

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 278**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05756320 .7**
96 Fecha de presentación: **20.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1758610**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento del cáncer usando tratamiento con IL-21 y anticuerpos monoclonales**

30 Prioridad:
20.05.2004 US 572973 P
10.12.2004 US 635380 P
14.04.2005 US 671281 P
12.05.2005 US 680447 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WA 98102, US

72 Inventor/es:
KINDSVOGEL, WAYNE R.;
HUGHES, STEVEN D.;
HOLLY, RICHARD D.;
CLEGG, CHRISTOPHER H.;
FOSTER, DONALD C.;
JOHNSON, REBECCA A.;
HEIPEL, MARK D. y
SIVAKUMAR, PALLAVUR V.

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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).

ES 2 390 278 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento del cáncer usando tratamiento con IL-21 y anticuerpos monoclonales

Antecedentes de la invención

5 En general, las citocinas estimulan la proliferación o diferenciación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmunitaria e inflamatoria del organismo. Las interleucinas son una familia de citocinas que median respuestas inmunológicas. Son cruciales en la respuesta inmunitaria los linfocitos T, que producen muchas citocinas y efectúan la inmunidad adaptativa frente a los antígenos. Las citocinas producidas por los linfocitos T se han clasificado como TH1 y TH2 (Kelso, A. Immun. Cell. Biol. 76:300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- γ , LT- α , y participan en respuestas inflamatorias, inmunidad vírica, inmunidad frente a parásitos intracelulares y rechazo de aloinjertos. Las citocinas de tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y participan en respuestas humorales, inmunidad frente a helmintos y respuesta alérgica. Las citocinas compartidas entre las citocinas de tipo 1 y 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- α . Existen algunas pruebas que indican que las poblaciones de linfocitos T productoras de tipo 1 y tipo 2 migran de forma preferente a tipos diferentes de tejidos inflamados.

15 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) tienen una célula progenitora común con los linfocitos T y los linfocitos B y desempeñan un papel en la vigilancia inmunitaria. Los linfocitos NK, que constituyen hasta el 15 % de los linfocitos de la sangre, no expresan receptores antigénicos y son un componente de la inmunidad innata. Los linfocitos NK participan en el reconocimiento y la destrucción de células tumorales y células infectadas por virus. Se cree que, *in vivo*, los linfocitos NK requieren activación, sin embargo, se ha demostrado que, *in vitro*, los linfocitos NK destruyen algunos tipos de células tumorales sin activación.

20 Se ha demostrado que la IL-21 es un potente modulador de linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK. (Parrish-Novak, et al. Nature 408:57-63, 2000; Parrish-Novak, et al., J. Leuk. Bio. 72:856-863, 2002; Collins et al., Immunol. Res. 28:131-140, 2003; Brady, et al. J. Immunol.:2048-58, 2004.) Se ha demostrado que la IL-21 coestimula la expansión de linfocitos NK y se ha demostrado que potencia las funciones efectoras de estos linfocitos. Las respuestas de linfocitos T incluyen la potenciación de la respuesta a antígeno primaria como la modulación de las funciones de linfocitos T de memoria (Kasaian et al., Immunity 16:559-569, 2002.)

30 El tratamiento con anticuerpos usa antígenos que se expresan selectivamente en determinados tipos celulares. El tratamiento con anticuerpos ha sido especialmente exitoso en el tratamiento del cáncer debido a que determinados tumores presentan antígenos únicos, antígenos específicos de linaje o antígenos presentes en cantidades en exceso con relación a las células normales. El desarrollo del tratamiento con anticuerpos monoclonales (AcM) ha evolucionado a partir de la tecnología de hibridoma de ratón (Kohler et al., Nature 256:495-497, 1975), que tenía una utilidad terapéutica limitada debido a la incapacidad para estimular la actividad de células efectoras inmunitarias humanas y la producción de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA; Khazaeli et col., J. Immunother. 15:42-52, 1994). La preparación de anticuerpos quiméricos que eran menos antigénicos se logró usando regiones constantes humanas y regiones variables de ratón. Estos anticuerpos tenían funciones efectoras aumentadas y repuestas HAMA reducidas (Boulianne et al., Nature 312:643-646, 1984). Se han desarrollado anticuerpos monoclonales humanos usando tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990) y, más recientemente, se han usado ratones transgénicos portadores de locus de Ig humanas para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos (Green, J. Immunol. Methods 231:11-23, 1999). Para una revisión del tratamiento con anticuerpos monoclonales, véase Brekke et al., Nat. Rev. Drug Discov. 2:52-62, 2002.

El documento WO 03/103589 describe el uso de IL-21 en cáncer y otras aplicaciones terapéuticas.

El documento WO 2004/032857 describe combinaciones de anticuerpos anti-ACE y un agente terapéutico.

Clegg et al., European Cytokine Network, vol. 14 (3), septiembre de 2003, página 28, describe posibilidades terapéuticas para la IL-21.

45 El documento WO 2005/037306 describe un tratamiento combinado de IL-21.

La presente invención permite potenciar la actividad antitumoral del tratamiento con anticuerpos monoclonales con IL-21. La combinación de IL-21 y anticuerpos monoclonales terapéuticos proporciona mejoras con respecto al tratamiento con anticuerpos monoclonales solo, en particular para pacientes que no responden al tratamiento con anticuerpos monoclonales solo o en combinación con otros regímenes de tratamiento. Estos y otros usos deberían resultar evidentes para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento.

Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere al tratamiento del cáncer en un sujeto, en particular sujetos humanos, que comprende coadministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de rituximab y una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-21 o un fragmento de un polipéptido de IL-21 como se muestra en la SEQ ID N.º: 2 desde el residuo de aminoácido 30 hasta el residuo 162. El anticuerpo monoclonal es rituximab. En otra realización, la

presente invención es para el tratamiento de linfoma no hodgkiniano. En la presente invención, se administran el anticuerpo monoclonal rituximab y el polipéptido de IL-21 una vez por semana durante hasta ocho semanas consecutivas. Otra realización de la presente invención establece que la dosis de polipéptido de IL-21 es de 10 a 500 µg/kg/dosis. En determinadas realizaciones de la presente invención, se ha tratado al paciente anteriormente con rituximab y no mostró remisión o regresión tumoral apreciable. En otras realizaciones, el paciente ha recaído después de recibir tratamiento con rituximab.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende coadministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-21 o un fragmento de un polipéptido de IL-21 como se muestra en la SEQ ID N.º: 2 desde el residuo de aminoácido 30 hasta el residuo 162, en el que la administración de IL-21 da como resultado una respuesta inmunológica óptima.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende la coadministración de un anticuerpo monoclonal que se une a un receptor de Her-2/neu y un polipéptido de IL-21 o un fragmento de un polipéptido de IL-21 como se muestra en la SEQ ID N.º: 2 desde el residuo de aminoácido 30 hasta el residuo 162. En una realización, el sujeto es un paciente humano. En otra realización, el anticuerpo monoclonal es trastuzumab.

Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende la coadministración de un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y un polipéptido de IL-21 o un fragmento de un polipéptido de IL-21 como se muestra en la SEQ ID N.º: 2 desde el residuo de aminoácido 30 hasta el residuo 162. En determinadas realizaciones, el sujeto es un paciente humano. En otra realización de la presente invención, se administra el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 a una dosis de 3 mg/kg cada tres semanas durante cuatro ciclos y se administra el polipéptido o fragmento de IL-21 de una a cinco veces por semana, durante hasta ocho semanas. La presente invención también proporciona realizaciones donde la dosis de polipéptido de IL-21 es de 10 a 500 µg/kg/dosis.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra curvas de supervivencia para ratones con depleción de macrófagos que fueron significativamente diferentes de las de ratones sin depleción.

La Figura 2 ilustra que los ratones con depleción de granulocitos por inyecciones de AcM anti-Gr-1 muestran una supervivencia reducida en comparación con ratones sin depleción.

La Figura 3 ilustra que la combinación de anti-CTLA4 + IL21 tiene efectos antitumorales en el modelo RENCa.

Descripción de la invención

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

El término "marca de afinidad" se usa en el presente documento para designar un segmento de polipéptido que puede estar unido a un segundo polipéptido para permitir la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios de unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, puede usarse como marca de afinidad cualquier péptido o proteína para los que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específica. Las marcas de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, proteína A (Nilsson et al., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31, 1988), una marca de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido FlagTM (Hopp et al., Biotechnology 6:1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina u otros dominios de unión o epítomos antigénicos. Véase, en general, Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. ADN que codifican las marcas de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (p. e., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

El término "variante alélica" se usa en el presente documento para designar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de la mutación y puede dar lugar a polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser sinónimas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos modificada. El término variante alélica también se usa en el presente documento para designar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Los términos "aminoterminal" y "carboxiterminal" se usan en el presente documento para designar posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción de un polipéptido en particular para designar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia situada en carboxiterminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está situada próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

- 5 El término "cáncer" o "célula cancerosa" se usa en el presente documento para designar un tejido o célula que se encuentra en una neoplasia que posee características que la diferencian de tejidos o células tisulares normales. Entre tales características se incluyen entre otras: grado de anaplasia, irregularidad en la forma, poca definición del contorno celular, tamaño del núcleo, cambios en la estructura de núcleo o el citoplasma, otros cambios fenotípicos, presencia de proteínas celulares indicadoras de un estado canceroso o precanceroso, aumento del número de mitosis y capacidad de metastatizar. Las palabras pertinentes al "cáncer" incluyen carcinoma, sarcoma, tumor, epitelioma, leucemia, linfoma, pólipo y escirro, transformación, neoplasia y similares.
- 10 El término "coadministración" se usa en el presente documento para designar que pueden administrarse un polipéptido o proteína de IL-21 y un anticuerpo monoclonal terapéutico simultáneamente o en momentos diferentes. La coadministración puede ser una única coadministración de IL-21 y anticuerpo monoclonal o varios ciclos de coadministración. La coadministración no es necesariamente el único momento en que se administra la IL-21 o el anticuerpo monoclonal a un paciente y puede administrarse cualquier agente solo o en una combinación con agentes terapéuticos distintos de IL-21.
- 15 El término "tratamiento combinado" se usa en el presente documento para designar que a un sujeto se le administra al menos una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IL-21 ("IL-21") y un anticuerpo monoclonal terapéutico. La composición de IL-21 puede ser un polipéptido maduro, uno de sus fragmentos, una fusión o un conjugado que demuestra actividad biológica de IL-21.
- 20 El término "aislado", cuando se aplica a un polinucleótido, designa que se ha sacado el polinucleótido de su medio genético natural y, por tanto, no tiene otras secuencias codificantes exógenas o no deseadas y está en una forma adecuada para su uso en sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas. Tales moléculas aisladas son aquellas que están separadas de su entorno natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención no tienen otros genes con los que se asocian normalmente, pero pueden incluir regiones de 5' y 3' no traducidas naturales, tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas resultará evidente para un experto en la técnica (véase por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316:774-78, 1985).
- 25 Un polipéptido o proteína "aislado/a" es un polipéptido o proteína que se encuentra en condiciones distintas a las de su entorno natural, tal como separado de la sangre y los tejidos animales. En una forma preferida, el polipéptido aislado no tiene, sustancialmente, otros polipéptidos, en particular 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 una pureza 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 formas glucosiladas o derivatizadas de forma alternativa.
- 30 El término "nivel" al hacer referencia a células inmunitarias, tales como linfocitos NK, linfocitos T, en particular linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y similares, un aumento del nivel es o bien un aumento del número de células o la potenciación de la actividad de la función celular.
- 35 El término "nivel" al hacer referencia a infecciones víricas se refiere a un cambio en el nivel de infección vírica e incluye, entre otros, un cambio en el nivel de LTC o linfocitos NK (como se describe anteriormente), una disminución de la carga vírica, un aumento de la valoración de anticuerpos antivíricos, la disminución de los niveles séricos de alanina aminotransferasa o la mejora determinada mediante examen histológico de un tejido u órgano objetivo. Las determinación de si estos cambios en el nivel son diferencias o cambios significativos está dentro del conocimiento del experto en la técnica.
- 40 El término "neoplásico", al hacer referencia a células, indica células que sufren una proliferación nueva y anómala, en particular en un tejido donde la proliferación es descontrolada y progresiva, dando lugar a una neoplasia. Las células neoplásicas puede ser malignas, es decir, invasivas y metastásicas, o benignas.
- 45 La expresión "dosis inmunológica óptima" se define como la dosis de IL-21 o IL-21 en combinación con un anticuerpo monoclonal que logra la respuesta inmunológica óptima.
- 50 La expresión "respuesta inmunológica óptima" se refiere a un cambio en una respuesta inmunológica después de la administración de IL-21 o la combinación de IL-21 + AcM con respecto a la observada cuando se administra el AcM solo, y puede ser (1) un aumento del número de linfocitos T CD8 específicos de tumor o activados, (2) un aumento del número de linfocitos T CD8 específicos de tumor o activados que expresan niveles más altos de granzima B o perforina o IFN γ , (3) regulación por incremento del receptor Fc γ (CD16, CD32 o CD64) en linfocitos NK, monocitos o neutrófilos, (4) un aumento de CD25 soluble en suero, (5) disminución del nivel sérico de proteínas liberadas por células tumorales (véase, Taro et al., J. Cell Physiol 203 (1): 1-5. 2005), por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (ACE), IgG, CA-19-9 o antígeno de cáncer de ovario (CA125), (6) un aumento del número de linfocitos NK que expresan niveles más altos de granzima B, perforina o IFN γ , (7) aumento de los niveles de citocinas de activación tales como IL-18, IL-15, IFN γ y quimiocinas que permiten la migración de células efectoras al tumor, tales como IP-10, RANTES, IL-8, MIP1a o MIP1b, (8) un aumento del número de macrófagos activados en la periferia o en el sitio tumoral, donde puede detectarse la activación por la expresión de un aumento de MHC de clase I o Clase II, la
- 55

producción de IL-15, IL-18, IFN γ o IL-21, o (9) actividad de macrófagos indicada por una disminución del recuento de glóbulos rojos (gravedad de la anemia).

Un "polinucleótido" es un polímero mono- o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido leído desde el extremo 5' al 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 polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado como "pb"), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Cuando el contexto lo permite, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando se aplica el término a moléculas bicatenarias se usa para designar la longitud total y se entenderá como equivalente al término "pares de bases". Los expertos en la técnica reconocerán que las longitudes de las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente y que sus extremos pueden ser escalonados como consecuencia de la escisión enzimática; por tanto, puede que no todos los nucleótidos de una molécula polinucleotídica bicatenaria estén apareados.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácido se denominan comúnmente "péptidos".

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 hidratos de carbono y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la cual se produce la proteína y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de las estructuras de sus esqueletos de aminoácidos; en general, no se especifican sustituyentes tales como grupos carbohidrato, aunque pueden estar presentes.

El término "receptor" designa una proteína asociada a una célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura multipéptica que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que normalmente participa en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) de la célula. Esta interacción da lugar a su vez a una modificación del metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que están relacionados con interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos de la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden ser unidos a la membrana, citosólicos o nucleares; monoméricos (p. ej., receptor de hormona estimulante de la tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (p. ej., receptor de PDGF, receptor de 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 "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad de una composición de IL-21 o una composición de IL-21 en combinación con un anticuerpo monoclonal que da como resultado una respuesta completa, una respuesta parcial o una enfermedad estable con un aumento del tiempo hasta la progresión con respecto a la mediana de la duración de la respuesta para el tratamiento con anticuerpos monoclonales sin IL-21.

La expresión "antígeno asociado a tumor" se refiere a un péptido o polipéptido o complejo peptídico que tiene un perfil de expresión diferente del antígeno que se encuentra en células no tumorales. Por ejemplo, un antígeno no tumoral puede expresarse con mayor frecuencia o densidad por células tumorales que por células no tumorales. Un antígeno tumoral puede diferir de un antígeno no tumoral estructuralmente, por ejemplo, el antígeno podría expresarse como un polipéptido truncado, tener alguna mutación en la secuencia de aminoácidos o en la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno, presentar un plegamiento incorrecto o modificaciones postraduccionales incorrectas. De forma similar a los antígenos que están presentes en células normales no tumorales del organismo huésped, permiten a las células tumorales escapar de los mecanismos de vigilancia inmunológica del huésped.

Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados por procedimientos analíticos imprecisos (p. ej., electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando un valor de este tipo se expresa como "alrededor de" X o "aproximadamente" X, se entenderá que el valor indicado de X tiene una precisión del $\pm 10\%$.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la administración de IL-21 en combinación con anticuerpos monoclonales terapéuticos da como resultado una actividad antitumoral que es más potente que al administrar anticuerpos monoclonales solos.

A. Descripción de IL-21.

Originalmente, la IL-21 humana (SEC ID N.º: 1 y SEQ ID N.º: 2) se denominó ligando $\alpha 11$ y se describe en las patentes de EE. UU. de propiedad conjunta N.º 6.307.024 y 6.686.178. El receptor de IL-21 (denominado anteriormente $\alpha 11$) denominado actualmente IL-21 R (SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 6), y el receptor heterodimérico IL-21R/IL-2R γ se describen en las publicaciones de la OMPI de propiedad conjunta N.º WO 0/17235

y WO 01/77171. Como se describe en estas publicaciones, la IL-21 se aisló a partir de una colección de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humanas activadas (hPBC), que se seleccionaron para CD3. El CD3 es un marcador de superficie celular exclusivo de células de origen linfoide, en particular de linfocitos T.

5 La secuencia de aminoácidos para el IL-21R indicó que el receptor codificado pertenecía a la subfamilia de receptores de citocinas de clase I, que incluye, entre otros, los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF y G-CSF (para una revisión véase, Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" en Cytokine 5(2): 95-106, 1993). Se ha identificado el receptor de IL-21 sobre linfocitos NK, linfocitos T y linfocitos B, lo que indica que la IL-21 actúa sobre células de linaje hematopoyético, en particular, células progenitoras linfoides y células linfoides. 10 Otras citocinas de haz de cuatro hélices conocidas que actúan sobre células linfoides incluyen IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Para una revisión de citocinas de haz de cuatro hélices, véase, Nicola et al., Advances in Protein Chemistry 52:1-65, 1999 y Kelso, A., Immunol. Cell Biol. 76:300-317, 1998.

15 Para la IL-21, una secuencia señal de secreción está constituida por los residuos de aminoácido del 1 (Met) al 29 (Ser), y un polipéptido maduro está constituido por los residuos de aminoácido del 30 (Gln) al 162 (Ser) (como se muestra en SEQ ID N.º: 2). La secuencia polinucleotídica correspondiente se muestra en la SEC ID N.º: 1. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia divulgada en la SEC ID N.º: 1 representa un sólo alelo de la IL-21 humana y que es de esperar que se produzcan variación alélica y ajuste alternativo.

20 En el presente documento se divulgan polipéptidos de IL-21 aislados que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar a los polipéptidos de SEC ID N.º: 2 o sus ortólogos. La expresión "identidad de secuencia sustancialmente similar" se usa en el presente documento para designar polipéptidos que comprenden una identidad de secuencia de al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o mayor del 95 % con las secuencias mostradas en la SEC ID N.º: 2 o sus ortólogos. La presente divulgación incluye también polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o mayor del 95 % con la secuencia de residuos de aminoácido del 1 al 162 o del 30 al 162 de la SEC ID N.º: 2. La presente divulgación incluye además moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para determinar el porcentaje de identidad. 25

En general, al diseñar modificaciones de moléculas o identificar fragmentos específicos, la determinación de la estructura irá acompañada de la evaluación de la actividad de las moléculas modificadas. Para un análisis extenso de modificaciones del polinucleótido y el polipéptido de IL-21, véanse las patentes de EE. UU N.º 6.307.024 y 6.686.178.

30 La presente divulgación también incluye la administración de moléculas que tienen la actividad funcional de IL-21. Así, la administración de fragmentos funcionales y polipéptidos modificados funcionales de polipéptidos de IL-21 y moléculas de ácido nucleico que codifican tales fragmentos funcionales y polipéptidos modificados se engloban en la presente divulgación. Una IL-21 "funcional" o uno de sus fragmentos como se definen en el presente documento se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad para inducir o inhibir funciones 35 celulares especializadas, en particular para células efectoras inmunitarias, tales como linfocitos NK, linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas. La IL-21 funcional incluye también la capacidad para presentar efectos antineoplásicos y antivíricos *in vitro* o *in vivo*, o a través de su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-IL-21 o un receptor IL-21 (bien soluble o bien inmovilizado).

40 También pueden usarse una variedad de fusiones polipeptídicas (y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas). Por ejemplo, puede prepararse un polipéptido de IL-21 como una fusión con una proteína que dimeriza divulgada en las patentes de EE. UU. N.º 5.155.027 y 5.567.584. A este respecto, las proteínas que dimerizan preferidas incluyen dominios de regiones constantes de inmunoglobulinas. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido de IL-21 pueden expresarse en células manipuladas genéticamente (para producir una variedad de análogos multiméricos de IL-21). Pueden fusionarse dominios auxiliares a polipéptidos de IL-21 para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicos. Por ejemplo, podría dirigirse una proteína o un polipéptido de IL-21 a un tipo celular predeterminado fusionando un polipéptido de IL-21 a un ligando o anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un receptor de la superficie de la célula objetivo. De este modo, pueden dirigirse polipéptidos y proteínas para fines terapéuticos o de diagnóstico. Puede fusionarse un polipéptido de IL-21 a dos o más restos, tales como una marca de afinidad para purificación y un dominio dirigido. Las fusiones polipeptídicas pueden comprender también uno o más sitios de escisión, en particular entre dominios. Véase, Tuan et al., Connective Tissue Research 34:1-9, 1996. 50

Independientemente de la secuencia de nucleótidos concreta de un polinucleótido de IL-21 variante, el polinucleótido codifica un polipéptido que se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, su capacidad para inducir o inhibir funciones celulares especializadas o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-IL-21 55 o un receptor de IL-21. Más específicamente, los polinucleótidos de IL-21 variantes codificarán polipéptidos que presentan al menos el 50 %, y en ciertas realizaciones, más del 70 %, el 80 % o el 90 %, de la actividad del polipéptido mostrado en la SEQ ID N.º: 2.

Para cualquier polipéptido de IL-21, incluidas variantes y proteínas de fusión, un experto en la técnica puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica totalmente degenerada que codifique esa variante usando el código

genético y procedimientos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de IL-21 usados en la presente pueden producirse en células huésped manipuladas genéticamente de acuerdo con técnicas convencionales. Células huésped adecuadas son aquellos tipos celulares que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y hacerse crecer en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, en particular células cultivadas u organismos pluricelulares. Se divulgan técnicas para manipular moléculas de ADN clonado e introducir ADN exógeno en una variedad de células huésped por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987. Se describen construcciones de expresión y procedimientos para producir IL-21 en la patente de EE. UU. N.º 6.686.178 y en el documento PCT US03/39764.

Conjugados de IL-21 usados para tratamiento pueden comprender restos poliméricos solubles en agua farmacéuticamente aceptables. 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, propionaldehído de PEG, *bis*-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de hidratos de carbono. Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular de desde aproximadamente 600 hasta aproximadamente 60.000, incluidos, 5.000, 12.000 y 25.000. Un conjugado de IL-21 también puede comprender una mezcla de tales polímeros solubles en agua.

B. Uso de IL-21 y anticuerpos monoclonales en tratamiento combinado.

Uno de los mecanismos relacionados con la actividad antitumoral del tratamiento con anticuerpos monoclonales es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En la CCDA, los anticuerpos monoclonales se unen a una célula objetivo (p. ej., célula cancerosa) y células efectoras específicas que expresan receptores para el anticuerpo monoclonal (p. ej., linfocitos NK, monocitos y granulocitos) se unen al complejo de anticuerpo monoclonal/célula objetivo, dando como resultado la muerte de la célula objetivo. La IL-21 potencia la función de las células efectoras, aumentando de este modo la eficacia del tratamiento con anticuerpos monoclonales. La dosis y la pauta de administración de IL-21 en combinación con AcM se basa en la capacidad de la IL-21 para elevar parámetros relacionados con la diferenciación y la actividad funcional de poblaciones de células que median la CCDA, incluidas, entre otras, linfocitos NK, macrófagos y neutrófilos. Estos parámetros pueden evaluarse usando ensayos de citotoxicidad celular, CCDA, de NK, macrófagos y neutrófilos (fracción de linfocitos NK o células mononucleares totales, o moléculas efectoras esenciales para la capacidad de las células de provocar la CCDA (p. ej., FasL, granzimas y perforina). La IL-21 también aumenta la producción de citocinas y quimiocinas por linfocitos NK cuando se combina con AcM y células tumorales (p. ej. IFN γ). También se ha demostrado la importancia de las células de Kupffer para la "eliminación" de linfocitos B recubiertos de rituximab (Gong et al., *J. Immunol.* 174:817-826, 2005). Otro mecanismo relacionado con la actividad antitumoral es la fagocitosis de células tumorales recubiertas de AcM. Esto también depende de los receptores de Fc y se ha demostrado influye en la depleción de B por anticuerpos anti-CD20 (Uchida et al. *J. Exp. Med.* 199 (12): 1659-69, 2004). La dosis y la pauta de administración de los AcM se basa en propiedades farmacocinéticas y toxicocinéticas adscritas al anticuerpo específico coadministrado y deberían optimizar estos efectos, al mismo tiempo que minimizan cualquier toxicidad que pueda asociarse con la administración de IL-21.

Basándose en los resultados con rituximab y trastuzumab descritos en detalle en el presente documento, otros anticuerpos monoclonales que usan mecanismos mediados por células efectoras inmunitarias para la actividad antitumoral por células efectoras también se potenciarán cuando se usa IL-21 en combinación con el anticuerpo. Además, debido a que la IL-21 potencia la actividad antitumoral mediada por células efectoras inmunitarias, determinados anticuerpos monoclonales que han tenido una eficacia antitumoral limitada cuando se usan solos serán buenos candidatos para el tratamiento combinado con IL-21.

El tratamiento combinado con IL-21 y un anticuerpo monoclonal puede estar indicado cuando ha fracasado una primera línea de tratamiento y puede considerarse como una segunda línea de tratamiento. Sin embargo, basándose en la actividad antitumoral potenciada de IL-21 en combinación con un anticuerpo monoclonal, la presente divulgación también proporciona el uso de la combinación como primera línea de tratamiento en poblaciones de pacientes que estén recién diagnosticados y no han sido tratados anteriormente con agentes antineoplásicos "pacientes de novo" y pacientes que no han recibido anteriormente ningún tratamiento con anticuerpos monoclonales "pacientes sin tratamiento previo".

La IL-21 también es útil en el tratamiento combinado con anticuerpos monoclonales en ausencia de cualquier CCDA mediada por anticuerpos directa de células tumorales. Los anticuerpos que bloquean una señal inhibitoria en el sistema inmunitario pueden dar lugar a respuestas inmunitarias aumentadas. Los ejemplos incluyen (1) anticuerpos frente a moléculas de la familia B7R que tienen función inhibitoria tales como, antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), muerte programada-1 (PD-1), atenuador de linfocitos B y T (BTLA); (2) anticuerpos frente a citocinas inhibitorias como IL-10, TGF β ; y (3) anticuerpos que provocan depleción o inhiben funciones de células supresoras como anti-CD25 o CTLA-4. Por ejemplo, se cree que los AcM anti-CTLA4 tanto en ratones como en seres humanos suprimen la función de linfocitos T reguladores inmunosupresores (Treg) o inhiben la señal inhibitoria

5 transmitida a través de la unión del CTLA-4 sobre linfocitos T a moléculas B7-1 o B7-2 sobre CPA o células tumorales. El CTLA-4 se expresa de forma transitoria sobre la superficie de linfocitos T activados y se expresa de forma constitutiva sobre linfocitos Treg. El entrecruzamiento del CTLA-4 da lugar a una señal inhibidora en linfocitos T activados y los anticuerpos frente al CTLA-4 bloquean la señal inhibidora en linfocitos T, dando lugar a la activación sostenida de los linfocitos T (Phan et al., PNAS, 100:8372-8377, 2003). En modelos de ratón, el tratamiento anti-CTLA4 da lugar a un aumento del número de linfocitos NK y linfocitos T CD8 específicos de tumor activados, dando como resultado respuestas antitumorales potentes. El receptor para IL-21 (IL-21R) se expresa en estas células efectoras y la IL-21 puede aumentar su función efectora adicionalmente mediante la activación de estas células a través del IL-21R. Esto puede dar lugar a una actividad antitumoral más potente. Están en curso ensayos clínicos en melanoma y cáncer de ovario y próstata en los que se administran anticuerpos bloqueantes frente a CTLA-4 a pacientes. Sin embargo, se ha relacionado la eficacia con acontecimientos adversos graves (véase el documento US 2004/0241169) y sería ventajoso un tratamiento combinado que diera como resultado un tratamiento menos tóxico.

15 La tabla 1 es una lista no exclusiva de anticuerpos monoclonales aprobados o que se están probando para los que es posible el tratamiento combinado con IL-21.

Tabla 1

<u>Objetivo</u>	<u>Nombre del fármaco</u>	<u>Indicación clínica</u>	<u>Empresa</u>
IL-2R α (CD25)	Zenapax	trasplante de riñón	Roche
IL-1R	AMG108	osteoartritis	Amgen
RANK-L	AMG162	osteoporosis	Amgen
Blys	LymptoSTAT-B	LES, AR	HGS
CD40L (CD39)	initiatedAID	Celltech/IDEC	
TRAIL-R1	HGS-ETR1	cánceres	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	tumores sólidos	HGS
CD30	SGN30	linfoma hodgkiniano, LNH	Seattle Genetics
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	Herceptin	Cáncer de mama	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CCR, CPNM, CCR	Abgenix
	EMD72000	tumores sólidos	Merck
	MDX-214	tumores positivos para EGF-R	Medarex
	Erbix	CCR	Imclone
VEGF-R	CDP791	tumores sólidos	Celltech
PDGF-R	CDP860	tumores sólidos	Celltech/ZymoGenetics
CD11a(α L)	Raptiva	psoriasis	Genentech
integrina α 4	Antegrin	EC, EM	PDL, Biogen-IDEC
integrina α 4 β 7	MLM02	EC, CU	Millenium
integrina α 5 β 3	Vitaxina	psoriasis, cáncer de próstata	AME/Lilly
CD2 (LFA3/Fc)	Amevive	psoriasis	Biogen-IDEC
CD152	CTLA-4/Ig	AR	Bristol Meyers
CD152	CTLA-4	cánceres	Medarex
CD49a	Integrina α 1	AR/Lupus	Biogen-IDEC
CD49e	Integrina α 5	cánceres	Protein Design Labs
MUC1			Theragyn
MUC18 (tipo TIM)	ABX-MA1	melanoma	
Mucina TAG-72	Anatumomab	cánceres	

(continuación)

<u>Objetivo</u>	<u>Nombre del fármaco</u>	<u>Indicación clínica</u>	<u>Empresa</u>
CD3	Ecromeximab	melanoma	Kyowa Hakko
	TRX4	DMID tipo I	TolerRx
	Nuvion	CU	PDL
	OrthoCloneOKT3	trasplante de órganos	Ortho biotech
CD4	HuMax-CD4	Linfoma de linfocitos T	GenMab
CD19	MT103	LNH	Medimmune
CD64 (Fc GR1)	AntiCD64	cánceres	Medarex
SIGLECs:			
CD33	MyloTarg	LMA	Celltect/Wyeth
	ZAmyl	LMA	Protein Design Labs
CD22	lymphocide	LNH, EAI	Immunomedics
CEA	CEA-Cide	cánceres	Immunomedics
CD20	Rituxan	LNH	Genentech
CD52	Campath	EM, LNH, linf. de linfocitos T	Genzyme, IDEX
CD44	Bivatuzumab	cánceres	Boehringer Ingelheim
CD23 (Fc Ep R)	IDEC152	asma alérgica, rinitis	Biogen/IDEC
LRR:			
CD14	ICOSIC14	sepsis	ICOS
EpCAM	Panorex	cáncer colorrectal	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	cánceres	Seattle Genetics
CD80	B7,1	psoriasis/LNH	Biogen/IDEC

1. IL-21 y anticuerpos monoclonales anti-CD20

5 El CD20 es un antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos y se expresa como el antígeno de superficie de linfocitos B Bp35, una proteína de 35 kD. El CD20 se encuentra en linfocitos B periféricos y puede identificarse sobre linfocitos B en maduración hasta la etapa de células plasmáticas (Reff et al., Blood 83:435-445, 1994). Se han probado anticuerpos monoclonales (AcM) anti-CD20 en la práctica clínica y, al menos un AcM anti-CD20 humanizado, el rituximab, se ha aprobado para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano (LNH). El rituximab (RITUXAN®) se une a células de linfoma y puede inducir la apoptosis directamente *in vitro*, pero también puede inducir una variedad de mecanismos efectores tales como la citotoxicidad dependiente del complemento y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (Shan et al., Blood 91:1644-1652, 1998). El rituximab se usa comúnmente como una primera línea de tratamiento para LNH (Maloney et al., Blood 90:2188-2195, 1997; en la patente de EE. UU N.º 5.736.137).

15 El rituximab es un AcM manipulado genéticamente con regiones variables de cadena ligera y pesada murinas y regiones constantes de cadena pesada gamma I y cadena ligera kappa humanas (en la patente de EE. UU. N.º 6.455.043). El anticuerpo quimérico está compuesto por dos cadenas pesadas de 451 aminoácidos y dos cadenas ligeras de 213 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 145 kD. En experimentos preclínicos, el anticuerpo inhibió el crecimiento celular en las líneas de linfocitos B FL-18, Ramos y Raji, e indujo la apoptosis en la línea DHL-4 de linfoma de linfocitos B humano de manera dependiente de dosis (Demidem et al. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 12:177-186, 1997). Se ha demostrado que el AcM tiene una semivida en suero relativamente larga y que el perfil de toxicidad es relativamente bajo.

25 Sin embargo, una población de pacientes significativa es resistente o se vuelve resistente con el tiempo al tratamiento con anticuerpos anti-CD20, incluso cuando se combina con otros tratamientos, tales como trasplante de médula ósea o trasplante de células madre, radioterapia y quimioterapia. En general, estos pacientes no presentan remisión o regresión tumoral apreciables después de la administración de anticuerpos anti-CD20 y se beneficiarían de nuevos tratamientos que potenciarían su capacidad de respuesta a los anticuerpos. Además, la potenciación de la actividad antitumoral también beneficiará a poblaciones de pacientes recién diagnosticados y que no habían sido

tratados anteriormente con agentes antineoplásicos "pacientes de novo" y a pacientes que no han recibido anteriormente ningún tratamiento con anticuerpos monoclonales "pacientes sin tratamiento previo".

5 Como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado que la IL-21 expande el número de linfocitos NK y potencia los efectos citotóxicos de los linfocitos NK y los linfocitos T. Además, se han identificado receptores para IL-21 en monocitos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NK (Parrish-Novak et al., J. Leuk. Biol. 72:856-863, 2002). Pruebas adicionales han demostrado que la IL-21 afecta a la proliferación y/o la diferenciación de linfocitos T y linfocitos B *in vivo*. Muchas líneas tumorales de linfocitos B humanos pueden injertarse en ratones IDCG y crecer de manera localizada o diseminada. En estos modelos, la medida del crecimiento tumoral o el tiempo de supervivencia del ratón huésped proporciona un medio para evaluar la eficacia terapéutica potencial contra cánceres de linfocitos B (Bonnetfoix et al., Leukemia and Lymphoma 25:169-178, 1997).

10 Cuando los anticuerpos median un efecto antitumoral a través de CCDA por células de base inmunitaria (incluidos linfocitos NK, macrófagos y neutrófilos) las células efectoras inmunitarias destruyen las células cancerosas que están unidas por el complejo de anticuerpo. La IL-21 puede usarse para potenciar la eficacia del tratamiento con anticuerpos debido, en parte, a su actividad inmunomoduladora. Se ha investigado el tratamiento combinado con rituximab y una citocina usando IL-2, IL-12 o IFN- α para el tratamiento de linfoma hodgkiniano y no hodgkiniano (Keilholz et al., Leuk. Lymphoma 35:641-2, 1999; Ansell et al., Blood 99:67-74, 2002; Carson et al., Eur. J. Immunol. 31:3016-25, 2001; y Sacchi et al., Haematologica 86:951-8, 2001).

15 Basándose en la capacidad de la IL-21 para activar y diferenciar efectores de CCDA, especialmente linfocitos NK, *in vitro* e *in vivo*, se realizaron estudios que combinaban IL-21 con anticuerpos y evaluaban la producción de citocinas, la citotoxicidad y la eliminación de tumores. Los estudios *in vitro* sometieron a ensayo la producción de citocinas y la lisis de células tumorales por linfocitos NK humanos tras la exposición a IL-21 y anticuerpo. Por ejemplo, puede evaluarse la lisis de células tumorales usando linfocitos NK aislados a partir de leucocitos de sangre periférica. Se cargan líneas de linfoma de linfocitos B humano, tales como DOHH2, Raji o Ramos, con calceína-AM o ^{51}Cr , se exponen a IL-21 durante de 1-7 días y se mide la lisis celular mediada por linfocitos NK. Otro ensayo mide la producción de citocinas. Normalmente, en estos ensayos se exponen linfocitos NK purificados a IL-21 y se cultivan *in vitro* con IgG adherida a las placas. Se mide la presencia de citocinas tales como INF- γ , TNF- α e IL-10. En la sección de ejemplos puede encontrarse la descripción detallada de estos tipos de ensayos. En el presente documento se enseñan estudios *in vivo* que monitorizan la supervivencia de los ratones después de la exposición del tumor. Otros posibles criterios de valoración para estudios *in vivo* pueden incluir pérdida de peso, disminución de la masa del tumor o parálisis de las extremidades posteriores (HLP, por sus siglas en inglés). Como se muestra en detalle en la sección de ejemplos, los resultados de estos experimentos demostraron que la actividad antitumoral contra tumores de linfocitos B CD20+ fue significativamente mayor para la combinación de rituximab e IL-21 que para rituximab o IL-21 solos. Otros experimentos en modelos animales adicionales, incluidos primates, proporcionan pruebas adicionales de la potenciación de IL-21 de la eficacia mediada por rituximab y constituyen la base para probar la combinación en pacientes con linfoma.

20 Los linfocitos, que incluyen linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK y células dendríticas y sus progenitores, tienen un ciclo de vida que implica la migración hacia o desde diversos tejidos linfoides y no linfoides. Se cree que todos los linfocitos maduran a partir de un progenitor linfoide multipotente que reside en la médula ósea. Los linfocitos indiferenciados circulan entre la sangre y tejidos linfoides secundarios hasta que las células mueren o se activan por antígenos. Cuando los linfocitos B o T se activan por antígeno, las células activadas recirculan a la sangre. Existen pruebas que indican que las quimiocinas desempeñan un papel importante en el tráfico de linfocitos. Se cree que la expresión de quimiocinas específicas, tales como CXCR3, promueve el tráfico de linfocitos B malignos desde un sitio a otro, desempeñando un papel en la migración de linfomas de linfocitos B a la sangre periférica, los ganglios linfáticos, la médula ósea y otros órganos (Trentin et al., J. of Clinical Invest. 104:115-121, 1999.) Se ha demostrado que el rituximab provoca la depleción de los linfocitos B presentes en la sangre periférica y los ganglios linfáticos periféricos (Reff et al. Blood 83:435-445, 1994) y la administración de un agente que conduzca los linfocitos CD20+ a estos tejidos proporcionaría un mecanismo para hacer a las células malignas previamente inaccesibles más sensibles a la destrucción mediada por rituximab. Se ha demostrado que la IL-21 tiene efectos tanto directos como indirectos sobre los linfocitos B (Parrish-Novak et al., J. Leukoc. Biol. 72:856-863, 2002; Mehta et al., J. Immunol 170:4111-4118, 2003; Ozaki et al., J. Immunol. 173:5361-5371, 2004.) y se sabe que afecta al proceso de maduración en determinadas células inmunitarias (Sivakumar et al., Immunol. 112:177-182, 2004.)

25 Los experimentos divulgados en el presente documento describen el descubrimiento de los presentes inventores de que la administración de IL-21 reducía inicialmente los linfocitos B, los linfocitos T y los linfocitos NK en circulación, seguido de un aumento sostenido y la resolución antes del siguiente ciclo de administración. La rápida inversión de la linfopenia y la depleción de folículos linfoides puede entenderse como la marginación transitoria de linfocitos activados combinada con un aumento de la recirculación desde los tejidos linfoides a la sangre. El aumento de linfocitos B periféricos se mitigó cuando se administraron IL-21 y rituximab y, de forma coherente, se observó una concentración mínima de linfocitos B más baja que la observada cuando se administraron IL-21 o rituximab solos. Por tanto, la IL-21 incrementa el potencial de depleción de linfocitos B por el rituximab, promoviendo la recirculación de linfocitos B que son susceptibles a la depleción. Además, la administración de IL-21 dio como resultado la potenciación de la actividad CCDA, con un aumento del número de linfocitos NK y células fagocíticas que expresan Fc γ RI y Fc γ RIII presentes cuando se realizaron ensayos de CCDA.

5 Se ha demostrado que los neutrófilos son importantes para la actividad antitumoral del rituximab en modelos de linfoma B xenogénico (Hernandez-Illizaliturri Clin. Cancer Res. 9(16 Pt. 1):5866-73. 2003). El papel de los granulocitos en la actividad antitumoral de mIL-21+rituximab se muestra por depleción con un AcM anti-Gr-1. Se expusieron grupos de ratones IDCG con y sin depleción de granulocitos a células Raji y después se trataron con rituximab solo o rituximab más mIL-21 como se describe en el ejemplo 10. La depleción de granulocitos redujo la supervivencia de ratones IDCG tratados con rituximab solo y con rituximab más mIL-21. Comparando grupos tratados con tratamiento combinado, la fracción superviviente después de 125 días se redujo de 0,67 a 0,0 para los animales con depleción de granulocitos. Sin embargo, la depleción de granulocitos no eliminó totalmente el beneficio de supervivencia de la IL-21 más rituximab, dado que resulta evidente un retraso significativo en el tiempo medio hasta la muerte (TTD) frente al grupo de control de vehículo.

10 Recientemente se ha demostrado que los macrófagos expresan receptores de IL-21 (Pelletier et al. J. Immunol 173 (12): 7521-30, 2004) y desempeñan un papel en la depleción de linfocitos B por AcM anti-CD20 (Uchida et al. J. Exp. Med. 199 (12): 1659-69, 2004). La depleción de macrófagos en ratones IDCG se realizó usando liposomas de clodronato y se probó IL-21 más rituximab en el modelo de linfoma de Raji diseminado. La depleción con liposomas de clodronato eliminó el 95 % de las células F4/80⁺ del hígado y el 90 % de las células F4/80⁺ de la pulpa roja del bazo. Se realizó la depleción de macrófagos tres días después de inyectar células Raji y se mantuvo la depleción de macrófagos hasta al menos de 27 días después de la inyección de células tumorales mediante inyección de liposomas de clodronato repetidas. La depleción de macrófagos también redujo la eficacia de la mIL-21 más rituximab. El TTD medio se redujo significativamente para los grupos tratados con liposomas de clodronato. Asimismo, se produjo una caída drástica de la mediana del tiempo de supervivencia en ratones IDCG con depleción de macrófagos tratados con rituximab solo en comparación con el grupo de ratones sin depleción correspondiente.

15 La depleción de neutrófilos con anti-Gr-1 redujo drásticamente la eficacia del rituximab solo como ya han comunicado otros autores (Hernandez-Illizaliturri, ibíd. 2003) y los experimentos mostraron que reducía la fracción de ratones supervivientes después del tratamiento con IL-21 más rituximab de 0,67 a 0,0. La IL-21 pueda actuar directamente afectando a los neutrófilos de ratón que, a su vez, pueden fagocitar células tumorales, efectuar la CCDA o producir intermedios de oxígeno citotóxicos. Pero la acción directa de la IL-21 sobre neutrófilos no está respaldada por estudios de neutrófilos humanos (Pelletier, ibíd.) donde no se detectaba el IL-21R α y la IL-21 no modulaba las respuestas de neutrófilos, incluidas la producción de superóxido, la fagocitosis, la quimiotaxis y la producción de citocinas. En su lugar, estos autores descubrieron que la IL-21 inducía la producción de IL-8 por macrófagos humanos que pueden dar lugar a quimiotaxis y activación de neutrófilos. Sin embargo, cuando se realizaron experimentos que respaldaban la presente invención, la depleción de macrófagos usando liposomas de clodronato dio como resultado una pérdida sólo parcial de la actividad antitumoral sinérgica presentada por IL-21 y rituximab. Estos resultados indicaron que en ratones IDCG tanto los neutrófilos como los macrófagos desempeñan un papel en la prolongación de la supervivencia con tratamiento combinado. Estudios recientes (Uchida et al., ibíd.) de depleción de linfocitos B normales con AcM anti-CD20 murinos también muestran que los macrófagos de ratón son la principal célula efectora necesaria y que los linfocitos NK no son esenciales, aunque en ese estudio no se investigaron los neutrófilos.

20 Estos hallazgos demuestran que la IL-21 en combinación con rituximab posee actividad antitumoral sinérgica en modelos de linfoma de linfocitos B xenogénico y que las células efectoras de la inmunidad innata colaboran en la mediación de los efectos sinérgicos de la IL-21 y el rituximab. Estos resultados indican que en ratones IDCG tanto los neutrófilos como los macrófagos desempeñan un papel en la prolongación de la supervivencia con tratamiento combinado. La IL-21 promueve la actividad antitumoral del rituximab en LNH y la acción de la IL-21 sobre macrófagos, linfocitos NK, linfocitos T y los propios tumores de linfoma, mejora la respuesta al tratamiento con rituximab.

25 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de pacientes con linfoma mediante la administración de IL-21 en combinación con rituximab en pacientes donde la liberación de células malignas desde los tejidos es necesaria para la actividad antitumoral mediada por rituximab. Además, serán ventajosas pautas de administración que mantienen los niveles de IL-21 cuando el rituximab está presente en la sangre periférica del paciente y se incluyen en la presente invención. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento del linfoma en un paciente que lo necesita que comprende administrar IL-21 durante el periodo de tratamiento cuando se determina que el rituximab está presente en la sangre periférica del paciente. En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento del linfoma en un paciente que lo necesita que comprende administrar IL-21 de una a tres veces por semana mientras el paciente recibe tratamiento con rituximab.

30 La clasificación de linfomas no hodgkinianos usada más comúnmente es el sistema de clasificación REAL (Ottensmeier, Chemico-Biological Interactions 135-136:653-664, 2001.) Se han identificado marcadores inmunológicos específicos para la clasificación de linfomas. Por ejemplo, los marcadores de linfoma folicular incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5-; los marcadores de linfoma linfocítico microcítico incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; los marcadores de linfoma de linfocitos B de la zona marginal incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD23-; los marcadores de linfoma difuso de linfocitos B grandes incluyen CD20+, CD3-; los marcadores de linfoma de células del manto incluyen CD20+, CD3-, CD10-, CD5+, CD23+; los marcadores de linfoma periférico de linfocitos T incluyen CD20-, CD3+; los marcadores de linfoma de linfocitos B grandes del mediastino primario incluyen CD20+,

CD3-; los marcadores de linfoma linfoblástico incluyen CD20-, CD3+, Tdt+; y los marcadores de linfoma de Burkitt incluyen CD20+, CD3-, CD10+, CD5- (Decision Resources, Non-Hodgkins Lymphoma, Waltham, MA., feb. 2002).

La clasificación clínica de linfoma no hodgkiniano (LNH) de la International Working Formulation divide la enfermedad en subtipos: (1) enfermedad de grado bajo (de escasa malignidad) que incluye linfocítico microcítico, consistente con leucemia linfocítica crónica (SC); folicular, predominantemente de células pequeñas hendidas (FSC); folicular, de células pequeñas hendidas y grandes mezcladas (FM); (2) enfermedad de grado intermedio que incluye folicular, predominantemente de células grandes (LF); difuso, de células pequeñas hendidas (DSC); difuso mixto, de células pequeñas y grandes (DM); difuso, de células grandes hendidas o no hendidas (DL); y (3) enfermedad de grado alto que incluye inmunoblástico, de células grandes (IBL); linfoblástico, de células convolutas o no convolutas (II); y de células pequeñas no hendidas, burkittiano o no burkittiano (SNC); (The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer 49 (10):2112-35, 1982). El sistema de estadificación de Ann Arbor se usa comúnmente para estadificar a pacientes con LNH. El estadio I significa la implicación de una sola región de ganglio linfático o implicación localizada de un sólo órgano o sitio extralinfático. El estadio II significa la implicación de dos o más regiones de ganglio linfático del mismo lado del diafragma o implicación localizada de un sitio u órgano extranganglionar y una o más regiones de ganglio linfático del mismo lado del diafragma. El estadio III significa la implicación de regiones de ganglio linfático de ambos lados del diafragma, posiblemente acompañada de implicación localizada de un órgano o sitio extranganglionar. El estadio IV significa implicación difusa o diseminada de uno o más órganos extranganglionares alejados con o sin implicación de ganglios linfáticos asociada ("Lymphoid neoplasms". En: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 6ª ed. Nueva York, NY: Springer, 2002, pág. 393-406). Se ha demostrado que el rituximab es eficaz en el tratamiento de linfomas de escasa malignidad y foliculares (Boye et al., Annals of Oncol. 14:520-535, 2003).

La actividad de la IL-21 en combinación con anticuerpos anti-CD20 sobre el crecimiento y la diseminación de células tumorales derivadas de neoplasias malignas hematológicas humanas puede medirse *in vivo*. Se han desarrollado varios modelos de ratón en los que se implantan células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes (denominados en conjunto modelos de xenoinjerto); véanse, por ejemplo, Cattani et al., Leuk. res. 18:513-22, 1994 y Flavell, Hematological Oncology 14:67-82, 1996. Las características del modelo de enfermedad varían con el tipo y la cantidad de células administradas al ratón y se conocen varios modelos de enfermedad en la técnica. Por ejemplo, pueden tratarse linfomas de linfocitos B humanos (p. ej. LR, Raji, TU2C) hechos crecer y diseminados en ratones IDCG con AcM e IL-21 para prolongar la supervivencia usando modelos conocidos por los expertos en la técnica. Para modelos ejemplares, véanse Funakoshi et al., J. Immunotherapy 19:93-101, 1996; Funakoshi et al., Blood 83:2787-94, 1994; Cattani et al., Leukemia Res. 18:513-522, 1994. De forma alternativa, pueden implantarse líneas celulares de linfoma de linfocitos B de ratón (A20, BCL, A31) y tratarse con AcM e IL-21 para prolongar la supervivencia (French et al., Nat. Medicine 5:548-553, 1999; Tutt et al., J. Immunol. 161:3176-3183, 1998). En un modelo, se pasan células tumorales (p. ej., células Raji (ATCC N.º CCL-86)) en cultivo y se inyectan aproximadamente 1×10^6 células por vía intravenosa en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG). Tales células tumorales proliferan rápidamente dentro del animal y pueden encontrarse circulando en la sangre y poblando numerosos sistemas de órganos. Se prueban tratamientos diseñados para destruir o reducir el crecimiento de células tumorales usando IL-21 y AcM anti-CD20 mediante la administración de IL-21 y AcM a ratones portadores de las células tumorales. La eficacia del tratamiento se mide y se evalúa estadísticamente como un aumento de la supervivencia en la población tratada con el tiempo. También puede monitorizarse la carga tumoral 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.

Los modelos animales que pueden usarse para demostrar la eficacia del tratamiento combinado usando IL-21 y AcM anti-CD20 incluyen modelos de primates no humanos de depleción de linfocitos B. Por ejemplo, mediante el tratamiento de macacos cangrejeros con vehículo o 0,05 mg/kg o 10,0 mg/kg de rituximab se identificaron diversas poblaciones de linfocitos B CD20, CD40 y CD21 como útiles para el estudio de tratamientos anti-CD20 (Vugmeyster et al., Internat. Immunol. 3:1477-1481, 2003).

En general, el tratamiento con rituximab para enfermedades de escasa malignidad consiste en cuatro infusiones de 375 mg/m^2 una vez por semana. La velocidad de infusión inicial es de 50 mg/h y aumenta hasta un máximo de 400 mg/h en incrementos de 50 mg cada 30 minutos (McLaughlin et al., Clinical Oncol. 16:2825-2833, 1998). Sin embargo, el tratamiento prolongado de ocho semanas ha demostrado cierta eficacia en el tratamiento para LNH de grado bajo o foliculares resistentes al tratamiento o en recidiva (Piro et al., Ann. Oncol. 10:619-621, 1999).

El establecimiento de la dosis y la pauta de administración óptimas para el tratamiento combinado de IL-21 y AcM anti-CD20 se realiza usando varios medios, incluidos la farmacocinética y farmacodinámica de la combinación, la sensibilidad de líneas de linfoma de linfocitos B humano y de muestras de linfoma primario a una combinación de IL-21 y AcM anti-CD20 *in vitro*, las dosis eficaces en modelos animales y la toxicidad de la combinación. Las medidas farmacocinéticas directas pueden realizarse en primates. Además, la IL-21 y los AcM anti-CD20 estimulan una variedad de respuestas en linfocitos normales, de modo que puede medirse la eficacia clínica en modelos animales normales. Además, pueden emplearse marcadores sustitutos para medir la actividad biológica de la combinación de IL-21 y AcM anti-CD20 sobre células efectoras en pacientes. Los marcadores sustitutos incluyen, entre otros, disminuciones significativas de las poblaciones de linfocitos B, aumentos en la población de linfocitos NK, activación de monocitos/macrófagos, aumento de FcRIII, aumento de la citotoxicidad de linfocitos T o NK sobre células CD20+

en presencia de anticuerpos anti-CD20. Los sustitutos son valiosos como indicadores de eficacia porque determinar respuestas tumorales terapéuticas tales como un aumento de la supervivencia puede requerir meses o años.

El tratamiento del linfoma, tal como el LNH o la leucemia linfoblástica crónica (LLC), usando una combinación de IL-21 y rituximab se demuestra usando estudios clínicos donde se investigan la seguridad y la eficacia. Inicialmente, se demuestra la seguridad en un estudio de fase I, que es un estudio abierto de dosis que aumentan hasta que se identifica una dosis máxima tolerada (DMT) o una dosis inmunológica óptima. Una dosis inmunológica óptima se define como la dosis de IL-21 o IL-21 en combinación con un anticuerpo monoclonal que logra la respuesta inmunológica óptima. Una respuesta inmunológica óptima se refiere a un cambio de una respuesta inmunológica después de la administración de IL-21 o la combinación de IL-21 + AcM con respecto a la observada cuando se administra el AcM solo y puede medirse como se describe en el presente documento.

Los participantes en un estudio de fase I inicial son sujetos con LNH CD20+ en recidiva o resistente al tratamiento. El aumento de la dosis se evalúa en cohortes de 3 a 6 sujetos en un esquema de aumento de dosis de 3 más 3 estándar. Se evalúan cohortes de 3 sujetos para determinar cualquier toxicidad limitante de la dosis (TLD) que se produzca al final de la cuarta semana. En ausencia de TLD, se produce el aumento de la dosis. Si en 1 de cada 3 se observa toxicidad limitante de la dosis, se incluyen 3 sujetos adicionales a ese nivel de dosis. Si > 1 sujetos en una cohorte dada experimentan toxicidad limitante de la dosis, entonces se produce una disminución de la dosis y se trata a 3 sujetos a una dosis intermedia que debe especificar el comité de vigilancia de datos y seguridad (CVDS). La dosis se encontraría entre la dosis que provocó la TLD y la siguiente dosis más baja. Si 0 de cada 3 pacientes experimentan una TLD a la dosis intermedia, entonces se interrumpe la inclusión y la dosis intermedia se declararía la DTM. Si ≥1 de cada 3 sujetos experimenta TLD a la dosis intermedia, entonces se interrumpe la inclusión y el nivel de dosis por debajo de ese se declararía la DMT.

A los sujetos se les administra rituximab, por vía intravenosa (IV) a 375 mg/m², una vez por semana y se les administra durante cuatro u ocho semanas consecutivas. La IL-21 se administra por inyección, bien por vía de administración IV, o intramuscular (IM) o subcutánea (SC). A la primera cohorte se le administra al menos 1 µg/kg y las dosis aumentan hasta la DMT o una dosis inmunológica óptima, de una manera gradual, por ejemplo, aumentando desde 3-10, 10-100, 100-300, 300-500, 500-900 y hasta 1000 µg/kg de una a cinco veces por semana. La presente divulgación proporciona composiciones de IL-21 en las que cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 1000 µg/kg. En determinadas realizaciones, la dosis de IL-21 está en el intervalo de 10 a 300 µg/kg.

La respuesta tumoral se usa para evaluar la actividad clínica primaria. Para evaluar la respuesta antitumoral, se produce la reestadificación en las semanas 4, 8 y 12 usando, por ejemplo, el seminario internacional para la normalización de los criterios de respuesta para linfomas no hodgkinianos (Cheson et al, J. Clin. Oncol. 17:1244-1253, 1999). Los marcadores farmacodinámicos de la IL-21 se usan como indicadores secundarios de actividad clínica.

Los acontecimientos adversos y las evaluaciones analíticas de seguridad estándar se usan para evaluar la seguridad. El análisis del suero para detectar anticuerpos frente a IL-21 se realizará para evaluar la inmunogenicidad.

La toxicidad limitante de la dosis se define usando los criterios terminológicos comunes para acontecimientos adversos (CTCAE, por sus siglas en inglés), versión 3, con fecha del 12 de diciembre de 2003, como cualquiera de los siguientes:

- Cualquier acontecimiento adverso de grado 4 o 5 probable o definitivamente relacionado con el agente en estudio
- Acontecimientos adversos de grado 3 no hematológicos probable o definitivamente relacionados con el agente en estudio, EXCEPTO aquellos relacionados con linfopenia de ≤ 7 días de duración, reagudización de tumores, fiebre, malestar general o anomalías analíticas que no son potencialmente mortales de grado 3 que son clínicamente insignificantes.

La eficacia y la seguridad se evalúan más a fondo en estudios clínicos de fase II y fase III. En estos estudios pueden caracterizarse farmacocinética, farmacodinámica, farmacogenética, farmacogenómica e inmunogenicidad adicionales. Un criterio de valoración principal se identifica de acuerdo con el seminario internacional para la normalización de los criterios de respuesta para linfomas no hodgkinianos (Cheson et al., *ibíd.*) y de acuerdo con las directrices reguladoras. Los criterios de valoración secundarios pueden incluir la incidencia y la gravedad de los acontecimientos adversos, el tiempo hasta la progresión, el tiempo hasta la recidiva de pacientes con respuesta completa, la supervivencia global y la incidencia de desarrollo de cualquier anticuerpo frente a IL-21. El estudio puede ser un estudio aleatorizado de dos ramas que compara el tratamiento con rituximab solo y con rituximab combinado con IL-21 en pacientes que no toleran o eligen no recibir quimioterapia. Los sujetos recibirán rituximab, administrado IV a 375 mg/m², una vez por semana y administrado durante cuatro u ocho semanas consecutivas. La IL-21 se administra IV o SC como una infusión secuencial en el mismo día y hasta cinco días de forma consecutiva, y las dosis de IL-21 estarán en el intervalo de 1-3, 3-10, 10-100, 100-300, 300-500, 500-900 y hasta 1000 µg/kg. De

forma alternativa, puede iniciarse un estudio aleatorizado de tres ramas para evaluar la seguridad y la eficacia de la IL-21 en combinación con rituximab frente a la IL-21 sola frente a rituximab solo usando criterios similares para el diseño del ensayo. El diseño de ensayos clínicos es bien conocido por los expertos en la técnica y las directrices proporcionadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), por ejemplo en la página web de herramientas de oncología de la FDA.

La DLT-21 y la IL-15 o la IL-2 presentan sinergia en sus efectos sobre los linfocitos NK *in vitro* con respecto a la producción de IFN- γ , citotoxicidad y proliferación (Parrish-Novak et al., J. Leuk. Biol. 72:856-863, 2002). Sin embargo, el tratamiento con IL-2 con dosis altas es altamente tóxico y requiere hospitalización prolongada. Se han probado muchos regímenes con dosis bajas de IL-2 y se ha descubierto que se toleran mejor, pero con pocas pruebas de eficacia antitumoral (Atkins, Semin. Oncol. 29 (3 supl. 7): 12, 2002). El tratamiento combinado de IL-2 y rituximab se describe en el documento WO 03/049694, donde se administra IL-2 a una dosis de "carga" mayor, seguida de una o más dosis de "mantenimiento" más bajas. La necesidad de continuar la administración de IL-2 se basa en mantener los niveles de linfocitos NK a niveles más altos de lo normal, pero debido a la toxicidad de la IL-2, puede ser necesario un periodo de descanso en el que no se administre IL-2. La administración de la combinación de IL-2 e IL-21 además de AcM anti-CD20 mantendrá los linfocitos NK y permitirá una administración más baja o menos frecuente de IL-2. Algunos de los efectos secundarios observados con dosis altas de IL-2 no se han demostrado al administrar IL-21. Por ejemplo, cuando se administró IL-21 a ratones a la dosis y la pauta de IL-2 que se ha comunicado que provocan síndrome de filtración capilar en ratones, no se presentó el síndrome de filtración capilar. Los resultados muestran claramente que la IL-21 no provoca la liberación de citocinas y la vasculitis asociadas con una dosis equivalente en masa de rIL-2 en ratones (Heipel et al., Blood 102 (11): N.º 2845, 2003). Por lo tanto, la combinación de dosis bajas de IL-2 con IL-21 y AcM anti-CD20 puede ser clínicamente útil aumentando la estimulación del sistema inmunitario de dosis bajas de IL-2 sin determinados efectos secundarios provocados por dosis mayores de IL-2.

La administración de IL-21 en combinación con AcM anti-CD20, tales como rituximab, usando los procedimientos de la presente divulgación dará como resultado un efecto antitumoral, denominado también respuesta tumoral. Las directrices normalizadas para la evaluación de la respuesta al tratamiento para el LNH son conocidas por los expertos en la técnica. Un conjunto de criterios normalizados ejemplares se describe en Cheson et al., J. of Clinical Oncol. 17:1244-1253, 1999. El International Working Group expuso recomendaciones y definiciones de medidas de respuesta. La tabla 2 resume los criterios de respuesta.

Tabla 2

Categoría de la respuesta	Exploración física	Ganglios linfáticos	Masas de los ganglios linfáticos	Médula ósea
Respuesta completa (RC)	Normal	Normal	Normal	Normal
Respuesta completa no confirmada (RCnc)	Normal	Normal	Normal	Indeterminado
Respuesta parcial (RP)	Normal	Normal	Normal	Positivo
RP	Normal	≥ 50 % de reducción	≥ 50 % de reducción	Irrelevante
RP	Disminución en hígado/bazo	≥ 50 % de reducción	≥ 50 % de reducción	Irrelevante
Recidiva/Progresión	Aumento del tamaño del hígado/bazo; sitios nuevos	Nuevos o aumentados	Nuevos o aumentados	Reaparición

Asimismo, pueden usarse marcadores sustitutos para indicar una actividad antitumoral potenciada. Por ejemplo, un cambio en las enzimas séricas y la biopsia puede demostrar una disminución de la carga tumoral.

Una medida de bioactividad que puede usarse como sustituta del efecto antitumoral es el mantenimiento de los niveles de linfocitos NK a un nivel que potencia el efecto antitumoral de un AcM anti-CD20 (Friedberg et al., Br. J. Hematol. 117:828-834, 2002). Otro sustituto es el aumento del número de linfocitos T (Parrish-Novak et al., *ibid.* 2002). En particular, el aumento del número de células para un subconjunto de linfocitos T se ha correlacionado con el aumento de la actividad citotóxica o el efecto antitumoral. Otra medida de bioactividad que puede usarse como sustituta para el efecto antitumoral es la depleción de linfocitos B (Reff et al., Blood 83:435-445, 1994).

2. Uso de IL-21 y anticuerpos monoclonales anti-Her-2/neu en tratamiento combinado

El producto del gen Her-2/neu es una fosfoglicoproteína de 185 kDa que está relacionada con el receptor del factor

de crecimiento epidérmico. Her-2/neu funciona como un receptor del factor de crecimiento y se expresa frecuentemente en tumores tales como cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de pulmón. El receptor Her-2/neu se sobreexpresa en el 25-30 % de los cánceres de mama humanos (Slamon et al. Science 235: 177-182, 1987; Slamon et al., Science 244:707-712, 1989) y se asocia con un pronóstico malo en estos pacientes.

5 Existen una serie de anticuerpos monoclonales que se dirigen a Her-2/neu, pero el HERCEPTIN[®], el nombre comercial para el trastuzumab (Genentech, Inc., San Francisco, CA) es actualmente el único agente terapéutico autorizado para el tratamiento de pacientes con cáncer positivo para Her-2/neu. Pueden encontrarse cantidades pequeñas de Her-2/neu en muchos tipos de células normales, y las células cancerosas tienen una expresión modificada que da lugar a la sobreexpresión y el aumento de la proliferación celular y la diferenciación asociadas con el fenotipo de la célula cancerosa. Sin embargo, el tratamiento satisfactorio con trastuzumab requiere que la expresión de Her-2/neu esté altamente sobreexpresada. Los niveles de expresión de Her-2/neu pueden determinarse usando muestras de biopsia fijadas y teñidas inmunohistoquímicamente. Estos tipos de ensayos son bien conocidos en la técnica e incluyen evaluaciones inmunohistoquímicas usando el anticuerpo monoclonal 4D5 (LabCorp, Research Triangle Park, NC), HerceptTest[®] (DAKO, Glostrup, Dinamarca) y el kit de sondas de ADN de HER-2 Vysis PathVysion[™] (Fujisawa Profesional, Inc., North Deerfield, IL). En general, los niveles de Her-2/neu son de 0 (normal) a 3+ y se ha demostrado que el tratamiento con trastuzumab es eficaz en pacientes con niveles de expresión 2+ o superiores.

Se ha demostrado que la IL-21 (p. ej., en el ejemplo 6) promueve la actividad lítica en linfocitos NK y linfocitos T efectores inmunitarios en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* con líneas celulares de cáncer de mama humano que expresan niveles del receptor Her-2/Neu altos o más bajos. La función efectora mediada por IL-21 potenciada da como resultado que el tratamiento con trastuzumab sea eficaz incluso cuando las células cancerosas expresan niveles bajos del receptor de Her-2/neu. Por ejemplo, pacientes con niveles de sobreexpresión 1+ o 2+ tratados con IL-21 y trastuzumab serán candidatos para el tratamiento, proporcionando una tratamiento valioso para poblaciones de pacientes no tratados anteriormente. Pueden usarse ratones portadores de carcinomas murinos que expresan Her-2/neu para probar IL-21 en combinación con AcM antiHer-2/neu (Penichet, et al., Lab Anim. Sci. 49:179-188, 1999).

Aunque cada protocolo puede definir de forma diferente las evaluaciones de la respuesta tumoral, pueden encontrarse directrices ejemplares en el Clinical Research Associates Manual, Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, 6 de octubre, 1998, actualizado en agosto de 1999. De acuerdo con el manual de la CRA (véase, el capítulo 7 "Response Assessment"), la respuesta tumoral significa una reducción o eliminación de todas las lesiones o metástasis medibles. En general, la enfermedad se considera medible si comprende lesiones medibles en dos dimensiones con márgenes claramente definidos mediante fotografía médica o rayos X, tomografía axial computerizada (TAC), formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) o palpación. Enfermedad evaluable significa que la enfermedad comprende lesiones medibles en una dimensión, masas con márgenes no definidos claramente, lesiones con ambos diámetros inferiores a 0,5 cm, lesiones en escáner con cualquiera de los diámetros menores que la distancia entre los cortes, lesiones palpables con diámetros menores de 2 cm o enfermedades óseas. Enfermedad no evaluable incluye derrames pleurales, ascitis y enfermedades documentadas por pruebas indirectas. En general, también se consideran no evaluables las lesiones irradiadas con anterioridad que no han progresado.

Los criterios para el estado objetivo son necesarios para protocolos de evaluación de la respuesta de tumores sólidos. Un criterio representativo incluye los siguientes: (1) Respuesta completa (RC) definida como la desaparición completa de la totalidad de la enfermedad medible y evaluable. Ausencia de lesiones nuevas. Ausencia de síntomas relacionados con la enfermedad. Ausencia de enfermedad no evaluable; (2) Respuesta parcial (RP) definida como una disminución igual o superior al 50 % con respecto al valor inicial de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles. Ausencia de progresión de enfermedad evaluable. Ausencia de lesiones nuevas. Se aplica a pacientes con al menos una lesión medible; (3) Progresión definida como un aumento del 50 % o de 10 cm² de la suma de los productos de las lesiones medibles con respecto a la suma más pequeña observada usando las mismas técnicas como valor inicial, o un empeoramiento claro de cualquiera de las enfermedades evaluables, o reaparición de cualquier lesión que había desaparecido, o aparición de cualquier lesión nueva, o incapacidad de retorno para la evaluación debido a la muerte o el deterioro del estado general (a menos que no esté relacionado con este cáncer); (4) Estable o sin respuesta definido como que no cumple los requisitos de RC, RP o Progresión. (véase, Clinical Research Associates Manual, supra.)

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

EJEMPLOS

55 Ejemplo 1

La IL-21 potencia la actividad dependiente de anticuerpos de los linfocitos NK

A.

Se obtuvo sangre periférica y se prepararon células mononucleares (CMN) mediante centrifugación en Ficoll. Se

purificaron linfocitos citolíticos naturales (NK) a partir de la población de CMN mediante enriquecimiento negativo, usando el kit de enriquecimiento negativo de linfocitos NK humanos StemSep™ Human NK Cell de Stem Cell Technologies (Vancouver, Columbia Británica). Brevemente, se marcaron las CMN con anticuerpos específicos de linaje (excluyendo el linaje NK) y a su vez se marcaron magnéticamente. Después, se pasaron las CMN marcadas por una columna magnética donde las células marcadas se retuvieron y los linfocitos NK fluyeron a su través.

Se plaqueraron los linfocitos NK a una densidad de 5×10^5 células/ml y se cultivaron durante 3 días en α MEM/suero autólogo al 10 %/ β -mercaptoetanol 50 μ M, con 0, 1, 10 o 100 ng/ml de hIL-21 (A794F) o 10 ng/ml de IL-12 (control positivo), todo en presencia o ausencia de estimulación de Fc. La estimulación de Fc se proporcionó plaqueando 100 μ g/ml de hIgG en PBS sobre plástico a 37 °C durante 1 hora, después se retiró la solución de PBS/anticuerpo y se cultivaron los NK sobre esa superficie. Después del periodo de cultivo de tres días, se recogieron los sobrenadantes. Se cuantificó el IFN- γ de los sobrenadantes usando el kit de ELISA de IFN- γ humano OptEIA de BD (BD Biosciences, San José, CA). Se representaron los resultados en forma de histograma, expresando ng/ml de IFN- γ por muestra.

En presencia de estimulación de Fc, la IL-21 provocó un aumento dependiente de la dosis de la producción de IFN- γ . A la dosis máxima de IL-21 probada en este experimento (100 ng/ml) se produjo un aumento de aproximadamente 18 veces con respecto al nivel basal. En ausencia de estimulación de Fc, no se observó un aumento de la producción de IFN- γ en presencia de IL-21.

B.

Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica por leucoféresis de un programa de donantes. Se prepararon células mononucleares (CMN) a partir de sangre sometida a aféresis mediante centrifugación en Ficoll. Se purificaron linfocitos citolíticos naturales (NK) a partir de la población de CMN mediante enriquecimiento negativo, usando el kit de enriquecimiento negativo de linfocitos NK humanos de Stem Cell Technologies. Brevemente, se marcaron las CMN con anticuerpos específicos de linaje (excluyendo el linaje NK) y a su vez se marcaron magnéticamente. Después, se pasaron las CMN marcadas por una columna magnética donde las células marcadas se retuvieron y los linfocitos NK fluyeron a su través.

Se plaqueraron los linfocitos NK a una densidad de 1×10^6 /ml y se cultivaron durante 1, 2, 3, 4, 6 o 7 días en α MEM/suero AB humano inactivado por calor al 10 %/ β mercaptoetanol 50 μ M/ITS (GibcoBRL de Invitrogen, Carlsbad, CA)/150 μ g/ml de transferrina complementaria/5 mg/ml de BSA, en presencia o ausencia de 0,2, 1, 5, 25 o 100 ng/ml de IL-21 humana. Al final de cada periodo de cultivo, se recogieron los linfocitos NK, se lavaron, se contaron y se colocaron en un ensayo citolítico de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), usando una línea celular de linfoma (Ramos, CRL 1596, American Type Culture Collection, Manassas, VA) como el objetivo citolítico. Las células objetivo se marcaron antes del ensayo incubándolas durante 60 minutos a 37 °C en solución salina tamponada de Hank (sin Ca o Mg) con FBS al 5 % (HBSSF) y calceína AM 10 μ M (Molecular Probes, n.º de cat C1430). Las células objetivo incorporan la tinción fluorescente (calceína AM) y la convierten en el citoplasma en el fluorocromo activo, que sólo se libera de la célula tras la lisis. Las células lisadas liberan el fluorocromo al sobrenadante, que después se recoge y se cuantifica la cantidad de fluorescencia en un fluorímetro. El porcentaje de lisis celular se calculó a partir de la cantidad de fluorescencia presente en el sobrenadante después de una incubación de 3 horas en presencia o ausencia de cantidades variables de linfocitos NK (efectores). Durante el ensayo de CCDA, se usaron objetivos sin anticuerpo añadido, con 1 μ g/ml de IgG no pertinente o con 1 μ g/ml de rituximab.

Se probaron dos donantes. Los linfocitos NK del donante A se cultivaron en 0, 1, 5, 25 o 100 ng/ml de IL-21 humana, con puntos temporales en los días 1, 2, 3, 4 y 7. Los linfocitos NK del donante B se cultivaron en 0, 0,2, 1, 5 o 25 ng/ml de IL-21 humana, con puntos temporales en los días 1, 2, 3, 4, 6 y 7. En ambos donantes se observó una potenciación (3-10 veces) de la actividad citolítica frente a las células objetivo en presencia de rituximab, en comparación con el control de IgG no pertinente. Esta potenciación de la actividad citolítica aumentó adicionalmente (2-10 veces) cuando se cultivaron los linfocitos NK en presencia de IL-21 antes del ensayo.

Los cultivos del donante A no mostraron ninguna diferencia significativa en la potenciación de la CCDA entre las dosis de IL-21 probadas (1, 5, 25 o 100 ng/ml) excepto en el día 7, cuando el cultivo de NK con 1 ng/ml de IL-21 mostró significativamente menos potenciación de la CCDA que las otras dosis. Los cultivos del donante B no mostraron ninguna diferencia significativa en la potenciación de la CCDA entre las dosis de IL-21 probadas (0,2, 1, 5 o 25 ng/ml) hasta el día 4 (y continuó a lo largo de los puntos temporales restantes) cuando los cultivos que contenían 0,2 ng/ml de IL-21 mostraron una actividad potenciadora de la CCDA significativamente menor que las otras dosis de IL-21 probadas. Ambos donantes mostraron una potenciación de la CCDA por IL-21 en todos los puntos temporales probados, con la mayor potenciación con respecto a la IgG no pertinente en los días 6 o 7.

C.

Se obtuvo sangre periférica de un programa de donantes como se describe en el ejemplo 1A. Se plaquearon linfocitos NK a una densidad de $8,1-11 \times 10^5$ /ml y se cultivaron durante 3 días en α MEM/suero autólogo al 10 %/ β -mercaptoetanol 50 μ M, en presencia o ausencia de 20 ng/ml de IL-21 humana. Al final del periodo de

5 cultivo, se recogieron los linfocitos NK, se lavaron, se contaron y se colocaron en un ensayo citolítico de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), usando la línea celular de linfoma DOHH2 (Kluin-Nelemans, H.C. et al. Leukemia 5: 221-224, 1991; Drexler, H.G. et al., DSMZ Catalogue of Cell Lines, 7ª ed., Braunschweig, Alemania, 1999) como el objetivo citolítico. Las células DOHH2 se marcaron antes del ensayo incubándolas durante 30 minutos en solución salina tamponada de Hank con FBS al 5 % (HBSSF) con calceína AM 25 µM (Molecular Probes). Los objetivos incorporan la tinción fluorescente (calceína AM) y la convierten en el citoplasma en el fluorocromo activo, que sólo se libera de la célula tras la lisis. Las células lisadas liberan el fluorocromo al sobrenadante, que después se recoge y se cuantifica la cantidad de fluorescencia en un fluorímetro. El % de lisis celular se calculó a partir de la cantidad de fluorescencia presente en el sobrenadante después de una incubación de 3 horas en presencia o ausencia de cantidades variables de linfocitos NK (efectores). Durante el ensayo de CCDA, se usaron objetivos sin anticuerpo añadido, con 2 µg/ml de IgG no pertinente o con 0,002, 0,02, 0,2 o 2 µg/ml de rituximab.

10 Se generaron resultados a partir de dos donantes y se expresaron como proporciones de efector:objetivo (E:O) frente a porcentaje de lisis. En ambos donantes, se observó una clara potenciación (6-11 veces a una E:O=3) de la actividad citolítica contra células DOHH2 en presencia de 2 µg/ml de rituximab, en comparación con anticuerpo no añadido o control de IgG no pertinente. La potenciación del rituximab fue igual a 2 µg/ml y a 0,2 µg/ml, comenzó a disminuir a la E:O más alta probada (4 o 6) a 0,02 µg/ml y fue claramente inferior a todas las E:O probadas a 0,002 µg/ml. La potenciación de la actividad citolítica dependiente de rituximab aumentó a todas las dosis de rituximab probadas (1,5-3 veces con respecto a la actividad potenciada por rituximab a una E:O=3) cuando se cultivaron los linfocitos NK durante 3 días en presencia de IL-21 antes del ensayo citolítico.

20 **Ejemplo 2**

La IL-21 regula por incremento la expresión de granzima B en linfocitos NK

25 Se aislaron linfocitos NK humanos a partir de células mononucleares purificadas en Ficoll-Paque mediante selección negativa usando un kit de separación de perlas magnéticas. (Miltenyi Biotech, CA). Después, se cultivaron los linfocitos NK durante 48 horas en medio solo o en 20 ng/ml de IL-21 humana. Se recogieron las células, se lavaron y después se tiñeron con marcadores de superficie. Tras la tinción con marcadores de superficie, se lavaron las células y después se permeabilizaron con tampón Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, San José, CA) durante 20 minutos. Después, se tiñeron las células con un anticuerpo marcado con CPA anti-granzima B humana o de control de isotipo (Caltag, Burlingame, CA) en tampón Perm/Wash. Se lavaron las células y después se leyeron en un citómetro de flujo FACSCalibur™. Los datos se analizaron usando el programa informático Cellquest™ (BD Biosciences).

30 La figura 1 muestra que la incubación de linfocitos NK humanos en presencia de IL-21 provoca un gran aumento de la expresión de granzima B, un importante mediador de la destrucción de linfocitos NK. Esto indica que, mediante la regulación por incremento de la granzima B, la IL-21 potencia la capacidad de los linfocitos NK de destruir sus células objetivo.

35 **Ejemplo 3**

IL-21 + rituximab aumentan la supervivencia de ratones inyectados con células de linfoma HS Sultan

40 Se realizó un estudio para evaluar si el crecimiento tumoral se retrasaba en ratones IDCG CB-17 inyectados con células HS-Sultan tratados con rituximab, IL-21 de ratón (mIL-21) o una combinación de mIL-21 y rituximab. El estudio se diseñó para caracterizar la supervivencia de ratones portadores de HS-Sultan en los diversos grupos de tratamiento.

Los protocolos fueron similares a los conocidos en la técnica (véase, Cattan et al. Leuk Res. 18 (7):513-522, 1994; Ozaki et al, Blood 90 (8):3179-86, 1997). A los ratones CD17-IDCG se les administraron 20 µg de rituximab (administrado cada cuatro días durante un total de 5 inyecciones), 100 µg de mIL-21 (administrada cinco días) o una combinación de rituximab y mIL-21 mediante inyecciones IP (administradas cinco veces para cada tratamiento).

45 Se monitorizó a los ratones para detectar condiciones de agonía o no superables tales como parálisis o pérdida de peso rápida. Durante el periodo de estudio se tomaron los pesos corporales dos veces por semana. Se registró el tiempo de supervivencia para todos los ratones y se compararon entre grupos de tratamiento mediante la representación de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y calculando estadísticas de orden logarítmico (Statview, SAS Institute, Cary, NC).

50 Se usaron los siguientes grupos:

Grupo 1 (n=10) 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 1.

Grupo 2 (n=10) 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 3.

Grupo 3 (n=10) 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 6.

Grupo 4 (n=10) control de vehículo (PBS) administrado IP en los días 1-5.

Grupo 5 (n=10) 100 µg de mIL-21 IP a diario durante 5 días comenzando el día 1.

Grupo 6 (n=10) 100 µg de mIL-21 durante 5 días comenzando el día 1 + 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 3.

5 Se repartieron los ratones (hembras, C.B-17 IDCG, de 9 semanas de edad; Harlan, Madison, WI) en 6 grupos. En el día 0, se recogieron células HS-Sultan (ATCC N.º CRL-1484) del cultivo y se inyectaron a todos los ratones por vía intravenosa, a través de la vena de la cola (1.000.000 células/ratón). Después, se trató a los ratones con rituximab, mIL-21 o una combinación de los dos agentes, usando las dosis y las pautas descritas en las descripciones anteriores de los grupos de tratamiento. Todos los tratamientos se administraron mediante inyección intraperitoneal en un volumen de 0,1 ml.

10 En los grupos de ratones tratados con rituximab, se observó un beneficio de supervivencia significativo cuando se inició la administración en el día 1 o el día 3, pero no en el día 6. La IL-21 murina sola no proporcionó ningún beneficio de supervivencia a los ratones portadores de tumores. Los ratones tratados con una combinación de mIL-21 (100 µg/día, días 1-5) y rituximab (20 µg/día, días 3, 7, 11, 15, 19) presentaron un beneficio de supervivencia altamente significativo ($P < 0,0001$ en comparación con el vehículo de control, $P < 0,02$ en comparación con el rituximab comenzando en el día 3; prueba de orden logarítmico). En el día 120 del estudio, la supervivencia acumulada en el grupo de mIL-21 + rituximab era del 70 %, frente al 20 % del grupo de rituximab solo.

Ejemplo 4

IL-21 + rituximab aumentan la supervivencia de ratones inyectados con células tumorales Raji

20 Se realizó un estudio para evaluar si el crecimiento tumoral se retrasaba en ratones IDCG CB-17 inyectados con células Raji tratados con rituximab, mIL-21 o una combinación de mIL-21 y rituximab. El estudio se diseñó para caracterizar la supervivencia de ratones portadores de Raji en los diversos grupos de tratamiento.

El protocolo se describe en el ejemplo 3.

Se usaron los siguientes grupos:

Grupo 1 (n=8) control de vehículo PBS administrado IP en los días 3-7.

25 Grupo 2 (n=8) 100 µg de mIL-21 IP a diario durante 5 días comenzando el día 1.

Grupo 3 (n=8) 100 µg de mIL-21 IP durante 5 días comenzando el día 3.

Grupo 4 (n=9) 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 3.

Grupo 5 (n=9) 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 5.

30 Grupo 6 (n=9) 100 µg de mIL-21 IP a diario durante 5 días comenzando el día 1 + 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 3.

Grupo 7 (n=9) 100 µg de mIL-21 IP a diario durante 5 días comenzando el día 3 + 20 µg de rituximab cada 4 días durante un total de 5 inyecciones comenzando el día 5.

35 Se repartieron los ratones (hembras, C.B-17 IDCG, de 9 semanas de edad; Harlan, Madison, WI) en siete grupos. En el día 0, se recogieron células Raji (ATCC N.º CRL-86) del cultivo y se inyectaron a todos los ratones por vía intravenosa, a través de la vena de la cola (1.000.000 células/ratón). Después, se trató a los ratones con rituximab, mIL-21 o una combinación de los dos agentes, usando las dosis y las pautas descritas en las descripciones anteriores de los grupos de tratamiento. Todos los tratamientos se administraron mediante inyección intraperitoneal en un volumen de 0,1 ml.

40 En los grupos de ratones tratados con rituximab, se observó un beneficio de supervivencia significativo cuando se inició la administración en el día 3 o el día 5. La IL-21 murina sola no proporcionó ningún beneficio de supervivencia a los ratones portadores de tumores. Los ratones tratados con una combinación de mIL-21 (100 µg/día, días 3-7) y rituximab (20 µg/día, días 5, 9, 13, 17, 21) presentaron un beneficio de supervivencia altamente significativo ($P < 0,0001$ en comparación con el vehículo de control, $P < 0,03$ en comparación con el rituximab comenzando en el día 5; prueba de orden logarítmico). En el día 100 del estudio, la supervivencia acumulada en el grupo de mIL-21 + rituximab era del 55 %, frente al 10 % del grupo de rituximab solo.

Ejemplo 5

Estudios con IL-21 + rituximab en primates no humanos

50 Se coadministraron rituximab y rIL-21 por vía intravenosa a grupos que consistían en tres macacos cangrejeros macho durante tres periodos de administración que consistían en un periodo de una semana por dosis. Hubo una semana sin administración entre la segunda y la tercera semana de administración. Se administró rituximab en el

5 primer día de cada periodo de administración y se administró rIL-21 durante tres días comenzando en el primer día de cada periodo de administración. Las excepciones de administración fueron el grupo de control al que se le administró como artículo de control cloruro sódico al 0,9 %, el grupo 3, al que se le administró rituximab solo, y el grupo 2, que recibió rIL-21 sola. Al grupo 5 se le administró rIL-21 en el primer día de cada periodo de administración, aunque la dosis semanal total fue equivalente a la de otros grupos que recibieron rIL-21. Al grupo 7 se le administró rIL-21 por vía subcutánea en lugar de intravenosa. El grupo 4 no recibió dosis durante el tercer periodo de administración; la última dosis la recibió en el día 10. La última dosis para todos los demás grupos fue en el día 24. A los animales se les administraron las dosis usando inyección intravenosa en la vena cefálica, safena u otra vena adecuada; inyección subcutánea en la zona intraescapular o en cualquier otro sitio adecuado.

10 Tabla 3

Programa del estudio y grupos						
Grupo	Tratamiento	Vía	Niveles de dosis (mg/kg)	Concentración (mg/ml)	Volumen de dosis ^b (ml/kg)	Días de la dosis
1	Artículo de control	IV	0,0	0,0	3,0 0,5	1, 8, 22 2, 3, 9, 10, 23, 24
2	rIL-21 Artículo de control	IV	0,5 0,0	1,0 0,0	0,5 2,5	1-3, 8-10, 22-24 1, 8, 22
3	Artículo de control Rituxan ^c	IV	0,0 0,05	0,0 0,1	0,5 0,5	1-3, 8-10, 22-24 1, 8, 22
4	rIL-21 Rituxan	IV IV	0,5 10	1,0 4,0	0,5 2,5	1-3, 8-10 1, 8
5	rIL-21 Artículo de control Rituxan ^c	IV IV IV	1,5 0 0,05	3,0 0,0 0,1	0,5 0,5 0,5	1, 8, 22 2, 3, 9, 10, 23, 24 1, 8, 22
6	rIL-21 Rituxan ^c	IV IV	0,5 0,05	1,0 0,1	0,5 0,5	1-3, 8-10, 22-24 1, 8, 22
7	rIL-21 Rituxan ^c	SC IV	0,5 0,05	3,0 0,1	0,17 0,5	1-3, 8-10, 22-24 1, 8, 22

^a En grupos con coadministraciones de rIL-21 y Rituxan, se administró el Rituxan antes que la rIL-21.
^b El volumen de administración (ml) de cada animal se calculó basándose en el peso corporal más reciente. Los volúmenes de dosis se redondearon al alza hasta el siguiente incremento legible de la jeringuilla.
^c La dosis de Rituxan fue seguida de un lavado con solución salina de 3,0 ml/kg.

15 Se analizaron subconjuntos de células de sangre periférica usando citometría de flujo. Se colocaron aproximadamente 1,3 ml de sangre recogida en un tubo tratado con EDTA-2K, una vez durante la aclimatación del día -8, antes de la administración y seis horas después de la dosis en los días 1, 8 y 22. Se tomaron muestras de antes de la dosis en los días 3, 10 y 24. Se tomaron muestras una vez en los días 7, 14, 17 y 42. Se alicuotaron aproximadamente 0,5 ml de la muestra para análisis hematológico y se mantuvo el resto de la muestra a temperatura ambiente hasta el procesamiento para el análisis de citometría de flujo.

20 Se recogieron aproximadamente 2,0 ml de sangre completa en tubos que contenían heparina de litio durante la aclimatación en los días -8 y -4. También se recogió antes de la administración en los días 3, 10, 22 y 24 y una vez en los días 7 y 14. Se almacenaron las muestras a temperatura ambiente hasta el procesamiento para los análisis de citometría de flujo y los ensayos de actividad CCDA.

Tabla 4

<u>Marcadores antigénicos</u>	<u>Tipo de célula identificado</u>
CD45/CD20/CD21/CD40	Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ⁻ /CD21 ⁺ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ⁺ /CD21 ⁻ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ⁺ /CD21 ⁺ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{alto} Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{alto} /CD21 ⁻ /CD40 ⁻ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{alto} /CD21 ⁻ /CD40 ⁺ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{alto} /CD21 ⁺ /CD40 ⁺ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{bajo} Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{bajo} /CD20 ^{bajo} CD40 ⁺ Linfocito B CD45 ⁺ /CD20 ^{bajo} /CD21 ⁺ /CD40 ⁺
CD45/CD14/CD16/CD64	Linfocito citolítico natural CD45 ⁺ /CD14 ⁻ /CD16 ⁺ Monocito CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD16 ⁻ Monocito CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD16 ⁺ Monocito CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD64 ⁻ Monocito CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD64 ⁺ Granulocito CD45 ⁺ /CD64 ⁻ Granulocito CD45 ⁺ /CD64 ⁺
CD45/CD3/CD8/CD11b + 11c	Linfocito T colaborador CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁻ Linfocito T citotóxico CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺ Linfocito NK CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD8 ⁺ Linfocito NK CD45 ⁺ /CD14 ⁻ /CD16 ⁺ Célula todo CD45 ⁺ /CD11b + 11c ^{dim} Célula todo CD45 ⁺ /CD11b + 11c ^{brillante} Célula CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD11b + 11c ^{dim} Célula CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD11b + 11c ^{brillante} Célula CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD11b + 11c ^{neg}

5 El tratamiento con IL-21 presentó efectos marcados sobre el fenotipo y el número de leucocitos en circulación. Poco después del tratamiento con IL-21, todas las poblaciones de linfocitos disminuyeron. Los linfocitos B se recuperaron más rápidamente que los linfocitos T y los linfocitos NK. Los linfocitos T volvieron a los niveles iniciales en 4-6 días después de la administración y los linfocitos T cooperadores se elevaron ligeramente 4-6 días después del segundo ciclo de tratamiento con IL-21. Los linfocitos NK disminuyeron en todos los grupos, con una recuperación sólo parcial entre ciclos de administración. El número de monocitos en circulación aumentó después del tratamiento con IL-21 y tanto los monocitos como los granulocitos presentaron un aumento de la expresión del receptor de Fc.

10 **A. Efectos en los linfocitos**

15 Las dosis subclínicas de rituximab redujeron el número de linfocitos B en circulación hasta una concentración mínima un 70 % por debajo del nivel inicial en un plazo de 6 h desde la administración. El tratamiento con rIL-21 sola redujo inicialmente los linfocitos B, los linfocitos T y los linfocitos NK en circulación, seguido de un aumento sostenido y la resolución antes del siguiente ciclo de administración. Basándose en la rápida inversión de la linfopenia y las observaciones anteriores de depleción de folículos linfoides con rIL-21, se interpretó este efecto como una marginación transitoria de linfocitos activados combinada con un aumento de la recirculación desde los tejidos linfoides a la sangre. El aumento de los linfocitos B periféricos se mitigó ampliamente en animales tratados con rIL-21 y rituximab y, de forma coherente, se observó una concentración mínima de linfocitos B, en relación con los grupos tratados con rituximab o rIL-21 solos. El tratamiento con rituximab no modificó los cambios en otros subconjuntos de linfocitos inducidos por la rIL-21.

20

(continuación)

Linfocitos B CD20alto en sangre periférica (recuentos por ul)																			
	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día
Tratamiento	-8	1	1,25	3	7	8	8,25	10	14	17	22	22,25	24	29	32	37	42		
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg																			
	1295	1240		0	10	111	339	0	7	189	6	426	132	64	6	86	148	475	
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg																			
	778	764	9	39	55	71	0	6	100	62	161	23	97	1	20	34	70		
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg																			
		163	0	7	24	99	0	0	5	63	102	161	46	18	1	5	7	18	

Tabla 7

Linfocitos T citotóxicos (LCT) en sangre periférica (recuentos por ul)																	
Tratamiento	Día -8	Día 1	Día 1,25	Día 3	Día 7	Día 8	Día 8,25	Día 10	Día 14	Día 17	Día 22	Día 22,25	Día 24	Día 29	Día 32	Día 37	Día 42
Control	2760	2206	2498	2867	2629	2502	2433	2688	2301	2926	3523	2705	2388	2064	2126	2662	2005
Control	3335	1891	1522	2212	2222	2051	2001	2099	2023	2438	1930	1983	2059	2141	2299	1977	2189
Control	2462	2002	1933	2496	2359	1531	1976	2133	2352	2302	1627	2411	2001	1623	2054	2087	1681
IL-21 0,5 mg/kg	1591	1171	650	996	1498	1377	668	568	1815	2928	978	527	591	2159	1914	1137	1156
IL-21 0,5 mg/kg	3916	3211	1307	830	3642	1782	1177	1331	5046	6180	2705	1629	1020	4204	2785	2648	1674
IL-21 0,5 mg/kg	3508	2978	1135	1331	2481	1516	743	1260	2728	3846	2702	1016	776	3604	3575	2658	2755
Ritux 0,05 mg/kg	1201	1353	1093	975	1079	580	963	713	795	1206	788	1037	512	683	503	996	644
Ritux 0,05 mg/kg	4245	3338	1069	3741	3394	2492	1084	2975	3166	3053	2830	1405	2294	2120	1804	2335	2078
Ritux 0,05 mg/kg	4417	2961	3737	3709	3412	3115	2790	3668	2572	3184	2778	3721	2582	2140	2316	2474	2335
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	2990	2613	840	381	1502	1005	548	1093	2478	4025	4224	4392	2690	4328	2943	3346	2627
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	3689	2888	1069	855	2323	1316	499	1480	3742	4043	3372	3123	1705	3156	2541	4294	2321
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	2636	3410	654	790	3573	2615	863	1671	3470	3947	3325	2812	1737	3297	2092	2588	1813

(continuación)

Linfocitos T citotóxicos (LCT) en sangre periférica (recuentos por ul)		Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día
Tratamiento	-8	1	1,25	3	7	8	8,25	10	14	17	22	22,25	24	29	32	37	42	
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg	1035	1233	453	435	970	1531	211	763	1591	1576	1457	297	230	1087	1047	909	528	
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg	1555	1413	653	880	1150	1357	323	640	1273	716	892	304	183	571	452	800	570	
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg		2244	781	672	1317	2156	362	679	1644	1883	2122	636	455	2021	1660	1652	1142	

Tabla 8

Linfocitos T colaboradores en sangre periférica (recuentos por ul)																	
	Día -8	Día 1	Día 1,25	Día 3	Día 7	Día 8	Día 8,25	Día 10	Día 14	Día 17	Día 22	Día 22,25	Día 24	Día 29	Día 32	Día 37	Día 42
Tratamiento																	
Control	2163	2052	2156	2044	2178	2543	2676	2499	2404	2504	3328	2392	2485	2254	2342	2692	1949
Control	4533	3187	2327	3400	3515	3659	3062	3303	3409	3845	3183	2768	3460	3493	3772	3244	3483
Control	5205	4603	4403	4871	4798	4195	4516	5174	4861	5336	4055	4887	4979	4189	5164	4672	3833
IL-21 0,5 mg/kg	2476	2489	1033	1734	2672	2400	904	1069	2806	3834	2153	624	1455	3475	3179	2429	2336
IL-21 0,5 mg/kg	5519	4727	2445	1475	5465	3086	1791	3498	7522	8228	4390	2247	2904	5849	4633	4771	5752
IL-21 0,5 mg/kg	4181	3811	1505	2134	3428	2102	1173	2152	3814	4795	4109	1561	1942	4579	4988	3906	3619
Ritux 0,05 mg/kg	1381	1439	1391	1228	1394	905	1439	1145	1219	1665	1345	1525	1048	1721	1471	1814	1121
Ritux 0,05 mg/kg	5265	4916	2477	4685	4994	5234	2956	5037	4991	5209	5112	2475	4826	5337	4818	5152	4455
Ritux 0,05 mg/kg	5378	4438	4687	5168	5362	5097	4099	5604	4144	4601	4638	4835	4405	5098	5032	4772	4062
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	3160	2905	961	768	2057	1416	750	1790	3418	4019	4376	3457	3257	4825	3661	3669	2601
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	3837	3166	1324	1288	2817	1725	626	1886	4039	3590	3038	2784	2185	3282	2665	3629	2742
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	4053	4970	1414	1689	4844	3214	1012	2709	5052	5337	4600	3659	2848	4858	3513	4056	3090

(continuación)

Linfocitos T colaboradores en sangre periférica (recuentos por ul)																	
	Día	Día	Día														
Tratamiento	-8	1	1,25	3	7	8	8,25	10	14	17	22	22,25	24	29	32	37	42
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg	1842	2234	841	1159	2017	2764	536	1815	2945	2932	3005	698	898	2577	2482	2330	1650
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg	1953	1946	770	1171	1702	2360	430	894	2003	1904	2261	428	376	2806	2714	2298	1871
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg		1647	329	779	1390	2683	550	780	1536	1799	2485	605	783	2127	1944	1720	1504

B. Efectos de CCDA

5 Se realizaron preparaciones de CMN con gradientes de densidad de Ficoll. Durante el curso de este estudio se caracterizaron preparaciones de CMN de todos los animales tratados en función de su inmunofenotipo y su actividad CCDA *ex vivo*. Las células objetivo se cargaron con calceína-AM antes del ensayo, con una liberación específica de la tinción intracelular durante una incubación de 3 h como el criterio de valoración del ensayo.

El tratamiento de macacos cangrejeros con rIL-21 dio como resultado cambios en los recuentos de linfocitos NK en sangre periférica y en el porcentaje de linfocitos NK en preparaciones de CMN. Inicialmente, los linfocitos NK disminuyeron después del tratamiento, con una tendencia hacia los valores iniciales entre ciclos de administración.

10 Las CMN de macacos cangrejeros tratados con rIL-21 o rituximab en combinación con rIL-21, mostraron un aumento de la actividad CCDA *ex vivo*, en comparación con CMN de animales tratados con control de vehículo y con rituximab solo. La actividad lítica fue baja en el día 3, correlacionada con muy pocos linfocitos NK en la preparación de CMN. En los días 7 y 10, aumentó la CCDA con respecto al valor inicial en animales tratados con rIL-21 y se observaron tendencias similares en animales tratados con rIL-21 más rituximab. En el día 14 se mantuvo la actividad lítica por linfocito NK, a pesar del bajo número de linfocitos NK en las preparaciones de CMN.

15

Tabla 9

Número de linfocitos NK en sangre periférica (recuentos/ul)																			
	Día -8	Día 1	Día 3	Día 7	Día 8	Día 8,25	Día 10	Día 14	Día 17	Día 22	Día 22,25	Día 24	Día 29	Día 32	Día 37	Día 42			
Control	210	211	224	224	326	223	202	147	204	368	196	181	126	190	149	180			
Control	209	160	232	177	221	285	147	187	135	121	181	127	60	95	128	200			
Control	339	470	565	525	388	443	462	533	560	335	381	496	263	476	531	290			
IL-21 0,5 mg/kg	394	367	305	859	573	145	287	650	1077	355	84	182	365	332	249	210			
IL-21 0,5 mg/kg	452	546	196	594	546	141	502	845	805	284	143	176	221	277	275	563			
IL-21 0,5 mg/kg	2135	183	9	122	0	927	198	550	1057	1249	209	239	1104	852	1109	956			
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg	268	211	89	179	271	26	242	335	156	173	62	53	143	105	141	81			
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg	231	164	211	133	211	23	241	88	55	61	18	146	72	60	88	152			
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 0,05 mg/kg		286	149	528	506	38	277	281	221	276	80	225	268	256	255	174			
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	579	399	153	365	218	81	408	464	469	224	161	139	330	251	405	119			

(continuación)

Número de linfocitos NK en sangre periférica (recuentos/ul)																
Tratamiento	Día 8	Día 1	Día 3	Día 7	Día 8	Día 8,25	Día 10	Día 14	Día 17	Día 22	Día 22,25	Día 24	Día 29	Día 32	Día 37	Día 42
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg																
	726	476	236	555	240	56	355	448	673	386	177	178	256	178	390	212
IL-21 0,5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg																
	337	442	310	310	154	67	525	482	1570	220	170	53	221	118	166	167
Ritux 0,05 mg/kg																
	235	240	191	179	183	67	137	176	235	167	129	129	108	97	191	109
Ritux 0,05 mg/kg																
	1265	794	948	824	712	125	795	836	638	745	398	623	681	542	741	615
Ritux 0,05 mg/kg																
	860	300	395	382	366	102	361	283	2944	290	225	268	223	175	210	276

Tabla 10

Linfocitos NK como porcentaje del total de la preparación de CMN							
Día_ Núm	Día 8	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	Día 22	Día 24
Control	3,6	3,2	3,5	2,9	3,05	4,5	6,6
Control	3,73	4,05	4,8	4,9	4,9	4,65	6,05
Control	7,87	7,45	8,5	7,25	7,15	7,65	11,45
IL-21 0,5 mg/kg 3d	8,03	1,9	4,6	1,1	4,95	8,55	2,1
IL-21 0,5 mg/kg 3d	8,4	0,35	3,65	0,55	4,65	8,15	0,65
IL-21 0,5 mg/kg 3d	17,97	2,95	5,4	1,45	4,3	11,5	2,9
Rituxan 0,05 mg/kg	7,77	6,05	7	5	8,75	8,1	8,2
Rituxan 0,05 mg/kg	7,63	6,75	8,45	6,35	9,3	8,35	9,55
Rituxan 0,05 mg/kg	6,17	3,95	4,4	2,45	3,7	4,25	6,25
Rituxan 10 mg/kg + IL-21 0,5 mg/kg	10,03	0,95	2,05	0,7	1,8	3,05	5,2
Rituxan 10 mg/kg + IL-21 0,5 mg/kg	9,6	0,35	2,85	0,55	1,75	5	6,3
Rituxan 10 mg/kg + IL-21 0,5 mg/kg	2,7	0,3	1,05	0,55	1	2,25	0,9
Rituxan 0,05 mg/kg + IL21 0,5 mg/kg	8,63	0,45	1,5	1,15	4,15	4,8	0,45
Rituxan 0,05 mg/kg + IL21 0,5 mg/kg	6,17	0,5	0,95	0,3	1,8	2,75	0,65
Rituxan 0,05 mg/kg + IL21 0,5 mg/kg	5,7	0,65	1,75	0,55	2,25	3,85	1

Tabla 11

CCDA en macacos cangrejeros tratados con rIL-21. A partir del porcentaje de lisis de prep. de CMN completas a una proporción de E:O de 25.										
Tratamiento	ID del macaco	Objetivo	Efector	Día -4	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	Día 22	Día 24
Control	Macaco 1	BT474-2	CMN	8,53	3,87	12,24	10,49	12,16	13,74	15,7
Control	Macaco 2	BT474-2	CMN	17,07	12,93	18,02	16,42	11,17	19,27	13,41
Control	Macaco 3	BT474-2	CMN	18,57	6,85	9,38	6,71	13,67	16,36	19,63
rIL-21 0,5 mg/kg	Macaco 4	BT474-2	CMN	23,13	9,45	46,34	25,28	29,78	24,14	9,72
rIL-21 0,5 mg/kg	Macaco 5	BT474-2	CMN	30,73	2,2	48,52	13,76	26,92	29,34	
rIL-21 0,5 mg/kg	Macaco 6	BT474-2	CMN	28,72	21,56	36,07	21,82	32,01	34,4	20,91
rIL-21 0,5 mg/kg+ Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 16	BT474-2	CMN	28	8,52	28,87	45,03	24,43	28,44	8,5
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 17	BT474-2	CMN	26,9	1,57	17,7	13,61	10,23	14,8	2,21

ES 2 390 278 T3

(continuación)

CCDA en macacos cangrejeros tratados con rIL-21. A partir del porcentaje de lisis de prep. de CMN completas a una proporción de E:O de 25.										
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 22	BT474-2	CMN	33,07	7,55	17,63	20,92	19,81	14,48	8,95
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Macaco 10	BT474-2	CMN	34,37	7,19	34	27,55	20,57	23,22	18,01
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Macaco 11	BT474-2	CMN	33,82	5,87	29	20,84	15,24	30,09	22,44
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Macaco 12	BT474-2	CMN	13,43	9,42	19,69	15,35	8,03	9,31	7
Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 7	BT474-2	CMN	27,91	15,51	30,78	25,22	33,84	25,26	25,86
Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 8	BT474-2	CMN	27,98	17,37	23,59	19,79	16,26	29,7	19,69
Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 9	BT474-2	CMN	33,81	6,78	20,15	16,21	14,52	17,47	26,16

Tabla 12

Porcentaje de lisis específica medido usando CCDA en macacos cangrejeros tratados con rIL-21. CCDA ajustada de NK para una proporción de E:O de 2.										
Tratamiento	ID del macaco	Objetivo	Efactor	Día -4	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	Día 22	Día 24
Control	Macaco 1	BT474-2	L_NK	9,43	4,71	16,24	18,46	14,41	14,35	15,83
Control	Macaco 2	BT474-2	L_NK	19,07	15,09	21,23	20,38	11,17	21,93	14,04
Control	Macaco 3	BT474-2	L_NK	18,45	7,12	8,98	7,51	13,77	16,47	18,88
rIL-21 0,5 mg/kg	Macaco 4	BT474-2	L_NK	23,1	15,98	52,37	63,06	31,84	23,77	10,28
rIL-21 0,5 mg/kg	Macaco 5	BT474-2	L_NK	30,52	2,99	57,41	49,07	29,02	29,32	
rIL-21 0,5 mg/kg	Macaco 6	BT474-2	L_NK	27,36	28,1	39,81	24,36	37,28	31,91	32,19
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 16	BT474-2	L_NK	27,95	10,39	35,81	57,8	25,19	29,25	8,51
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 0,05 mg/kg macaco	Macaco 17	BT474-2	L_NK	27,14	1,57	19,63	20,07	10,23	17,33	

(continuación)

Porcentaje de lisis específica medido usando CCDA en macacos cangrejeros tratados con rIL-21. CCDA ajustada de NK para una proporción de E:O de 2.										
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 22	BT474-2	L_NK	31,2	7,57	23,16	21,63	21,63	14,48	8,95
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Macaco 10	BT474-2	L_NK	33,53	9,87	46,66	30,62	26,89	25,51	19,54
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Macaco 11	BT474-2	L_NK	33,5	6,71	37,37	27,43	15,89	31,52	22,95
rIL-21 0,5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Macaco 12	BT474-2	L_NK	13,43	15,24	37,3	15,56	9,89	9,31	7
Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 7	BT474-2	L_NK	27,7	16,68	32,32	27,36	33,62	25,26	25,82
Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 8	BT474-2	L_NK	26,03	18,13	23,11	21,31	16,24	29,56	19,67
Rituxan 0,05 mg/kg	Macaco 9	BT474-2	L_NK	34,07	7,69	7,69 25,72	22,44	15,06	21,03	26,84

C. Criterios de valoración adicionales

5 La IL-2R α soluble (sCD25), un marcador de activación inmunitaria, aumentó rápidamente tras la administración de rIL-21, y la perforina intracelular, una enzima granular lítica aumentó más lentamente, con su expresión más alta después del segundo intervalo de administración. El FcyRI (CD64) y el FcyRIII (CD16) estaban regulados por incremento tanto en monocitos como en granulocitos.

10 Se midió la perforina por citometría de flujo en las preparaciones de CMN. Para la medida de sCD25, se recogió sangre una vez durante la aclimatación del día -8 y una vez en los días 17, 29, 37 y 42. También se recogió en los días 1, 8 y 22 antes de la administración de la dosis y cinco minutos, 30 minutos, dos horas y seis horas después de la dosis. En los días 3, 10 y 24, se recogió sangre 30 minutos después de la dosis.

15 Se transfirieron aproximadamente 0,75 ml de sangre a un tubo de coagulación SST. Se dejó que las muestras coagularan a temperatura ambiente durante aproximadamente 40-60 minutos. Se obtuvo suero por centrifugación (2000 x g durante aproximadamente 15 minutos, a 2-8 °C) y se almacenó en un congelador a -70 °C. Se cap turó el CD25 soluble presente en el suero usando un anticuerpo monoclonal murino anti-sCD25 y se detectó con anticuerpo policlonal de cabra biotilado anti-sCD25. La estreptavidina-HRP y el sustrato TMB permitieron la cuantificación colorimétrica del sCD25 presente en las muestras y los estándares.

Tabla 13

Contenido de sCD25 en suero (ng/ml)	Día -8	Día 1	Día 3	Día 8	Día 10	Día 17	Día 22	Día 24	Día 29
Control	0	0	0	0,79	0,69	0,73	0	0	0,67
Control	1,01	1,14	0,91	1,08	1,12	1,2	1,14	1,08	1,04
Control	0,75	0,73	0,85	0,85	0,97	0,98	0,97	0,86	1,31
IL-21 0,5 mg/kg	0	0	2,58	1,41	10,2	1,43	0	6,54	0,97
IL-21 0,5 mg/kg	0	0,81	4,58	1,64	8,37	1,21	0,81	5,16	1,29

ES 2 390 278 T3

(continuación)

Contenido de sCD25 en suero (ng/ml)									
IL-210,5 mg/kg	0	0	2,49	1,73	9,29	1,4	0,8	5,65	1,43
Rituxan 0,05 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rituxan 0,05 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rituxan 0,05 mg/kg	0,75	0,7	0,67	0,67	0	0	0	0	0
Rituxan 10 mg/ml + IL-21 0,5 mg/kg	0	0	3,12	1,29	9,82	1,11	0	0	0
Rituxan 10 mg/ml + IL-21 0,5 mg/kg	0	0	3,18	1,36	13,5	0,7	0	0	0
Rituxan 10 mg/ml + IL-21 0,5 mg/kg	0	0	3,51	0,83	8,31	0	0	0	0
Rituxan 0,05 mg/kg + IL21 0,5 mg/kg	0	0	1,74	1,3	9,51	0	0	2,76	0
Rituxan 0,05 mg/kg + IL21 0,5 mg/kg	0	0	4,75	1,83	13	0,95	0	7,98	0
Rituxan 0,05 mg/kg + IL21 0,5 mg/kg	0	0	3,39	1,29	6,75	1,48	0	5,7	0

Tabla 14

Porcentaje de LTC positivos para la expresión de perforina								
Día_Núm	Día -8	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	Día 22	Día 24	Día 29
Control	0,9	1,6	0,2	0	0,4	0	0	0,4
Control	2,3	1	1,2	1,1	5,9	0,1	0,2	5,9
Control	3,8	1,7	2	2	4,2	0,1	0,7	3,5
IL-21 0,5 mg/kg	4,7	10,4	16,7	34,7	28,3	0	0,2	20,1
IL-21 0,5 mg/kg	1,3	17,5	9,8	33,4	31,8	0	4,2	35,6,
IL-21 0,5 mg/kg	4,2	7,6	19,6	39,4	24,6	0,2	12,3	21,4
Rituxan bajo	1,7	0,1	0,1	1	0,4	0,1	0	1,7
Rituxan bajo	1,3	0,3	0,1	2,4	1	0	0,1	3,9
Rituxan bajo	2,6	1,3	0,6	0,4	7,2	0	0,1	5,9
Rituxan alto + IL-21 0,5 mg/kg	0,3	0,2	1,2	16,8	26,8	0	0,1	0,9
Rituxan alto + IL-21 0,5 mg/kg	2,1	1,8	5,1	13,8	25,2	0,1	0,2	
Rituxan alto + IL-21 0,5 mg/kg	1,1	14,8	4,6	18,7	9,8	0	0	9,8
Rituxan bajo + IL-21 0,5 mg/kg	3,1	16,5	16,2	34,6	51,6	0,2	19	58
Rituxan bajo + IL-21 0,5 mg/kg	0,7	3,7	1,9	5,8	9	0,1	5,8	12,9
Rituxan bajo + IL-21 0,5 mg/kg	3	6,5	7	12,4	20,8	0,1	3,7	15

Tabla 15

Porcentaje de linfocitos NK positivos para la expresión de perforina								
Día_Núm	Día -8	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14	Día 22	Día 24	Día 29
Control	0,6	23,2	0,9	1,8	2,4	1,7	0,5	2,3
Control	3,5	4,5	3,1	3,3	22,2	3,1	0,6	13
Control	17	5,8	3,5	6,3	19,1	1	4,6	29,8
IL-21 0,5 mg/kg 3d	1,6	6,4	17,3	19,2	56,4	1,2	1,4	23,6
IL-21 0,5 mg/kg 3d	0,9	14,5	4,3	11,1	43,6	0,8	2,5	58,9
IL-21 0,5 mg/kg 3d	6,5	5,4	23,9	49,4	43,4	0,8	10,5	45,5
Rituxan bajo	2,1	0,3	0,9	1,9	1,4	1,3	0,4	5,8
Rituxan bajo	1,8	0,9	0,4	7	2,4	1,5	0,2	10,3
Rituxan bajo	2,6	1,4	1,6	3,2	13,2	4,7	0,3	5,7
Rituxan alto + IL-21 0,5 mg/kg	0,5	6,8	4,5	16,1	49,6	2,1	0,6	2,5
Rituxan alto + IL-21 0,5 mg/kg	3,3	18,1	4,1	4,4	51,1	1,7	1,5	
Rituxan alto + IL-21 0,5 mg/kg	0,8	25,9	3,2	3	22,3	7,7	6,7	32,6
Rituxan bajo + IL21 0,5 mg/kg	2,1	15	7,1	14,5	73,7	2,9	9,6	66
Rituxan bajo + IL21 0,5 mg/kg	1,1	19,8	2,7	8,9	8,2	4,7	9,6	10,9
Rituxan bajo + IL21 0,5 mg/kg	6,2	20,3	7,3	13,5	49	8,7	9,9	22,7

Tabla 16

con respecto al valor inicial de CD64 MFI														
Día	Día 3	Día 7	Día 8	Día 8,25	Día 10	Día 14	Día 17	Día 22	Día 22,25	Día 24	Día 29	Día 32	Día 37	Día 42
Control	-14,0	-3,5	-12,9	-11,8	-24,2	-2,3	-8,6	5,3	-1,0	-8,5	-2,9	0,3	-19,6	-25,8
Control	-1,2	5,6	-4,3	-9,0	-2,1	6,4	3,2	18,2	11,7	3,3	17,8	6,6	4,6	-1,2
Control	-17,0	22,2	-12,3	-10,8	-5,6	-2,4	11,9	41,0	20,9	24,0	27,0	-15,9	10,2	-18,3
Control IL-21 0,5 mg/kg	-16,3	-2,4	-0,7	-11,0	0,0	25,9	19,6	9,3	9,5	-13,3	2,2	0,4	-14,2	-35,6
IL-21 0,5 mg/kg	65,0	143,1	81,4	110,2	151,8	160,2	123,7	97,7	88,0	77,6	88,9	1,9	16,1	-10,9
IL-21 0,5 mg/kg	68,3	34,2	34,2	39,8	76,2	74,8	71,1	74,1	83,1	64,2	41,7	-9,4	12,9	-15,2
Rituxan 0,05 mg/ml	-0,3	0,7	10,3	9,8	7,9	2,2	13,5	10,7	15,5	0,1	21,1	8,8	4,7	-2,0
Rituxan 0,05 mg/ml	-11,8	15,6	-10,0	-18,0	-15,3	-4,2	6,1	18,3	17,7	0,0	22,0	-10,7	-1,9	-31,5
Rituxan 0,05 mg/ml	0,0	1,8	-8,7	0,4	-9,5	-6,4	20,8	21,3	22,1	21,8	31,9	4,1	0,2	7,7
Rituxan 10 mg/ml + IL -21 0,5 mg/kg	2,9	41,1	21,5	9,5	35,3	83,1	28,0	15,9	21,9	26,2	-2,4	-29,8	-14,6	-10,0
Rituxan 10 mg/ml + IL-21 0,5 mg/kg	5,7	48,3	16,2	10,9	41,7	73,2	60,6	45,5	42,2	24,8	22,1	-1,3	2,0	-5,7
Rituxan 10 mg/ml +	-16,5	76,5	69,0	77,9	113,1	313,4	144,8	99,1	137,1	85,8	15,3	-12,9	-27,4	-11,6
Rituxan 0,05 mg/ml + IL21 0,5 mg/kg	-1,5	138,8	130,6	101,1	122,2	256,0	176,2	47,8	35,7	42,2	162,5	94,7	16,3	4,0
Rituxan 0,05 mg/ml + IL21 0,5 mg/kg	26,1	36,2	26,0	21,5	63,6	92,9	68,9	41,9	57,9	46,3	12,0	-3,0	-2,4	-11,6
Rituxan 0,05 mg/ml + IL21 0,5 mg/kg	40,7	30,3	56,3	97,1	154,5	251,6	129,8	35,7	79,1	43,9	92,0	62,2	57,9	19,2

Tabla 17

Monocitos - Cambio porcentual con respecto al valor inicial de CD64 MFI														
Día	Día 3	Día 7	Día 8	Día 8,25	Día 10	Día 14	Día 17	Día 22	Día 22,25	Día 24	Día 29	Día 32	Día 37	Día 42
Control	-6,0	-25,1	-23,8	-17,8	-0,2	-2,1	3,4	2,0	-1,2	-1,5	10,1	-15,5	-6,7	-9,8
Control	-12,5	-18,0	-30,5	-6,5	-10,6	0,9	12,8	6,1	15,3	12,4	13,3	-35,7	1,2	8,5
Control	-13,7	-13,6	-23,0	-10,9	11,0	4,6	10,0	10,4	12,1	4,1	6,3	-31,1	-17,7	11,6
IL-21	74,2	32,7	12,1	36,1	127,6	35,4	10,2	0,3	23,9	105,2	2,7	-22,1	-1,1	-25,9
IL-21 0,5 mg/kg	346,4	119,0	39,3	122,3	322,5	112,0	37,9	19,2	54,5	301,2	66,2	-10,6	30,7	7,8
IL-21 0,5 mg/kg		65,4	23,4	125,1	230,4	67,0	38,1	18,4	82,4	185,2	39,5	-18,6	-13,6	13,9
Rituxan 0,05 mg/ml	-14,8	-11,5	-17,3	-1,3	-3,8	-8,6	-10,6	-6,3	7,3	-16,0	-11,8	-12,3	-8,1	-2,7
Rituxan 0,05 mg/ml	-21,0	-3,9	-16,8	16,6	-11,1	7,3	5,6	3,5	22,6	13,7	9,9	-12,6	15,9	14,2
Rituxan 0,05 mg/ml	-6,9	4,4	-21,1	2,5	8,2	16,1	17,3	13,8	10,8	15,6	24,2	-24,1	25,4	50,6
Rituxan 10 mg/ml + IL-21 0,5 mg/kg	236,5	123,6	77,5	182,4	320,9	114,1	57,9	23,8	32,8	11,8	21,2	8,0	31,0	60,5
Rituxan 10 mg/ml + IL-21	249,5	123,3	68,1	173,8	281,8	62,3	75,7	19,1	22,6	16,4	26,0	-2,5	35,2	5,9
Rituxan 10 mg/ml + IL-21 0,5 mg/kg	334,9	105,2	52,6	115,1	393,7	135,5	107,4	2,7	8,3	5,2	29,1	-3,0	21,6	-3,5
Rituxan 0,05 mg/ml + IL21 0,5 mg/kg	225,5	114,3	76,2	159,7	304,1	89,9	46,2	33,1	58,1	281,6	58,2	7,6	21,3	13,3
Rituxan 0,05 mg/ml + IL21 0,5 mg/kg	208,9	1148,7	83,3	194,4	368,5	89,4	43,0	28,3	82,5	245,1	39,0	-4,6	9,5	10,9
Rituxan 0,05 mg/ml + IL21 0,5 mg/kg	196,9	183,6	128,5	303,1	356,7	108,2	26,5	15,3	55,9	193,6	11,9	-10,4	48,8	20,8

Ejemplo 6

Dstrucción de líneas celulares de cáncer de mama que expresan Her-2/neu mediada por IL-21 y trastuzumab

A.

5 Se obtuvieron doscientos ml de sangre humana de un programa de donantes. Se recogieron 180 ml de sangre en tubos de ácido cítrico y dextrosa y se recogieron 20 ml del mismo donante en tubos de coagulación (BD Biosciences). Se centrifugó la sangre de los tubos de coagulación a 2800 rpm durante 30 minutos. Se recogió el suero de la parte superior y se usó en los medios de cultivo (véase más adelante). Los 180 ml de sangre de los tubos de ACD se agruparon y se diluyeron 1:2 en solución salina de tampón de fosfato (PBS), suero bovino fetal (FBS) al 2 %. Se pusieron alícuotas de sangre de 30 ml en tubos de 50 ml. Se depositaron 12 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) formando una capa sobre sobre el fondo de cada uno de los tubos de 50 ml de sangre. Se centrifugaron los tubos de sangre a 1800 rpm durante 30 minutos. Se recogió la interfaz de capa leucocítica de cada tubo de 50 ml y se agruparon. Se lavaron los grupos 2-3 veces con un total de 100x el volumen celular de PBS, FBS al 2 %. El sedimento final lavado se volvió a suspender en 2 ml de PBS, FBS al 2 %. Se contaron las células en un hemocitómetro.

15 Se cultivaron células CMN purificadas como se describe anteriormente a 5×10^6 células/ml, en SF completo (α MEM con nucleósidos, B-mercaptoetanol 50 μ M, insulina 1:100, transferrina, reserva de selenio (Invitrogen), 150 μ g/ml de transferrina adicionales, 5 mg/ml de seroalbúmina bovina) con suero autólogo al 4 %, con o sin la adición de 20 ng/ml de IL-21 humana durante 4 días a 37 °C. En el día 4 se recogieron las células, se contaron en el hemocitómetro y se lavaron en solución salina tamponada de Hank (HBSS sin Ca o Mg) con suero bovino fetal (FBS) al 5 %, ahora denominado HBSSF. Se resuspendieron los sedimentos celulares en HBSSF a 5×10^6 células/ml.

20 Se marcaron líneas celulares de cáncer de mama objetivo, incluidas BT-474 (ATCC N.º HTB-20), SK-BR-3 (ATCC N.º HTB-30) o MCF-7 (ATCC N.º HTB-22), con calceína 10 μ M en HBSSF durante 1 hora a 37 °C. Después, se lavaron los objetivos en 10 volúmenes de HBSSF a 1100 rpm durante 8 minutos. Se resuspendieron los sedimentos celulares en HBSSF a 50.000 células/ml. Se centrifugaron células efectoras CMN pretratadas con o sin IL-21 humana durante 4 días como se describe anteriormente a 1100 rpm durante 8 minutos y se resuspendieron los sedimentos celulares en HBSSF a aproximadamente 5×10^6 células/ml. Se prepararon diluciones seriadas 1:3 de los efectores en placas de fondo redondo de 96 pocillos por duplicado. Se añadieron 100 μ l de objetivos a cada pocillo en presencia de 2 μ g/ml de IgG humana o de 2,5 μ g/ml de trastuzumab. Se centrifugaron las placas de 96 pocillos a 500 rpm durante 3 minutos. Se incubaron las placas a 37 °C durante 3 horas y después se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se transfirieron 100 μ l de sobrenadante de cada pocillo a placas de 96 pocillos de fondo plano y se leyeron en el fluorímetro Wallac (Wallac) a 485/535 con intervalos de 1 segundo.

25 La línea celular de cáncer de mama MCF-7 expresa antígeno Her-2/neu a niveles bajos en comparación con la línea celular BT-474, que expresa este antígeno a niveles altos. En el ensayo de CCDA descrito anteriormente, cuando se usan objetivos MCF-7 a una proporción de efector:objetivo (E:O) de 3, los efectores no tratados en presencia de trastuzumab no tienen más actividad citolítica que los efectores no tratados con IgG en el ensayo. En presencia de trastuzumab, a una E:O de 10, los efectores pretratados con IL-21 tienen 4 veces más actividad citolítica que los efectores no tratados. A una E:O de 10, en presencia de IgG, los efectores pretratados con IL-21 presentaban un aumento de 0,5 veces de la actividad citolítica con respecto a los efectores no tratados. Cuando los objetivos son células BT-474, en presencia de trastuzumab, a una E:O de 10 se produce un aumento de 7 veces de la actividad citolítica de los efectores no tratados con respecto a aquellos no tratados y con IgG presente en el ensayo. A una E:O de 10, el pretratamiento con IL-21 aumenta esta actividad citolítica 2 veces. Estos resultados respaldan el hecho de que la línea celular MCF-7 es una línea celular que expresa poco antígeno, ya que el trastuzumab solo no es eficaz para potenciar la actividad citolítica efectora sobre esta línea celular. El trastuzumab solo es eficaz para potenciar la actividad citolítica de efectores sobre los objetivos BT-474. El pretratamiento con IL-21 aumenta adicionalmente la actividad citolítica de los efectores sobre estas dos líneas celulares.

Tabla 18

Actividad CCDA de linfocitos NK humanos contra objetivos de cáncer de mama. El criterio de valoración es el porcentaje lisado a una proporción de E:O de 3.			
Donante	Objetivo	Control	Pretratamiento con rIL-21
A74	MCF-7	11,2943	22,71177
A74	SKBr3	12,12149	39,34667
A74	MCF-7	0	25,9

ES 2 390 278 T3

(continuación)

Actividad CCDA de linfocitos NK humanos contra objetivos de cáncer de mama. El criterio de valoración es el porcentaje lisado a una proporción de E:O de 3.			
B202	HCC142 8	27,76922	54,18124
B202	HCC38	27,4133	43,12007
B202	HCC38	9,00991	40,34685
B202	MCF7	13,73884	45,35621
B202	MCF7	8,487321	39,9608
B202	MCF7	8,739211	41,61529
B202	SKBR3	28,50026	53,7579
B202	SKBR3	14,84613	26,45897
C025	HCC142 8	18,60837	50,02053
C025	HCC142 8	14,20742	27,40921
C025	HCC38	16,89381	32,41753
C025	HCC38	7,033291	28,39438
C025	MCF7	14,40028	45,16213
C025	MCF7	6,009641	27,19668
C025	MCF7	8,491816	23,90491
C025	MCF7	11,2943	22,71177
C025	SKBR3	26,61171	48,15062
C025	SKBR3	18,33489	34,07056
C025	SKBR3	12,12149	39,34667

B.

5 Se obtuvieron doscientos ml de sangre humana de un programa de donantes. Se recogieron 180 ml de sangre en tubos de ácido cítrico y dextrosa y se recogieron 20 ml del mismo donante en tubos de coagulación (BD Biosciences). Se centrifugó la sangre de los tubos de coagulación a 2800 rpm durante 30 minutos. Se recogió el suero de la parte superior y se usó en los medios de cultivo (véase más adelante). Los 180 ml de sangre de los tubos de ACD se agruparon y se diluyeron 1:2 en solución salina de tampón de fosfato (PBS), suero bovino fetal (FBS) al 2 %. Se pusieron alícuotas de sangre de 30 ml en tubos de 50 ml. Se depositaron 12 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) formando una capa sobre el fondo de cada uno de los tubos de 50 ml de sangre. Se centrifugaron los tubos de sangre a 1800 rpm durante 30 minutos. Se recogió la interfaz de capa leucocítica de cada tubo de 50 ml y se agruparon. Se lavaron los grupos 2-3 veces con un total de 100x el volumen celular de PBS, FBS al 2 %. El sedimento final lavado se volvió a suspender en 2 ml de PBS, FBS al 2 %. Se contaron las células en un hemocitómetro.

15 Se diluyeron CMN a $5 - 10 \times 10^7$ células/ml en PBS, FBS al 2 %. Se purificaron los linfocitos NK usando el kit de enriquecimiento de linfocitos NK humanos de StemCell Technologies. Se centrifugaron los linfocitos NK a 1100 rpm durante 8 minutos y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS, FBS al 2 % y se contaron en un hemocitómetro.

20 Se plaquearon células BT-474 (ATCC N.º HTB-20) a 125×10^6 células/ml en una placa de 12 pocillos en DMEM (Gibco), FBS al 10 % y se dejó que se adhirieran durante 3 horas. Se diluyeron linfocitos NK purificados como anteriormente a $1 - 2 \times 10^6$ células/ml en SF completo (α MEM con nucleósidos, β -mercaptoetanol 50 μ M, insulina 1:100, transferrina, reserva de selenio (Invitrogen), 150 μ g/ml de transferrina adicionales, 5 mg/ml de seroalbúmina bovina) más suero AB humano inactivado por calor al 4 %. Los medios se retiraron por aspiración de las células BT-474 y se añadieron 2 ml de linfocitos NK diluidos a las células BT-474, estableciendo el cocultivo. Al cocultivo se le añadió nada, 2 μ g/ml de trastuzumab, 20 ng/ml de IL-21 humana o 2 μ g/ml + 20 ng/ml de IL-21 humana. Se incubaron los cocultivos durante la noche a 37 °. Después del cocultivo durante la noche se recogieron las células y se contaron en un hemocitómetro. Se lavaron las células en HBSSF (véase más adelante) y se resuspendieron los sedimentos celulares en 1 ml de HBSSF.

25 Se añadieron 20 μ g/ml de gamma globulina de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) y anticuerpo conjugado 1:100 a 100.000 - 200.000 linfocitos NK en 100 μ l de HBSSF. La combinación de

anticuerpos incluía CD25FITC, CD56PE, CD16Cychrome y CD8APC (BD Pharmingen). Los controles de isotipo incluían 100.000 - 200.000 linfocitos agrupados de cocultivos de NK con cada anticuerpo solo. Se incubaron las células a 4 °C durante 30 minutos en oscuridad. Se lavaron las células 1 vez en PBS, FBS al 2 % y se dejaron en 200 µl de PBS, FBS al 2 %. Se añadió paraformaldehído al 0,2 % para fijar las células y las células se mantuvieron a 4 °C hasta que estuvieron listas para realizar el análisis FACS. Se realizó un análisis FACS en un FACS Calibur de Becton Dickinson a los 3-4 días de la fijación. Se usó el programa informático Cellquest para analizar los datos de flujo. Se calculó el número total de células multiplicando el número de células por ml por el volumen del cultivo.

En la totalidad de los los 4 donantes sometidos a prueba se observó un aumento de la población de células CD56+/CD25+ cuando el trastuzumab y la IL-21 estaban presentes en el cocultivo de linfocitos NK y la línea celular de cáncer de mama BT-474. Específicamente, en comparación con los cocultivos con medio solo (descritos anteriormente), el trastuzumab solo dio como resultado un aumento de 2 - 20 veces, la IL-21 sola dio como resultado un aumento de 2 - 4 veces y, cuando estaban presente la IL-21 y el trastuzumab se observó un aumento de 4 - 50 veces de la población CD56+/CD25+. En todos los donantes se observó un aumento de la población CD56+/CD25+ en presencia de IL-21 y trastuzumab con respecto a todas las demás condiciones de cocultivo.

C.

Se obtuvieron 200 ml de sangre humana del programa de donantes del propio centro. Se recogieron 180 ml de sangre en tubos ACD y se recogieron 20 ml del mismo donante en tubos de coagulación. Se centrifugó la sangre de los tubos de coagulación a 2800 rpm durante 30 minutos. Se recogió el suero de la parte superior y se usó en los medios de cultivo (véase más adelante). Los 180 ml de sangre de los tubos de ACD se agruparon y se diluyeron 1:2 en solución salina de tampón de fosfato (PBS), suero bovino fetal (FBS) al 2 %. Se pusieron alícuotas de sangre de 30 ml en tubos de 50 ml. Se depositaron 12 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, N.º de cat. 17-1440-03) formando una capa sobre el fondo de cada uno de los tubos de 50 ml de sangre. Se centrifugaron los tubos de sangre a 1800 rpm durante 30 minutos. Se recogió la interfaz de capa leucocítica de cada tubo de 50 ml y se agruparon. Se lavaron los grupos 2-3 veces con un total de 100x el volumen celular de PBS, FBS al 2 %. El sedimento final lavado se volvió a suspender en 2 ml de PBS, FBS al 2 %. Se contaron las células en un hemocitómetro.

Se cultivaron células CMN purificadas como se describe anteriormente a $0,5 \times 10^6$ células/ml en SF completo (α MEM con nucleósidos, β -mercaptoetanol 50 μ M, insulina 1:100, transferrina, reserva de selenio (Invitrogen), 150 μ g/ml de transferrina adicionales, 5 mg/ml de seroalbúmina bovina) con suero autólogo al 4 %, con o sin la adición de 20 ng/ml de IL-21 humana durante 4 días a 37 °C. En el día 4 se recogieron las células, se contaron en el hemocitómetro y se lavaron en solución salina tamponada de Hank (HBSS sin Ca o Mg) con suero bovino fetal (FBS) al 5 %, ahora denominado HBSSF. Se resuspendieron los sedimentos celulares en HBSSF a $0,5 \times 10^6$ células/ml.

Se marcaron líneas celulares de cáncer de mama objetivo, incluidas BT-474 o MCF-7, con calceína 10 μ M en HBSSF durante 1 hora a 37 °C. Después, se lavaron los objetivos con 10 volúmenes de HBSSF a 1100 rpm durante 8 minutos. Se resuspendieron los sedimentos celulares en HBSSF a 50.000 células/ml. Se centrifugaron células efectoras CMN pretratadas con o sin IL-21 humana durante 4 días como se describe anteriormente a 1100 rpm durante 8 minutos y se resuspendieron los sedimentos celulares en HBSSF a aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml. Se prepararon diluciones seriadas 1:3 de los objetivos en placas de fondo redondo de 96 pocillos por duplicado. Se añadieron 100 µl de objetivos a cada pocillo en presencia de 2 µg/ml de IgG humana o de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 o 0,31 µg/ml de herceptin. Se centrifugaron las placas de 96 pocillos a 500 rpm durante 3 minutos. Se incubaron las placas a 37 °C durante 3 horas y después se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo a placas de 96 pocillos de fondo plano y se leyeron en el fluorímetro de Wallac a 485/535 con intervalos de 1 segundo.

Usando las líneas celulares BT-474 o MCF-7 como objetivos en un ensayo de CCDA, las CMN pretratadas con IL-21 presentan más actividad a todas las concentraciones de trastuzumab probadas que las CMN no tratadas o cuando hay IgG presente en el ensayo. A una proporción de efector:objetivo (E:O) de 3, la actividad citolítica es máxima a 5 µg/ml de trastuzumab cuando se usan BT-474. A una E:O de 3, la actividad citolítica es máxima a 1,25 µg/ml cuando se usan MCF-7.

D.

Se recogió sangre periférica de macacos cangrejeros en tubos de 5 ml con heparina de litio y se almacenó a temperatura ambiente hasta el procesamiento de las muestras. Se diluyeron las muestras con PBS que contenía EDTA 1 mM y se recogió la fracción de células mononucleares (CMN) por centrifugación sobre Ficoll al 95 %. Después de lavarlas, se cultivaron las células durante 3 días en medios de crecimiento que contenían 20 ng/ml de rIL-21 o en medios de control. Después de la incubación, se lavaron y se contaron las células, y se tiñeron alícuotas para realizar el inmunofenotipado por citometría de flujo. Se usó una alícuota de células para realizar ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos como sigue. Se cargaron células objetivo de cáncer de mama BT-474 con tinción de calceína-AM durante 60 minutos a 37 °C, se lavaron y se colocaron 1000 células objetivo en pocillos que contenían 2 µg/ml de Herceptin y 50.000, 25.000, 12.500, 6250, 3125, 1563 o 781 CMN. Se incubaron

5 los ensayos durante 3 h en oscuridad a 37 °C. Después de esta incubación, se midió la liberación de calceína-AM a los sobrenadantes y se calculó la lisis específica basándose en la liberación por lisis total (detergente) y la liberación no específica en ausencia de cualquier célula efectora CMN. Se repitió el experimento dos veces para cada uno de los 8 macacos cangrejeros donantes. Se presentaron los datos como porcentaje de lisis específica por CMN a una proporción de E:O de 25, o se normalizaron los datos para reflejar el número real de linfocitos NK en la preparación de CMN, basándose en el análisis de citometría de flujo. Para los datos ajustados de NK, se ajustó la proporción de E:O frente al porcentaje lisado usando una curva sigmoïdal de 4 parámetros y se usó la ecuación de Hill para determinar el porcentaje lisado a una proporción de E:O de 3 NK por objetivo BT-474.

10 El tratamiento *in vitro* de CMN de macaco cangrejero con rIL-21 aumentó la actividad en ensayos de CCDA mediada por Herceptin usando objetivos de cáncer de mama BT-474. Algunos animales presentaron una respuesta mayor frente a rIL-21 que otros, y esta respuesta variable fue coherente en cada animal en experimentos repetidos. Se ajustó un modelo de efectos mixtos usando Proc MIXED en SAS® (Littell et al. SAS System for Mixed Models; SAS Institute, 1996) con el tratamiento como un efecto fijo y efectos aleatorios para el donante y el tratamiento por interacción de donante. Se usó la opción Kenward Roger en SAS® para determinar los grados de libertad del denominador para el cálculo del valor de P para el tratamiento. El término del tratamiento fue muy significativo.

Tabla 19

Actividad CCDA de preparaciones de CMN de macaco cangrejero frente a objetivos de cáncer de mama BT-474. El criterio de valoración es el porcentaje lisado a una proporción de E:O de 25.

	Controles-sin tratamiento	Pretratamiento con rIL-21		
Animal	Cont-ciclo1	Cont-ciclo2	rIL21-ciclo1	rIL21-ciclo2
A	15,10089		34,57907	
B	4,576255	6,457869	17,69686	15,00928
C	12,60543	4,191629	29,77582	20,20712
D	25,48322	16,04117	32,51966	32,08234
E	20,77167	6,569754	32,82285	26,04751
F	15,85598	4,479947	22,39635	12,16969
G	31,07411	18,44403	54,5077	37,00462
H	26,21558	7,980985	29,85094	20,00046

Tabla 20

Actividad CCDA de preparaciones de CMN de macaco cangrejero frente a objetivos de cáncer de mama BT-474. El criterio de valoración es el porcentaje lisado a una proporción de E:O ajustada de NK de 3.

	Controles-sin tratamiento	Pretratamiento con rIL-21		
Cont animal	Cont	Cont	IL-21	IL-21
A	17,56976		36,4764	
B	5,349258	7,43626	22,17732	17,10627
C	13,51977	3,109	31,55683	26,31246
D	24,98626	15,87297	31,02951	31,07489
E	19,4483	6,177042	38,98066	24,94877
F	16,14824	4,779288	24,31473	15,74664
G	31,54203	17,95528	53,47342	35,68798
H	23,98745	8,451089	32,60043	16,41115

Ejemplo 7**Modelo de ratón de depleción de CD4/CD8**

5 Durante muchos años se ha usado la depleción de células usando anticuerpos frente a receptores de superficie celular para comprender las funciones específicas de estas células en los mecanismos inmunitarios. Cuando se inyectan en ratones, los anticuerpos frente a los antígenos CD4 y CD8 de los linfocitos T provocan la depleción de subconjuntos de linfocitos T específicos mediante un mecanismo que implica la CCDA y el complemento. Se inyectan dosis bajas de anticuerpos en ratones para provocar una depleción de entre el 20-50 % de linfocitos T CD4 o CD8. Se administra IL-21 a grupos de ratones y se estudia su capacidad para potenciar la depleción realizando un seguimiento de los linfocitos T mediante citometría de flujo. El aumento de la depleción de los linfocitos T con la IL-21 indica la capacidad de la IL-21 para potenciar la depleción de células mediada por anticuerpos *in vivo*.

15 Para los estudios de depleción se usan CD4 de rata anti-ratón (clon GK1.5, ATCC) o CD8 de rata anti-ratón (clon 53-6.72, ATCC). A grupos de ratones C57BL/16 de 8-12 semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyecta i.p. anticuerpo de control, 5-50 µg de AcM anti-CD4 o anti-CD8 el día 0. Los grupos de ratones reciben i.p. PBS o 25 µg de mIL-21 comenzando dos días antes de los sangrados hasta el día uno. Se sangra a los ratones en los días 1, 4 y 7. Se somete a ensayo el número de linfocitos T CD4 y CD8 en la sangre mediante citometría de flujo.

El aumento de la depleción de linfocitos T con la IL-21 indica la capacidad de la IL-21 para potenciar la depleción de células mediada por anticuerpos *in vivo*, lo que sugiere que la IL-21 puede potenciar los efectos mediados por anticuerpos.

Ejemplo 8**20 Ensayo de eliminación pulmonar**

Se han usado ensayos de eliminación pulmonar para estudiar la función de los linfocitos NK *in vivo*. Se inyectan i.v. en ratones células RAJI marcadas con cromo-51 (⁵¹Cr). Los grupos de ratones reciben PBS, mIL-21, rituximab solo o rituximab + IL-21. Se sacrifica a los ratones 5-8 horas después de la inyección i.v. y se somete a ensayo a los pulmones para determinar la cantidad de radioactividad usando un contador gamma. La disminución de la radioactividad en el pulmón es un indicador del aumento de la eliminación (destrucción) de células tumorales por linfocitos NK. La capacidad de la IL-21 para potenciar la eliminación de células tumorales en presencia de rituximab es indicativa de la capacidad de la IL-21 de potenciar la actividad lítica mediada por anticuerpos *in vivo*.

30 Se marcan células RAJI con 100 µCi de ⁵¹Cr durante 2 horas a 37 °C. Se lavan las células dos veces con PBS y se resuspenden en PBS estéril, a pH 7,2. A los ratones se les inyectan i.v. 10 millones de células RAJI marcadas en el tiempo 0 (t = 0). Grupos de ratones reciben 20 µg de anticuerpo de control o rituximab i.p. a t = 10 min. Grupos de ratones reciben PBS o 25 µg de mIL-21 a t = -24 h, t = 0 h y t = 4 h. Se sacrifica a los ratones entre 5-8 horas después de la inyección de tumores, se aíslan los pulmones y se cuenta en un contador gamma. La radioactividad se representa gráficamente como el porcentaje de inyecciones de control (células marcadas solas).

35 La disminución de la radioactividad en el pulmón es un indicador del aumento de la eliminación (destrucción) de células tumorales por linfocitos NK. La capacidad de la IL-21 para potenciar la eliminación de células tumorales en presencia de rituximab es indicativa de su capacidad de potenciar la actividad lítica mediada por anticuerpos *in vivo*.

Ejemplo 9**Estudio de depleción de Raji/macrófagos IDCG**

40 La combinación de IL-21+rituximab (rituximab) tiene una actividad antitumoral sinérgica en un modelo tumoral de Raji/IDCG. Se cree que la CCDA desempeña un papel importante en la actividad antitumoral del rituximab *in vivo*, y los macrófagos son células efectoras importantes en este proceso. La IL-21 puede influir en la actividad CCDA de los macrófagos en ratones, dando lugar a la sinergia con el rituximab. Con el fin de probar la importancia de los macrófagos en el efecto antitumoral de IL21 + rituximab, se provocará la depleción de macrófagos en ratones, usando liposomas de clodronato (Sigma, St. Louis, MO). El experimento demuestra que los macrófagos son decisivos para la actividad antitumoral sinérgica de IL-21 + rituximab mediante la demostración de que los ratones con depleción de esta población celular presentan una supervivencia acortada con relación a los ratones sin depleción.

50 Para estudiar la importancia de los macrófagos en la actividad antitumoral de IL21 + rituximab contra células Raji en ratones IDCG, se realizó el experimento siguiente. Se retrasó el tratamiento con rituximab para reducir su eficacia (Funakoshi, Longo et al. Blood, 83(10):2787-94, 1994) y se inyectó mIL-21 durante 5 días consecutivos que encuadran la primera inyección de rituximab. Se usaron células HS-Sultan y Raji porque no generan señales a través de STAT1 o STAT3 y su crecimiento no se inhibe por la IL-21 *in vitro* o *in vivo*).

Grupo	Cepa	#Ratones	Tratamiento
1.)	IDCG	10 (1481-90)	Liposomas de clodronato+IL-21+rituximab
2.)	IDCG	10 (1491-1500)	Liposomas de PBS+IL-21+rituximab
3.)	IDCG	9 (1501-09)	Liposomas de clodronato+rituximab
4.)	IDCG	9 (1510-18)	Liposomas de PBS+rituximab
5.)	IDCG	9 (1519-28)	Liposomas de clodronato+PBS

1 x 10⁶ células Raji inyectadas IV en el día 0 del estudio

100 µg de IL-21 administrados por vía IP en los días 3-7

5 20 µg de rituximab administrados por vía IP en el día 5, el día 9, el día 13, el día 17 y el día 21.

Liposomas administrados IV:

día 3 - 0,2 ml de liposomas al 100 %

día 9 - 0,2 ml de liposomas al 50 %

día 15 - 0,2 ml de liposomas al 50 %

10 día 21 - 0,2 ml de liposomas al 50 %

La figura 1 muestra que la depleción de macrófagos con liposomas de clodronato (p. ej., Clod.IL21+R) redujo espectacularmente el beneficio de supervivencia para ratones IDCG portadores de células de linfoma Raji en comparación con ratones inyectados con liposomas de PBS. Los ratones depleción de macrófagos tratados con IL-21+rituximab (Clod.IL21+R) o rituximab (Clod.R) presentaron una supervivencia (tiempo medio hasta la muerte) significativamente más corta en comparación con los ratones sin depleción (PBS.IL21+R y PBS.R respectivamente).

15

Ejemplo 10

Eliminación tumoral después de IL-21 + rituximab en ratones IDCG con depleción de granulocitos

La IL-21 junto con rituximab es capaz de eliminar eficazmente células tumorales RAJI *in vivo* mejor que el rituximab solo. Se inyectarán células RAJI en ratones IDCG CB17 que tienen depleción de granulocitos. Se estudió el efecto del rituximab solo o en combinación con IL-21.

20

A ratones CB17-idcg se les inyectaron IV 1 x 10⁶ células Raji. Además, a algunos de los ratones se les inyectó anticuerpo monoclonal Gr-1 (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Se tratará a los ratones con 20 µg de Rituxan, 100 µg de mL-21 o una combinación de Rituxan y mL-21 mediante inyecciones IP.

Se monitorizó a los ratones para detectar 1) pérdida de peso corporal coherente o rápida del 20 %, 2) parálisis o incapacidad de mantener una posición erguida o moverse, 3) respiración trabajosa - especialmente si va acompañada de descarga nasal o cianosis, 4) letargo o ausencia de respuesta a estímulos suaves. Se sacrificó a los ratones que cumplían los criterios anteriores.

25

Se administraron tratamientos de Ac para los grupos 1-6 en los días 5, 9, 13, 17 y 21. A los grupos 7-10 se les trató en los días 12, 19, 26, 33 y 40. La proteína se administró en los días 3-7 para los grupos 1-6 y en los días 10-14 para los grupos 7-10.

30

Ratones	#	Depleción	Tratamiento con Ac	Proteína
1) C.b-17 IDCG	8	ninguna	PBS	PBS
2) C.B-17 IDCG	8	ninguna	20 µg de rituximab	PBS
3) C.B-17 IDCG	8	ninguna	20 µg de rituximab	100 ug de IL-21
4) C.B-17 IDCG	8	Gr-1	PBS	PBS
5) C.B-17 IDCG	8	Gr-1	20 µg de rituximab	PBS
6) C.B-17 IDCG	8	Gr-1	20 µg de rituximab	100 ug de IL-21

La figura 2 muestra que la actividad antitumoral sinérgica de IL-21+rituximab está comprometida por la depleción de granulocitos con AcM anti-Gr-1. La supervivencia de ratones IDCG portadores de Raji (fracción superviviente a los 100 días) se reduce significativamente en ratones IDCG con depleción de granulocitos (líneas de puntos) en comparación con los ratones sin depleción (líneas continuas).

5 **Ejemplo 11**

IL-21 en combinación con anticuerpos anti-CTLA4

A. Modelo tumoral de células RENCA

10 Para probar si la IL-21 en combinación con AcM anti-CTLA4 tiene efectos sobre el crecimiento de tumores en ratones, se usó un modelo tumoral de células RENCA. Se ha demostrado que los modelos de ratón de carcinoma de células renales que usan células Renca establecen tumores metastásicos que son sensibles al tratamiento agentes inmunoterápicos tales como la IL-12 y la IL-2 (Wigginton et al., J. of Natl. Cancer Inst. 88:38-43, 1996). A grupos de ratones se les inyectó s.c tumor RENCA en el día 0. Después, se inyectó a los ratones vehículo solo, 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 (clon 9H10, eBiosciences, San Diego, CA), 25 ug de mIL-21 sola o 50 ug o 100 ug de anti-CTLA4 en combinación con 25 ug de mIL-21. Se usó una dosis baja de 25 ug de mIL-21 que normalmente no tiene un efecto antitumoral potente en este modelo.

15 A ratones BALB/c hembra de diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectaron SC en el flanco derecho $0,1 \times 10^6$ células RENCA en el día 0. Grupos de ratones recibieron vehículo solo (PBS, pH 7,2) o 25 ug de mIL-21 en los días 5-9, 19-23. Grupos distintos recibieron 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA-4 solo en los días 0, 4 y 8 o recibieron AcM anti-CTLA4 (50 ug o 100 ug) en los días 0, 4 y 8 en combinación con 25 ug de mIL-21 en los días 5-9, 19-23. Todas las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral 3X/semana durante 5 semanas usando medidas de calibre. Se calculó el volumen del tumor usando la fórmula $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$ (mm³).

20 La inyección de mIL-21 sola o las dos concentraciones de AcM anti-CTLA4 solo no tuvieron ningún efecto sustancial sobre el crecimiento tumoral. En contraste, la combinación de mIL21 con AcM anti-CTLA4 a cualquier concentración mostró una disminución significativa del volumen del tumor en comparación con los controles (figura 1). Estos datos indican que la combinación de IL21 con AcM anti-CTLA4 tiene actividad antitumoral sinérgica y es un posible tratamiento combinado para el cáncer.

B. La administración terapéutica de IL-21 de ratón en combinación con anti-CTLA4 de ratón inhibe el crecimiento tumoral en el modelo RENCA.

30 Para probar si la combinación de IL-21 con AcM anti-CTLA4 tiene efectos sobre el crecimiento tumoral en ratones cuando se administra usando un régimen terapéutico, a grupos de ratones se les inyectó s.c. tumor RENCA en el día 0. Después, a los ratones se les inyectó vehículo solo, 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 (clon 9H10, eBiosciences), 25 ug de mIL-21 sola o 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 en combinación con 25 ug de mIL-21 comenzando a un volumen de tumor de 60-80 mm³. Se usa una dosis baja de 25 ug de mIL-21 que normalmente no tiene un efecto antitumoral potente en este modelo. El AcM anti-CTLA4 se administran en los días 1, 5, 9 y 13, después de haberse alcanzado un volumen tumoral de 60-80 mm³. La mIL-21 se inyecta en los días 5-9, 19-23 o desde los días 1-10 después de haberse alcanzado un volumen tumoral de 60-80 mm³. Los efectos antitumorales observados en los grupos que combinaban mIL-21 y AcM anti-CTLA4 indican un efecto antitumoral sinérgico en este modelo cuando se administra en un régimen terapéutico.

35 40 A ratones BALB/c hembra de diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectan SC en el flanco derecho $0,1 \times 10^6$ células RENCA en el día 0. Grupos de ratones recibieron vehículo solo (PBS, pH 7,2) o 25 ug de mIL-21 en los días 5-9, 19-23 o en los días 1-10 después de haberse alcanzado un volumen tumoral de 60-80 mm³. Grupos distintos reciben 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA solo en los días 1, 5, 9 y 13 o reciben AcM anti-CTLA4 (50 ug o 100 ug) en los días 1, 5, 9 y 13 en combinación con 25 ug de mIL-21 en los días 5-9, 19-23 o en los días 1-10 después de haberse alcanzado un volumen tumoral de 60-80 mm³. Todas las inyecciones se administran por vía intraperitoneal. Se monitoriza el crecimiento tumoral 3X/semana durante 5 semanas usando medidas de calibre. Se calcula el volumen del tumor usando la fórmula $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$ (mm³).

45 Los efectos antitumorales observados en los grupos que combinaban mIL-21 y AcM anti-CTLA4 indican un efecto antitumoral sinérgico en este modelo cuando se administra en un régimen terapéutico. Estos datos indican que la combinación de IL21 con AcM anti-CTLA4 tiene actividad antitumoral sinérgica y es un posible tratamiento combinado para el cáncer.

C. El tratamiento combinado con mIL-21 y anti-CTLA4 de ratón inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de timoma E.G7.

55 Para probar si la combinación de mIL-21 y AcM anti-CTLA4 induce la actividad antitumoral, a grupos de ratones se les inyecta s.c el tumor E.G7 en el día 0 (Shrikant, P y Mescher, M., J. Immunology 162:2858-2866, 1999). A los ratones se les inyecta vehículo solo, 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 (clon 9H10, eBiosciences), 25 ug de mIL21

- 5 sola o 50 ug o 100 ug de anti-CTLA4 en combinación con 25 ug de mL21. Se usa una dosis baja de 25 ug de mL-21 que normalmente no tiene un efecto antitumoral potente en este modelo. El AcM anti-CTLA4 se administra en los días 0, 4 y 8. La mL21 se inyecta en los días 5-9, 19-23 o en los días 2-20 en días alternos (EOD, por sus siglas en inglés). Los efectos antitumorales observados en los grupos que combinan mL21 y CTLA4 indican un efecto antitumoral sinérgico en este modelo.
- 10 A ratones C57BL/6 hembra de diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectan SC en el flanco derecho $0,4 \times 10^6$ células E.G7 (ATCC N.º CRL-2113) en el día 0. Después, a los ratones se les inyecta vehículo solo, 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 (clon 9H10, eBiosciences), 25 ug de mL-21 sola o 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 en combinación con 25 ug de mL-21. Se usa una dosis baja de 25 ug de mL-21 que normalmente no tiene un efecto antitumoral potente en este modelo. El AcM anti-CTLA4 se administra en los días 0, 4 y 8. La mL-21 se inyecta en los días 5-9, 19-23 o en los días 2-20 en días alternos (EOD). Las inyecciones intraperitoneales se administraron en un volumen total de 200 ul. Todos los reactivos se administran mediante inyecciones intraperitoneales. Se monitoriza el crecimiento tumoral 3X/semana durante 4 semanas usando medidas de calibre. Se calculó el volumen del tumor usando la fórmula $\frac{1}{2}*(B)^2*L$ (mm³).
- 15 Los efectos antitumorales observados en los grupos que combinan mL21 y AcM anti-CTLA4 indican un efecto antitumoral sinérgico en este modelo. Estos datos indican que la combinación de IL-21 con AcM anti-CTLA4 tiene actividad antitumoral sinérgica y es un posible tratamiento combinado para el cáncer.
- D. El tratamiento combinado con mL-21 y AcM anti-CTLA4 de ratón inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de melanoma B 16.**
- 20 PAra probar si la combinación de mL-21 y AcM anti-CTLA4 induce la actividad antitumoral en otros tumores, a grupos de ratones se les inyectan s.c. células de melanoma B16-F10 (ATCC N.º CRL-6475) en el día 0. Después, a los ratones se les inyecta vehículo solo, 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 (clon 9H10, eBiosciences), 25 ug de mL-21 sola o 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 en combinación con 25 ug de mL-21. El AcM anti-CTLA4 se administra en los días 0, 4 y 8. La mL-21 se inyecta en los días 5-9, 19-23 o en los días 2 y 20 en días alternos (EOD). Los efectos antitumorales observados en los grupos que combinan mL-21 y AcM anti-CTLA4 indican un efecto antitumoral sinérgico en este modelo.
- 25 A ratones C57BL/6 hembra de diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectan SC en el flanco derecho $0,5 \times 10^6$ células de melanoma B16 en el día 0. Después, a los ratones se les inyecta vehículo solo, 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 (clon 9H10, eBiosciences), 25 ug de mL-21 sola o 50 ug o 100 ug de AcM anti-CTLA4 en combinación con 25 ug de mL-21. El AcM anti-CTLA4 se administra en los días 0, 4 y 8. La mL21 se inyecta en los días 5-9, 19-23 o en los días 2-20 en días alternos (EOD). Las inyecciones intraperitoneales se administraron en un volumen total de 200 ul. Todos los reactivos se administran mediante inyecciones intraperitoneales. Se monitoriza el crecimiento tumoral 3X/semana durante 4 semanas usando medidas de calibre. Se calculó el volumen del tumor usando la fórmula $\frac{1}{2}*(B)^2*L$ (mm³).
- 30 Los efectos antitumorales observados en los grupos que combinan mL21 y AcM anti-CTLA4 indican un efecto antitumoral sinérgico en este modelo. Estos datos indican que la combinación de IL-21 con AcM anti-CTLA4 tiene actividad antitumoral sinérgica y es un posible tratamiento combinado para el cáncer.
- 35

Listado de secuencias

- <110> ZymoGenetics, Inc.
Kindsvogel, Wayne R.
Hughes, Steven D.
- 5 Holly, Richard D.
Clegg, Christopher H.
Foster, Donald C.
Johnson, Rebecca A.
Heipel, Mark D.
- 10Sivakumar, Pallavur V.

- <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DEL CÁNCER USANDO TRATAMIENTO CON IL-21 Y ANTICUERPOS MONOCLONALES
- 15 <130> 04-03PC
- <160> 2
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 25 <220>
<221> CDS
<222> (47)...(532)
- 30 <400> 1

```

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

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

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

ES 2 390 278 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

tgaggatcta acttgcagtt ggacactatg ttacatactc taatatagta gtgaaagtca 592
ttcttttgta ttccaagtgg aggagcccta ttaaattata taaagaaata 642

```

<210> 2
 <211> 162
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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

```

REIVINDICACIONES

1. Rituximab y un polipéptido de IL-21 o un fragmento de un polipéptido de IL-21 como se muestra en la SEQ ID N.º: 2 desde el residuo de aminoácido 30 hasta el residuo 162, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que el rituximab y el polipéptido de IL-21 son para su administración una vez por semana durante hasta ocho semanas consecutivas.
2. Rituximab y un polipéptido o fragmento de IL-21 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es linfoma no hodgkiniano.
3. Rituximab y un polipéptido o fragmento de IL-21 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sujeto es un paciente humano.
4. Rituximab y un polipéptido o fragmento de IL-21 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el paciente no ha mostrado anteriormente remisión o regresión tumoral apreciable en respuesta al rituximab.
5. Rituximab y un polipéptido o fragmento de IL-21 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el paciente ha recaído después de recibir tratamiento con rituximab.
6. Rituximab y un polipéptido o fragmento de IL-21 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la administración de IL-21 da como resultado una respuesta inmunológica óptima.
7. Uso de rituximab y un polipéptido de IL-21 o un fragmento de un polipéptido de IL-21 como se muestra en la SEQ ID N.º: 2 desde el residuo de aminoácido 30 hasta el residuo 162, para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto, en el que el rituximab y el polipéptido de IL-21 son para su administración una vez por semana durante hasta ocho semanas consecutivas.

Figura 1

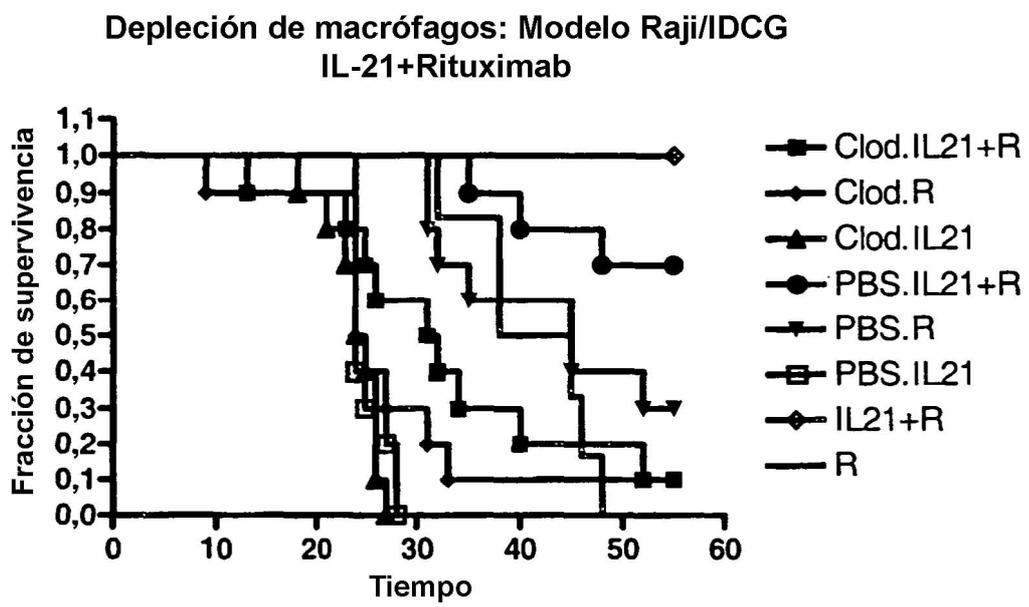


Figura 2

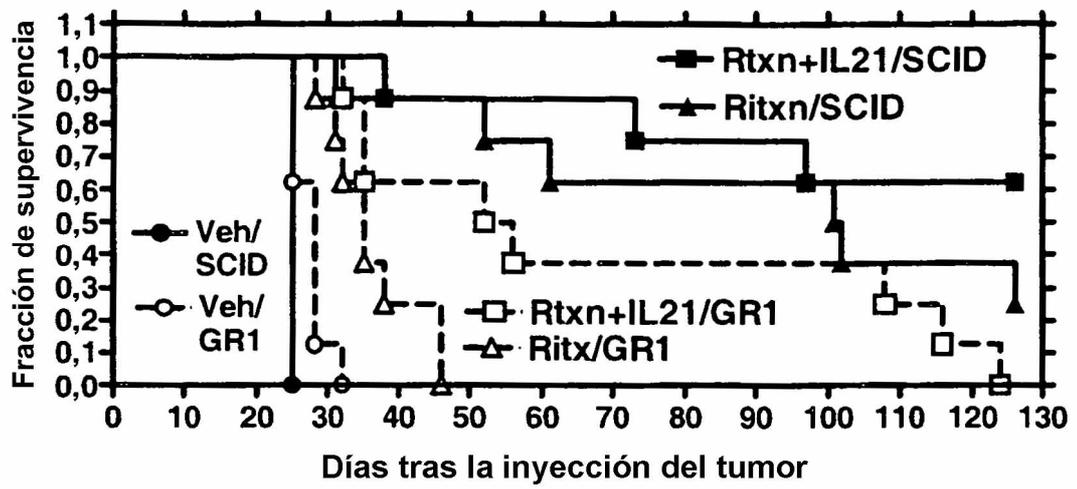
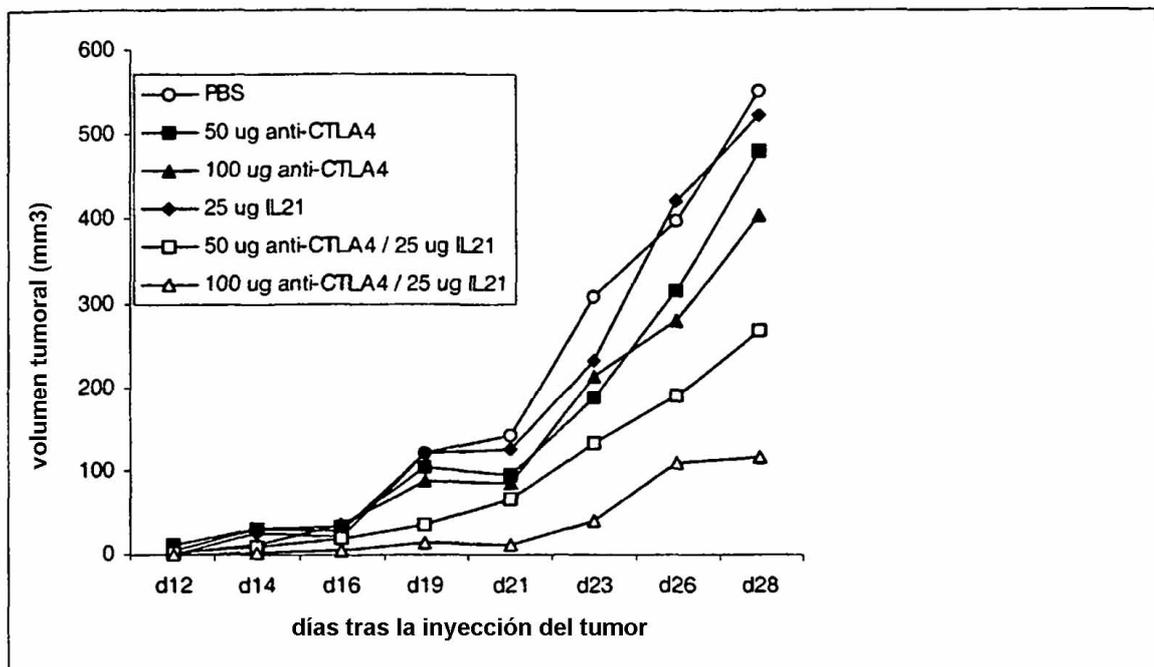


Figura 3



$p < 0,001$ para 100 ug de anti-CTLA4 + IL-21 en el día 28

$p = 0,012$ para 50 ug de CTLA4 + IL21 en el día 28