t) se usó para evaluar la estabilidad térmica y conformacional de IL-21 humana en función de pH usando dicroísmo circular (CD). La solución de 2 mg/ml se diluyó a 100 μ g/ml en tampones de PBS que variaban de pH 3,3-8,8. Los espectros de CD de UV lejano se controlaron en el intervalo de temperatura de 5-90 °C en intervalos de 5 °C (n=3/pH). El espectropolarímetro CD usado fue un Jasco 715 (Jasco, Easton, MD). El desplegamiento térmico se controló por cambios en la elipticidad a 222 nm en función de la temperatura. Se estimaron estimaciones de la T_m asumiendo un modelo de desplegamiento de dos estados. Los datos se ajustaron (curva sigmoidea) usando SlideWrite Plus para Windows v4.1 (Advanced Graphics Software; Encinitas, CA).

15 La recuperación y estabilidad de Minibomba Alzet (Modelo N° 1007D; ALZA Corporation, Mountain View, CA) se evaluó cargando bombas con 100 μ l de la solución de IL-21 humana 2 mg/ml, colocando las bombas en 1,8 ml de LDPE que contenía 1 ml de PBS (pH 7,4) y almacenándolas a 37 °C. La liberación/recuperación de IL-21 humana a partir de las minibombas se evaluó por CX-, RP- y SEC-HPLC los días 2, 4 y 7. La actividad se evaluó por bioensayo el día 7. El estudio se diseñó para evaluar la liberación de 3 bombas por momento de toma de muestras.

20 Los datos cromatográficos sugirieron que los procedimientos CX- y SEC-HPLC eran indicativos de estabilidad, mientras que el procedimiento de RP-HPLC no lo era. Se observaron al menos 3 picos adicionales que indicaban productos de degradación evidentes por CX-HPLC. El procedimiento de SEC-HPLC resolvió un agregado de IL-21 humano evidente, eluyendo antes que IL-21 humana. Sin embargo, no se observaron picos adicionales significativos que eluyeran después del pico de IL-21 humana. Esto sugiere que los productos de degradación observados por CX-HPLC resultaron con mayor probabilidad de modificaciones de aminoácidos tales como desamidación en lugar de procedimientos de hidrólisis/proteólisis que condujeron a variantes recortadas. Se observó un pequeño grado de estrechamiento anterior/posterior por RP-HPLC (en relación con el control) en muestras que se ha demostrado que habían experimentado degradación significativa por SEC- y CXHPLC. Sin embargo, los productos de degradación evidentes se resolvieron por RP-HPLC. La degradación observada por CX-HPLC aumentó en función de tiempo/temperatura, y siguió una cinética de primer orden evidente. El porcentaje de IL-21 humana recuperada por CX-HPLC después de 29 días a 37 °C, 30 °C y 5 °C fue 39 %, 63 % y 98 %, respectivamente. La agregación también aumentó de una manera dependiente de tiempo-temperatura. El porcentaje de agregado encontrado en preparaciones almacenadas durante 29 días a 37 °C, 30 °C y 5 °C fue de 7,4, 3,4 y por debajo de límites detectables (BDL), respectivamente. No se observaron diferencias significativas por bioensayo en ninguna muestra, lo que sugiere que los productos de degradación tienen actividad equivalente a IL-21 humana intacta. No se ha observado degradación por ningún ensayo en muestras sometidas a hasta 10 ciclos f/t.

25 La liberación de IL-21 humana de Minibombas Alzet fue coherente con la liberación de volumen teórica esperada. Esto sugiere que la adsorción a superficie significativa no alteraría el suministro de IL-21 humana usando las Minibombas Alzet con una concentración de llenado de 2 mg/ml. Se observó la degradación coherente con la previamente observada. El porcentaje de pureza determinado por CX-HPLC de IL-21 humana liberada después de 2, 4 y 7 días fue del 96 %, 90 % y 79 %, respectivamente. Debería reconocerse que también se produce degradación después de que IL-21 humana se libere a o se diluya con medio de liberación. Por lo tanto, el porcentaje de pureza dentro de la minibomba puede ser diferente en cierto grado al que se determinó que está en el medio de liberación. La bioactividad de la muestra fue coherente con la cantidad esperada de IL-21 humana liberada de las minibombas.

30 Los espectros de CD de UV lejano de IL-21 humana, como se esperaba, fueron coherentes con interleucinas, tales como IL-3 (J. Biochem., 23: 352-360, 1991), IL-4 (Biochemistry, 30: 1259-1264, 1991), y mutantes de IL-6 (Biochemistry, 35: 11503-11511, 1996). No se observaron cambios globales de los espectros CD de UV lejano en función del pH. Los resultados mostraron que el pH de estabilidad conformacional/térmica máxima fue ~ pH 7,4. El análisis de las curvas de desplegamiento se basó en un mecanismo de desplegamiento de dos estados para permitir la comparación de la estabilidad térmica/conformacional en función de pH/composición. Sin embargo, uno o más intermedios pueden existir durante el proceso de desplegamiento puesto que la cooperación era relativamente baja, basándose en la poca profundidad de la curva de desplegamiento. Aunque no se diseñaron específicamente estudios para determinar si IL-21 humana se vuelve a plegar después del desplegamiento térmico a 90 °C, los datos preliminares sugieren que se produce al menos un replegamiento parcial después de que la temperatura de la muestra se vuelva a enfriar a 20 °C.

Estos estudios permiten que se identifique un paradigma analítico para evaluar la pureza y verificar la estabilidad de IL-21 humana. Por ejemplo, puede usarse SEC-HPLC para caracterizar el grado y la tasa de agregación en solución acuosa. De forma similar, puede usarse CX-HPLC para caracterizar el grado y tasa de degradación de IL-21 humana por mecanismos distintos de agregación. El bioensayo puede usarse para verificar la actividad de IL-21 humana y sus productos de degradación acuosa. Por ejemplo, las variantes de IL-21 humana generadas en solución acuosa y resueltas por CX-HPLC pueden en sí mismas ser útiles como agentes terapéuticos, puesto que tienen bioactividad equivalente. Además, el hecho de que IL-21 humana se degrade por varios procedimientos diferentes (agregación, modificaciones de aminoácidos) sugiere que puede ser necesaria una formulación preferida o única que minimice la tasa de cada proceso de degradación para estabilidad a largo plazo de un producto en solución.

Se está realizando identificación de la naturaleza de los productos de degradación acuosa y determinación de sus dependencias cinéticas (pH, concentración, excipientes). Se ha determinado que la estabilidad de IL-21 humana en suero/plasma apoya el diseño e interpretación de los estudios *in vivo*.

Ejemplo 15

Efecto de IL-21 en tumores derivados de linfocitos B *in vivo*.

15 A. Infusión de IL-21 usando bombas miniosmóticas

La administración de IL-21 por infusión constante mediante bombas miniosmóticas dio como resultado concentraciones en suero de estado estacionario proporcionales a la concentración de la IL-21 contenida en la muestra. Se cargaron 0.22 ml de IL-21 (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) contenida en solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0) a una concentración de 2 mg/ml o 0,2 mg/ml en condiciones estériles en bombas mini-osmóticas Alzet (modelo 2004; Alza corporation Palo Alto, CA). Se implantaron bombas por vía subcutánea en ratones a través de una incisión de 1 cm en la piel dorsal, y a piel se cerró con cierres de herida estériles. Estas bombas se diseñan para suministrar sus contenidos a una tasa de 0,25 µl por hora durante un periodo de 28 días. Este procedimiento de administración dio como resultado aumento significativo de la supervivencia en ratones a los que se inyectaron células tumorales (posteriormente).

25 B. Efecto de IL-21 en tumores derivados de linfocitos B *in vivo*

Los efectos de IL-21 humana (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) se ensayaron *in vivo* usando un modelo de xenotrasplante de tumor de ratón descrito en el presente documento. Los modelos de xenotrasplante ensayados fueron línea celular linfoblastoide humana IM-9 (ATCC N° CRL159). Se dividieron los ratones C.B-17 SCID (hembras C.B-17/lcrHsd-scid; Harlan, Indianapolis, Indiana) en 4 grupos. El día 0, se recogieron células IM-9 (ATCC N° CRL159) del cultivo y se inyectaron por vía intravenosa, a través de la vena de la cola, a todos los ratones (aproximadamente 1.000.000 de células por ratón). El día 1, se implantaron bombas mini-osmóticas que contenían artículos de ensayo o artículos de control por vía subcutánea a los ratones. Los ratones de los grupos 1-3 (n=9 por grupo) se trataron con concentraciones crecientes de IL-21: el grupo 1 contenía IL-21 humana 2,0 mg/ml y se le suministraron 12 µg por día; el grupo 2 contenía IL-21 humana 0,20 mg/ml y se le suministraron 1,2 µg por día; el grupo 3 contenía IL-21 humana 0,02 mg/ml y se le suministraron 12 µg por día. Los ratones del grupo 4 (n = 9) fueron un control y se trataron con vehículo (PBS pH 6,0).

Los ratones tratados con infusión de IL-21 12 µg/día o 1,2 µg/día tuvieron supervivencia aumentada en comparación con ratones tratados con vehículo (p<0,0001 y p<0,005 para 12 µg/día o 1,2 µg/día frente a vehículo respectivamente, usando ensayos de rango logarítmico de la función de supervivencia). Los ratones del grupo de dosis de 0,12 µg/día tuvieron una supervivencia similar a la de los ratones del grupo tratado con vehículo. Estos resultados mostraron que IL-21 redujo significativamente los efectos de las células tumorales de linfocitos B *in vivo*, dando como resultado significativamente aumento de la supervivencia.

Ejemplo 16

Efectos antitumorales *in vivo* de IL-21 en modelos de melanoma B16-F10 y timoma AG.7

45 A. Efecto de IL-21 murina en crecimiento de metástasis de melanoma B16-F10 *in vivo*

Se dividieron los ratones (hembra C57B16, 9 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) en tres grupos. El día 0, se recogieron células de melanoma B16-F10 (ATCC N° CRL-6475) del cultivo y se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola a todos los ratones (aproximadamente 100.000 células por ratón). Los ratones se trataron después con el artículo de ensayo o vehículo asociado por inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la solución indicada. Los ratones del primer grupo (n = 24) se trataron con vehículo (PBS pH 6,0), que se inyectó el día 0, 2, 4, 6 y 8. Los ratones del segundo grupo (n = 24) se trataron con IL-21 murina (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024), que se inyectó a una dosis de 75 µg el día 0, 2, 4, 6 y 8. Los ratones del tercer grupo (n = 12) se trataron con IL-21 murina, que se inyectó a una dosis de 75 µg diariamente desde el día 0 hasta el día 9. Todos los ratones se sacrificaron el día 18 y los pulmones se recogieron para cuantificación de tumor. Se contaron los focos de crecimiento tumoral mayores de 0,5 mm de diámetro en todas las superficies de cada lóbulo del pulmón. En ambos grupos de ratones tratados con IL-21 murina, el número medio de focos tumorales presentes en los pulmones se

redujo significativamente, en comparación con ratones tratados con vehículo. Los ratones tratados más frecuentemente (es decir diariamente) tuvieron menos focos tumorales que los ratones tratados en días alternos, aunque este no fue un hallazgo estadísticamente significativo entre estos dos grupos.

- 5 Estos resultados indicaron que el tratamiento con IL-21 murina ralentizó el tratamiento de los tumores de melanoma B 16 o potenció la capacidad del sistema inmune para destruir las células tumorales. Los efectos del tratamiento en células tumorales se midieron probablemente a través de células del sistema inmune (es decir linfocitos, linfocitos NK), que poseen receptores para IL-21, tales como, por ejemplo, receptor de IL-21 y $\alpha 11/IL-2R\gamma$ (Publicaciones de WIPO N° WO 0/17235 y WO 01/7717) y se sabe que están asociados con actividad anti-tumoral.

B. Efecto de IL-21 murina en crecimiento de timoma EG.7 *in vivo*

- 10 Se dividieron los ratones (hembra C57B16, 9 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) en tres grupos. El día 0, se recogieron células de EG.7 (ATCC N° CRL-2113) del cultivo y se inyectaron 1.000.000 de células por vía intraperitoneal en todos los ratones. Los ratones se trataron después con el artículo de ensayo o vehículo asociado por inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la solución indicada. Los ratones del primer grupo (n = 6) se trataron con vehículo (PBS pH 6,0), que se inyectó el día 0, 2, 4 y 6. Los ratones del segundo grupo (n = 6) se trataron con IL-21 murina (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024), que se inyectó a una dosis de 10 μg el día 0, 2, 4 y 6. Los ratones del tercer grupo (n = 6) se trataron con IL-21 murina, que se inyectó a una dosis de 75 μg el día 0, 2, 4 y 6. En ambos grupos de ratones tratados con IL-21 murina, el tiempo de supervivencia aumentó significativamente, en comparación con ratones tratados con vehículo. El grupo tratado con dosis de 75 μg de IL-21 tuvo supervivencia significativamente mayor que el grupo tratado con dosis de 10 μg , y el 33 % (2/6 ratones) de este grupo sobrevivió durante más de 70 días. Una parte adicional de este estudio ensayó el efecto de las mismas dosificaciones llevadas a cabo hasta el día 12. Los resultados fueron muy similares al programa de dosificación más corto, teniendo ambas dosis supervivencia significativamente aumentada frente al tratamiento con vehículo, y la dosis más alta dio la mejor respuesta (50 % de supervivencia después de 70 días).

- 25 En algunos experimentos se inyectaron aproximadamente 4.000.000 de linfocitos T OT-I por vía intraperitoneal a los ratones el día antes del día 0. Los ratones se trataron después con IL-21 o vehículo como anteriormente. La presencia de los linfocitos T OT-I no tuvo efecto en el tipo de supervivencia de los ratones tratados con vehículo. En los ratones tratados con IL-21 la presencia de los linfocitos T OT-I potenció el tiempo de supervivencia en comparación con los ratones tratados con IL-21 solamente.

- 30 Estos resultados indicaron que el tratamiento con IL-21 murina ralentizó el crecimiento de los tumores EG.7 o potenció la capacidad del sistema inmune para destruir las células tumorales. El aumento de la supervivencia proporcionado por los linfocitos T OT-I en presencia de tratamiento con IL-21 sugiere que IL-21 activa las células efectoras del sistema inmune.

Ejemplo 17

Efectos de IL-21 en las citocinas de suero y filtración vascular

- 35 A. Análisis de IL-21 en citocinas de suero

- La terapia con IL-2 es eficaz en el tratamiento de ciertos cánceres. Sin embargo, el uso de IL-2 como un agente terapéutico se ha visto limitado por sus efectos tóxicos, concretamente síndrome de filtración vascular (VLS). El VLS inducido por IL-2 se caracteriza por infiltración de linfocitos, monocitos y neutrófilos en el pulmón provocando daño endotelial en el pulmón que con el tiempo conduce a filtración vascular (revisado en Lentsch AB y col, Cancer Immunol. Immunother., 47: 243, 1999). Puede inducirse VLS en ratones con administración de dosis altas repetidas de IL-2 y medición de filtración vascular por captación de Azul de Evans por el pulmón. Otros parámetros que se ha mostrado que son característicos de VLS en ratones incluyen niveles aumentados en suero de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ (Anderson JA y col, J. Clin. Invest. 97: 1952, 1996) así como números aumentados de T, NK y monocitos activados en diversos órganos. El bloqueo de $\text{TNF}\alpha$ con una molécula de TNFR-Fc soluble inhibió la infiltración pulmonar por linfocitos y por lo tanto la lesión pulmonar (Dubinett SM y col, Cell. Immunol. 157: 170, 1994). El objetivo fue comparar la capacidad de IL-2 e IL-21 para inducir VLS en ratones y medir los diferentes parámetros indicativos de VLS (captación de Azul de Evans, análisis de citocinas en suero, fenotipo celular del bazo).

- Los ratones (hembras, C57B16, 11 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) se dividieron en 5 Grupos. Todos los grupos contenían 10 ratones por grupo. Los grupos son como sigue: el Grupo I o Grupo de Vehículo recibió solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS); los Grupos II y III recibieron IL-2 0,6 o 1,8 millones de UI/inyección respectivamente; los Grupos IV y V recibieron IL-21 de ratón (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) o 100 μg /inyección respectivamente. El estudio consistió en 4 días, el peso corporal se midió diariamente y los animales recibieron 7 inyecciones intraperitoneales de sustancia de ensayo durante el periodo de 4 días. Los animales recibieron dos inyecciones diarias el día 1-3 y el cuarto día recibieron una inyección sencilla por la mañana. Dos horas después de la inyección final los animales recibieron una inyección en la vena de la cola de Azul de Evans 1 % (0,2 ml). Dos horas después de la inyección de azul de Evans se anestesió a los ratones con Isoflurano y se extrajo sangre que se analizó con respecto a citocinas en suero. Después de la extracción de sangre se realizó

perfusión transcárdica a los animales con solución salina heparinizada (25 U hep/ml solución salina). Después de la perfusión se retiró el bazo y se pesó, se retiraron el hígado y el pulmón y se colocaron en 10 ml de formamida durante 24 horas de incubación a temperatura ambiente. Después de 24 horas de incubación se cuantificó la filtración vascular por extravasación de azul de Evans mediante medición de la absorbancia del sobrenadante a 650 nm usando un espectrofotómetro.

Se tomaron muestras de sangre de los ratones y se separó el suero usando un tubo separador de suero convencional. Se usaron 25 µl de suero de cada animal en un ensayo de Matriz de Perlas de Citocina Becton Dickenson (BD) (Kit de Th1/Th2 CBA de ratón). El ensayo se realizó según el protocolo del fabricante. Brevemente, se incubaron 25 µl de suero con 25 µl de mezcla de perlas (IL-2, IL-4, IL-5, TNFα e IFNγ) y 25 µl de reactivo de detección de PE durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. También se preparó un conjunto de patrones de citocina a diluciones que variaban de 0-5000 pg/ml con perlas según las instrucciones del fabricante. Las perlas incubadas se lavaron una vez en tampón de lavado y se adquirieron datos usando un BD FACScan según las instrucciones descritas en el Kit. Los datos se analizaron usando el Software de Matriz de Perlas Citométrico BD (BD Biosciences, San Diego, CA).

El análisis de citocinas del suero usando el kit de citocinas CBA (Becton Dickenson, San Diego, CA) no mostró aumento de los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, IFNγ o TNFα en los grupos tratados con control de PBS. Hubo un aumento dependiente de dosis de los niveles de IL-5, IFNγ y TNFα en sueros de ratones tratados con IL-2. No hubo aumento de los niveles de las 5 citocinas medidas en el suero de ratones tratados con IL-21. Los niveles de citocinas en la dosis más alta de IL-21 reflejaron los de los animales tratados con PBS. Esto muestra que a diferencia del tratamiento con IL-2 que conduce a aumento de los niveles de suero de las citocinas inflamatorias IL-5, TNFα e IFNγ, el tratamiento con IL-21 no tiene ningún efecto en estas citocinas inflamatorias.

Se proporcionan los resultados de un experimento representativo en la Tabla 6. Todas las concentraciones se expresan en pg/ml con una media de 4 animales/grupo.

Tabla 6

	TNFα	IFNγ	IL5	IL4	IL2
PBS	2,4	0,0	2,9	2,2	1,3
IL2 0,6 millIU	22,9	21,6	1095,0	2,5	2,0
IL2 1,8 millIU	69,1	185,1	1132,9	2,0	1,9
IL2 3,6 millIU	78,9	195,6	651.3	1,8	2,1
IL-21 3 µg	2,1	1,6	2,7	1,7	1,6
IL-21 100 µg	3,1	0,0	4,0	0,0	1,1
IL-21 200 µg	7,3	1,9	4,0	2,6	1,9

Como se muestra en la Tabla 5 anterior, el tratamiento de ratones con IL-2 dio como resultado un aumento drástico de las citocinas inflamatorias en suero, concretamente IL-5, IFNγ y TNFα. El tratamiento de ratones con IL-21 no mostró ningún aumento de los niveles de citocina por encima de los ratones tratados con PBS. Estos resultados muestran que incluso a las dosis más altas, IL-21 no regula positivamente citocinas inflamatorias y su efecto en células *in vivo* es diferente de IL-2.

El tratamiento de ratones con dosis alta repetida de IL-2 dio como resultado un aumento de los niveles en suero de IL-5, IFNγ y TNFα. Se ha mostrado que estas citocinas pro-inflamatorias desempeñan un papel en VLS asociado con toxicidad de IL-2. El bloqueo de TNFα dio como resultado reducción de la infiltración de linfocitos a los pulmones y redujo la lesión pulmonar asociada con toxicidad de IL-2 (Dubinett SM y col, 1994, Cell. Immunol. 157: 170). El tratamiento con IL-21 no tuvo ningún efecto en los niveles de IL-5, TNFα o IFNγ en suero. Esto sugiere que IL-21 actúa de forma diferente a IL-2 *in vivo* y que la falta de citocinas pro-inflamatorias en sueros de ratones tratados con IL-21 podría indicar menor toxicidad de IL-21 en comparación con IL-2.

B. Análisis de IL-21 en inmunofenotipación de filtración vascular de células esplénicas

El síndrome de filtración vascular inducido por IL-2 (VLS) implica daño orgánico que se produce en el nivel de endotelio postcapilar. Sin embargo, este daño se produce de forma secundaria a dos procesos patológicos distintos: el desarrollo de VLS, y la migración transendotelial de linfocitos. La lesión orgánica aguda está mediada por infiltración de neutrófilos mientras que la lesión orgánica crónica está mediada por infiltración de monocitos y linfocitos (revisado en Lentsch AB y col, mencionado anteriormente). En ratones, la reducción del número de células con fenotipos de superficie característicos de células LAK o NK alivia el daño orgánico (Anderson TD y col, Lab.

Invest. 59: 598, 1988; Gately, MK y col. J. Immunol., 141: 189, 1988). El aumento de los números de linfocitos NK y monocitos es por lo tanto un marcador de efectos celulares mediados por IL-2 de VLS. Además, IL-2 regula positivamente directamente la expresión de moléculas de adhesión (es decir LFA-1, VLA-4 e ICAM-1) en linfocitos y monocitos (Anderson JA y col, mencionado anteriormente). Se cree que este aumento permite a las células unirse a células endoteliales activadas y ayuda en la trans migración de células al tejido. El aumento de la expresión de estas moléculas se considera otro marcador de activación celular inducida por IL-2 durante VLS. El objetivo de este estudio fue estudiar células esplénicas de ratones tratados con IL-2 e IL-21 en un protocolo VLS y comparar los efectos de las dos citocinas para mediar en efectos celulares asociados con VLS.

Se analizaron grupos de ratones C57BL/6 coincidentes en edad y sexo tratados y descritos anteriormente (Ejemplo 17A). El día 4, los ratones se sacrificaron y se estudió el fenotipo de las poblaciones de células esplénicas por citometría de flujo convencional. La celularidad y el peso esplénico aumentaron drásticamente en ratones tratados con IL-2 en comparación con ratones tratados con PBS. Los ratones tratados con IL-21 tuvieron un ligero aumento de los pesos esplénicos (a las dosis más altas) pero no hubo aumento significativo de la celularidad esplénica en comparación con los grupos tratados con PBS. El análisis de población celular mostró un aumento significativo de porcentaje y números de NK, NKT y monocitos en ratones tratados con IL-2 pero no en los ratones tratados con IL-21. Además, hubo un aumento drástico dependiente de dosis de células que expresaban LFA-1 en los grupos tratados con IL-2 en comparación con controles de PBS. El tratamiento con IL-21 no tuvo efecto en la expresión de LFA-1 en células esplénicas.

Se aislaron bazo de ratones de los diversos grupos. Se lisaron glóbulos rojos incubando las células durante 4 minutos en tampón de lisis ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, EDTA 0,1 mM) seguido de neutralización en medio RPMI-10 (RPMI con FBS 10 %). La expresión de marcadores de superficie celular se analizó por citometría de flujo de tres colores convencional. Todos los anticuerpos se obtuvieron de BD Pharmingen (San Diego, CA). Se usaron CD11a conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (LFA-1), CD49d (VLA-4, una cadena), Gr-1 FITC, CD4 conjugado con ficoeritrina (PE), NK1.1, CD11b y CD8 conjugado con CyC, CD3 y B220 para teñir células. Se usaron 1-3 x 10⁶ células para tinciones individuales. Se bloqueó la unión no específica incubando células en tampón de bloqueo (PBS, FBS 10 %, 2.4G2 20 ug/ml). Después de bloquear, las células se incubaron con anticuerpos primarios durante 20 minutos. A no ser que se especifique de otro modo, todos los mAb se usaron a 1 µg/tinción en un volumen de 100 µl. Las células se lavaron una vez en PBS 1X y se resuspendieron en PBS antes de adquirirse usando los instrumentos FACScan o FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). Los datos se analizaron usando el Software Cellquest (BD Biosciences).

Los ratones tratados con IL-2 tuvieron aumento significativo de los pesos del bazo en comparación con grupos tratados con PBS (Tabla 7, a continuación). Los ratones tratados con IL-21 tuvieron un aumento significativo del peso del bazo frente a los controles. Sin embargo, los aumentos de los grupos tratados con IL-21 fueron significativamente menores que en los grupos tratados con IL-2 (p=0,0002). El aumento de los pesos de bazo en ambos grupos fue dependiente de dosis. La Tabla 7 a continuación muestra los grupos de tratamiento; los pesos esplénicos medios se muestran en mg y n=4.

Tabla 7

	Peso total del bazo (mg)	Dev. Tip.	p valor (frente a PBS)
PBS	63,5	9,7	0
IL-2 (0,6)	177,5	17,8	<0,0001
IL-2 (1,8)	204,25	10	<0,0001
IL-2 (3,6)	231,2	9,6	<0,0001
IL-21 (33)	92,8	6	0,0022
IL-21 (100)	117,6	19,3	0,0024
IL-21 (200)	125,85	33	0,0111

Se muestran los datos de celularidad esplénica media en la Tabla 8, a continuación (n=4). El tratamiento con IL-2 a dosis más alta aumentó la celularidad esplénica significativamente frente a los grupos tratados con PBS de control. Los grupos tratados con IL-21 no mostraron aumento significativo de la celularidad esplénica en comparación con grupos de PBS.

Tabla 8

	Células totales (x 10 ⁶)	Dev. Tip.	p valor (frente a PBS)
PBS	48	16,4	o
L-2 (0,6)	57,1	11,8	0,4014
IL-2 (1,8)	100,4	21,6	<0,0083
IL-2 (3,6)	101,8	4,25	<0,0007
IL-21 (33)	58,8	13,5	0,3463
IL-21 (100)	48	7,83	0,9769
IL-21 (200)	53,8	22,5	0,6917

5 El VLS inducido por IL-2 se caracteriza por aumento de los números de linfocitos NK, monocitos y células que expresan el marcador de adhesión LFA-1 (revisado en Lentsch AB y col, mencionado anteriormente). Los datos anteriores usando IL-2 reproducen informes publicados sobre el aumento de linfocitos NK, monocitos y células LFA-1+. Los ratones tratados con IL-2 muestran todos los signos de VLS en comparación con los controles. Por el contrario, los ratones tratados con IL-21, aunque tienen una captación aumentada de Azul de Evans, no muestran aumento de citocinas proinflamatorias en suero, o aumento de células LFA-1+ o linfocitos NK. Además, aunque los ratones tratados con IL-21 muestran números aumentados de monocitos, el aumento es menor que el que se ve con animales tratados con IL-2, lo que sugiere que los efectos mediados por IL-2 son más graves que los efectos mediados por IL-21. Tomados juntos los datos de celularidad esplénica y los datos de citocina en suero, IL-21 no induce una respuesta inflamatoria comparable a IL-2. Todos los parámetros analizados indicarían que IL-21 induce respuesta inflamatoria pequeña, si la hubiera, cuando se administra en un protocolo de VLS en dosis similares a IL-2 (peso/peso).

15 Además, como se muestra en la Tabla 9 y Tabla 10, a continuación, el análisis de citometría de flujo de las células de bazo de ratones reveló que los ratones tratados con IL-2 tenían un aumento dependiente de dosis del porcentaje y números de linfocitos NK/T esplénicos (NK1.1+CD3+), linfocitos NK (NK1.1+CD3-), macrófagos (CD11b+) y células LFA-1+ (TABLA III y IV). Los ratones tratados con IL-21 no tuvieron aumento de linfocitos NK/T, linfocitos NK o células LFA-1+. Hubo un aumento del % y número de macrófagos y granulocitos (datos no mostrados) en el grupo tratado con IL-21 en comparación con los grupos tratados con PBS de control. Este aumento fue similar o menor que el aumento en ratones tratados con IL-2.

Tabla 9: % medio de células de linaje en bazo (n=4)

	% NK/T	% NK	% macrófagos	% B	% CD4 T	% CD8 T	% LFA-1 +
PBS	0,7225	3,1925	6,625	50,025	21,975	14,275	11,1775
IL-2 (0,6)	4,34	9,3375	12,525	43,9	17,65	10,15	29,26
IL-2 (1,8)	3,2	13,9	14,525	43,75	15,55	11,55	34,825
IL-2 (3,6)	3,075	14,3	11,875	42,8	14,875	17,325	44,05
IL-21 (33)	0,615	2,9875	7,825	53,65	17,925	10,95	8,4375
IL-21 (100)	0,63	2,76	11,375	48,325	17,825	11,275	13,35
IL-21 (200)	1,025	3,4325	16,175	45,125	17,225	12,15	15,7

Tabla 10: Números de células esplénicas (x 10⁶ células, n=4)

	NKT	NK	CD11b	B220	Cd4	Cd8	LFA-1	Gr-1
PBS	0,33	1,54	3,19	24,34	10,19	6,58	5,41	1,11
IL-2 (0,6)	2,34	5,33	7,04	25,23	10,16	5,77	16,60	2,82
IL-2 (1,8)	3,08	14,29	14,16	43,63	15,57	11,62	35,11	7,65
IL-2 (3,6)	3,15	14,59	12,08	43,53	15,13	17,64	44,83	4,76
IL-21 (33)	0,37	1,77	4,67	31,50	10,47	6,32	5,05	1,05
IL-21 (100)	0,30	1,33	5,35	23,16	8,55	5,40	6,35	1,54
IL-21 (200)	0,56	1,86	8,46	23,85	9,20	6,39	8,43	3,20

Además, se midieron criterios de valoración adicionales entre los grupos. Se compararon los siguientes criterios de valoración: peso corporal, peso del bazo, filtración vascular en pulmón e hígado y citocinas en suero. No se observó diferencia significativa de los pesos corporales entre los grupos. Como se ha analizado anteriormente, los animales tratados con ambas dosis de IL-2, Grupo II y III, tuvieron pesos del bazo significativamente más pesados en comparación con animales tratados con IL-21 y control de PBS ($p < 0,0001$). Los animales tratados con ambas dosis de IL-21, Grupo IV y V, tuvieron pesos del bazo significativamente más pesados en comparación con animales de control con PBS ($p < 0,007$ Grupo IV y $p < 0,0001$ Grupo V).

También se midió la filtración vascular tanto en pulmón como en hígado. En pulmón, ambos grupos de animales tratados con IL-2, Grupo II y III, tuvieron un aumento significativo de la filtración vascular ($p < 0,0001$) en comparación con animales de control con PBS. Solo el Grupo III, la dosis alta de IL-2 tuvo un aumento significativo de filtración vascular en comparación con IL-21 tanto de dosis baja como de dosis alta ($p < 0,0001$ y $p < 0,0065$) respectivamente. Solo la dosis más alta de IL-21, Grupo V, tuvo un aumento significativo de filtración vascular en comparación con animales tratados con PBS ($p < 0,0001$). Sin embargo, la cantidad de filtración vascular fue significativamente más baja que en todos los animales tratados con IL-2. En el hígado, los animales tratados con IL-2 de dosis tanto baja como alta tuvieron un aumento significativo de filtración vascular ($p < 0,0016$ y $p < 0,0001$ respectivamente) en comparación con animales tratados con PBS. Los animales tratados con la dosis alta de IL-2 tuvieron un aumento significativo de filtración vascular en comparación con animales tratados con IL-21 de dosis tanto baja como alta ($p < 0,0002$ y $p < 0,0001$ respectivamente). Solo los animales tratados con IL-21 de dosis baja tuvieron un aumento significativo de filtración vascular en comparación con animales tratados con PBS ($p < 0,0397$).

Ejemplo 18

Análisis citométrico de flujo de expresión del receptor de IL-21

Se evaluó la expresión de los receptores de IL-21 en linfocitos B neoplásicos derivados de muestras de ensayo de linfoma no de Hodgkin (NHL). Se usaron múltiples mAb para identificar linfocitos B neoplásicos y colocalizar receptores de IL-21 (Publicaciones de WIPO N° WO 0/17235 y WO 01/77171). La tinción inmunofluorescente por mAb anti-IL-21R o por biotina-IL-21 se registró como media de fluorescencia pico. Las puntuaciones cualitativas se evaluaron basándose en el desplazamiento de la media del pico de fluorescencia en relación con un mAb de control de isotipo coincidente.

Usando mAb anti receptor de IL-21 o biotina-IL-21 (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) los inventores detectaron uniformemente el receptor de IL-21 en muestras de ensayo de linfoma folicular (FL) derivadas de ganglio linfático. Sin embargo, casi ninguna muestra de ensayo derivada de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) mostró tinción significativa para receptor de IL-21, o tinción a intensidad muy baja en relación con mAb de control negativo. La tinción por mAb antirreceptor de IL-21 y biotina-IL-21 se correlacionó bien y detectó tinción moderada de linfoma folicular. Estos datos sugirieron que los receptores de IL-21 representan una diana terapéutica para linfoma folicular.

Ejemplo 19

Actividad de CTL murinos alorreactivos tratados con IL-21 de ratón (ensayos citotóxicos)

A. Ensayo de CTL

Se examinó la citólisis diana mediada por CTL (linfocitos T citotóxicos) por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional. Se generaron CTL alorreactivos (H-2^b anti-H-2^d) en un cultivo de linfocitos mixtos con esplenocitos C57B1/6 (H-2^b) con esplenocitos Balb/c irradiados con 3000 rad (H-2^d). Después de 7 días, los CTL se volvieron a estimular con esplenocitos Balb/c irradiados (y sin citocinas adicionales). Después de 7 días adicionales, los CTL se

volvieron a estimular durante 5 días en presencia de sobrenadantes recogidos de esplenocitos de rata activados con conA (una fuente en bruto de citocinas que se sabe que apoyan el crecimiento de CTL), IL-2 de ratón recombinante 10 ng/ml (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN), IL-15 humana recombinante (R&D Systems), IL-21 o una combinación de IL-15 e IL-21 (5 ng/ml cada una). Después de 5 días, los CTL se ensayaron con respecto a su capacidad para lisar células diana marcadas con ^{51}Cr : células de mastocitoma H-2^d P815 (ATCC N° TIB-64) y el timoma H-2^b EL4 (ATCC N° TIB-39) como un control negativo.

Los inventores cultivaron células P815 y EL4 en medio RP10 (RPMI 1640 convencional (GibcoBRL, Grand Island, NY) complementado con FBS 10 % (Hyclone) así como glutamina 4 mM (GibcoBRL), penicilina 100 U.I./ml + estreptomycin 100 MCG/ml (GibcoBRL), β -mercaptoetanol 50 μM (Gibco/BRL) y tampón HEPES 10 mM (GibcoBRL). El día del ensayo, se recogieron $1-2 \times 10^6$ células diana y se resuspendieron a $2,5-5 \times 10^6$ células/ml en medio RP10. Los inventores añadieron 50-100 μl de cromato sódico- ^{51}Cr 5 mCi/ml (NEN, Boston, MA) directamente a las células y las incubaron durante 1 hora a 37 °C, después las lavaron dos veces con 12 ml de PBS y las resuspendieron en 2 ml de medio RP10. Después de contar las células en un hemacitómetro, las células diana se diluyeron a $0,5-1 \times 10^5$ células/ml y se mezclaron 100 μl ($0,5-1 \times 10^4$ células) con células efectoras a diversas relaciones de efector: diana. Después de una incubación conjunta de 4 horas de células efectoras y las células diana marcadas a 37 °C, se recogió la mitad del sobrenadante de cada pocillo y se contó en un contador gamma durante 1 minuto/muestra. El porcentaje de liberación de ^{51}Cr específico se calculó a partir de la fórmula $100 \times (X-Y)/(Z-Y)$, en la que X es liberación de ^{51}Cr en presencia de células efectoras, Y es la liberación espontánea en ausencia de efectores y Z es la liberación de ^{51}Cr total de células diana incubadas con Tritón X-100 0,5 %. Los datos se representaron como el porcentaje de lisis específica frente a la relación de efector y diana en cada pocillo.

Los CTL reestimulados en presencia de rmlL-2 mostraron la mayor actividad lítica en las células diana P815, consiguiendo >70 % de lisis específica a una relación de efector y diana de 33:1. Los siguientes CTL más activos fueron los reestimulados en presencia de IL-21 + rhIL-15 (62 % de lisis específica), seguido de CTL cultivado con rhIL-15 (~50 % de lisis), CTL cultivado con IL-21 solo (30 % de lisis) y CTL reestimulado con sobrenadante de conA de rata (~10 % de lisis). Ninguno de los CTL lisó las células H-2^b EL4 (todos los CTL lisaron menos del 2 % de las dianas de EL4, incluso a la mayor relación de efector y diana de 33:1). Este patrón de potenciación de citólisis por citocinas (IL-2>IL-21 + IL-15>IL-15>IL-21>conA SN) se mantuvo en 2 experimentos repetidos. Estos datos demuestran que IL-21, particularmente en combinación con IL-15, puede potenciar la función efectora de CTL.

Ejemplo 20

30 Hipersensibilidad de tipo retardado en ratones knockout (KO) de IL-21

IL-21 es una citocina que se produce por los linfocitos T y que se ha mostrado que desempeña un papel en la proliferación y función de los linfocitos T. La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es una medida de las respuestas de los linfocitos T CD4 auxiliares a antígeno específico. En esta, los ratones se inmunizan con una proteína específica (por ejemplo, ovoalbúmina de pollo, OVA) y después se les presenta el mismo antígeno en el oído. El aumento del grosor del oído después de la presentación es una medida de la respuesta inmune específica al antígeno, mediada principalmente por linfocitos T CD4. Para entender la función *in vivo* de IL-21, se modificaron por ingeniería genética ratones deficientes en proteína IL-21 (ratones KO para IL-21). Si IL-21 es importante para las respuestas de linfocitos T, se debería esperar que los ratones KO para IL-21 tuvieran un defecto en las respuestas de linfocitos T. Un procedimiento para ensayar esto es inducir una respuesta DTH en ratones KO para IL-21. Los ratones KO para IL-21 y crías de la misma camada de control se inmunizaron con OVA mezclada con un adyuvante CFA (Adyuvante Completo de Freund). Se volvió a presentar a los grupos de ratones PBS (control) u OVA en el oído. Los ratones de control desarrollaron buena DTH cuando se les inyectó OVA como se muestra por aumento del grosor del oído a las 24 horas después de la presentación. Por el contrario, los ratones KO para IL-21 tuvieron un menor grado de grosor del oído en comparación con los controles. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,0164$). Sin embargo, a las 48 horas después de la presentación, no hubo diferencia en la respuesta de ratones de tipo silvestre o KO para IL-21. Como se esperaba, ni los ratones de control ni los KO para IL-21 respondieron a PBS (sin cambio en el grosor del oído).

Los ratones KO para IL-21 ($n=8$) y las crías de la misma camada de tipo silvestre de control ($n=8$) se inmunizaron en la espalda con 100 μg de ovoalbúmina de pollo (OVA) emulsionada en CFA en un volumen total de 200 μl . Siete días después de la inmunización, se inyectaron a la mitad de los ratones en cada grupo ($n=4/\text{gp}$) 10 μl de PBS en el oído y a la otra mitad se les inyectaron 10 μg de OVA en PBS en un volumen de 10 μl . El grosor del oído de todos los ratones se midió antes de la inyección en el oído de los ratones (medición 0). El grosor del oído se midió 24 horas y 48 horas después de la presentación. Se calculó la diferencia del grosor del oído entre la medición 0 y la medición de 24 horas o 48 horas.

55 A las 24 horas después de la presentación, los ratones de control o ratones KO para IL-21 a los que se había presentado PBS mostraron cambio mínimo o ninguno en el grosor del oído. En respuesta a la nueva presentación de OVA, los oídos de los ratones de control mostraron inflamación significativa ($18,54 \pm 2,79 \times 10^{-3}$ cm). Por el contrario, los ratones KO para IL-21 mostraron una reducción del grosor del oído en comparación con los controles ($12,7 \pm 1,07 \times 10^{-3}$ cm). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,0164$). Esto sugirió que IL-21 desempeña un

papel importante en las respuestas de linfocitos T CD4. Sin embargo, a las 48 horas después de la presentación, las respuestas en ratones KO para IL-21 no fueron diferentes de las de los controles lo que sugiere que IL-21 no influye en la respuesta en esta etapa. Se están realizando experimentos adicionales para evaluar el papel de IL-21 en respuestas DTH y en respuesta de linfocitos T.

- 5 Estos resultados sugieren que IL-21 desempeña un papel importante en las respuestas de linfocitos T CD4. Las respuestas de linfocitos T CD4 contribuyen significativamente a la inmunidad, tanto de una manera positiva para estimular inmunidad contra microbios y tumores como de una manera negativa en casos de autoinmunidad e inflamación. Puede considerarse que el uso de IL-21 estimula la respuesta de linfocitos T CD4 basándose en los resultados anteriores.

10 **Ejemplo 21**

IL-21 modifica la respuesta de linfocitos T OT-I a péptido OVA como se presenta por células dendríticas murinas.

A. Aislamiento y marcaje de linfocitos T OT-I

- 15 Están disponibles ratones que portan un receptor de linfocitos T transgénico específico para OVA257-264 en H-2K^b (OT-I transgenics, Jackson Laboratories). Las células de ganglios linfáticos de estos animales se empobrecieron con respecto a adherencia y los linfocitos T CD8 (linfocitos T OT-I) se enriquecieron por selección negativa usando columnas CD8 Collect (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canadá). Se evaluó la pureza de los linfocitos T CD8 por citometría de flujo y fue típicamente 90-95 % con <1 % de linfocitos T CD4.

- 20 Los linfocitos T OT-I se marcaron con diacetato succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) colocándolos en medio de crecimiento que comprendía medio RPMI-1640 complementado con FCS 10 % (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT), glutamina 2 mM (Gibco BRL), penicilina 50 U/ml (Gibco BRL), estreptomycin 50 µg/ml (GibcoBRL, Grand Island, NY) y 2-mercaptoetanol 50 µM (Sigma, St Louis, MO) que contenía CFSE 5 µM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron después tres veces, cada vez resuspendiendo en PBS que contenía FBS 5 %, centrifugando 5 minutos a 300 g, 20 °C, y retirando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento antes de su uso.

25 B. Preparación de células dendríticas murinas

Se cultivaron células dendríticas derivadas de médula ósea (DC) de médula ósea de ratón en medio de crecimiento en presencia de GM-CSF usando procedimientos bien conocidos (por ejemplo Inaba, K. y col., J. Exp. Med. 176: 1693-1702, 1992). Después de seis días de cultivo se estimularon con LPS 1 µg/ml (Sigma, St Louis, MO) durante una noche y después se lavaron en medio de crecimiento antes de su uso.

30 C. Estimulación *in vitro* de linfocitos T

- Se pulsaron DC preparadas como anteriormente con péptido OVA257-264 10 nm (SEC ID N°: 17) durante 2 horas. Las DC pulsadas se lavaron en medio de crecimiento para retirar cualquier péptido no unido y después se cultivaron con linfocitos T OT-I purificados preparados como se ha descrito anteriormente en presencia de otro medio solo o rIL-2 de ratón 20 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) o IL-2 murina 50 ng/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024). Después de 48 o 72 horas de incubación las células se recogieron y se analizaron por citometría de flujo con respecto a niveles de fluorescencia CFSE y unión con Anexina V (Pharmingen, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante.

- 40 Los resultados mostraron que cuando se presenta antígeno específico a linfocitos T OT-I en DC, estos experimentan 3-5 ciclos de división celular hasta el día 2 y 5-7 ciclos de división celular hasta el día 3, como se demuestra con marcaje de CFSE. En presencia de IL-2 su proliferación aumenta de modo que hasta el día 2 han experimentado 5-6 ciclos y hasta el día 3, 7-9 ciclos. Cuando los linfocitos T se tratan con IL-2, experimentan apoptosis el día 3 como se demuestra por unión con Anexina V. A diferencia de IL-2, IL-21 induce proliferación de linfocitos T aumentada y evita el marcaje de Anexina V hasta el día 3. IL-21 continúa potenciando la proliferación y evitando la apoptosis incluso en presencia de IL-2 añadida.

- 45 IL-21 potencia la proliferación así como reduce la apoptosis de las células CTL murinas. Esta actividad implica un papel inmunoestimulador positivo para IL-21 en situaciones clínicas, tales como cáncer o enfermedad viral, en las que los CTL pueden desempeñar un papel.

Ejemplo 22

Efecto de IL-21 murina en el crecimiento de timoma EG.7 *in vivo*:

- 50 IL-21 modifica la respuesta de linfocitos T OT-I en el modelo EG-7 de actividad antitumoral mediada por CTL

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen células infectadas y transformadas en virtud de la presentación de antígenos virales y tumorales en la superficie celular. Las respuestas antitumorales eficaces requieren la estimulación y expansión de clones de CTL específicos de antígeno. Este proceso requiere la interacción de varios

tipos celulares además de CTL y habitualmente da como resultado el establecimiento de memoria inmunológica. La línea celular tumoral EG-7 se transfecta con ovoalbúmina de pollo y de este modo expresa un antígeno de linfocitos T bien caracterizado, un péptido OVA (SEC ID N°: 17) presentado en H-2k^b. Los linfocitos T OT-I (Ejemplo 21) destruyen células tumorales EG7 *in vitro* e *in vivo* (Shrikant, P y Mescher, M., J. Immunology 162: 2858-2866, 1999).

5 Se dividieron los ratones (hembra, C57B16, 9 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) en tres grupos. El día 0, se recogieron células EG.7 (ATCC N° CRL-2113) del cultivo y se inyectaron 1.000.000 de células por vía intraperitoneal en todos los ratones. Los ratones se trataron después con el artículo de ensayo o vehículo asociado por inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la solución indicada. Los ratones del primer grupo (n = 6) se trataron con vehículo (PBS pH 6,0), que se inyectó el día 0, 2, 4 y 6. Los ratones del segundo grupo (n = 6) se trataron con IL-21
10 murina, que se inyectó a una dosis de 10 µg el día 0, 2, 4 y 6. Los ratones del tercer grupo (n = 6) se trataron con IL-21 murina, que se inyectó a una dosis de 75 µg el día 0, 2, 4 y 6. En ambos grupos de ratones tratados con IL-21 murina, el tiempo de supervivencia aumentó significativamente, en comparación con ratones tratados con vehículo. El grupo tratado con dosis de 75 µg de IL-21 tuvo supervivencia significativamente mayor que en el grupo tratado con dosis de 10 µg y el 33 % (2/6 ratones) de este grupo sobrevivió durante más de 70 días. Una parte adicional de este estudio ensayó el efecto de las mismas dosificaciones llevadas a cabo hasta el día 12. Los resultados fueron muy similares al programa de dosificación más corto, habiéndose aumentado significativamente con ambas dosis la supervivencia frente a tratamiento con vehículo y la dosis más alta dio la mejor respuesta (50 % de supervivencia después de 70 días).

En algunos experimentos se inyectaron 4.000.000 de linfocitos T OT-I por vía intraperitoneal en los ratones el día antes del día 0. Los ratones se exploraron después con IL-21 o vehículo como anteriormente. En diversos momentos después del tratamiento los linfocitos T OT-I se recuperaron a partir de la cavidad peritoneal y se contaron. La presencia de los linfocitos T OT-I no tuvo efecto en el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con vehículo. El tratamiento con IL-21 dio como resultado un aumento diez veces del número de linfocitos T OT-I que podían recuperarse de la cavidad peritoneal. En ratones tratados con IL-21 la presencia de linfocitos T OT-I potenció el
25 tiempo de supervivencia en comparación con los ratones tratados con IL-21 solo.

El aumento de la supervivencia conferido por tratamiento con IL-21 con o sin linfocitos T específicos de tumor añadidos muestra que IL-21 activa células efectoras endógenas del sistema inmune. La recuperación aumentada de linfocitos T OT-I de la cavidad peritoneal muestra que IL-21 aumenta el número de linfocitos T específicos de tumor en el sitio del tumor.

30 Como se predice por la capacidad de IL-21 para potenciar la supervivencia de linfocitos T *in vitro* estos resultados indican que el tratamiento con IL-21 ha potenciado la capacidad del sistema inmune para destruir células tumorales *in vivo*. Estos resultados *in vivo* demuestran un papel inmunoestimulador positivo para IL-21 en situaciones clínicas relevantes, tales como en enfermedad viral o cáncer humano, en las que los CTL pueden desempeñar un papel al combatir la enfermedad.

35 **Ejemplo 23**

IL-21 reduce la carga tumoral en el modelo RMA-RAE1 de actividad antitumoral mediada por NK

Los linfocitos citolíticos naturales sirven como una primera línea de defensa contra ciertas infecciones virales y tumores. La actividad de linfocitos NK eficaz no requiere exposición previa a la diana ni se cree que estos mantengan memoria inmunológica de la diana. Por lo tanto, los linfocitos NK “detectan” si las células se transforman,
40 infectan o están de otro modo “en tensión” en virtud de una serie de moléculas en la superficie de la célula diana. RAE-1 es una proteína expresada en la superficie de células “en tensión” que se implica específicamente en la activación de un receptor en la superficie de linfocitos NK conduciendo de este modo a lisis de la célula “en tensión”. La transfección de la línea celular de tumor RMA con RAE-1 la hace insensible a lisis por linfocitos NK tanto *in vitro* como *in vivo*.

45 La línea celular de linfoma RMA (proporcionada por el Dr. L. Lanier y Dr. Jay Ryan, UCSF, San Francisco, CA) se cultivó en medio RPMI-1640 complementado con FCS 10 % (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT), glutamina 2 mM (Gibco BRL), penicilina 50 U/ml (Gibco BRL), estreptomycin 50 µg/ml (GibcoBRL, Grand Island, NY) y 2-mercaptoetanol 50 µM (Sigma, St Louis, MO). Se establecieron transfectantes estables de RMA-RAE1delta o células RMA transfectadas de forma simulada por electroporación: se añadieron 30 µg de plásmido RAE-1delta-pCDEF3 (transfectante RAE-1delta), o plásmido pCDEF3 (transfectante simulado) a aproximadamente 1×10^7 células en medio RPMI-1640 en una cubeta de 4 mm (BioRad, Richmond, CA), respectivamente. El vector pCDEF3 se proporcionó amablemente por el Dr. Art Weiss (UCSF, San Francisco California). Se realizó electroporación usando un pulsador génico BioRad (250 V, 960 µF). 48 horas después de la electroporación, se cultivaron células RMA-RAE-1delta y transfectadas de forma simulada en medio RPMI-1640 completo complementado con G418 1 mg/ml
55 (GIBCO BRL).

Se inyectó a grupos de seis o más animales por experimento por vía intraperitoneal células que estaban transfectadas de forma simulada o transfectadas con RMA-RAE-1delta. Los experimentos preliminares que titularon el número de células tumorales inyectadas indicaron que 1×10^4 células RMA y 1×10^5 células RMA-RAE-1delta

daban como resultado formación de tumor y posterior morbilidad en el 100 % de los animales. La inoculación intraperitoneal (IP) de ratones con células RMA-RAE1delta en números comparables a dosis letales (aproximadamente 1×10^4) de las células RMA parentales da como resultado que los tumores se rechacen completamente sin la implicación de linfocitos T o el establecimiento de memoria inmunológica. La inoculación IP de ratones con un exceso 10 veces de células RMA-RAE1delta da como resultado muerte del ratón supuestamente por "saturación" de la capacidad de los linfocitos NK para rechazar el tumor (Cerwenka y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 98: 11521-11526, 2001). Para experimentos de eficacia de citocinas se administraron seis inyecciones IP de 10 μ g de IL-21 murina o control de vehículo a los ratones cada dos días los días -4, -2, 0, 2, 4 y 6. Todos los ratones se controlaron diariamente con respecto a desarrollo de líquido ascítico tumoral, indicado por hinchazón del abdomen, y se sacrificaron cuando la carga tumoral fue excesiva para evitar dolor y sufrimiento. Se consideró a los animales sin tumor cuando sobrevivían más de 8 semanas. Para los experimentos de nueva presentación, se inoculó a los animales supervivientes con 1×10^4 células RMA-simuladas después de 8 semanas.

La administración de pequeñas cantidades de IL-21 murina dio como resultado supervivencia potenciada de los ratones que recibieron el número de células tumorales portadoras de RAE1 en exceso 10 veces. Algunos ratones tratados con IL-21 llegaron a estar completamente sin tumor. El tratamiento con IL-21 no tuvo efecto en la supervivencia de ratones a los que se proporcionó la línea celular RMA parental lo que muestra que el efecto se medió específicamente por linfocitos NK. Pareció que RAE1, y por lo tanto los linfocitos NK, se requerían para el efecto de IL-21. Además, los ratones que sobrevivieron a la presentación de tumor RMA-RAE1 letal en virtud de tratamiento con IL-21 fueron capaces de rechazar una presentación posterior con la línea celular parental RMA. Esto mostró que IL-21 también induce memoria inmunológica en estos ratones. Esta capacidad de IL-21 para potenciar la actividad de linfocitos NK muestra que IL-21 puede tener beneficio terapéutico en el tratamiento de pacientes que tienen tumores o enfermedades virales.

Ejemplo 24

Inmunohistoquímica de IL-21 en diversos tejidos y líneas celulares humanas

El fin de este experimento fue determinar si IL-21 podría detectarse en tejidos seleccionados por medio de inmunohistoquímica. Los tejidos se procesaron por procedimientos inmunohistoquímicos convencionales usando un Techmate 500 (BioTek Solutions, Tucson, AZ). Brevemente, se trataron secciones desparafinizadas de tejidos incluidos en parafina con suero de cabra normal 5 % en PBS y un agente de bloqueo (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, Reactivo A y reactivo B (listo para su uso)) para minimizar la tinción de fondo no específica. Se aplicó uno de dos anticuerpos anti-IL-21 primarios (E3149 (IL-21-CHO ratón>humano, HH4.9.1C2.1A6.1C8, PAS) o E2865 (IL-21-CHO ratón>humano, HH4.3.1.2D1.1C12, PAS), ambos preparados de forma interna) seguido de un anticuerpo anti-ratón de cabra biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se generó un producto de reacción coloreado mediante una reacción de peroxidasa-3'3'-diaminobencidina (kit de tinción de DAB/peroxidasa ChemMate que incluye contratinción verde de metilo; CMS/Fisher, Houston, TX). Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y después se examinaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600, Nikon Corporation, Tokio, Japón).

Se ensayaron las siguientes células y tejidos: células BHK transfectadas con IL-21 (control positivo), células BHK-570, tipo silvestre (control negativo) y pulmón humano normal, pulmón humano con inflamación perivascular crónica, ganglio linfático normal humano, ganglio linfático humano con linfoma de linfocitos B, bazo humano con mielofibrosis y duodeno humano. Estos tejidos se obtuvieron por contrato de CHTN (Nashville, TN) o NDRI (Filadelfia, PA). También se ensayaron tejidos normales humanos en un portaobjetos multitisular (Biomedica, Hayward, CA) y tejidos humanos anómalos/tumorales en un portaobjetos multitisular (Biomedica, Hayward, CA).

El anticuerpo E3149 produjo tinción positiva solamente en las células BHK transfectadas. Con el anticuerpo E2865, se observó tinción intensa en las células de control positivo así como en células mononucleares ocasionales de identidades conocidas en el epitelio del intestino delgado en el bloque multitisular normal. La localización en el intestino delgado de la que se obtuvo esta muestra se desconoce. Este tipo celular positivo fue poco común (1 célula en 3 secciones) en una sección separada de duodeno humano.

Además, se distribuyó de forma difusa una población positiva de células mononucleares por todo el bazo humano de un paciente con mielofibrosis. No se descubrió un patrón de tinción similar en los bazos del bloque tisular multihumano normal. Aunque hubo cierta tinción en los bazos del bloque multitisular la tinción no estaba claramente asociada a células. Además, una sección de pulmón inflamado contenía células en forma de huso teñidas y células mononucleares en lo que parece el espacio subpleural (el tamaño y calidad de la sección hacen la determinación de la localización difícil). Se observó tinción positiva en pituiticos dispersados en hipófisis en el bloque multitisular. Las hipófisis teñidas con anticuerpo de isotipo fueron negativas. Se observó tinción coloidal en secciones de tiroides del bloque multitisular en una sección de adenocarcinoma de tiroides en el bloque multitumoral. La importancia de esto se desconoce, el coloide en la sección de isotipo ocasionalmente estaba teñido (pero con menos intensidad que en los tejidos teñidos con anti-IL-21 correspondientes). También se vio tinción ligera en el epitelio folicular de tiroides, pero su intensidad estaba cerca de los niveles de fondo.

La tinción en el carcinoma no diferenciado en el bloque multitumoral se asocia con un área central de residuos necróticos mezclados con células inflamatorias, la especificidad de esta tinción es cuestionable. De forma similar, la tinción en el adenocarcinoma pancreático puede asociarse con residuos necróticos o células inflamatorias asociadas.

- 5 Debido a la localización de la tinción en los tejidos anteriores es posible que IL-21 desempeñe un papel en la inmunidad de la mucosa intestinal (células ocasionales en el epitelio del intestino), inflamación (asociada con células inflamatorias en el pulmón, carcinoma no diferenciado, adenocarcinoma pancreático) y mielofibrosis; fibrosis en la médula ósea que da como resultado hematopoyesis extramedular en el bazo, esto podría implicar también proliferación del linaje de células que produce IL-21 intentando IL-21 regular el proceso. Una precaución con estos resultados es que los inventores obtienen diferentes patrones de tinción con diferentes anticuerpos. Esto puede deberse al reconocimiento de diferentes epítomos por los dos anticuerpos.

Ejemplo 25

IL-21 promueve la expansión de linfocitos NK estimulada por IL-2 en cultivos de PBMNC en presencia de IL-4

- 15 IL-4 inhibe la expansión de linfocitos NK estimulada con IL-2. En dos experimentos se sembraron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMNC) a 200.000 células/pocillo en alfa-MEM+ suero autólogo 10 % con IL-2 10 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) con o sin IL-4 0,5 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) y con o sin IL-21 10 ng/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) y se cultivaron durante 8 días. El número de células viables por pocillo se determinó usando procedimientos convencionales y las células analizadas por citometría de flujo con respecto a expresión de CD3, CD16 y CD56. Los linfocitos NK se definieron como la población negativa para CD3 positiva para CD56.

- 20 Los cultivos de los dos donantes cultivados con IL-2 solo contenían aproximadamente 151.000 y 326.000 linfocitos NK respectivamente el día 8. Los cultivos de los dos donantes cultivados con IL-2 e IL-21 contenían aproximadamente 446.000 y 588.000 linfocitos NK respectivamente. Los cultivos de los dos donantes cultivados con IL-2 e IL-4 contenían aproximadamente 26.000 y 29.000 linfocitos NK el día 8. Sin embargo, los cultivos de los dos donantes cultivados con IL-2, IL-4 e IL-21 contenían aproximadamente 229.000 y 361.000 linfocitos NK, que representan un aumento de 8,8 y 12,5 veces en el rendimiento de linfocitos NK frente al cultivo con IL-2 e IL-4 solo.

- 25 Estos resultados demuestran que IL-21 promueve la expansión de linfocitos NK, y que IL-21 puede superar en gran medida los efectos inhibidores de IL-4 en el crecimiento de linfocitos NK. En algunas enfermedades la expresión de IL-4 puede desempeñar un papel en la patología. Por ejemplo los ratones que portan el melanoma B16F10 generan una gran población de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-4 que parece limitar la respuesta antitumoral del huésped. Además, los ratones deficientes en *gel* STAT 6 (requerido para señalización de IL-4) muestran una capacidad potenciada para rechazar tumores. La capacidad de IL-21 para antagonizar la acción de IL-4, e inducir la expresión de IFN- γ (descrita en el presente documento), además de la actividad antitumoral *in vivo* y los datos descritos en el presente documento, sugiere que IL-21 puede usarse en el tratamiento de tumores malignos, infecciones o enfermedad autoinmune en las que hay una respuesta Th2 que limita la capacidad de los huéspedes para controlar la enfermedad.

Ejemplo 26

IL-21 actúa de forma sinérgica con IL-2 para promover el crecimiento de linfocitos NK de sangre periférica.

- 40 Los linfocitos de sangre periférica de un donante humano sano se prepararon por un procedimiento de centrifugación de Ficoll convencional. Los linfocitos se enriquecieron negativamente de forma magnética como se describe en el presente documento usando el sistema de enriquecimiento negativo de linfocitos NK humanos de Stem Cell Technologies. Los NK se cultivaron a una concentración de partida de aproximadamente 75.000/ml en MEM alfa 2 ml/pocillo con suero donante 10 %, BME 50 μ M, flt3L 2 ng/ml e IL-2 0, 0,5, 10 o 50 ng/ml +/- IL-21 0, 5 o 50 ng/ml. Después de 15 días de cultivo las células se recogieron, contaron y analizaron por citometría de flujo con respecto a CD3, CD56 y CD161. Todas las células analizadas después de 15 días de cultivo fueron CD3-/CD56+, que se definen como linfocitos NK. El día 0, las células se analizaron por citometría de flujo y se descubrió que eran >98 % CD3-/CD56+.

- 50 El "aumento en veces" del número de células se define como el número de células final dividido por el número de células inicial. Cualquier "aumento en veces" por debajo de 1 es por lo tanto una reducción del número de células. En general, los resultados de IL-2 a 10 ng/ml fueron similares a los resultados obtenidos con 50 ng/ml de IL-2, y los resultados a IL-21 5 ng/ml fueron similares a los obtenidos con IL-21 50 ng/ml. Sin IL-2 presente, el aumento de células totales fue de 0,064 veces. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml en el cultivo, los aumentos fueron de 0,11 veces. Esto indica que IL-21 tiene muy poca actividad proliferativa en los NK por sí mismo. A una concentración baja de IL-2 0,5 ng/ml, los inventores observaron un aumento de 0,25 veces. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml, los inventores observaron un aumento de 2,9 veces. A concentraciones mayores de IL-2, el aumento en veces fue en general más alto, pero el efecto de IL-21 se redujo en general, aunque aún era positivo. En IL-2 10 ng/ml los inventores observaron un aumento de 2,9 veces. Cuando se incluyó IL-31 5 ng/ml, los inventores observaron un aumento de 7 veces.

El efecto de IL-21 en estos cultivos dependía de la presencia de al menos IL-2 de dosis baja. Sin IL-2, el efecto de IL-21 era mínimo. Cuando IL-2 está presente, especialmente a la concentración más baja, quizás fisiológica, el efecto de IL-21 es el mayor. La falta de efecto de IL-21 solo, acoplado con su capacidad para actuar de forma sinérgica con concentraciones bajas de otras citocinas puede permitir que actúe de forma terapéutica en sitios de infección o tumor maligno sin provocar toxicidad sistémica.

Ejemplo 27

IL-21 estimula el crecimiento de NK y NKT de cultivos de linfocitos de sangre periférica que contienen IL-2 o IL-15

Se prepararon linfocitos de sangre periférica de 3 donantes humanos sanos por el procedimiento de centrifugación de Ficoll convencional. Los linfocitos se cultivaron después a una concentración de partida de 200.000/ml en MEM alfa con suero del donante 10 %, BME 50 μ M (Sigma), flt3L 2 ng/ml (R&D Systems), e IL-2 0, 0,5, 10 o 50 ng/ml (R&D Systems) o IL-15 (R&D Systems) +/- IL-21 0, 5 o 50 ng/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024). Después de 12 días de cultivo las células se recogieron, contaron y analizaron por citometría de flujo con respecto a CD3, CD56 y CD8. Los linfocitos NK se definieron como CD56+/CD3- y los linfocitos NKT se definieron como CD56+/CD3+.

El "aumento en veces" del número de células (definido como el número de células final/número de células inicial) fue variable entre los tres donantes, pero las tendencias fueron en general uniformes. En general, los resultados de IL-2 o IL-15 a 10 ng/ml fueron similares a los resultados obtenidos con IL-2 o IL-15 50 ng/ml, y los resultados con IL-21 5 ng/ml fueron similares a los obtenidos con IL-21 50 ng/ml. Sin IL-2 o IL-15 presente, el aumento de células totales fue de 0,33, 0,23 y 0,19 veces entre los tres donantes. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml en el cultivo, los aumentos fueron de 0,47, 0,31 y 0,35 veces. A una concentración baja de IL-2 de 0,5 ng/ml, los inventores observaron aumentos de células totales de 2,2, 1,1 y 1,0 veces entre los tres donantes. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml, los inventores observaron aumentos de células totales de 5,5, 2,3, 3,1. Los inventores observaron aumentos de los números de NK sin IL-21 de 16, 4,2 y 3,5 veces. Cuando estaba presente IL-21 (a 5 ng/ml) estos aumentos fueron de 24, 15 y 21, respectivamente. Los NKT también se vieron afectados de forma positiva en estas condiciones. Los aumentos de NKT fueron de 4,4, 5,7 y 1,8 veces sin IL-21 y 10, 9 y 15 con IL-21 5 ng/ml.

Estos resultados se reflejan en IL-15. Con IL-15 0,5 ng/ml, se vio un aumento de células totales de 0,98, 0,43 y 0,88 veces entre los tres donantes. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml, los inventores observaron aumento de células totales de 1,4, 0,9, 1,7 veces. Se vieron aumentos de los números de NK de 8,0, 0,85 y 3,7 veces sin IL-21. Cuando estaba presente IL-21 5 ng/ml, estos aumentos fueron de 13, 5,5 y 11 veces. Los aumentos de NKT con IL-15 0,5 ng/ml fueron 3,3, 2,3 y 1,6 veces para los tres donantes, pero fueron de 3,9, 5,2 y 4,7 veces cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml.

A concentraciones mayores de IL-2 los aumentos fueron en general mayores, pero el efecto de IL-21 en general se redujo, aunque aún era positivo. Con IL-2 10 ng/ml los inventores observaron aumentos de células totales de 18, 2,5 y 2,8 veces entre los tres donantes. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml, los inventores observaron aumentos de células totales de 21, 3,6, 9,8 veces. Los inventores observaron aumentos de los números de NK de 114, 13 y 13 veces sin IL-21. Cuando estaba presente también IL-21 (a 5 ng/ml) estos aumentos fueron de 100, 19 y 56 respectivamente. Los NKT también se vieron afectados de forma positiva en estas condiciones. Los aumentos de NK fueron 33, 15 y 12 veces sin IL-21 y 52, 20 y 38 con IL-21 5 ng/ml.

Con IL-15 10 ng/ml, los inventores observaron aumentos de células totales de 18, 0,8 y 1,7 veces entre los tres donantes. Cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml, los inventores observaron aumento de células totales en 23, 1,4, 6,9 veces. Los inventores observaron aumentos de números de NK de 128, 58 y 2,0 veces sin IL-21. Cuando estaba presente IL-21 5 ng/ml, esos aumentos fueron de 107, 1,1 y 9,4 veces. Los aumentos de NKT con IL-15 10 ng/ml fueron de 60, 6,5 y 5,7 veces para los tres donantes, pero fueron 66, 12 y 33 veces cuando se incluyó IL-21 5 ng/ml.

Los efectos de IL-21 en estos cultivos dependieron de la presencia de al menos IL-2 o IL-15 de dosis baja. Sin estas citocinas, el efecto de IL-21 fue mínimo. Cuando está presente IL-2 o IL-15, especialmente a las concentraciones más bajas, quizás fisiológicas, el efecto IL-21 es el mayor. La falta de efecto de IL-21 solo, acoplado con su capacidad para actuar de forma sinérgica con concentraciones bajas de otras citocinas pueden permitir que actúe de forma terapéutica en sitios de infección o tumor maligno sin provocar toxicidad sistémica.

Ejemplo 28

IL-21 inhibe la producción de IL-13 en cultivos de linfocitos NK

IL-13 comparte subunidades receptoras y muchas de las actividades biológicas de IL-4, pero a diferencia de IL-4, IL-13 se produce por linfocitos NK. Puesto que los linfocitos NK también producen IFN- γ , y estas dos citocinas tienen en gran parte actividades opuestas, se realizaron experimentos para examinar los efectos de IL-21 en la expresión de IL-13 e IFN- γ en cultivos de células PBMC y NK.

Se sembraron linfocitos NK de sangre periférica humana seleccionados de forma negativa a aproximadamente $3,75 \times 10^5$ células/ml y se estimularon 2 días con IL-2, IL-4 10 (R&D Systems) o IL-21 (Patente de Estados Unidos N°

6.307.024) 10 ng/ml o sin ninguna citocina en MEM alfa + suero autólogo 10 %. Después de dos días en cultivo se añadió IL-2 a todos los pocillos a 10 ng/ml y las células se cultivaron durante 3 días adicionales, después los sobrenadantes se recogieron y se analizaron por ELISA con respecto a IL-13 e IFN- γ . Los linfocitos NK cultivados durante dos días sin ninguna citocina produjeron IFN- γ aproximadamente 2130 pg/ml e IL-13 aproximadamente 175 pg/ml. Las células estimuladas con IL-21 produjeron IFN- γ produjeron aproximadamente 10.300 pg/ml e IL-13 90 pg/ml. Las células estimuladas con IL-2 produjeron IFN- γ 12.700 pg/ml e IL-13 1000 pg/ml. Las células estimuladas con IL-4 no produjeron IFN- γ detectable ni IL-13.

Debe observarse que las células estimuladas durante los primeros dos días con IL-21 produjeron 5 veces más IFN- γ , pero solo la mitad de IL-13 que células no estimuladas. En comparación con células estimuladas con IL-2 durante los primeros dos días de cultivo las células estimuladas con IL-21 produjeron 80 % de IFN- γ , pero solo 9 % de IL-13. Por lo tanto IL-21 promueve selectivamente la expresión de IFN- γ y reduce la expresión de IL-13.

Ejemplo 29

IL-21 actúa de forma sinérgica con IL-2 para promover la producción de IFN- γ en linfocitos NK esplénicos de ratón

Se prepararon linfocitos NK esplénicos de ratón C57BL/6 por lisis en agua de una suspensión celular de los bazoos, utilizando después el protocolo de clasificación magnética de células por enriquecimiento negativo de NK murino de Stem Cell Technologies. Las células preparadas usando este procedimiento fueron 65 % positivas para Pan NK basándose en análisis de flujo usando el anticuerpo de Pan NK DX5 de PharMingen.

Los linfocitos NK murinos enriquecidos de forma negativa se cultivaron durante 8 días a 500.000 células/ml en RPMI 1640 con suero bovino fetal inactivado por calor 10 % y L-glutamina 2 mM, BME 50 μ M y antibiótico PSN con mIL-2 20 ng/ml (R&D Systems) o mIL-21 10 ng/ml (Patente de Estados Unidos N° 6.307.024) o ambos. Los sobrenadantes celulares se recogieron y las células se contaron al final del periodo de cultivo. Se ensayaron los sobrenadantes celulares con respecto a mIFN- γ usando un kit de ELISA disponible en el mercado de PharMingen.

Los números de células al final del periodo de 8 días fueron de aproximadamente 1.300.000 para el cultivo que contiene IL-2, 220.000 para el cultivo de IL-2/IL-21 y 10.000 para el cultivo de IL-21. Los niveles de mIFN- γ fueron de 2,2 ng/ml, 30 ng/ml y 0,28 ng/ml respectivamente. Cuando se expresan como pg/500.000 células, los resultados son 238, 14.000 y 12.000. IL-21 potencia la expresión de IFN- γ en estos cultivos, que cuando se combinan con los efectos de supervivencia/proliferación celular de IL-2, da como resultado altos niveles de IFN- γ secretado al medio. IFN- γ es un iniciador importante de la respuesta inmune, y se considera una citocina con preferencia por TH1. Estos datos apoyan que IL-21 desempeña un papel en la actividad antineoplásica, antiviral del sistema inmune, y, por lo tanto, puede usarse como un agente terapéutico en aplicaciones antineoplásicas, antivirales y otras.

Ejemplo 30

Efectos del conjugado de toxina saporina-IL-21 en linfocitos T y líneas de linfocitos T humanas

La capacidad del conjugado de toxina saporina-IL-21 para unirse a linfocitos T murinos normales se determinó por ensayos de competición de FACS y se comparó con la unión a las mismas células por IL-21 murina. Se mostró que el conjunto de toxina saporina-IL-21 murina se une a estas células con la misma afinidad que IL-21 (Ejemplo 30A).

La presencia de Receptor de IL-21 Humano (Publicación de WIPO N° WO 0/17235 y WO 01/77171) en las siguientes líneas de linfocitos T se determinó por análisis de FACS: leucemia de linfocitos T humanos MOLT-13 (DSMZ N° ACC_436), linfoma de linfocitos T cutáneo humano HUT-78 (ATCC N° TIB_161), linfoma de linfocitos T cutáneo humano HUT-102 (ATCC N° TIB_162), línea de ALCL humana DEL (DSMZ N° ACC_338) y leucemia de linfocitos T/NK humanos YT (DSMZ N° ACC_434; Ejemplo 30B).

Los efectos de conjugado de toxina saporina-IL-21 humana descritos en el presente documento se ensayó tanto en linfocitos T humanos normales (Ejemplo 30C) como en líneas de linfocitos T humanos que se ha mostrado que expresan el Receptor de IL-21 Humana (es decir, MOLT-13, HUT-78, HUT-102, DEL e YT; ejemplo 30D). Los resultados mostraron que los linfocitos T humanos normales y las líneas de linfocitos T tratadas con conjugado de toxina saporina-IL-21 humana proliferaron mucho menos o en absoluto en comparación con células dejadas sin tratar o células cultivadas con IL-21 no conjugada o con saporina solamente.

Los resultados indican que el conjugado de toxina-IL-21 (saporina u otro) puede controlar algunos tipos de neoplasia de linfocitos T con poco o ningún efecto también en proliferación de linfocitos T humanos normales *in vitro* a 30 pM o menos. Un mecanismo propuesto de la inhibición observada de proliferación de línea celular *in vitro* es como sigue: el conjugado de toxina-IL-21 se une con alta afinidad al receptor de IL-21 expresado en la superficie de estas células. El conjugado de toxina-IL-21 humana se recoge después por las células y, en el caso con el conjugado de toxina-saporina, la capacidad de las células para producir proteína y su proliferación se bloquea posteriormente. Por lo tanto, el conjugado de inmunotoxina saporina-IL-21, u otra fusión de toxina-IL-21 podrían usarse de forma terapéutica en prevención y tratamiento de leucemias de linfocitos T y linfomas, y otros cánceres en los que se expresan receptores de IL-21.

A. La unión de conjugado de toxina saporina-IL-21 murina en linfocitos T murinos normales por análisis de citometría de flujo

Se aislaron esplenocitos murinos totales de ratones C57/BL6 hembra de 4 meses de edad normales (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Los bazos se recogieron y se trituraron suavemente entre portaobjetos esmerilados para crear una suspensión celular. Se retiraron los glóbulos rojos por lisis hipotónica como sigue: las células se sedimentaron y el sobrenadante se retiró por aspiración. Los inventores rompieron el sedimento con agitación en vórtex suave, después añadieron 900 μ l de agua estéril en agitación, seguido rápidamente (menos de 5 s después) por 100 μ l de HBSS 10X (GibcoBRL; Rockville Maryland). Las células se resuspendieron después en 10 ml de HBSS 1X y los residuos se retiraron pasando las células sobre un tamiz celular revestido con malla de nailon (Falcon/BD; Franklin NK). Estas células de bazo empobrecidas para RBC se sedimentaron después y se resuspendieron en tampón de tinción de FACS: HBSS (GibcoBRL; Rockville Maryland) que contenía suero humano al 3 %, BSA al 1 %, y HEPES 10 mM.

Las alícuotas que contenían aproximadamente 1×10^6 glóbulos blancos de bazo se tiñeron para análisis citométrico de flujo de 3 colores con mAb anti-CD4 murino-FITC, anti-B220 murino-CyChrome (PharMingen, San Diego, CA) e IL-21 murina biotinilada (2 μ g/ml) seguido de Estreptavidina-PE (Caltag; Burlingame CA). Se compitió con la tinción de la IL-21 murina biotinilada por cantidades molares valoradas equivalentes (0,0175 nM a 3,5 nM) tanto de conjugado de saporina-IL-21 como de IL-21 no biotinilada. Las células se analizaron en un FACSScan usando software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los resultados demostraron que el conjugado de toxina saporina-IL-21 murina se une a estas células con la misma afinidad que IL-21.

B. La unión de IL-21 murina biotinilada en líneas de linfocitos T humanos por análisis de citometría de flujo

Se tiñeron las alícuotas que contenían $0,4 \times 10^6$ a 1×10^6 células MOLT-13, células HuT-78, células HuT-102, células DELL o células YT para análisis citométrico de flujo de 1 color con IL-21 murina biotinilada valorada (40 ng/ml a 1000 ng/ml) seguido de Estreptavidina-PE (Caltag; Burlingame CA). Las células se analizaron en un FACSScan usando software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los resultados demostraron que IL-21 murina biotinilada se une a estas líneas celulares con alta afinidad. Los resultados también demostraron que la IL-21 murina es reactiva de forma cruzada entre especies puesto que reconoce y se une a la molécula Receptora de IL-21 Humana en la superficie de las líneas de linfocitos T humanos.

C. El efecto de la inmunotoxina saporina-IL-21 humana en proliferación de linfocitos T humanos normales

Se recogió sangre completa de un donante humano sano, se separó en alícuotas en tubos de 50 ml y se pasó sobre gradientes de densidad de Ficoll. Se recogieron las células empobrecidas para RBC en la interfaz (PBMC) y se lavaron de forma exhaustiva con PBS seguido de RPMI 1640 complementado con ultrasuero humano al 10 % y L glutamina 2 mM. Las PBMC se suspendieron a 111×10^6 /ml en tampón MACS (PBS, BSA al 1 %, EDTA 0,8 mg/l). Las células se combinaron con microperlas anti-CD14 humano, microperlas anti-CD19 humano y microperlas anti-CD56 humano (Miltenyi Biotech; Auburn CA) según las instrucciones del fabricante. La mezcla se incubó durante 20 min a 4 °C. Estas células marcadas con perlas de CD14, CD19 y CD56 se lavaron con tampón MACS volumen 5X y después se resuspendieron en 1,5 ml de tampón MACS.

Se preparó una columna VS+ (Miltenyi Biotech; Auburn CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se colocó después en un campo magnético VarioMACS™ (Miltenyi Biotech; Auburn CA). La columna se equilibró con 3 ml de tampón MACS. Las PBMC revestidas con perlas de CD14/CD19/CD56 se aplicaron después a la columna. Se permitió que la fracción de PBMC CD14-CD19-CD56- que contenía los linfocitos T humanos pasara a través de la columna y se recogió en un tubo de 15 ml. La columna se lavó con 10 ml (2 X 5 ml) de tampón MACS para retirar por lavado los Linfocitos T Humanos residuales. Se descartó la columna con células CD14+CD19+CD56+ unidas. Los linfocitos T humanos y el eluyente de lavado se agruparon juntos y se contaron.

Se retiró una muestra de los linfocitos T humanos seleccionados de forma negativa para tinción para evaluar la pureza de la fracción. Se usó un anticuerpo anti-CD3 humano de ratón conjugado con cychrome (PharMingen) para teñir las células seleccionadas. Se demostró que los linfocitos T seleccionados de forma negativa eran 67 % CD3+.

Los linfocitos T primarios aislados se cultivaron a $0,5 \times 10^6$ /ml con cantidades molares valoradas equivalentes (0,03 pM a 30 pM) tanto de conjugado de saporina-IL-21 como de IL-21 en una placa revestida con CD3 anti-humano valorado (0 a 2 μ g/ml) (clon UCHT-1; Southern Biotech; Birmingham Alabama) como un co-activador para los linfocitos T humanos. Después de 3 días de crecimiento, las células se pulsaron con 3H-timidina (5 μ Ci/ml; AmershamBiosciences, Piscataway NJ) durante 18 horas. Las células se lisaron y se capturó ADN en tiras de filtro de vidrio (Packard, Meriden CT) y se contaron con la incorporación de 3H-timidina para evaluar la proliferación de las células.

Los resultados mostraron que IL-21 a 0,3 pM y mayor tenía un efecto estimulador en combinación con anti-CD3 revestido 2 μ g/ml. El conjugado de saporina-IL-21 no tuvo tal efecto estimulador. Tampoco tuvo efecto inhibitor en comparación con el estímulo de revestimiento de anti-CD3 2 μ g/ml solamente. En suma, estos datos pueden interpretarse como indicativos de que aunque un estímulo de IL-21 estaba presente en los pocillos que contenían el

conjugado de saporina-IL-21, el aumento esperado de la proliferación debido a la parte de IL-21 de la molécula se suprimió por la presencia de la parte de saporina de la molécula conjugada. Sin embargo, la parte de saporina de la molécula no suprimió el efecto estimulador debido al anticuerpo revestido anti-CD3.

D. El efecto del conjugado de inmunotoxina saporina-IL-21 humana en líneas de linfocitos T humanos

- 5 Se sembraron células de 5.000 células/ml a 50.000 células/ml con cantidades molares valoradas equivalentes (0,2 pM a 400 pM) tanto de conjugado de saporina-IL-21 como de IL-2. Después de 2 días de crecimiento las células se pulsaron con ³H-timidina 5 µCi/ml (AmershamBiosciences, Piscataway NJ), durante 18 horas. Las células se lisaron, se capturó ADN en tiras de filtro de vidrio (Packard, Meriden CT) y se contaron con respecto a incorporación de ³H-timidina para evaluar la proliferación de las células.
- 10 Las células MOLT-13 tratadas con saporina-IL-21 habían incorporado ³H-timidina hasta solamente el 70 % de la incorporación de ³H-timidina por las células MOLT-13 tratadas con IL-21. Las células HuT-78 tratadas con saporina-IL-21 crecieron hasta solamente el 33 % de la densidad de las células HuT-78 no tratadas. Las células HuT-102 tratadas con saporina-IL-21 crecieron a solamente el 20 % de la densidad de las células HuT-102 no tratadas. Las células DEL tratadas con saporina-IL-21 crecieron hasta solamente el 25 % de la densidad de las células DEL no tratadas. Las células YT tratadas con saporina-IL-21 crecieron hasta solamente el 3 % de la densidad de las células YT no tratadas. Los resultados indican que el conjugado de toxina-IL-21 (saporina u otro) puede ser eficaz en el control de algunos tipos de neoplasias de linfocitos T. Además, podría usarse conjugado de inmunotoxina saporina-IL-21 u otra fusión de toxina-IL-21 de forma terapéutica en la prevención y tratamiento de leucemias y linfomas de linfocitos T, y otros cánceres en los que se expresan receptores de IL-21.

20 **Ejemplo 31**

Efectos *in vivo* de IL-21 en los linfomas de linfocitos B

Se mantienen líneas celulares de linfoma B humano *in vitro* por pase en medio de crecimiento. Las células se lavan exhaustivamente en PBS para retirar componentes de cultivo.

- 25 Se inyecta a los Ratones SCID (típicamente) un millón de células de linfoma humano a través de la vena de la cola en un volumen de 100 microlitros. (El número óptimo de células inyectadas se determina empíricamente en un estudio piloto para producir formación tumoral coherente con la cinética deseada). Se inicia tratamiento con IL-21 al día siguiente por implantación subcutánea de una mini bomba osmótica ALZET® (ALZET, Cupertino, CA) o por inyección i.p. diaria de IL-21 o vehículo. Los ratones se controlan con respecto a supervivencia y morbilidad significativa. Los ratones que pierden más del 20 % de su peso corporal inicial se sacrifican, así como ratones que muestran morbilidad sustancial tal como parálisis de las extremidades posteriores. Dependiendo de la línea celular de linfoma empleada, los ratones no tratados típicamente mueren en de 3 a 6 semanas. Para linfomas de linfocitos B que secretan IgG o IgM, la progresión de la enfermedad también puede controlarse por toma de muestras sanguíneas semanales y midiendo los niveles de Inmunoglobulina humana en suero por ELISA.

A. Modelo de IM-9/respuesta a dosis de IL-21

- 35 Se inyectó a los ratones 1x10⁶ células IM-9 y se implantaron mini bombas osmóticas de 28 días al día siguiente. Las bombas se cargaron con las siguientes concentraciones de IL-21 para suministro: 0, 0,12, 1,2 o 12 microgramos por día con 8 ratones por grupo de dosis. IL-21 mostró un claro efecto dependiente de dosis en la protección de los ratones de la línea celular tumoral. Los efectos de IL-21 dependieron de la dosis. Los ratones supervivientes al final del experimento no tenían señales de enfermedad y no tenían IgG humana detectable en su suero.

40 B. Modelo de IM-9/empobrecimiento de NK de IL-21

- Se redujo el número de linfocitos NK en los ratones administrando 5 dosis de anticuerpo anti-asialo-GM-1 cada tres días comenzando 15 días antes de la inyección de células tumorales o se dejaron sin reducir el número como controles. La mitad de los ratones empobrecidos y no empobrecidos se trataron con IL-21 12 µg/día y la otra mitad se trataron solamente con vehículo. La reducción del número de linfocitos NK no disminuyó significativamente la actividad de IL-21. Estos datos demostraron que los linfocitos NK no son necesarios para el efecto de IL-21 en el modelo de IM-9 en ratones SCID.

C. Otras líneas celulares ensayadas

- 50 Se ensayaron las siguientes líneas celulares adicionales usando el modelo mostrado para células IM-9. IL-21 suministrado a 12 µg/día por minibomba es eficaz contra células CESS en ratones SCID. IL-21 administrado a ratones con tumores implantados de células RAJI no tuvo eficacia. IL-21 administrado a ratones con tumores implantados de células RAMOS no tuvo eficacia. IL-21 administrado a ratones con tumores implantados de células HS SULTAN tuvo eficacia significativa, pero no evitó la enfermedad de la mayoría de los ratones, solamente ralentizó su aparición. IL-21 DoHH2 no tuvo eficacia.

Estos datos demuestran que la eficacia de IL-21 en modelos de linfoma de ratón SCID se correlaciona con la capacidad para inhibir el crecimiento de las líneas celulares de linfoma *in vivo*. Además, la reducción del número de linfocitos NK de ratones SCID tanto para linfocitos T como para linfocitos B no reduce la eficacia de IL-21 en el modelo de IM-9. Es probable que la eficacia de IL-21 en modelos de linfoma de ratón SCID dependa de sus efectos directos sobre las células tumorales puesto que no se vio eficacia en tres de las tres líneas celulares ensayadas en el modelo que no se inhibieron por IL-21 *in vitro*, y la reducción del número de NK no tuvo efecto en la eficacia de IL-21 en el modelo de IM-9. En un paciente con un sistema inmune intacto, se predicen efectos antitumorales mediados por células efectoras dependientes de IL-21 a partir de experimentos con ratones inmunocompetentes en modelos de tumor singénico. La demostración de los efectos antitumorales directos en ratones SCID sugiere que la terapia con IL-21 podría tener efectos antitumorales directos y mediados por efector combinados en tumores malignos de linfocitos B seleccionados en seres humanos.

Ejemplo 32

Los efectos de IL-21 en un modelo de carcinoma de ovario singénico de ratón

El efecto de IL-21 se ensaya con respecto a eficacia en carcinoma de ovario usando un modelo singénico de ratón como se describe en Zhang y col., Am. J. of Pathol. 161: 2295-2309, 2002. Brevemente, usando transfección retroviral y separación de células activada por fluorescencia se genera una línea celular de carcinoma de ovario ID8 murina C57BL6 que sobreexpresa de forma estable la isoforma VEGF164 murina y la proteína verde fluorescente potenciada (GFP). La construcción retroviral que contenía ADNc de GFP y VEGF164 se transfectó en células BOSC23. Las células se analizaron por separación de células FACS y se identificaron las células positivas altas para GFP.

Las células transfectadas con GFP/VEGF164 ID8 se cultivaron hasta la subconfluencia y se prepararon en una suspensión celular sencilla en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y MATRIGEL frío (BD Biosciences, Bedford, MA). Se inyectó a ratones C57BL6 hembra de seis a ocho semanas de edad por vía subcutánea en el flanco 5×10^6 células o células de control no transfectadas. Como alternativa, se puede inyectar a los ratones por vía intraperitoneal 7×10^6 células o células de control. Los animales se siguen con respecto a supervivencia o se sacrifican ocho semanas después de la inoculación y se evalúan con respecto a crecimiento tumoral. Los ratones se tratan con IL-21 murina recombinante comenzando 3-14 días después de la implantación del tumor o cuando se ha establecido injerto del tumor y velocidad de crecimiento. Se administrarán niveles de tratamiento de 0,5-5 mg/kg diariamente durante 5-14 días y pueden continuarse después si no se ven pruebas de formación de anticuerpos neutralizadores.

Ejemplo 33

Los efectos de IL-21 en un modelo RENCA de ratón

La eficacia de IL-21 en un modelo de carcinoma de células renales se evalúa usando ratones BALB/c a los que se han inyectado células RENCA, un adenocarcinoma renal de ratón de origen espontáneo, esencialmente como se describe en Wigginton y col., J. Nat. Cancer Instit. 88: 38-43, 1996.

Brevemente, se inyecta a ratones BALB/c entre ocho y diez semanas células RENCA 1×10^5 células en la cápsula renal de los ratones. Doce días después de la implantación de células tumorales, los ratones se nefrectomizan para retirar tumores primarios. Se permite que los ratones se recuperen de la cirugía, antes de la administración de IL-21. Los ratones se tratan con IL-21 murina recombinante comenzando 3-14 días después de la implantación del tumor o cuando se establece el injerto tumoral y la velocidad de crecimiento. Se administran niveles de tratamiento de 0,5-5 mg/kg diariamente durante 5-14 días y pueden continuarse después si no se ven pruebas de formación de anticuerpos neutralizadores. Como alternativa, pueden introducirse células RENCA por inyección subcutánea (5×10^5 células) o intravenosa (1×10^5 células).

Los ratones se evalúan con respecto a la respuesta tumoral en comparación con ratones no tratados. La supervivencia se compara usando un procedimiento Kaplan-Meier, así como evaluando el volumen tumoral.

Ejemplo 34

Los efectos de IL-21 en un modelo de tumor colorrectal de ratón

Los efectos de IL-21 en un modelo de ratón colorrectal se ensayan como se describe en Yao y col., Cancer Res. 63: 586-592, 2003. En este modelo, se implantan células de tumor de colon de ratón MC-26 en la subcápsula esplénica de ratones BALB/c. Después de 14 días, se administra a los ratones tratados IL-21. Los ratones se tratan con IL-21 murina recombinante comenzando 3-14 días después de la implantación del tumor o cuando se ha establecido el injerto tumoral y la velocidad de crecimiento. Se administrarán niveles de tratamiento de 0,5 – 5 mg/kg diariamente durante 5-14 días y pueden continuarse después si no se ven pruebas de formación de anticuerpos neutralizadores.

La eficacia de IL-21 en la prolongación de la supervivencia o la promoción de una respuesta tumoral se evalúa usando técnicas convencionales descritas en el presente documento.

Ejemplo 35El efecto de IL-21 en un modelo de cáncer pancreático de ratón

La eficacia de IL-21 en un modelo de cáncer pancreático de ratón se evalúa usando el protocolo desarrollado por Mukherjee y col., J. Immunol. 165: 3451-3460, 2000. Brevemente se crían ratones transgénicos MUC1 (MUC1.Tg) con ratones que expresan oncogén que desarrollan de forma espontánea tumores del páncreas (ratones ET) designados como ratones MET. MUC1.Tg. Los ratones ET expresan los primeros 127 aminoácidos de Ag T grande SV40 bajo el control del promotor de elastasa de rata. El cincuenta por ciento de los animales desarrollan tumores pancreáticos potencialmente letales antes de aproximadamente la semana 21 de edad. Las células se ensayan de forma rutinaria por citometría de flujo con respecto a la presencia de MUC1. Todos los ratones son del fondo C57BL/6. Los animales se sacrifican y se caracterizan a intervalos de 3 a 24 semanas. Los ratones se observan cuidadosamente con respecto a señales de mala salud, incluyendo letargo, distensión abdominal, incapacidad de comer o beber, pérdida de peso notable, heces pálidas y postura encorvada.

El páncreas completo se libera por disección de grasa y ganglios linfáticos, se pesa y se extiende sobre papel absorbente para su fotografía. Se cuentan los nódulos y el páncreas se fija en methacarn, se procesa para microscopia por procedimientos convencionales, se secciona en etapas a 5 µm (aproximadamente 10 secciones por páncreas de ratón), se tiñe con hematoxilina y eosina y se examina por microscopio óptico. Los tumores se obtienen de ratones MET en diversos puntos temporales durante la progresión del tumor, se fijan en methacarn (metanol 60 %, cloroformo 30 %, ácido acético glacial 10 %), se incluyen en parafina y se seccionan para análisis inmunohistoquímico. Los anticuerpos de MUC1 usados son CT1, un Ab policlonal de conejo que reconoce la región de la cola citoplasmática humana y de ratón de MUC1, HMFG-2, BC2 y SM-3, que tienen epítomos en el dominio TR de MUC1.

Se realiza determinación de la actividad CTL usando un procedimiento de derivación de ⁵¹Cr convencional después de estimulación peptídica *in vitro* de 6 días sin citocinas añadidas adicionales. Se recogen esplenocitos de ratones MET individuales pasando a través de una malla de nylon seguido de lisis de RBC.

Se analizan células sencillas de bazos de ratones MET por inmunofluorescencia de dos colores con respecto a alteraciones en subpoblaciones linfocíticas: CD3, CD4, CD8, Fas, FasL, CD11c y MHC clase I y II. Los niveles de citocinas intracelulares se determinaron después de que se estimularan células con péptido MUC1 (10 µg/ml durante 6 días) y se trataron con brefeldina A (también llamada Golgi-Stop; PharMingen) como se indica en la recomendación del fabricante (4 µl/1,2 x 10⁷ células/6 ml durante 3 horas a 37 °C antes de la tinción). Las células se permeabilizan usando el kit de permeabilización PharMingen y se tiñen con respecto a IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-5 intracelulares como se describe por PharMingen. Todos los Ab marcados con fluorescencia se obtuvieron de PharMingen. Se realizó análisis citométrico de flujo en FACScan Becton Dickinson usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Los ratones se trataron con IL-21 murina recombinante comenzando 3-14 días después de la implantación del tumor o cuando se ha establecido injerto tumoral y velocidad de crecimiento. Se administrarán niveles de tratamiento de 0,5-5 mg/kg diariamente durante 5-14 días y puede continuarse después si no se ven pruebas de formación de anticuerpos neutralizadores.

Ejemplo 36Los efectos de IL-21 en un modelo de cáncer de mama murino

La eficacia de IL-21 en un modelo murino para cáncer de mama se comprueba usando un modelo singénico como se describe en Colombo y col., Cancer Research 62: 941-946, 2002. Brevemente, células TS/A que son un carcinoma mamario espontáneo para ratones BALB/C. Las células se cultivan durante aproximadamente una semana para seleccionar clones. Las células TS/A seleccionadas se dejan crecer y se usan para infectar ratones CD-1 *nu/nu* BR (Charles River Laboratories) por 2 x 10² células TS/inyectadas por vía subcutánea en el flanco del ratón.

Los ratones se tratan con IL-21 murina recombinante comenzando 3-14 días después de la implantación del tumor o cuando se ha establecido injerto tumoral y velocidad de crecimiento. Se administrarán niveles de tratamiento de 0,5-5 mg/kg diariamente durante 5-14 días y puede continuarse después si no se ven pruebas de formación de anticuerpos neutralizadores. Los tumores se escinden después de sacrificar los animales y se analizan con respecto a volumen y usando histoquímica e inmunohistoquímica.

Ejemplo 37Los efectos de IL-21 en un modelo de cáncer de próstata murino

Los efectos de IL-21 en la respuesta tumoral se evalúan en modelo de cáncer de próstata murino usando un modelo similar al descrito en Kwon y col., PNAS 96: 15074-15079, 1999. En este modelo, existe un crecimiento metastásico de adenocarcinoma transgénico de línea celular de cáncer de próstata derivado de próstata de ratón (TRAMP)

TRAMP-C2, que se implanta en ratones C57BL/6. La recaída metastásica es probable, produciéndose principalmente en los ganglios linfáticos de drenaje en proximidad cercana al tumor primario.

Brevemente, la línea celular C2 usada es una línea de pase temprano derivada del ratón TRAMP que desarrolla espontáneamente tumores autóctonos atribuibles a expresión de antígeno SV40 restringida a próstata. Las células se cultivan e inyectan por vía subcutánea en los ratones C57BL/6 a $2,5-5 \times 10^6$ células/0,1 ml de medio. Los ratones se tratan con IL-21 murina recombinante comenzando 3-14 días después de la implantación del tumor o cuando se ha establecido injerto tumoral y velocidad de crecimiento. Se administrarán niveles de tratamiento de 0,5-5 mg/kg diariamente durante 5-14 días y pueden continuarse después si no se ven pruebas de formación de anticuerpos neutralizadores. Los tumores se escinden después de sacrificar los animales y se analizan con respecto a volumen y usando histoquímica e inmunohistoquímica.

Ejemplo 38

Los efectos de IL-21 y quimioterapia en el crecimiento de líneas de linfocitos B humanos *in vitro*

Se ensayaron los efectos de IL-21 y zeocina solas y en combinación sobre el crecimiento de líneas de linfocitos B humanas IM-9 y HS Sultan *in vitro* para determinar si los efectos citotóxicos/inhibidores del crecimiento de IL-21 y un agente quimioterapéutico serán aditivos o sinérgicos en líneas celulares sensibles a IL-21. Se usó ZEOCINX (Invitrogen, Carlsbad, CA) como un antibiótico con un mecanismo de acción similar al agente quimioterapéutico relacionado bleomicina.

Se sembraron líneas celulares IM-9 y HS Sultan a 50.000 células/ml en medio RPMI1640 complementado con L-glutamina 2 mM y FBS inactivado por calor 10 % con y sin IL-21 (a 20 ng/ml) y/o ZEOCINA (a 15,6 µg/ml para IM-9s y 31 µg/ml para HS Sultan) durante dos días, después las células se recogieron y se lavaron una vez para retirar la zeocina y se volvieron a sembrar con o sin IL-21 en una serie de diluciones celulares seriadas, con 6 pocillos por dilución, en placas de fondo redondo de 96 pocillos para determinar su capacidad de crecimiento relativa. Las placas se puntuaron en 6 días usando azul de Alamar, como una medida de células viables por pocillo, y reflejando su supervivencia y crecimiento a partir del tratamiento anterior. Las poblaciones celulares tratadas con ZEOCINX tuvieron menos de un décimo de la capacidad de crecimiento de células no tratadas, y la combinación de IL-21 con zeocina redujo adicionalmente la capacidad de crecimiento en aproximadamente un orden de magnitud. Estos datos sugieren que IL-21 podría combinarse de forma exitosa con quimioterapia para aumentar las tasas de respuesta en el tratamiento de linfoma.

Ejemplo de referencia 39

Modelos de LCMV

Los modelos de LCMV son modelos *in vitro* para ensayar el efecto de un compuesto en células infectadas con un miembro de la familia *Flaviviridae*, de la que VHC es un miembro. Estos modelos se usan para evaluar el efecto que IL-21 tiene en los CTL y el efecto que IL-21 tiene en la carga viral. Se usan dos modelos: infección de LCMV Armstrong (aguda) e infección de LCMV Clon 13 (crónica). (Véase, por ejemplo, Wherry y col., J. Virol. 77: 4911-4927, 2003; Blattman y col., Nature Med. 9(5): 540-547, 2003; Hoffman y col., J. Immunol. 170: 1339-1353, 2003). Existen tres etapas de desarrollo de linfocitos T CD8 en respuesta a virus: 1) expansión, 2) contracción y 3) memoria (modelo agudo). IL-21 se inyecta durante cada etapa para modelos tanto agudos como crónicos. En el modelo crónico, IL-21 se inyecta 60 días después de la infección para evaluar el efecto de IL-21. Para modelos tanto agudos como crónicos, se inyecta IL-21 y se examinan los siguientes parámetros: tinción tetramérica por flujo para contar el número de linfocitos T CD8⁺ específicos de LCMV; la capacidad de las células tetrámero+ para producir citocinas cuando se estimulan con su antígeno de LCMV afín; y la capacidad de linfocitos T CD8⁺ específicos de LCMV para proliferar en respuesta a su antígeno de LCMV afín. Los linfocitos T específicos de LCMV se fenotipan por citometría de flujo para evaluar el estado de activación y diferenciación de las células. Además, se examina la capacidad de CTL específicos de LCMV para lisar células diana que portan su antígeno de LCMV afín. Se accede al número y función de linfocitos T CD4⁺ específicos de LCMV, excepto para el ensayo de histólisis.

Se determina la mejora de la calidad y cantidad de linfocitos T CD8⁺ específicos de LCMV después de administración de IL-21. Específicamente, se muestran resultados de producción de citocinas aumentada, especialmente porcentajes aumentados de IFN-γ de células tetrámero+ que proliferan y un aumento de la actividad citolítica. El fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ de ratones tratados con IL-21 refleja la diferenciación a una célula efectora, es decir, pérdida de expresión de CD27 y pérdida de expresión de CCR7 así como expresión de granzima B y perforina aumentada. Además, se muestra una reducción de la carga viral después del tratamiento con IL-21. Para ratones tratados con IL-21 se considera significativo un aumento del 20 % en el porcentaje de linfocitos T positivos para tetrámero que proliferan, generan citocinas o presentan un fenotipo maduro en relación con ratones no tratados. Un aumento del 20 % de la actividad citolítica se considera significativo.

La inyección de IL-21 que conduce a una reducción de la carga viral se debe a control más eficaz de infección viral especialmente en el modelo crónico en el que sin tratamiento las titulaciones virales permanecen elevadas durante un periodo de tiempo prolongado. Una reducción de 5 veces de la titulación viral en relación con ratones no tratados

se considera significativa.

Ejemplo de referencia 40

Estudios *ex vivo* de CTL humanos de pacientes con VHC

5 Se examina sangre obtenida de pacientes con VHC infectados de forma crónica y CTL específicos de VHC *in vitro* después de cultivo con IL-21. Los linfocitos T específicos de VHC se enumeran tiñendo con tetrámeros que contienen péptido de VHC y proteínas de HLA de Clase I solubles. Usando citometría de flujo se accede a la capacidad de linfocitos T específicos de VHC CD8+ para proliferar y producir citocinas (especialmente interferón- γ e IL-2) en respuesta a antígenos de VHC incubados en presencia o ausencia de IL-21. Los CTL específicos de VHC se fenotipan con respecto a estado de activación y función efectora (específicamente para expresión de CD27 y CCR7). También se evalúa la actividad citolítica para células diana de HLA coincidente que portan péptidos de VHC (véase, por ejemplo, Wedemeyer y col., J. Immunol. 169: 3447-58, 2002; Gruener y col., J. Virol. 75: 5550-58, 2001; Cramp y col., Gastroenterology 118: 346-55, 2000.)

15 Se mide cultivo *in vitro* de linfocitos T específicos de VHC con su antígeno afín con IL-21 para demostrar supervivencia, proliferación y producción de citocinas aumentadas por los CTL, en comparación con los cultivados en medio solamente. La actividad citolítica de los CTL específicos de VHC se mide para demostrar aumentos significativos después de cultivo en IL-21 en relación con los mismos CTL cultivados en medio.

Ejemplo de referencia 41

Modelo de gripe de infección viral aguda

A. Experimento preliminar para ensayar la actividad antiviral.

20 Para determinar la actividad antiviral de IL-21 en virus de la gripe y medir diversos parámetros inmunes, centrándose en inmunidad humoral y mediada por células, se realizó un estudio *in vivo* usando ratones c57B1/6 infectados por gripe usando el siguiente protocolo:

Animales: ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad (Charles River) con 148 ratones, 30 por grupo. Grupos:

- 25 (1) Control absoluto (no infectado) para procesar en paralelo con respecto a titulación de anticuerpos e histopatología (2 animales por grupo)
- (2) Solución salina vehículo (i.p.)
- (3) Amantadina (control positivo) 10 mg/día durante 5 días (por vía oral) comenzando 2 horas antes de la infección
- 30 (4) Tratados con IL-21 (5 μ g, i.p. comenzando 2 horas después de la infección)
- (5) IL-21 (25 μ g, i.p. comenzando 2 horas después de la infección)
- (6) IL-21 (125 μ g, i.p. comenzando 2 horas después de la infección)

Día 0 – Excepto para los controles absolutos, todos los animales infectados con virus de la gripe

- 35 Para carga viral (10 a DL50)
- Para ensayo de inmunología (DL30)

Día 0 - 9 – inyecciones diarias de IL-21 (i.p.)
Registro de peso corporal y apariencia general (3 veces/semana)

- 40 Día 3 – sacrificio de 8 animales por grupo
- Carga viral en el pulmón derecho (DICT50)
- Histopatología del pulmón izquierdo
- Muestra sanguínea para titulación de anticuerpos

45 Día 10 - sacrificio de todos los animales supervivientes recogiendo muestras de sangre para titulación de anticuerpos, aislando linfocitos de pulmón (4 grupos de 3) para ensayo de CTL directo (en los 5 grupos) e inmunofenotipación cuantitativa para los siguientes marcadores: CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD8/CD11b, CD8/CD44/CD62L, CD3/DX5, GR-1/F480 y CD19.

50 Los resultados demostraron que el tratamiento con IL-21 potenció la actividad citolítica específica de virus de células mononucleares pulmonares. Se plantea la hipótesis de que esta actividad CTL potenciada sea importante para resolución de enfermedad viral humana. El tratamiento no tuvo efecto significativo en la carga viral del día 4, producción de anticuerpos del día 10 o pérdida de peso. La incapacidad de alterar la carga viral el día 4 sugiere que el tratamiento con IL-21 no aumentó significativamente la actividad de NK. La producción de anticuerpos del día 10 es un punto temporal temprano de importancia incierta. La incapacidad para alterar la pérdida de peso sugiere que la potenciación por IL-21 de la actividad de CTL era inadecuada para alterar el curso de la infección. Esto podría deberse a que la infección era simplemente demasiado agresiva.

B. Experimento secundario para ensayar con respecto a actividad antiviral.

Estudio N° 1:

- 5 1. Determinación de DL₅₀ de un nuevo repertorio de virus de la gripe adaptados para ratón y análisis de la capacidad para inducir respuestas inmunes en ratones C57B1/6 infectados. En primer lugar, se producen dos nuevos repertorios de virus de la gripe humana y se valoran. En segundo lugar, el último pase de virus adaptado a ratón se pasa en huevos embrionados. Además, un repertorio de virus no adaptados (repertorio congelado ATCC) se pasa en huevos embrionados. En tercer lugar, se prepara un repertorio de control de fluido alantoideo en huevos embrionados inoculados con PBS. Ambos repertorios se valoran por HAU (usando eritrocitos de gallo 0,5 %) y DICT₅₀ (usando células MDCJK). Los repertorios de virus y el control de fluido alantoideo se congelan a -80 °C.
- 10 2. Determinación de la DL₅₀ para repertorios de virus adaptados para ratones en ratones C57B1/6 se realiza usando 6 ratones hembra C57B1/6 (8 semanas de edad) (Charles River). Se proporciona a los ratones una inoculación intranasal (20 µl) con una micropipeta de animales anestesiados (ketamina/xilacina, i.p.) y después se proporcionan 6 dosis de cada repertorio de virus (dilución 1/10) + control de PBS. Hay 8 animales por dosis. El número de animales se registra diariamente y el peso corporal se mide cada dos días.
- 15 El día 14 después de la infección, se registra el número de animales que sobrevivió a la infección con virus y su peso corporal, y se calcula la DL₃₀ para ambos repertorios virales para ratones C57B1/6.
- 20 3. Se analiza la respuesta inmune inducida por virus de la gripe adaptado a ratón en ratones C57BL/6. Se ensaya la citotoxicidad mediada por CTL usando células efectoras (células mononucleares de los pulmones), 10 días después de la infección en ratones a los que se les proporcionó 1 DL₃₀ de repertorio viral. Las células diana son línea celular tumoral EL-4 (H-2^b) infectada por gripe ATCC N° TIB39 (Brit. J. Cancer 4: 372, 1950). Se realizan ensayos por cuadruplicado a diferentes relaciones E:T comenzando desde el 50:1. Además para comparar la susceptibilidad de las células diana infectadas con virus de la gripe A/PR/8/34 adaptados para ratón y no adaptados, se usan células diana no infectadas y células EL-4 infectadas con virus de la gripe B-Lee/40 para control específico. Se realizan tres experimentos para comparar respuestas de CTL en ratones infectados con los repertorios de virus.
- 25 Inmunofenotipación: Se realizan experimentos de inmunofenotipación preliminar en 3 grupos de células mononucleares de los pulmones recogidos el Día 10 después de la infección de 3 ratones infectados con 1 DL₃₀ de virus adaptado a ratón. También pueden determinarse poblaciones de interés de células de pulmón en ratones C57BL/6 normales que usan células agrupadas de 8 ratones para cada determinación. Estos estudios usarán 44 animales.
- 30

Estudio N° 2:

- 35 Para determinar las dosis infecciosas a las que las señales clínicas de enfermedad (pérdida de peso) no son demasiado graves, mientras se induce a la vez una respuesta de CTL de pulmón detectable pero subóptima, se ensaya un estudio de respuesta a dosis comenzando con la DL₃₀ de virus adaptado a ratón. El experimento usa 40 ratones C57B1/6 hembra (8 semanas de edad) (Charles River) y se anestesia a los animales. Hay 4 grupos de 2 animales para un DL₃₀ y de 4 animales por dosis para dosis inferiores. Las dosis son 1 DL₃₀, dilución 1/10, dilución 1/100 de virus.
- 40 El número de animales se registra diariamente y el peso corporal se registra cada dos días. Día 10 después de la infección: registrar el número de animales que han sobrevivido a la presentación de virus y su peso corporal. El día 10, los animales se sacrifican y se evalúan con respecto a inducción de CTL en 4 grupos por dosis (2 ó 4 animales por grupo), usando EL-4 no infectadas, infectadas por A/PR/8/34 e infectadas por B/Lee/40 como dianas y 7 relaciones de E:T diferentes (50/1, 25/1; 12/1; 6/1; 3/1; 1,5/1; y 0,75/1).

45 Estudio N° 3

Se realiza estudio de eficacia de IL-21 en ratones C57B1/6 infectados con virus adaptado a ratón usando ratones C57B1/6 hembra de 8 semanas de edad (Charles River). Los grupos tienen 36 animales por grupo.

- 50 Grupo 1: Vehículo (i.p.)
 Grupo 2: Control positivo: anticuerpo neutralizador anti gripe (A/USSR anti gripe de cabra (H1N1) (Chemicon International, Temecula, CA)); 40 µg/ratón a 2 horas y 4 horas después de la infección (10 µl intranasales)
 Grupo 3: ZG-01 (5 µg, i.p.)
 Grupo 4: ZG-01 (25 µg, i.p.)
 Grupo 5: ZG-01 (125 µg, i.p.)

55

Tabla 11

Grupos de tratamiento	Sacrificados el día 10	
	Inmunología	ARN+ IHC+H&E
Grupo 1 (28 ratones) Vehículo	24 animales (6 ratones/grupo)	4 animales
Grupo 2 (28 ratones) control +ve (Ab Neutralizador)	24 animales (6 ratones/grupo)	4 animales
Grupo 3 (28 ratones) IL-21 (5 µg)	24 animales (6 ratones/grupo)	4 animales
Grupo 4 (28 ratones) IL-21 (25 µg)	24 animales (6 ratones/grupo)	4 animales
Grupo 5 (28 ratones) IL-21 (125 µg)	24 animales (6 ratones/grupo)	4 animales
Total (140 animales)	120	20

Se preparan ensayos inmunológicos y observaciones de seguimiento diario:

Día 0 – todos los animales infectados con virus de gripe (dosis determinada en el experimento 2)

Día 0-9 – inyecciones diarias de IL-21 (i.p.). Se registra peso corporal y apariencia general cada dos días.

5 Día 10 – sacrificio de los animales supervivientes (se usarán 24 animales para evaluación inmune completa; 4 para aislamiento de ADN y tinción con H y E).

Aislamiento de linfocitos de pulmón (4 grupos de 6) para ensayo de CTL directo en los pulmones (en los 5 grupos) usando EL-4 como dianas y relación de E:T diferente (basándose en los mejores resultados de los experimentos 1 y 2).

10 Tinción de tetrámeros: el número de linfocitos T CD8+ que se unen a tetrámeros MHC de clase I que contienen epítipo de nucleoproteína de gripe A (NP) se evalúa usando complejos de MHC de clase I con péptidos virales: FLU-NP₃₆₆₋₃₇₄/D^b(ASNENMETM), (péptido LMCV/D^b).

15 Inmunofenotipación cuantitativa de los siguiente: CD8, tetrámero, IFN-γ intracelular, NK1.1, CD8, tetrámero, CD62L, CD44, CD3 (+ o -), NK1.1 (+), IFN-γ intracelular, CD4, CD8, NK1.1, DX5, CD3 (+ o -), NK1.1, DX5, tetrámero, muestras de color sencillo para ajuste del citómetro.

Estudio de supervivencia/reinfección

Tabla 12

Grupos de tratamiento	Reinfección con 1 DL ₃₀	Reinfección con 5 DL ₅₀
Grupo 6 (32 ratones) Vehículo	Grupo 6A 12 animales	Grupo 6B 20 animales
Grupo 7 (32 ratones) IL-21 (125 µg)	Grupo 7A 12 animales	Grupo 7A 20 animales
Total (64 animales)	24 animales	40 animales

20 Día 30: Estudio de supervivencia (12 animales por grupo) con ratones que se tratan durante 9 días con diferentes dosis de IL-21 o con control de anticuerpo anti gripe positivo. Se mide el peso corporal y la producción de anticuerpos en muestras de suero individuales (Total, IgG1, IgG2a, IgG2b).

Estudio de reinfección:

Se usan 2 grupos de 32 animales en este estudio.

Día 0: Ambos grupos se infectarán con virus A/PR (1DL30).

El grupo 6 no se tratará.

El grupo 7 se tratará durante 9 días con 125 µg de IL-21.

- 5
Día 30: Estudio de supervivencia
Se miden el peso corporal y la producción de anticuerpos en muestras de suero individuales (Total, IgG1, IgG2a, IgG2b).
Día 60: Estudio de reinfección
Los supervivientes de cada grupo se dividirán en 2 subgrupos
10 Los grupos 6A y 7A se reinfectarán con virus A/PR (1 DL30)
Los grupos 6B y 7B se reinfectarán con virus A/PR (1 DL30).
Ambos grupos se seguirán y se determinará el día de sacrificio. Se miden el peso corporal y la producción de anticuerpos en muestras de suero individuales (Total, IgG1, IgG2a, IgG2b).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15
<110> ZymoGenetics. Inc.
Nelson, Andrew J.
Hughes, Steven D.
Holly, Richard D.
20 Kindsvogel, Wayne R.

<120> USO DE IL-21 EN CÁNCER Y OTRAS APLICACIONES TERAPÉUTICAS

<130> 02-11 PC

25
<150> US 60/387.127

<151> 07-06-2002

30
<160> 17

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

35
<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

40
<221> CDS

<222> (47)...(532)

ES 2 381 265 T3

<400> 1

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtactt atg aga tcc Met Arg Ser 1	55
agt cct ggc aac atg gag agg att gtc atc tgt ctg atg gtc atc ttc Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met Val Ile Phe 5 10 15	103
ttg ggg aca ctg gtc cac aaa tca agc tcc caa ggt caa gat cgc cac Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His 20 25 30 35	151
atg att aga atg cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag ctg aaa aat Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn 40 45 50	199
tat gtg aat gac ttg gtc cct gaa ttt ctg cca gct cca gaa gat gta Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val 55 60 65	247
gag aca aac tgt gag tgg tca gct ttt tcc tgt ttt cag aag gcc caa Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln 70 75 80	295
cta aag tca gca aat aca gga aac aat gaa agg ata atc aat gta tca Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser 85 90 95	343
att aaa aag ctg aag agg aaa cca cct tcc aca aat gca ggg aga aga Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg 100 105 110 115	391
cag aaa cac aga cta aca tgc cct tca tgt gat tct tat gag aaa aaa Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys 120 125 130	439
cca ccc aaa gaa ttc cta gaa aga ttc aaa tca ctt ctc caa aag atg Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met 135 140 145	487
att cat cag cat ctg tcc tct aga aca cac gga agt gaa gat tcc Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser 150 155 160	532
tgaggatcta acttgcagtt ggacactatg ttacatactc taatatagta gtgaaagtca tttctttgta ttccaagtgg aggagcccta ttaaattata taaagaata	592 642

ES 2 381 265 T3

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

5

<400> 2

```

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1           5           10           15
Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
 20           25           30
Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
 35           40           45
Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
 50           55           60
Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
 65           70           75           80
Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
 85           90           95
Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
 100          105          110
Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
 115          120          125
Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
 130          135          140
Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
 145          150          155          160
Asp Ser
  
```

10 <210> 3
 <211> 3072
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (54)...(491)

<400> 3

20

ES 2 381 265 T3

gagaaccaga ccaaggcct gtcacagct cctggagact cagttctggt ggc atg	56
Met	
1	
gag agg acc ctt gtc tgt ctg gta gtc atc ttc ttg ggg aca gtg gcc	104
Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val Ala	
5 10 15	
cat aaa tca agc ccc caa ggg cca gat cgc ctc ctg att aga ctt cgt	152
His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg	
20 25 30	
cac ctt att gac att gtt gaa cag ctg aaa atc tat gaa aat gac ttg	200
His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu	
35 40 45	
gat cct gaa ctt cta tca gct cca caa gat gta aag ggg cac tgt gag	248
Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu	
50 55 60 65	
cat gca gct ttt gcc tgt ttt cag aag gcc aaa ctc aag cca tca aac	296
His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn	
70 75 80	
cct gga aac aat aag aca ttc atc att gac ctc gtg gcc cag ctc agg	344
Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg	
85 90 95	
agg agg ctg cct gcc agg agg gga gga aag aaa cag aag cac ata gct	392
Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala	
100 105 110	
aaa tgc cct tcc tgt gat tcg tat gag aaa agg aca ccc aaa gaa ttc	440
Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe	
115 120 125	
cta gaa aga cta aaa tgg ctc ctt caa aag atg att cat cag cat ctc	488
Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu	
130 135 140 145	
tcc tagaacacat aggacccgaa gattcctgag gatccgagaa gattcccag	541
Ser	

ES 2 381 265 T3

gactgaggag	acgccggaca	ctatagacgc	tcacgaatgc	aggagtacat	cttgccctctt	601
gggattgcaa	gtggagaagt	acgatacgtt	atgataagaa	caactcagaa	aagctatagg	661
ttaagatcct	ttcgcgccatt	aactaagcag	acattgtggt	tccctgcaca	gactccatgc	721
tgtcaacatg	gaaaatctca	actcaacaag	agcccagctt	cccgtgtcag	ggatttctgg	781
tgcttctcaa	gctgtggctt	catcttattg	cccaactgtg	acattctttg	attggaaggg	841
gaaaactaaa	gcttttagca	aaaatacagc	tagggaattt	gtc gatctgc	gagagtaaga	901
cctcttatga	tcctaacgga	atgatgtaag	ctggaaataa	taagcataag	atgaaattga	961
aaattgaagt	ctttattctt	taagaaaaac	tttgtacttg	aaagcatgtc	tgaagagttt	1021
actcattacc	acaacatctt	agcatattga	taactaacat	ctttatactc	tacaagagag	1081
gctttccaga	taggtacagt	ttttcttctc	tattaggtct	atcaaaattt	aacctattat	1141
gagggtcacc	cctggctttc	actgtttttc	taaagaggca	aggggtgtagt	aagaagcagg	1201
cttaagttgc	cttctccca	atgtcaagtt	ctttataag	ctaatagttt	aatcttgtga	1261
agatggcaat	gaaagcctgt	ggaagtgcaa	acctcactat	cttctggagc	caagtagaat	1321
ttcaagttt	gtagctctca	cctcaagtgg	ttatgggtgt	cctgtgatga	atctgtctagc	1381
tccagcctca	gtctctctc	ccacatcctt	tccttcttt	cctctttgaa	acttctaaga	1441
aaaagcaatc	caacaagtt	cagcacttaa	gacacattgc	atgcacactt	ttgataagtt	1501
aatccaacc	atctatttaa	aatcaaaatc	aggagatgag	ccaagagacc	agaggttctg	1561
ttccagttt	aaacagactt	ttactgaaca	tccaatcctt	ttaaccacag	aggctaaatt	1621
gagcaaatag	ttttgccatt	tgatataaatt	tccaacagta	tgtttcaatg	tcaagttaaa	1681
aagtctacaa	agctattttc	cctggagtgg	tatcatcgct	ttgagaattt	cttatggtta	1741
aatggatct	gagatccaag	catggcctgg	gggatggttt	tgatctaagg	aaaaagggtg	1801
ctgtacctca	cagtgccttt	aaaacaagca	gagatcccgt	gtaccgccct	aagatagcac	1861
agactagtg	taactgattc	ccagaaaagt	gtcacaatca	gaaccaacgc	attctcttaa	1921
actttaaaaa	tatgtattgc	aaagaacttg	tgtaactgta	aatgtgtgac	tgttgatgac	1981
attatacaca	catagcccac	gtaagtgtcc	aatggtgcta	gcattggttg	ctgagtttgc	2041
tgctcgaaag	ctgaagcaga	gatgcagtc	ttcacaagc	aatgatggac	agagagggga	2101
gtctccatgt	tttattcttt	tgttgtttct	ggctgtgtaa	ctgttgactt	cttgacattg	2161
tgatthttat	atttaagaca	atgtatthttat	tttgggtgtg	ttattgttct	agcctthttaa	2221
atcactgaca	atthtctaate	aagaagtaca	aataatthcaa	tgacagcacag	gctaagagct	2281
tgtatcgthtt	ggaaaagcca	gtgaaggctt	ctccactagc	catgggaaag	ctacgctthta	2341
gagtaaaacta	gacaaaattg	cacagcagtc	ttgaacctct	ctgtgctcaa	gactcagcca	2401
gtcctthtgac	attattgttc	actgtgggtg	ggaacacatt	ggacctgaca	cactgtthtg	2461
tgthccatgaa	ggttgccact	ggtgtaagct	thttthtggt	thcattctct	tatctgtgaga	2521
acaagaatgt	gggctthtcc	taagtctatt	ctgtatthtta	thctgaaactt	cgtatgtctg	2581
agththtaatg	thttgagthac	thcttacagga	acacctgacc	acactthtga	gthtaaththt	2641
atthccaagthg	tgataththtag	thgtthcaaaa	agghaaggha	tatacatata	tacatacata	2701
catatacata	tataatata	tataatata	tataatata	tataatata	tataatata	2761
tataatata	gagagagaga	gagagagaga	gagaaagaga	gagagthgt	tgtagthcat	2821
aggagthcag	aggaaatcag	thtatggcctg	thatactgta	gctgaaagthg	thttctthtgt	2881
gaaataathc	atagcathat	tgatctatgt	tatthgctctg	thttatthtac	agthcacacct	2941
gagaaththtag	ththtaathatg	aatgatgthac	ththataactt	aatgathatth	tathatgtht	3001
ththgththtga	atgththtgtg	thcatggcttc	thththtaaga	cctgathcata	thaaathgcta	3061
cccagthccgg	a					3072

<210> 4

<211> 146

ES 2 381 265 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

5

```

Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1          5          10          15
Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu
 20          25          30
Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp
 35          40          45
Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys
 50          55          60
Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser
 65          70          75          80
Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu
 85          90          95
Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile
 100         105         110
Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu
 115         120         125
Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His
 130         135         140
Leu Ser
 145
    
```

<210> 5

<211> 1614

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (1614)

<400> 5

```

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

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

15

ES 2 381 265 T3

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc	144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr	
35 40 45	
ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc	192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser	
50 55 60	
tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc	240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr	
65 70 75 80	
tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc	288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val	
85 90 95	
aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt	336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe	
100 105 110	
ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg	384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val	
115 120 125	
acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac	432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp	
130 135 140	
cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac	480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr	
145 150 155 160	
agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc	528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile	
165 170 175	
tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa	576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys	
180 185 190	
gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc	624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser	
195 200 205	

ES 2 381 265 T3

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag	672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln	
210 215 220	
acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac ctg ctg ctt	720
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu	
225 230 235 240	
ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc ttc tgg agc ctg aag	768
Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys	
245 250 255	
acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata tgg gcc gtc ccc agc	816
Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser	
260 265 270	
cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc tgc agc gga gac ttc	864
Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe	
275 280 285	
aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc agc ctg gag ctg gga	912
Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly	
290 295 300	
ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag gtg tac agc tgc cac	960
Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His	
305 310 315 320	
cca cca cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc acg gag cta caa gaa	1008
Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu	
325 330 335	
cca gca gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc aag ccc agc ttc tgg	1056
Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp	
340 345 350	
ccg aca gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac agt gag gag agg gat	1104
Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp	
355 360 365	

ES 2 381 265 T3

cgg cca tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg act gtg cta gat gca 1152
 Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
 370 375 380

gag ggg cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag gat gac ggc tac cca 1200
 Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
 385 390 395 400

gcc ctg gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc cca ggc cta gag gac 1248
 Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
 405 410 415

cca ctc ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc tgt ggc tgt gtc tca 1296
 Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
 420 425 430

gct ggc agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga agc ctc ctg gac aga 1344
 Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
 435 440 445

cta aag cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg gct ggg gga ctg ccc 1392
 Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
 450 455 460

tgg ggt ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag agt gag gcg ggc tca 1440
 Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
 465 470 475 480

ccc ctg gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac agt ggc ttt gtg ggc 1488
 Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
 485 490 495

tct gac tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc agc ccc ggg gac 1536
 Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
 500 505 510

gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg gtc att cct ccg 1584
 Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
 515 520 525

cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc 1614
 Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 530 535

ES 2 381 265 T3

<211> 538

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400>6

```

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1           5           10           15
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
           20           25           30
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
           35           40           45
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
 50           55           60
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65           70           75           80
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
           85           90           95
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
           100          105          110
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
           115          120          125
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
           130          135          140
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145          150          155          160
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
           165          170          175
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
           180          185          190
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
           195          200          205
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210          215          220
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
225          230          235          240
Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
           245          250          255
Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser
           260          265          270

```

Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
 275 280 285
 Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly
 290 295 300
 Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
 305 310 315 320
 Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
 325 330 335
 Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
 340 345 350
 Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp
 355 360 365
 Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
 370 375 380
 Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
 405 410 415
 Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
 420 425 430
 Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
 435 440 445
 Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
 450 455 460
 Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
 465 470 475 480
 Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
 485 490 495
 Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
 500 505 510
 Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
 515 520 525
 Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 530 535

<210> 7

<211> 153

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>7

ES 2 381 265 T3

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

<210> 8

<211> 153

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 381 265 T3

Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln
 20 25 30
 Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys
 35 40 45
 Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr
 50 55 60
 Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr
 65 70 75 80
 Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln
 85 90 95
 Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg
 100 105 110
 Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala
 115 120 - 125
 Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met
 130 135 140
 Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
 145 150

<210> 9

5

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

10

ES 2 381 265 T3

Met	Arg	Ile	Ser	Lys	Pro	His	Leu	Arg	Ser	Ile	Ser	Ile	Gln	Cys	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Asn	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Glu	Ala	Gly	Ile	His
		20						25					30		
Val	Phe	Ile	Leu	Gly	Cys	Phe	Ser	Ala	Gly	Leu	Pro	Lys	Thr	Glu	Ala
		35					40					45			
Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile
	50					55					60				
Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His
65					70					75					80
Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln
				85					90					95	
Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val	Glu
			100					105						110	
Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val
		115					120					125			
Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile
	130					135						140			
Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn
145					150					155					160
Thr	Ser														

<210> 10

<211> 144

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 381 265 T3

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1 5 10 15
 Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
 20 25 30
 Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
 35 40 45
 Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
 50 55 60
 Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
 85 90 95
 Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
 100 105 110
 Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 130 135 140

<210> 11

<211> 22

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC22281

10

<400> 11

tgatgaatgac ttgtccctg aa 22

<210> 12

15

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Cebador oligonucleotídico ZC22279

<400> 12

ES 2 381 265 T3

aacaggaaaa agctgaccac tca 23

<210> 13
<211> 31
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda TaqMan de ligando zalpha11, ZG32
10

<400> 13
tctgccagct ccagaagatg tagagacaaa c 31

<210> 14
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Cebador oligonucleotídico ZC22277

<400> 14
ccaggagtgt ggcagcttc 20

25 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico ZC22276

<400> 15
gcttgcctt cagcatgtag a 21
35

<210> 16
<211> 23

ES 2 381 265 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> sonda TaqMan[®] de zalpha11, designada ZG31

<400> 16

cggtccccc ttcaacgtg act 23

10 <210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido OVA257-264

<400> 17

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que tiene una actividad funcional de IL-21, y un anticuerpo monoclonal, para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en el que el cáncer se selecciona del grupo de carcinoma de células renales, cáncer de mama, glioma y cáncer de colon; y en el que el primer polipéptido tiene al menos 80 % de identidad con un polipéptido de IL-21 que comprende los restos 41 (Gln) a 148 (Ile) de SEC ID N°: 2 o restos 32 (Gln) a 162 (Ser) de SEC ID N°: 2.
2. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el uso da como resultado una respuesta tumoral.
- 10 3. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en los que dicha respuesta tumoral es una respuesta completa o una respuesta parcial.
4. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en los que dicho cáncer es carcinoma de colon y dicho anticuerpo monoclonal es ERBITUX[®].
5. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en los que dicho cáncer es cáncer de mama y dicho anticuerpo monoclonal es HERCEPTIN[®].
- 15 6. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en los que el primer polipéptido tiene al menos 90 % de identidad con un polipéptido de IL-21 que comprende los restos 41 (Gln) a 148 (Ile) de SEC ID N°: 2 o los restos 32 (Gln) a 162 (Ser) de SEC ID N°: 2.
- 20 7. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en los que el primer polipéptido tiene al menos 95 % de identidad con un polipéptido de IL-21 que comprende los restos 41 (Gln) a 148 (Ile) de SEC ID N°: 2 o los restos 32 (Gln) a 162 (Ser) de SEC ID N°: 2.
8. Un polipéptido y anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en los que el primer polipéptido es un polipéptido de IL-21 que comprende los restos 41 (Gln) a 148 (Ile) de SEC ID N°: 2 o los restos 32 (Gln) a 162 (Ser) de SEC ID N°: 2.