



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103127502 A

(43) 申请公布日 2013.06.05

(21) 申请号 201310057516.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005.05.20

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

60/572,973 2004.05.20 US

60/635,380 2004.12.10 US

60/671,281 2005.04.14 US

60/680,447 2005.05.12 US

(62) 分案原申请数据

200580021262.5 2005.05.20

(71) 申请人 津莫吉尼蒂克斯公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 W·R·金德斯沃格尔

S·D·胡格赫斯 R·D·豪雷

C·H·克雷格 D·C·弗斯特

R·A·约翰逊 M·D·黑佩尔

P·V·斯瓦库玛

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

权利要求书1页 说明书48页

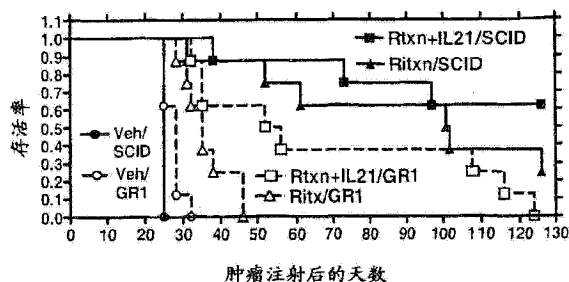
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

使用 IL-21 和单克隆抗体治疗癌症的方法

(57) 摘要

描述了通过共施用治疗性单克隆抗体和 IL-21 治疗癌症的方法。可使用的示例性单克隆抗体是利妥昔单抗、曲妥单抗和抗 CTLA-4 抗体。对于对单克隆抗体疗法具有抗性的、在用单克隆抗体治疗后复发的或其中增强的 IL-21 抗肿瘤效果减少毒性(该毒性和使用单克隆抗体的治疗法相关)的患者群体,所述组合疗法的增强的抗肿瘤性特别有用。



1. 在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用治疗上有效量的单克隆抗体和治疗上有效量的 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,该片段为 SEQ ID NO:2 中所示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。

2. 在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用治疗上有效量的抗 CD20 单克隆抗体和治疗上有效量的 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,该片段为 SEQ ID NO:2 中所示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述单克隆抗体是利妥昔单抗。

4. 权利要求 2 的方法,其中所述癌症是非何杰金氏淋巴瘤。

5. 权利要求 2 的方法,其中所述受治疗者是人患者。

6. 权利要求 3 的方法,其中每周一次施用利妥昔单抗和 IL-21 多肽,进行长达连续 8 周。

7. 权利要求 3 的方法,其中每周一次地施用利妥昔单抗和每周高达 5 次地施用 IL-21 多肽,进行长达连续 8 周。

8. 权利要求 3 的方法,其中所述 IL-21 多肽的剂量是从 10 至 500 μ g/kg/剂。

9. 权利要求 5 的方法,其中所述患者以前曾用利妥昔单抗治疗过但没有显示明显的肿瘤缓减或消退。

10. 权利要求 5 的方法,其中所述患者在接受利妥昔单抗治疗后复发。

11. 在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用治疗上有效量的抗 CD20 单克隆抗体和治疗上有效量的 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,该片段为 SEQ ID NO:2 中所示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段,其中施用 IL-21 导致最佳的免疫反应。

12. 在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用结合 Her-2/neu 受体的单克隆抗体和 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,该片段为 SEQ ID NO:2 中所示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述受治疗者是人患者。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述单克隆抗体是曲妥单抗。

15. 在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用结合细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 的单克隆抗体和 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,该片段为 SEQ ID NO:2 中所示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述受治疗者是人患者。

17. 权利要求 16 的方法,其中每三周一次地以 3mg/kg 的剂量施用抗 CTLA-4 单克隆抗体,进行 4 个循环,和每周 1-5 次地施用 IL-21 多肽或片段,施用长达 8 周。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述 IL-21 多肽的剂量是从 10 至 500 μ g/kg/剂。

使用 IL-21 和单克隆抗体疗法治疗癌症的方法

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 5 月 20 日、申请号为 201110107971.2、发明名称为“使用 IL-21 和单克隆抗体疗法治疗癌症的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 细胞因子一般刺激造血谱系的细胞的增殖或分化,或参与身体的免疫和炎症反应机制。白细胞介素是介导免疫反应的细胞因子的家族。免疫反应的核心是 T 细胞,该细胞产生许多细胞因子和影响对抗原的适应性免疫。已将 T 细胞产生的细胞因子分类为 TH1 和 TH2 (Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76:300-317, 1998)。1 型细胞因子包括 IL-2、IFN- γ 、LT- α , 其参与炎症反应、病毒性免疫、细胞内寄生虫免疫和同种异体移植物排斥。2 型细胞因子包括 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 和 IL-13, 其参与体液反应、蠕虫免疫和过敏性反应。1 型和 2 型之间共享的细胞因子包括 IL-3, GM-CSF 和 TNF- α 。一些证据显示 1 型和 2 型生产性 T 细胞群体优先地迁移入不同类型的炎症组织。

[0004] 天然杀伤 (NK) 细胞和 T 细胞以及 B 细胞具有共同的祖细胞,在免疫监督中发挥作用。NK 细胞,其占血液淋巴细胞的高达 15%,不表达抗原受体,是先天免疫的组成部分。NK 参与识别和杀伤肿瘤细胞和病毒感染的细胞。在体内,据认为 NK 细胞需要激活,然而,在体外,已显 NK 细胞杀伤一些类型的肿瘤细胞而无需激活。

[0005] 已显示 IL-21 是细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞的有效调节剂。(Parrish-Novak 等人 *Nature*408:57-632000;Parrish-Novak 等人, *J. Leuk. Bio.* 72:856-863, 2002;Collins 等人, *Immunol. Res.* 28:131-140, 2003;Brady, 等人 *J. Immunol.* :2048-58, 2004.)。已显示 IL-21 共刺激 NK 细胞的扩增,已证明其增强这些细胞的效应器功能。T 细胞应答包括调节记忆 T 细胞功能以及增强初级抗原反应 (Kasaian 等人, *Immunity*16:559-569, 2002)。

[0006] 抗体疗法使用选择性地某些细胞类型中表达的抗原。抗体疗法在癌症的治疗中已取得了显著的成功,因为某些肿瘤细胞展现独特的抗原、谱系特异性抗原,或相对于正常细胞存在过量的抗原。单克隆抗体 (MAb) 疗法的发展已从小鼠杂交瘤技术 (Kohler 等人, *Nature*256:495-497, 1975) 发展而来,由于不能刺激人免疫效应器细胞的活性和产生人抗小鼠的抗体 (HAMA;Khazaeli 等人, *J. Immunother.* 15:42-52, 1994), 因此该单克隆抗体具有有限的治疗功效。使用人恒定区和小鼠可变区获得抗原性较低的基因工程改造的嵌合型抗体。这些抗体具有增加的效应器功能和减少的 HAMA 反应 (Boulianne 等人, *Nature*312:643-646, 1984)。已使用噬菌体展示技术 (McCafferty 等人, *Nature*348:552-554, 1990) 来发展人单克隆抗体,最近以来,已使用携带人 Ig 基因座的转基因小鼠生产完全人单克隆抗体 (Green, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, 1999)。关于单克隆抗体疗法,参见, Brekke 等人, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:52-62, 2002。

[0007] 本发明提供了用 IL-21 增强单克隆抗体疗法的抗肿瘤活性的方法。IL-21 和治疗性单克隆抗体的组合提供了超过单独使用单克隆抗体的改善,尤其适用于对于对单独的单克隆抗体治疗或和其他治疗方案组合的单克隆抗体治疗不产生反应的患者。根据此处的教导,这些和其他用途对于本领域技术人员来说应当是很明显的。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了在受治疗者中,特别是人受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用治疗上有效量的单克隆抗体和治疗上有效量的 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,如 SEQ ID NO:2 中显示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。在一个实施方案中,所述单克隆抗体是抗 CD20 单克隆抗体。在另一实施方案中,单克隆抗体是利妥昔单抗。在另一个实施方案中,本发明的方法治疗非何杰金氏淋巴瘤。本发明的其他实施方案提供了这样的方法,在该方法中,长达连续 8 周每周一次地施用单克隆抗体利妥昔单抗和 IL-21 多肽。在另一个实施方案中,长达连续 8 周,每周一次地施用利妥昔单抗,每周高达 5 次地施用 IL-21 多肽。本发明的另一个实施方案提供了从 10 至 500 μ g/kg/ 剂的 IL-21 多肽剂量。在本发明的某些实施方案中,以前曾用利妥昔单抗治疗患者,但未显示明显的肿瘤减缓或消退。在其他实施方案中,在接受利妥昔单抗治疗后,患者复发疾病。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用治疗上有效量的抗 CD20 单克隆抗体和治疗上有效量的 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,如 SEQ ID NO:2 中显示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。其中,施用 IL-21 导致最佳免疫学应答。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用结合 Her-2/neu 受体的单克隆抗体和 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,如 SEQ ID NO:2 中显示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。在一个实施方案中,受治疗者是人患者。在另一个实施方案中,单克隆抗体是曲妥单抗。

[0012] 本发明的一个方面提供了在受治疗者中治疗癌症的方法,其包括共施用结合细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 的单克隆抗体和 IL-21 多肽或 IL-21 多肽的片段,如 SEQ ID NO:2 中显示的从氨基酸残基 30 至残基 162 的片段。在某些实施方案中,受治疗者是人患者。在本发明的另一实施方案中,以每三周 3mg/kg 的剂量施用抗 CTLA-4 单克隆抗体,进行 4 个循环,和以每周 5 次,长达 8 周地施用 IL-21 多肽或片段。本发明也提供了这样的实施方案,在该实施方案中,IL-21 多肽的剂量是从 10 至 500 μ g/kg/ 剂。

[0013] 附图概述

[0014] 图 1—举例说明去除了巨噬细胞的小鼠显示不同于非去除小鼠的存活曲线。

[0015] 图 2—举例说明通过抗 Gr-1MAb 的注射去除了粒细胞的小鼠,当和非去除小鼠比较时,显示减少的存活率。

[0016] 图 3—举例说明抗 CTLA4+IL21 的组合在 RENCa 模型中具有抗肿瘤效果。

[0017] 发明描述

[0018] 在详细地描述本发明之前,定义下列术语可有助于理解其:

[0019] 此处所用的术语“亲和标签”是指可附着至第二多肽以提供第二多肽的纯化或检测或提供用于第二多肽与底物的附着的位点的多肽片段。原则上,任何可获得其相应的抗体或其他特异性结合试剂的肽或蛋白可用作亲和标签。亲和标签包括多组氨酸片段、A 蛋白 (Nilsson 等人 EMBO J4:10751985; Nilsson 等人 Methods Enzymol, 198:31991)、谷胱甘肽 S 转移酶 (Smith 和 Johnson, Gene67:31, 1988)、Glu-Glu 亲和标签 (Grussenmeyer 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA82:7952-4, 1985)、P 物质、Flag™ 肽 (Hopp 等人, Biotechnology6:1204-10, 1988)、链霉抗生物素蛋白结合性肽或其他抗原表位或结合结构域。一般参见 Ford 等人, Protein Expression and Purification2:95-107, 1991。可

从商业提供商（例如，PharmaciaBiotech, Piscataway, NJ）商购获得编码亲和和标签的 DNA。

[0020] 此处使用的术语“等位基因变体”是指占据相同染色体位点的任何两个或多个可选择的基因的形式。等位基因变异天然地通过突变发生，其可导致群体内的表型多态性。基因突变可以是沉默的（被编码的多肽上未发生改变）或可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。术语等位基因变体此处也可用于表示由基因的等位变体编码的蛋白。

[0021] 此处所用的术语“氨基末端”和“羧基末端”是指多肽内的位置。在上下文允许的情况下，针对多肽的特定序列或部分，这些术语用于表示临近或相对位置。例如，位于多肽内参照序列的羧基末端的某一序列位于靠近该参照序列的羧基端，但不一定位于完整多肽的羧基端。

[0022] 此处所用的术语“癌症”或“癌细胞”是指在赘生物中发现的、具有使其和正常组织或组织细胞区分开的特征的组织或细胞。在这些特征中包括但不限于：退行性变化的程度、形状上的不规则、细胞轮廓的不可分辨性、细胞核大小、细胞核或细胞质的结构上的改变、其他表型改变、预示癌症或前癌状态的细胞蛋白的存在、增加的有丝分裂次数和转移的能力。和“癌症”有关的术语包括癌、肉瘤、肿瘤、上皮癌、白血病、淋巴瘤、息肉，以及硬癌、转化、赘生物等。

[0023] 此处所用的术语“共施用”表示 IL-21 多肽或蛋白和治疗性单克隆抗体可以同时给药或在不同时间给药。共施用也可以是 IL-21 和单克隆抗体的单次共施用或共施用的多个循环。共施用不必只限于给患者施用 IL-21 或单克隆抗体时候，可单独地或和除了 IL-21 以外的治疗剂一起施用药剂。

[0024] 此处所用的术语“组合治疗”是指给受治疗者施用至少一种治疗有效剂量的 IL-21 组分（“IL-21”）和治疗性单克隆抗体。所述 IL-21 组分可以是展示 IL-21 的生物学活性的成熟的多肽、其片段、融合物或缀合物。

[0025] 术语“分离的”，当用于多核苷酸时，是指已将该多核苷酸从其天然遗传背景中取出，从而不含有其他外来或不想要的编码序列，其以适合在经遗传工程改造的蛋白生产系统中使用的形式存在。这样的分离的分子是从其天然环境中分离的分子，包括 cDNA 和基因组克隆。本发明的分离的 DNA 分子不含通常和其相关的其他基因，但可包含天然发生的 5' 和 3' 非翻译区例如启动子和终止子。相关区域的鉴定对于本领域技术人员来说是很明了（参见例如，Dyanan 和 Tijan, *Nature*316:774-78, 1985）。

[0026] “分离的”多肽或蛋白是在除了其天然环境外，例如除了血液和动物组织外的条件下发现的多肽或蛋白。在优选的形式中，分离的多肽基本上不含有其他多肽，特别是动物来源的其他多肽。优选地以高度纯化的形式，即大于 95% 的纯度、更优选地大于 99% 的纯度提供多肽。当用于本说明书中时，术语“分离的”不排除相同的多肽以可选择的物理形式存在，例如以二聚体或可选择地糖基化或衍生的形式存在。

[0027] 术语“水平”，当指免疫细胞，例如 NK 细胞、T 细胞、特别是细胞毒性 T 细胞、B 细胞等时，增加的水平是指增加的细胞数目或增强的细胞功能的活性。

[0028] 术语“水平”，当用于指病毒感染时，是指病毒感染水平上的改变，其包括，但不限于，CTLs 或 NK 细胞（如上面所描述的）的水平上的变化、病毒载量上的减少、增加的抗病毒的抗体的滴度、如通过靶组织或器官的组织学检查所确定的丙氨酸氨基转移酶的血清学水平上的降低或提高。确定这些水平上的改变是否具有显著的差异或改变对本领域技术人

员来说是熟知的。

[0029] 术语“赘生性”，当指细胞时，表示在组织中特别是这样的组织中正进行新的和正常增殖的细胞，在所述组织中，扩增是不受控制的和累进的，从而导致赘生物。所述赘生性细胞可以是恶性的，即侵袭性的和转移性的，或可以是良性的。

[0030] 术语“最佳免疫剂量”定义为获得最佳免疫反应的 IL-21 或 IL-21 和单克隆抗体的剂量。

[0031] 术语“最佳免疫反应”是指在施用 IL-21 或 IL-21+MAb 的组合后，在免疫反应上的改变超过当单独地施用 MAb 时观察到的改变，其可以是 (1) 被激活的或肿瘤特异性 CD8T 细胞的数量上的增加，(2) 表达更高水平的粒酶 B 或穿孔素或 IFN γ 受体的活化的或肿瘤特异性 CD8T 细胞的数量上的增加，(3) NK 细胞、单核细胞或中性粒细胞上的 Fc γ 受体 (CD16、CD32 或 CD64) 的上调，(4) 血清中可溶性 CD25 的增加，(5) 通过肿瘤细胞释放的蛋白例如癌胚抗原 (CEA)、IgG、CA-19-9 或卵巢癌抗原 (CA125) 的血清水平上的减少 (参见，例如，Taro 等人 *J. Cell Physiol* 203(1):1-5, 2005)，(7) 激活性细胞因子例如 IL-18、IL-15、IFN γ 和能够使效应器细胞寻找到肿瘤的趋化因子例如 IP-10、RANTES、IL-8、MIP1a 或 MIP1b 的水平上的增加，(8) 在肿瘤位点外周或其上的被活化的巨噬细胞的数量上的增加，其中可通过增加的 MHC I 型或 II 型的表达，IL-15、IL-18、IFN γ 或 IL-21 的产生来检测激活，或 (9) 通过红细胞计数的下降 (贫血的严重度) 表示的巨噬细胞活性。

[0032] “多核苷酸”是从 5' 至 3' 末端阅读的脱氧核糖核酸或核糖核酸碱基的单链或双链聚合物。多核苷酸包括 RNA 和 DNA，其可从天然来源分离，体外合成，或从天然和合成的分子的组合制备。多核苷酸的大小表示为碱基对 (编写为“bp”)、核苷酸 (“nt”) 或千碱基 (“kb”)。在上下文允许的情况下，后两个术语可描述单链的或双链的多核苷酸。当所述术语用于双链分子时，其用于表示总的长度，理解为和术语“碱基对”的意思相同。本领域技术人员认识到双链多核苷酸的两条链可在长度上稍微不同，其末端可以因为酶的切割而产生交错，因此双链多核苷酸分子内的核苷酸可以不配对。

[0033] “多肽”是由肽键连接的氨基酸残基的多聚体，无论是天然产生的还是合成的。少于大约 10 个氨基酸的多肽通常称为“肽”。

[0034] “蛋白”是包含一个或多个肽链的大分子。蛋白也可包含非肽成分，例如糖基。可通过产生该蛋白的细胞向蛋白加入糖和其他非肽取代物，糖和非肽取代物随细胞的类型不同而不同。此处根据蛋白的氨基酸主链结构来定义蛋白；取代物例如糖基一般不具体指明，但是可以存在。

[0035] 术语“受体”是指这样的细胞结合的蛋白，该蛋白结合生物活性分子 (即，配体) 和介导该配体对细胞的作用。膜结合受体的特征在于包含细胞外配体结合结构域和一般参与信号转导的细胞内效应器结构域的多个肽结构。配体和受体的结合导致受体的构象变化，该变化导致效应器结构域和细胞内的其他分子之间产生相互作用。该相互作用依次导致细胞的代谢上的改变。和受体-配体相互作用关联的代谢事件包括基因的转录、磷酸化、去磷酸化、环 AMP 产量的增加、细胞钙的动员、膜脂的动员、细胞粘附、肌醇脂类的水解和磷脂的水解。一般地，受体可以是膜结合的、存在于细胞溶质或细胞核中的、单体的 (例如，促甲状腺激素受体、 β -肾上腺素能受体) 或多聚体的 (例如，PDGF 受体、生长激素受体、IL-3 受体、GM-CSF 受体、G-CSF 受体、促红细胞生成素受体和 IL-6 受体)。

[0036] 术语“治疗上有有效的量”被定义为这样的 IL-21 组分或 IL-21 组分和单克隆抗体的量,该量导致完全的反应、部分反应、或稳定的疾病,这些反应或稳定的疾病具有增加的超过在无 IL-21 的情况下单克隆抗体疗法的中等反应持续时间的进程时间。

[0037] 术语“肿瘤相关抗原”是指具有不同于非肿瘤细胞中发现的抗原的表达特征谱的肽或多肽或肽复合物。例如,和非肿瘤细胞相比,肿瘤细胞可以更高的频率或密度表达非肿瘤抗原。肿瘤抗原可在结构上与非肿瘤抗原不同,例如,肿瘤抗原可作为截短的多肽表达,在编码该抗原的氨基酸序列或多核苷酸序列上具有一些突变,翻译后错误折叠或不正确修饰。和存在于宿主生物中的正常的、非肿瘤细胞上的抗原相似,其可使肿瘤细胞逃避宿主免疫监视机制。

[0038] 通过不精确分析方法(例如,凝胶电泳)确定的多聚体的分子量和长度应理解为近似值。当这样的值表示为“大约”X 或“近似”X 时,所述的 X 值要理解为精确值 $\pm 10\%$ 。

[0039] 此处引用的所有文献以其全文在此引用作为参考。

[0040] 本发明基于这样的发现,即 IL-21 和治疗性单克隆抗体的一起施用导致比单独施用单克隆抗体更有效的抗肿瘤活性。

[0041] A. IL-21 的描述。

[0042] 人 IL-21 (SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2) 最初被称为 zalpha11 配体,在共同拥有的美国专利号 6,307,024 和 6,686,178 中对其进行了描述,该专利在此引用作为参考。在共同拥有的 WIPO 公开号 W00/17235 和 W001/77171 中描述了 IL-21 受体,(以前称为 zalpha11) 现称为 IL-21R (SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6)、异二聚体受体 IL-21R/IL-2R γ , 该文献在此引用作为参考。如在这些出版物中所描述的,IL-21 分离自从激活的用 CD3 筛选的人外周血细胞 (hPBCs) 产生的 cDNA 文库。CD3 是对于淋巴来源的细胞特别是 T 细胞是独特的细胞表面标志物。

[0043] IL-21R 的氨基酸序列显示被编码的受体属于 I 类细胞因子受体亚家族,该家族包括,但不限于,IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、EPO、TPO、GM-CSF 和 G-CSF 的受体(综述参见, Cosman, “The Hematopoietin Receptor Superfamily” in *Cytokine* 5(2):95-106, 1993)。已在 NK 细胞、T 细胞和 B 细胞上鉴定了 IL-21 受体,这表明 IL-21 对造血谱系细胞特别是淋巴祖细胞和淋巴样细胞起作用。其他已知的对淋巴样细胞起作用的四-螺旋-束(four-helical-bundle)的细胞因子包括 IL-2、IL-4、IL-7 和 IL-15。关于四-螺旋-束细胞因子,参见, Nicola 等人, *Advances in Protein Chemistry* 52:1-65, 1999 和 Kelso, A., *Immunol. Cell Biol.* 76:300-317, 1998。

[0044] 对于 IL-21,分泌信号序列由氨基酸残基 1 (Met) 至 29 (Ser) 组成,成熟的多肽由氨基酸残基 30 (Gln) 至 162 (Ser) (如 SEQ ID NO:2 中所示) 组成。对应的多核苷酸序列示于 SEQ ID NO:1 中。本领域技术人员承认 SEQ ID NO:1 中公开的序列代表人 IL-21 的单个等位基因,预期可发生等位基因变异和可变剪接。

[0045] 本发明也提供了具有和 SEQ ID NO:2 的多肽或其直向同源物基本上相似的序列同一性的分离的 IL-21 多肽。术语“基本上相似的序列同一性”此处是指多肽包含和 SEQ ID NO:2 中显示的序列或其直向同源物至少 80%、至少 90%、至少 95% 或大于 95% 的序列同一性。本发明也包括包含这样的氨基酸序列的多肽,该氨基酸序列和 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 1 至 162 或 30 至 162 的序列具有至少 80%、至少 90%、至少 95% 或超过 95% 的序列同一性。本

发明还包括编码这些多肽的核酸分子。用于确定同一性百分比的方法对本领域技术人员来说是已知的。

[0046] 一般地,当设计针对分子的修饰或鉴定特异性片段时,通过对经修饰的分子的活性的评估来进行结构确定。关于 IL-21 多核苷酸和多肽的修饰的详细描述,参见,美国专利号 6,307,024 和 6,686,178,在此引用其作为参考。

[0047] 本发明也包括施用具有 IL-21 的功能活性的分子。因此,本发明包括施用 IL-21 多肽的功能性片段和经功能性修饰的多肽以及编码这些功能性片段和经修饰的多肽的核酸分子。此处定义的“功能性”IL-21 或其片段的特征在于其增殖或分化活性,在于其诱导或抑制特化的细胞功能的能力,特别是对于免疫效应器细胞例如 NK 细胞、T 细胞、B 细胞和树突细胞。功能性 IL-21 也包括展现体内或体外抗癌和抗病毒作用的能力,或特异性结合抗 IL-21 的抗体或 IL-21 受体(可溶性的或被固定的)的能力。

[0048] 也可使用各种多肽融合物(和相关的包含一种或多种多肽融合物的多聚体蛋白)。例如,可将 IL-21 多肽与二聚化蛋白制备为融合物,如美国专利号 5,155,027 和 5,567,584 中所公开的。在该方面,优选的二聚化蛋白包含免疫球蛋白的恒定区结构域。可在经遗传工程改造的细胞中表达免疫球蛋白-IL-21 多肽融合物(以产生各种多聚体 IL-21 类似物)。可将辅助结构域融合至 IL-21 多肽以将其靶向特定的细胞、组织或大分子。例如,可将 IL-21 多肽或蛋白靶向预先确定的细胞类型,通过将 IL-21 多肽融合至这样的配体或单克隆抗体来将 IL-21 多肽靶向预先确定的细胞类型,所述配体或单克隆抗体特异性地结合该靶细胞的表面上的受体。这样,为了治疗或诊断目的,可靶向多肽或蛋白。可将 IL-21 多肽融合至两个或更多个部分,例如用于纯化的亲和和标签和靶向性结构域。多肽融合物也可包含一个或多个切割位点,特别是在结构域之间。参见, Tuan 等人, Connective Tissue Research 34:1-9, 1996。

[0049] 不论变体 IL-21 多核苷酸的特定的核苷酸序列如何,该多核苷酸编码这样的多肽,该多肽的特征在于其增殖或分化活性,在于其诱导或抑制特化的细胞功能的能力,或在于特异性结合抗 IL-21 的抗体或 IL-21 受体的能力。更明确地,变体 IL-21 多核苷酸编码这样的多肽,该多肽表现至少 50%,在某些实施方案中,大于 70%、80% 或 90% 的 SEQ ID NO:2 中显示的多肽的活性。

[0050] 对于任何 IL-21 多肽,包括变体和融合蛋白,本领域技术人员可容易地使用遗传密码子和本领域内已知的方法产生完全简并的编码该变体的多核苷酸序列。

[0051] 根据常规技术可在经遗传工程改造的宿主细胞中生产用于本发明的 IL-21 多肽。合适的宿主细胞是可用外源 DNA 转化或转染和在培养物中培养的细胞类型,包括细菌、真菌细胞和培养的高等真核细胞。真核细胞,特别是多细胞生物的培养细胞是优选的。用于操作克隆的 DNA 分子和将外源 DNA 导入各种宿主细胞的技术公开于 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 和 Ausubel 等人, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987。用于产生 IL-21 的表达构建体和方法描述于美国专利号 6,686,178 和 PCT US03/39764,在此引用作为参考。

[0052] 用于治疗 IL-21 缀合物包含药物可接受的水溶性聚合物部分。合适的水溶性聚合物包括聚乙二醇 (PEG)、单甲氧基-PEG、单-(C1-C10) 烷氧基-PEG、芳氧基-PEG、

聚-(N-乙烯基吡咯烷酮) PEG、三氟乙磺酰单甲氧 PEG、PEG 丙醛、二琥珀酰亚胺碳酸 PEG、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化的多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇、葡聚糖、纤维素或其他基于糖类的聚合物。合适的 PEG 可具有从大约 600 至大约 60,000 的分子量,包括,例如,5,000、12,000、20,000 和 25,000。IL-21 缀合物也可包含这些水溶性聚合物的混合物。

[0053] B. 在组合疗法中使用 IL-21 和单克隆抗体。

[0054] 和单克隆抗体疗法的抗肿瘤活性相关的一个机制是抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。在 ADCC 中,单克隆抗体结合靶细胞(例如,癌细胞)和表达该单克隆抗体受体的特异性效应器细胞(例如,NK 细胞、单核细胞和粒细胞)结合单克隆抗体/靶细胞复合物导致靶细胞死亡。IL-21 增强效应器细胞功能,从而增加单克隆抗体治疗的功效。和 MAbs 组合的 IL-21 的施用剂量和方案基于 IL-21 提高这样的参数的能力,所述参数和介导 ADCC 的细胞群体的分化和功能活性关联,所述细胞包括但不限于 NK 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞。可使用 NK、巨噬细胞和中性粒细胞的细胞毒性、ADCC (NK 细胞级分或总的单核细胞、或细胞进行 ADCC 的能力所需的效应器分子(例如, FasL、粒酶和穿孔素))的测定法估计这些参数。当和 MAb+ 肿瘤细胞组合时,IL-21 也通过 NK 细胞增加细胞因子(例如 IFN γ) 和趋化因子的产量。也已证明 Kupffer 细胞“清除”利妥昔单抗包被的 B 细胞的重要性 (Gong 等人, J. Immunol. 174:817-826, 2005)。和抗肿瘤活性相关的另一个机制是 MAb 包被的肿瘤细胞的吞噬作用。这也是 Fc 受体依赖性的,已显示影响通过抗 CD20 的抗体进行的 B 细胞去除 (Uchida 等人 J. Exp. Med. 199 (12):1659-69, 2004)。MAbs 的剂量和给药方案基于归于共施用的特定抗体的药物动力学和毒性动力学特征,应当最优化这些效果,同时使任何可能和 IL-21 施用相关的毒性降至最低。

[0055] 基于此处详细描述的有关于利妥昔单抗和曲妥单抗的结果,当 IL-21 和利用免疫效应器细胞介导的抗肿瘤活性的机制的其他单克隆抗体一起使用时,所述单克隆抗体的抗肿瘤活性也得到了增强。此外,因为 IL-21 增强免疫效应器细胞介导的抗肿瘤活性,某些单独使用时具有有限的抗肿瘤功效的单克隆抗体将成为用于和 IL-21 一起使用的组合疗法的优良候选者。

[0056] 当第一线治疗失败时,可使用 IL-21 和单克隆抗体的组合疗法,可将其当作第二线疗法。然而,基于和单克隆抗体组合的 IL-21 的增强的抗肿瘤活性,本发明也提供了使用该组合作为患者群体中的第一线疗法,所述患者群体是最新被诊断的并且是以前未接受过抗癌药治疗的“新患者 (de novo patients)”和以前未接受过任何单克隆抗体治疗的“未曾服药的患者 (naïve patients)”。

[0057] 在任何直接的抗体介导的肿瘤细胞的 ADCC 不存在的情况下,也可将 IL-21 和单克隆抗体一起用于组合疗法。在免疫系统中阻断抑制信号的抗体可导致提高的免疫应答。示例包括 (1) 抗 B7R 家族的分子例如细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4)、编程性死亡-1 (PD-1)、B 和 T 淋巴细胞衰减子 (BTLA) 的抗体,该家族分子具有抑制性功能;(2) 抗抑制性细胞因子如 IL-10、TGF β 的抗体;和 (3) 去除或抑制抑制性细胞的功能的抗体如抗 CD25 或 CTLA-4。例如,据认为小鼠和人中的抗 CTLA4mAbs 都抑制免疫抑制性调节 T 细胞 (Tregs) 的功能或抑制抑制性信号,该信号通过 T 细胞上的 CTLA-4 和 APCs 或肿瘤细胞上的 B7-1 或 B7-2 分子结合来传递。CTLA-4 在被激活的 T 细胞表面短暂表达而在 Treg 细胞上

组成型地表达。交联 CTLA-4 导致对激活的 T 细胞的抑制性信号,抗 CTLA-4 的抗体阻断对 T 细胞的抑制性信号,从而导致持续的 T 细胞活化 (Phan 等人,PNAS, 100:8372-8377, 2003.)。在小鼠模型中,抗 CTLA4 治疗导致被激活的肿瘤特异性 CD8T 细胞和 NK 细胞的数目增加,从而导致有效的抗肿瘤反应。IL-21 的受体 (IL-21R) 在这些效应器细胞上表达,IL-21 可通过 IL-21R 激活这些效应器细胞来进一步增强其效应器功能。这可以导致更有效的抗肿瘤活性。正在黑色素瘤、卵巢癌和前列腺癌中进行这样的临床试验,在该试验中,给患者施用抗 CTLA-4 的阻断性抗体。然而,功效和一系列副作用相关联 (参见,US2004/0241169),产生更低毒性治疗的组合疗法是有利的。

[0058] 表 1 是经批准或经检验可能和 IL-21 一起用于组合疗法的单克隆抗体的非排它性目录。

[0059] Table1

[0060]

靶	药物名称	临床适应症	公司
IL-2R α (CD25)	赛尼哌	肾移植	Roche
IL-1R	AMG108	骨关节炎	Amgen
RANK-L	AMG162	骨质疏松	Amgen
Blys	LympoSTAT-B	SLE, RA	HGS
CD40L (CD39)	initiatedAID	Celltech/IDEC	
TRAIL-R1	HGS-ETR1	癌症	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	实体瘤	HGS
CD30	SGN30	Hodgkins, NHL	Seattle Genetics
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	Herceptin	乳腺癌	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CRC, NSCLC, RCC	Abgenix
	EMD72000	实体瘤	Merck
	MDX-214	EGF-R-阳性肿瘤	Medarex
	Erbix	CRC	Imclone
VEGF-R	CDP791	实体瘤	Celltech
PDGF-R	CDP860	实体瘤	Celltech/ZymoGenetics
CD11a (α L)	Raptiva	牛皮癣	Genentech
α 4-整合蛋白	Antegrin	CD, MS	PDL, Biogen-IDEC
α 4 β 7 整合蛋白	MLM02	CD, UC	Millenium
α 5 β 3 整合蛋白	Vitaxin	牛皮癣、前列腺癌	AME/Lilly
CD2 (LFA3/Fc)	Amevive	牛皮癣	Biogen-IDEC
CD152	CTLA-4/Ig	RA	Bristol Meyers
CD152	CTLA-4	癌症	Medarex
CD49a	Integrin α 1	RA/Lupus	Biogen-IDEC

[0061]

CD49e	Integrin $\alpha 5$	癌症	Protein Design Labs
MUC1			Theragyn
MUC18 (TIM 样)	ABX-MA1	黑色素瘤	
TAG-72 粘蛋白	Anatumomab	癌症	
CD3	Ecromeximab	黑色素瘤	Kyowa Hakko
	TRX4	I 型 IDDM	TolerRx
	Nuvion	UC	PDL
	OrthoClone0KT3	器官移植	Ortho biotech
CD4	HuMax-CD4	T-细胞淋巴瘤	GenMab
CD19	MT103	NHL	Medimmune
CD64 (Fc GR1)	AntiCD64	癌症	Medarex
SIGLECs:			
CD33	MyloTarg	AML	Celltech/Wyeth
	ZAmyl	AML	Protein Design Labs
CD22	lymphocide	NHL, AID	Immunomedics
CEA	CEA-Cide	癌症	Immunomedics
CD20	Rituxan	NHL	Genentech
CD52	Campath	MS, NHL, T 细胞淋巴瘤	Genzyme, IDEX
CD44	Bivatuzumab	癌症	Boehringer Ingelheim
CD23 (Fc Ep R)	IDEC152	过敏性哮喘, 鼻炎	Biogen/IDEC
LRR:			
CD14	ICOSIC14	脓毒症	ICOS
EpCAM	Panorex	结肠直肠癌	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	癌症	Seattle Genetics
CD80	B7.1	牛皮癣/NHL	Biogen/IDEC

[0062] 1. IL-21 和抗 CD20 单克隆抗体

[0063] CD20 是人 B 淋巴细胞限制的分化抗原,其作为 B 细胞表面抗原 Bp35 (35kD 蛋白) 表达。CD20 发现于外周 B 细胞,可在浆细胞阶段之前在成熟 B 细胞中鉴定其 (Reff 等人, *Blood*83:435-445, 1994)。抗 CD20 单克隆抗体 (MAbs) 已在临床中接受检验,已批准至少一种人源化的抗 CD20MAb 即利妥昔单抗用于治疗非何杰金淋巴瘤 (NHL)。利妥昔单抗(**RITUXAN®**)结合淋巴瘤细胞,可在体外直接诱导编程性死亡,同时也能诱导各种效应器机制例如补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (Shan 等人, *Blood*91:1644-1652, 1998)。利妥昔单抗通常用作 NHL 的第一线治疗 (Maloney 等人, *Blood*90:2188-2195, 1997; 美国专利号 5,736,137)。

[0064] 利妥昔单抗是用鼠类轻链和重链可变区和人 γ I 重链和 κ 轻链恒定区通过基因

工程制备的 MAb (U. S. Patent 6, 455, 043)。嵌合型抗体由 2 条 451 个氨基酸的重链和 2 条 213 个氨基酸的轻链组成,其具有大约 145kD 的分子量。在临床前实验中,抗体抑制 B 细胞系 FL-18、Ramos 和 Raji 中的细胞生长和以剂量依赖性方式在 DHL-4 人 B 细胞淋巴瘤细胞系中诱导编程性死亡 (Demidem 等人 Cancer Biotherapy&Radiopharmaceuticals 12:177-186, 1997)。已显示 MAb 在血清中具有相对长的半衰期并且毒性特征谱相对较低。

[0065] 然而,相当大的患者群体是不顺从的或在用抗 CD20 抗体治疗一段时间后变得具有抵抗性,甚至在和其他疗法例如骨髓或干细胞移植、放射疗法和化疗法结合治疗时也如此。这些患者一般在施用抗 CD20 抗体后未表现出可感觉到的肿瘤的减缓或消退,其可从可增强对该抗体的反应性的新疗法中获得益处。此外,增强的抗肿瘤活性也有益于这样的患者群体,所述患者群体是新诊断的和以前从未接受抗癌药治疗的“新患者 (de novo patients)”和以前未接受过任何单克隆抗体治疗的“未曾服药的患者 (naïve patient)”。

[0066] 如前面所提到的,已显示 IL-21 增加 NK 细胞的数目和加强 NK 细胞和 T 细胞的细胞毒功效。此外,已在单核细胞、树突细胞、B 细胞、T 细胞和 NK 细胞上鉴定了 IL-21 的受体 (Parrish-Novak 等人, J. Leuk. Biol. 72:856-863, 2002)。其他的证据已显示 IL-21 在体内影响 T 细胞和 B 细胞的增殖和 / 或分化。可将许多人 B 细胞肿瘤细胞系移植入 SCID 小鼠中并以局部或散布的方式生长。在这些模型中,肿瘤生长的测量或宿主小鼠的存活时间提供了用于评估有效的抗 B 细胞瘤的治疗功效的方法 (Bonnefoix 等人, Leukemia and Lymphoma 25:169-178, 1997)。

[0067] 当抗体通过基于免疫的细胞 (包括 NK 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞) 产生的 ADCC 介导抗肿瘤效应时,被这些抗体复合物结合的癌细胞被免疫效应器细胞杀死。部分因为 IL-21 的免疫调节活性的原因, IL-21 可用于增强抗体疗法的功效。就何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤的治疗使用 IL-2、IL-12 或 IFN- α 调查了利妥昔单抗和细胞因子的组合疗法 (Keilholz 等人, Leuk. Lymphoma 35:641-2, 1999; Ansell 等人, Blood 99:67-74, 2002; Carson 等人, Eur. J. Immunol. 31:3016-25, 2001; 和 Sacchi 等人, Haematologica 86:951-8, 2001)。

[0068] 基于 IL-21 激活和分化 ADCC 的效应器特别是 NK 细胞的能力,进行将 IL-21 和抗体组合并确定细胞因子产量、细胞毒性和肿瘤清除的体内和体外研究。体外研究测定细胞因子的产量,在暴露于 IL-21 和抗体后,肿瘤细胞被人 NK 细胞裂解。例如,可使用从外周血白细胞分离的 NK 细胞估量肿瘤细胞裂解。用钙黄绿素 AM 或 ^{51}Cr 加载人 B 细胞淋巴瘤细胞系例如 DOHH2、Raji 或 Ramos,将其暴露于 IL-21 进行 1-7 天,测量 NK 细胞介导的细胞裂解。另一种测定法测量细胞因子的产量。在这些测定法中,一般将纯化的 NK 细胞暴露于 IL-21,和用附着至板的 IgG 进行体外培养。测量这些细胞因子如 INF- γ 、TNF- α 和 IL-10 的存在。可在实施例部分找到这些种类的测定法的详细描述。此处教授了在肿瘤攻击后,监控小鼠的存活的体内研究。其他可能的体内研究的参数可包括体重的减轻、肿瘤团块的减小或后肢麻痹 (HLP) 的减轻。如在实施例部分详细显示的,这些实验的结果表明利妥昔单抗和 IL-21 的组合的抗 CD20+B 细胞肿瘤的抗肿瘤活性高于单独的利妥昔单抗或 IL-21 的抗肿瘤活性。在另外的动物模型包括灵长类动物模型中的其他实验提供了 IL-21 增强利妥昔单抗介导的功效的其他证据,所述实验是在淋巴瘤患者中检验所述组合的基础。

[0069] 包括 B 细胞、T 细胞、NK 细胞和树突细胞和其祖细胞的淋巴细胞具有包括迁移至和移出各种淋巴和非淋巴组织的生命周期。据认为所有淋巴细胞从存在于骨髓中的多能淋巴祖细胞发育成熟而来。原初淋巴细胞在血液和二级淋巴组织之间循环直至细胞死亡,或被抗原激活。当 B 或 T 细胞被抗原激活时,被激活的细胞再循环至血液。有证据显示趋化因子在淋巴细胞的运输过程中起着重要的作用。据认为特定趋化因子例如 CXCR3 的表达促进了恶性 B 细胞从一个位点至另一个位点的运输,从而在 B 细胞淋巴瘤迁移至外周血、淋巴节、骨髓和其他器官中起作用 (Trentin 等人, J. of Clinical Invest. 104:115-121, 1999.)。已显示利妥昔单抗清除 B 细胞在外周血和外周淋巴节中的存在 (Reff 等人 Blood 83:435-445, 1994), 驱动 CD20+ 细胞进入这些组织的试剂的施用提供了使以前难以到达的恶性细胞对利妥昔单抗介导的杀伤更易感的机制。已显示 IL-21 具有直接和间接的对 B 细胞的作用 (Parrish-Novak 等人, J. Leukoc. Biol. 72:856-863, 2002; Mehta 等人, J. Immunol 170:4111-4118, 2003; Ozaki 等人, J. Immunol. 173:5361-5371, 2004.), 并且已知 IL-21 在某些免疫细胞中影响成熟过程 (Sivakumar 等人, Immunol. 112:177-182, 2004.)。

[0070] 此处公开的实验描述了本发明的发现,即 IL-21 的施用最初减少循环性 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞,然后在下一个循环周期前,所述细胞持续地增加和分解。淋巴细胞减少和淋巴样滤泡清除的快速逆转可理解为和增加的从淋巴组织至血液的再循环结合的激活的淋巴细胞的短暂迁移。当施用 IL-21 和利妥昔单抗时,外周 B 细胞的增加减少了,相应地观察到比当单独地施用 IL-21 或利妥昔单抗时观察到的 B 细胞最低值更低的 B 细胞最低值。因此,IL-21 增强了通过利妥昔单抗减少 B 细胞的效能,从而促进了对清除易感的 B 细胞的再循环。此外,IL-21 的施用导致增强的 ADCC 活性,当进行 ADCC 测定时,存在增加的 NK 细胞和表达 Fc γ RI 和 Fc γ RIII 的吞噬细胞的数量。

[0071] 已显示中性粒细胞对异种 B 淋巴瘤模型中的利妥昔单抗的抗肿瘤活性非常重要 (Hernandez-Ilizaliturri Clin. Cancer Res. 9(16Pt. 1):5866-73, 2003)。粒细胞在 mIL-21+ 利妥昔单抗的抗肿瘤活性中的作用通过使用抗 GR-1MAb 进行清除来显示。如实施例 10 中所描述的,用 Raji 细胞攻击去除粒细胞的或非去除的 SCID 小鼠组,然后用单独的利妥昔单抗或用利妥昔单抗和 mIL-21 进行处理。粒细胞的清除减少了单独用利妥昔单抗和用利妥昔单抗加 mIL-21 处理的 SCID 小鼠的存活率。比较用组合疗法治疗的组,对于去除了粒细胞的动物,125 天后存活的比例从 0.67 减少至 0.0。然而,粒细胞的去除不完全消除 IL-21 加利妥昔单抗的存活益处,因为相对载体对照组,平均死亡时间 (TTD) 的显著延迟是很明显的。

[0072] 近来已显示巨噬细胞表达 IL-21 受体 (Pelletier 等人 J. Immunol 173(12):7521-30 2004) 并在通过抗 CD20MAbs 的 B 细胞清除中发挥作用 (Uchida 等人 J. Exp. Med. 199(12):1659-69, 2004)。使用氯膦酸脂质体在 SCID 小鼠中去除巨噬细胞,在散布型的 Raji 淋巴瘤模型中检验 IL-21 和利妥昔单抗。使用氯膦酸脂质体在肝脏中消除了 95% 的 F4/80⁺ 细胞,在脾脏的红髓中消除了 90% 的 F4/80⁺ 细胞。在注射 Raji 细胞后 3 天除去巨噬细胞,通过反复的氯膦酸脂质体注射保持巨噬细胞清除直至肿瘤细胞注射后至少 27 天。巨噬细胞的清除也降低 mIL-21+ 利妥昔单抗的功效。对于氯膦酸脂质体处理的组,平均 TTD 显著减少。当和对应的非去除小鼠组相比,单独用利妥昔单抗处理的去除

巨噬细胞的 SCID 小鼠的平均存活时间也急剧下降。

[0073] 如其他人所报道的 (Hernandez-Ilizaliturri, *ibid.* 2003), 用抗 Gr-1 去除中性粒细胞显著地降低了单独的利妥昔单抗的功效, 实验显示其将用 IL-21+ 利妥昔单抗处理后的小鼠存活比例从 0.67 下降至 0.0。IL-21 可直接作用影响小鼠中性粒细胞, 该细胞依次可吞噬肿瘤细胞, 影响 ADCC 或产生细胞毒性氧中间物。但 IL-21 对中性粒细胞的直接作用没有受到人中性粒细胞的研究 (Pelletier, 同上) 的支持, 在该研究中, 没有检测到 IL-21R α , IL-21 不调节中性粒细胞反应, 所述反应包括过氧化物的产生、吞噬作用、趋化性和细胞因子的产生。相反地, 这些作者发现 IL-21 通过人巨噬细胞诱导 IL-8 的产生, 其可导致中性粒细胞趋化性和活化。然而, 当进行支持本发明的实验时, 使用氯膦酸脂质体进行的巨噬细胞的去除只导致由 IL-21 和利妥昔单抗的组合展示的协同抗肿瘤活性的部分丧失。这些结果暗示着在 SCID 小鼠中, 中性粒细胞和巨噬细胞在使用组合治疗的情况下在延长存活上起作用。最近的使用抗 CD20MAbs 去除正常 B 细胞的研究 (Uchida 等人, 同上) 也显示小鼠巨噬细胞是所需的主要效应器细胞, NK 细胞不是必需的, 然而, 在该研究中没有研究中性粒细胞。

[0074] 这些发现证明了 IL-21 和利妥昔单抗的组合在异种 B 淋巴瘤模型中具有协同的抗肿瘤活性, 证明先天性免疫效应器细胞帮助介导 IL-21 和利妥昔单抗的协同效应。这些结果表明在 SCID 小鼠中, 在使用组合疗法的情况下, 中性粒细胞和巨噬细胞在延长存活时间上起作用。IL-21 提高利妥昔单抗对 NHL 的抗肿瘤活性, IL-21 对巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞和淋巴瘤肿瘤的作用自身提高了对利妥昔单抗治疗的反应。

[0075] 因此本发明提供了通过在患者中施用 IL-21 和利妥昔单抗来治疗患有淋巴瘤的患者的方法, 在所述患者中, 恶性细胞从组织中的释放是利妥昔单抗介导的抗肿瘤活性所必需的。此外, 在利妥昔单抗存在于患者的外周血的同时保持 IL-21 的水平的给药方案是有利的, 该方案属于本发明。在某些实施方案中, 本发明提供了在需要其的患者中治疗淋巴瘤的方法, 其包括在确定利妥昔单抗存在于患者的外周血的治疗期间施用 IL-21。在另一个实施方案中, 本发明提供了在需要其的患者中治疗淋巴瘤的方法, 其包括在该患者接受利妥昔单抗治疗的同时每周施用 IL-21 一至三次。

[0076] 最常使用的非何杰金氏淋巴瘤分类是 REAL 分类系统 (Ottensmeier, Chemico-Biological Interactions 135-136:653-664, 2001)。已鉴定了用于淋巴瘤分类的特异性免疫标志物。例如, 滤泡性淋巴瘤标志物包括 CD20+、CD3-、CD10+、CD5-; 小淋巴细胞淋巴瘤标志物包括 CD20+、CD3-、CD10-、CD5+、CD23+; 缘带 B 细胞淋巴瘤 (marginal zone B cell lymphoma) 标志物包括 CD20+、CD3-、CD10-、CD23-; 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤标志物包括 CD20+、CD3-; 套细胞淋巴瘤标志物包括 CD20+、CD3-、CD10-、CD5+、CD23+; 外周 T 细胞淋巴瘤标志物包括 CD20-、CD3+; 原发性纵隔大 B 细胞淋巴瘤 (primary mediastinal large B cell lymphoma) 标志物包括 CD20+、CD3-; 原淋巴细胞淋巴瘤标志物包括 CD20-、CD3+、Tdt+; 伯基特淋巴瘤标志物包括 CD20+、CD3-、CD10+、CD5- (Decision Resources, Non-Hodgkins Lymphoma, Waltham, MA., Feb. 2002)。

[0077] International Working Formulation 提供的非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 的临床分类法将疾病分为亚型: (1) 低级 (无痛) 疾病, 其包括小淋巴细胞的, 对应于慢性淋巴细胞性白血病 (SC); 滤泡的, 主要是小卵裂细胞 (FSC); 滤泡的, 混合型小卵裂细胞和大细

胞 (FM) ; (2) 中级疾病, 其包括滤泡的, 主要是大细胞 (FL) ; 弥漫性的小卵裂细胞 (DSC) ; 弥散性混合型小细胞和大细胞 (DM) ; 弥散性大卵裂或非卵裂细胞 (DL) ; 和 (3) 高级疾病, 其包括成免疫细胞的, 大细胞 (I BL) ; 原淋巴细胞的曲折核细胞或非曲折核细胞 (LL) ; 小非卵裂细胞, 伯基特或非伯基特细胞 (SNC; (The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer 49(10):2112-35, 1982)。一般使用 Ann Arbor staging 系统对患有 NHL 的患者进行分类。I 期表示涉及单个淋巴结区域或区域性涉及单个淋巴外器官或位置。II 期表示涉及在隔膜同侧的两个或多个淋巴结区域或区域性涉及核外位置或器官和在隔膜同侧的一个或多个淋巴结区域。III 期是指涉及在隔膜两侧的淋巴结区域, 可能伴随区域性涉及核外器官或位置。IV 期是指弥散性或散布性涉及一个或多个远距离的核外器官的伴随或不伴随涉及相关的淋巴结 ("Lymphoidneoplasms" In: American Joint Committee on Cancer. :AJCC Cancer Staging Manual. 第 6 版, New York, NY: Springer, 2002, pp393-406)。已显示利妥昔单抗在治疗无痛和滤泡性淋巴瘤上是有效的 (Boye 等人, Annals of Oncol. 14:520-535, 2003)。

[0078] 可在体内测量 IL-21 和抗 CD20 抗体对产生自人血液恶性肿瘤的肿瘤细胞的生长和扩散的活性。已发展了几个小鼠模型, 在所述小鼠模型中, 人肿瘤细胞被移植入免疫缺陷性小鼠 (一起被称为异种移植模型) ; 参见, 例如, Cattani 等人, Leuk. Res. 18:513-22, 1994 和 Flavell, Hematological Oncology 14:67-82, 1996。疾病模型的特征随被转移至小鼠的细胞的种类和数量的不同而不同, 在本领域已知几种疾病模型。例如, 可使用本领域技术人员已知的模型, 用 MAbs 和 IL-21 治疗在 SCID 小鼠中生长和扩散的人 B 细胞淋巴瘤 (例如 RL, Raji, TU2C) 以延长存活时间。关于示例性模型, 参见, Funakoshi 等人, J. Immunotherapy 19:93-101, 1996; Funakoshi 等人, Blood 83:2787-94, 1994; Cattani 等人, Leukemia Res. 18:513-522, 1994。可选择地, 可移植小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞系 (A20, BCL, A31) 和用 MAbs 和 IL-21 对其进行治疗以延长存活时间 (French 等人, Nat. Medicine 5:548-553, 1999; Tutt 等人, J. Immunol. 161:3176-3183, 1998)。在一个模型中, 将肿瘤细胞 (例如 Raji 细胞 (ATCC No. CCL-86)) 培养传代, 将大约 1×10^6 个细胞经静脉内途径注射入严重的合并型免疫缺陷 (SCID) 小鼠。这些肿瘤细胞在动物体内快速繁殖, 可发现其在血液中循环和移居至许多器官系统。通过给带肿瘤细胞的小鼠施用 IL-21 和 MAbs 来检验这样的疗法, 该疗法经设计使用 IL-21 和抗 CD20MAbs 来杀死或减少肿瘤细胞生长。测量治疗的功效, 以一段时间内在受治疗的群体中增加的存活率来在统计学上评估治疗的功效。也可使用熟知的方法例如流式细胞仪 (或 PCR) 在一段时间内来监控肿瘤负荷, 对存在于外周血样品中的肿瘤细胞的数目进行定量。

[0079] 可用于证明使用 IL-21 和抗 CD20MAbs 的组合疗法的功效的模型包括去除 B 细胞的非人灵长类动物模型。例如, 通过用载体、0.05mg/kg 或 10.0mg/kg 利妥昔单抗处理短尾猴 (*Cynomolgus monkey*), 各种 B 细胞 CD20、CD40 和 CD21 群体经鉴定在研究抗 CD20 治疗剂上非常有用 (Vugmeyster 等人, Internat. Immunol. 3:1477-1481, 2003)。

[0080] 无痛疾病的利妥昔单抗疗法通常由 4 次每周一次 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 的输注组成。开始时的输注率是 $50\text{mg}/\text{hr}$, 然后以每 30 分钟 50mg 的增率逐渐增加至 $400\text{mg}/\text{hr}$ 的最大值 (McLaughlin 等人, Clinical Oncol. 16:2825-2833, 1998)。然而, 已显示 8 周的延长治疗在治疗难治愈的或复发性的低级 NHL 或滤泡性 NHL 上具有一定的功效 (Piro 等人, Ann.

Oncol. 10:619-621, 1999)。

[0081] 使用多种方法为 IL-21 和抗 CD20MAb 组合疗法建立最佳剂量水平和给药方案,包括组合的药物动力学和药物代谢动力学、人 B 细胞淋巴瘤细胞系和原发性淋巴瘤样品在体外对 IL-21 和抗 CD20MAbs 的组合的敏感性、动物模型中有效的剂量以及组合的毒性。可在灵长类动物中进行直接的药物动力学测量。此外,IL-21 和抗 CD20MAb 刺激各种正常淋巴细胞内的反应,这样,可在正常的动物模型中测量临床功效。另外,可使用替代标志在患者中测量 IL-21 和抗 CD20MAb 的组合对效应器细胞的生物学活性。替代标志包括,但不限于,B 细胞群体的显著减少,NK 细胞群体的增加,单核细胞 / 巨噬细胞的激活,FcRIII 的增加、在抗 -CD20 抗体存在的情况下 NK 或 T 细胞对 CD20+ 细胞的毒性的增加。替代标志作为功效的指示剂是有价值的,因为治疗性肿瘤反应例如存活时间的增加可能需要数月至数年的时间确定。

[0082] 使用研究安全性和有效性的临床研究验证使用 IL-21 和利妥昔单抗的组合的淋巴瘤例如 NHL 或慢性原淋巴细胞白血病 (CLL) 的治疗。首先,在第 I 阶段研究中验证安全性,该研究阶段是剂量的开放标签 (open-label) 研究,在该研究中逐渐增加剂量直至最大耐受剂量 (MTD) 或最佳免疫剂量被确定。最佳免疫剂量被鉴定为获得最佳免疫反应的 IL-21 的剂量或 IL-21+ 单克隆抗体的剂量。最佳免疫反应是指在施用 IL-21 或 IL-21+MAb 组合后的免疫反应上的变化,该变化超过单独施用 MAb 时观察到的免疫反应上的变化,可如此处所描述的,测量最佳免疫反应。

[0083] 最初的第 I 阶段研究的参与者是患有复发性或难治愈的 CD20+NHL 的受治疗者。在标准的 3+3 剂量增加方案中,在 3 至 6 个受治疗者的群体中估量剂量的增加。在第 4 周结束前就任何剂量限制性毒性 (DLT) 的发生评估由 3 个受治疗者组成的组。在 DLT 不存在的情况下,剂量增加。如果观察到 3 个受治疗者中的一个具有剂量限制性毒性,那么在该剂量水平上招募另外 3 个受治疗者。如果在给定的组中超过 1 个受治疗者经历了剂量限制性毒性,那么减少剂量,以安全监察委员会 (Safety Monitoring Committee) (SMC) 确定的中等剂量治疗 3 个受治疗者。剂量可以在引起 DLT 的剂量和下一个较低的剂量之间。如果 3 个受治疗者中在中等剂量上没有 1 个经历 DLT,那么停止招募,该中等剂量被称为 MTD。如果 3 个受治疗者中 ≥ 1 个在中等剂量上经历 DLT,那么停止招募,低于该剂量的剂量水平称为 MTD。

[0084] 每周一次连续 4 或 8 周以 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 经静脉内 (IV) 途径给受治疗者施用利妥昔单抗。通过 IV、肌肉 (IM) 或皮下 (SC) 施途径注射提供 IL-21。以至少 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 给第一组施用,剂量以逐步的方式逐渐增加至 MTD 或最佳免疫剂量,例如从 3-10、10-100、100-300、300-500、500-900 和增加至高达 $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$,从每周一次增加至每周 5 次。本发明提供了 IL-21 组合物,其中各剂量在大约 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围内。在某些实施方案中,IL-21 的剂量在 10 至 $300\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内。

[0085] 使用肿瘤反应评估主要的临床活性。为评估抗肿瘤反应,使用例如针对非何杰金氏淋巴瘤的 International Workshop to Standardize Response Criteria (Cheson 等人, J. Clin. Oncol. 17:1244-1253, 1999) 在第 4、8 和 12 周进行再分期。IL-21 的药物代谢动力学标志用作临床活性的第二指标。

[0086] 使用不良事件和标准安全实验室评估来评价安全性。进行抗 IL-21 的抗体的血清

分析以确定免疫原性。

[0087] 使用 Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 第 3 版(日期为 2003 年 12 月 12 日)将剂量限制性毒性定义为下列的任一种：

[0088] • 可能或明确地和研究试剂相关的任何第 4 级或第 5 级不良事件

[0089] • 非血液方面第 3 级不良事件,所述事件可能或明确地涉及研究试剂,但是排除那些与少于 7 天持续时间的淋巴细胞减少、肿瘤发红、发烧、不适或无生命威胁的第 3 级实验室异常相关的。

[0090] 在 II 期和 III 期临床研究中进一步评估功效和安全性。在这些研究中,可表征另外的药物动力学、药物代谢动力学、遗传药理学(pharmacogenetics)、药物基因组学、免疫原性。根据针对非何杰金氏淋巴瘤的 International Workshop to Standardize Response Criteria(Cheson 等人,同上)和根据管理指南确定第一终点(primary endpoint)。第二终点可包括不良事件的发生率和严重度、进程的时间、完全反应者的复发的时间、总存活数和针对 IL-21 的任何抗体的发生率。研究可以是随机的、对臂研究(two-arm study),该研究在不能耐受或不接受化学疗法的患者中比较利妥昔单抗单一疗法和利妥昔单抗和 IL-21 的组合疗法。受治疗者将接受连接 4 周或 8 周、每周一次的经静脉内(IV)途径施用 375mg/m² 利妥昔单抗。以在同一天相继输注的方式经静脉内或皮下途径施用 IL-21,给药长达连续 5 天,IL-21 的剂量在 1-3、3-10、10-100、100-300、300-500、500-900 和高达 1000 μ g/kg 的范围之内。可选择地,可进行随机的三臂研究,使用试验设计的类似标准来评估 IL-21 和利妥昔单抗的组合对单独的 IL-21 对单独的利妥昔单抗的安全性和有效性。临床试验设计对于本领域技术人员来说是熟知的,由食品与药品管理局(FDA)提供指导,例如在 FDA Oncology Tools 网址上提供指导。

[0091] 在 IFN- γ 产物的细胞毒性和增殖性方面(Parrish-Novak 等人,J. Leuk. Biol. 72:856-863(2002)), IL-21 和 IL-15 或 IL-2 在体外对 NK 细胞的影响上表现出协同作用。然而,高剂量的 IL-2 治疗是高度毒性的并且需要悉心的住院治疗。已对许多 IL-2 的低剂量方案进行了检验,发现具有更好的耐受性,但只显示很低的抗肿瘤功效(Atkins, Semin. Oncol. 29(3Suppl. 7):12, 2002)。W003/049694 中描述了 IL-2 和利妥昔单抗的组合疗法,其中以更高的“起始”剂量施用 IL-2,然后以一种或更多种更低的“维持”剂量施用 IL-2。对 IL-2 的继续给药的需要基于维持比正常水平更高的 NK 细胞水平,但由于 IL-2 的毒性的原因,可要求其中不施用 IL-2 的休息期。抗 CD20MAbs 和 IL-2 和 IL-21 的组合的施用可维持 NK 细胞和允许 IL-2 的更低剂量或更少频率的给药。当已施用 IL-21 时,没有显示在高剂量 IL-2 的情况下看到的某些副作用。例如,当在报道的在小鼠中导致血管渗漏综合征的 IL-2 的剂量和给药方案下给小鼠施用 IL-21 时,不存在血管渗漏综合征。结果清楚地显示 IL-21 不会在小鼠中引起和基于相等质量的 rIL-2 剂量相关的细胞因子释放和血管炎(Heipel 等人,Blood 102(11):No. 2845, 2003)。因此,低剂量 IL-2 和 IL-21 以及抗 CD20MAbs 的组合可具有临床用途的原因在于其增强了低剂量 IL-2 的免疫系统刺激而不产生由更高的 IL-2 剂量造成的某些副作用。

[0092] 使用本发明的方法施用 IL-21 和抗 CD20MAbs 例如利妥昔单抗的组合,将导致抗肿瘤效应,也称作肿瘤抑制作用。评估对 NHL 的治疗的反應的标准指导方针对本领域技术人员来说是熟知的。Cheson 等人,J. of Clinical Oncol. 17:1244-1253, 1999 中描述了示例

性的成套统一标准。国际工作小组(The International Working Group)提出了反应测量的建议和定义。表 2 概述了反应标准。

[0093] 表 2

[0094]

反应分类	身体检查	淋巴结	淋巴结质量	骨髓
完全反应 (CR)	正常	正常	正常	正常
未证实的完全反应 (CRu)	正常	正常	正常	不确定
部分反应 (PR)	正常	正常	正常	阳性
PR	正常	≥50% 减少	≥50% 减少	不相关
PR	肝脏/脾脏的减少	≥50% 减少	≥50% 减少	不相关
复发/ 进展	扩大的肝/脾脏; 新位点	新的或增加的	新的或增加的	复发

[0095] 也可使用替代标志指示增强的抗肿瘤活性。例如,血清中酶的变化和活组织检查可显示肿瘤负荷的减少。

[0096] 可用作抗肿瘤作用的替代标志的生物学活性的一个量度是在这样的水平上的 NK 细胞水平的维持,在该水平上,NK 细胞增强抗 CD20MAb 的抗肿瘤作用 (Friedberg 等人, Br. J. Hematol. 117:828-834, 2002)。另一种替代是 T 细胞数量的增加 (Parrish-Novak 等人, 同上, 2002)。特别地, T 细胞亚群的增加的数量已和增加的细胞毒性活性或抗肿瘤效应关联。可用作抗肿瘤作用的替代的生物学活性的另一种量度是 B 细胞的去除 (Reff 等人, Blood 83:435-445, 1994)。

[0097] 2. IL-21 和抗 Her-2/neu 单克隆抗体在组合疗法中的应用

[0098] Her-2/neu 基因产物是 185kDa、和表皮生长因子受体关联的磷酸糖蛋白。Her-2/neu 用作生长因子受体,其通常由肿瘤例如乳腺癌、卵巢癌和肺癌表达。Her-2/neu 受体在 25-30% 的人乳腺癌中过量表达 (Slamon 等人 Science 235:177-182, 1987; Slamon 等人, Science 244:707-712, 1989), 并和这些患者中的预后不良相关。

[0099] 有许多靶向 Her-2/neu 的单克隆抗体,但 **HERCEPTIN®**, 即曲妥单抗 (Genentech, Inc., San Francisco, CA) 的商品名,是目前唯一经批准用于治疗 Her-2/neu 阳性癌症患者的治疗剂。在许多正常细胞类型中发现少量 Her-2/neu,癌细胞已改变表达,导致过量表达、与癌症细胞表型相关的增加的细胞增殖和分化。然而,使用曲妥单抗的成功的治疗要求 Her-2/neu 的表达是高度过量表达。可使用经固定的和经免疫组织学染色的活组织检查样品来确定 Her-2/neu 的表达水平。这些种类的测定法在本领域是熟知的,其包括使用 4D5 单克隆抗体 (LabCorp, Research Triangle Park, NC)、**HerceptTest®** (DAKO, Glostrup, Denmark) 和 Vysis PathVysion™HER-2 DNA Probe 试剂盒 (Fujisawa Healthcare, Inc., North Deerfield, IL) 的免疫组织化学评估。Her-2/neu 的水平一般是

0(正常)至3+,已显示曲妥单抗疗法对具有2+或更高表达水平的患者是有效的。

[0100] 已证明(例如,实施例6)IL-21在体外和体内模型中都促进免疫效应器T细胞和NK细胞中的裂解活性,所述模型使用表达更高或更低的Her-2/neu受体水平的人乳腺癌细胞系。IL-21介导的增强的效应器功能导致即使在癌细胞表达更低Her-2/neu受体的水平时,曲妥单抗疗法仍然有效。例如,用IL-21和曲妥单抗治疗的具有1+或2+过量表达水平的患者将是接受治疗的候选者,该治疗为以前未接受治疗的患者群体提供了有价值的疗法。可使用负荷Her-2/neu表达性鼠癌的小鼠检验IL-21和抗Her-2/neu MAbs的组合(Penichet, 等人, Lab Anim. Sci. 49:179-188, 1999)。

[0101] 尽管各方案在定义肿瘤反应评估法上可能存在差异,但可在 Clinical Research Associates Manual, Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, October 6, 1998, updated August 1999 中发现示例性指导方针。根据 CRA Manual(参见,第7章“Response Assessment”),肿瘤反应是指所有可测量的病灶或转移的减少或消除。如果疾病包含二维的可测量的病灶,该病灶具有通过医学照片或X射线、计算机控制轴向断层扫描术(CT)、磁共振成像(MRI)或触诊明确确定的边界,那么该疾病一般被认为是可测量的。可估值的疾病是指疾病包含在一维上可测量的病灶、具有模糊界定的边界的肿块、两条直径都小于0.5cm的病灶、在扫描中任一直径小于切口之间距离的病灶、直径小于2cm的可触诊的病灶、或骨病。不可估值的疾病包括胸腔积液、腹水和通过间接证据证明的疾病。以前照射的、没有发展的病灶通常也被认为是不可估值的。

[0102] 确定实体癌反应的方案需要客观状态的标准。代表性的标准包括下列:(1)完全反应(CR),定义为所有可测量的和可估值的疾病的完全消失。无新的病灶。无疾病相关症状。无不可估值的疾病的证据;(2)部分反应(PR),定义为在所有可测量的病灶的垂直直径的乘积的和上和基线相比,大于或等于50%的减少。无可估值的疾病进展。无新的病灶。用于具有至少一种可测量的病灶的患者;(3)进展,定义为在可测量的病灶的乘积的和上超过使用和基线中所用的技术相同的技术观察到的最小的和50%或10cm²的增加、或任何可估值的疾病的明显恶化、或任何已消失的病灶的复发、或任何新的病灶的出现、或由于死亡或恶化状况(除非与该癌症无关)导致的不能对评估作出回答(return);(4)稳定的或无反应性,定义为不符合CR、PR或进展的状况。(参见, Clinical Research Associates Manual, 同上)

[0103] 通过下列非限定性实施例进一步举例说明本发明。

实施例

[0104] 实施例1

[0105] IL-21 增强抗体依赖性NK细胞活性

[0106] A.

[0107] 获取外周血,通过菲可离心(ficoll centrifugation)制备单核细胞(MNC'S)。使用StemSep™ Human NK Cell Stem Cell Technologies(Vancouver, British Columbia) human NK cell negative enrichment 试剂盒,通过负富集从MNC群体中纯化天然杀伤(NK)细胞。简而言之,用谱系特异性抗体(不包括NK谱系)标记MNC,依次对其进行磁性标记。然后将标记的MNC通过磁柱,其中标记的细胞被保留,而非标记的NK细胞则流过磁柱。

[0108] 以 5×10^5 细胞/mL 的密度将 NK 细胞涂板, 在 α MEM/10% 自体血清 /50 μ M β - 巯基乙醇和 0、1、10 或 100ng/mL hIL-21 (A794F) 或 10ng/mL IL-12 (阳性对照) 中培养 3 天, 所有事件都在 Fc 刺激存在或不存在的条件下进行。通过在 37°C 将 100 μ g/mL PBS 中的 hIgG 涂板在塑料板上进行 1 小时, 然后除去 PBS/ 抗体溶液, 将 NK 培养在该表面来提供 Fc 刺激。在 3 天培养期后, 收集上清液。使用 BD OptEIA human IFN- γ ELISA 试剂盒 (BD Biosciences, San Jose, CA) 对上清液中的 IFN- γ 进行定量。以直方图的形式绘制结果, 表示为每样品 ng/mL IFN- γ 。

[0109] 在 Fc 刺激存在的条件下, IL-21 在 IFN- γ 产量上产生剂量依赖性增加。在本实验中受试 L-21 的最大剂量 (100ng/mL) 上, 存在超过背景大约 18 倍的增加。在 Fc 刺激不存在的情况下, 在 IL-21 存在的情况下, IFN- γ 的产量没有增加。

[0110] B.

[0111] 通过白细胞分离法从捐献计划 (donor program) 中获得外周血白细胞。通过菲可离心从血液成分部分清除的血液 (apheresed blood) 制备单核细胞 (MNC's)。使用 Stem Cell Technologies human NK cell negative enrichment 试剂盒, 通过负富集作用从 MNC 群体纯化天然杀伤 (NK) 细胞。简而言之, 用谱系特异性抗体 (不包括 NK 谱系) 标记 MNC, 依次对其进行磁性标记。然后将标记的 MNC 通过磁柱, 其中标记的细胞被保留, 而非标记的 NK 细胞则流过磁柱。

[0112] 在 0.2、1、5、25 或 100ng/mL 人 IL-21 存在或不存在的条件下, 以 1×10^6 /mL 的密度将 NK 细胞涂板并在 α MEM/10% 热失活的人 AB 血清 /50 μ M β - 巯基乙醇 /ITS (Invitrogen GibcoBRL, Carlsbad, CA) /150 μ g/mL 补充的转铁蛋白 /5mg/mL BSA 中培养 1、2、4、6 或 7 天。在各培养期结束时, 收获 NK 细胞, 洗涤细胞、对细胞计数, 使用淋巴瘤细胞系 (Ramos, CRL1596, American Type Culture Collection, Manassas, VA) 作为细胞裂解靶, 将 NK 细胞置于抗体依赖性细胞毒性裂解 (ADCC) 测定中。测定前, 通过在 37°C 下在含有 5%FBS (HBSSF) 和 10 μ M 钙黄绿素 AM (Molecular Probes, cat no C1430) 的 Hanks 缓冲盐溶液 (不含 Ca 或 Mg) 中温育 60 分钟来标记靶细胞。靶细胞吸收了荧光染料 (钙黄绿素 AM) 并在细胞质中将其转变成活性荧光染料, 该染料只在细胞裂解后才从细胞中释放。裂解的细胞将荧光染料释放入上清液中, 然后收获上清液, 在荧光计中对荧光进行定量。在不同量的 NK 细胞 (效应器) 存在或不存在的条件下温育 3 小时后, 根据存在于上清液中的荧光量计算出细胞裂解的百分比。为进行 ADCC 测定法, 使用未加入抗体的靶、靶和 1 μ g/mL 无关的 IgG、或靶和 1 μ g/mL 利妥昔单抗。

[0113] 检验 2 个供体。将供体 A NK 细胞培养在 0、1、5、25 或 100ng/mL 人 IL-21 中, 时间点为第 1、2、3、4 和 7 天。将供体 B NK 细胞培养在 0、0.2、1、5 或 25ng/mL 人 IL-21 中, 时间点为第 1、2、3、4、6 和 7 天。当和无关的 IgG 对照相比, 在利妥昔单抗存在的条件下, 在两个供体中都存在抗靶细胞的细胞裂解活性的增强 (3-10 倍)。当在测定前在 IL-21 存在的条件下培养 NK 细胞时, 细胞裂解活性上的该增强获得进一步增加 (2-10 倍)。

[0114] 但供体 A 培养物显示, 在受试 IL-21 的剂量中 (1、5、25 或 100ng/mL), 除了第 7 天 (1ng/mL IL-21 NK 培养物具有显著低于其他剂量的 ADCC 增强活性) 外, 在 ADCC 的增加上没有显著差异。但供体 B 培养物显示, 在第 4 天以前 (和继续通过剩余的时间点) 在受试 IL-21 的剂量中 (0.2、1、5 或 25ng/mL), 在 ADCC 的增强上没有显著差异, 但是在第 4 天, 包

含 0.2ng/mL IL-21 的培养物具有显著低于其他受试 IL-21 剂量的 ADCC 增强活性。在所有受试时间点上,两个供体都显示了 IL-21ADCC 的增强,相对于无关的 IgG,最大增强出现在第 6 或第 7 天。

[0115] C.

[0116] 如实施例 1A 中所述从捐赠计划中获得外周血。以 $8.1-11 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度将 NK 细胞涂板,在 20ng/mL 人 IL-21 存在或不存在的条件下,在 α MEM/10% 自体血清 /50 μ M β 巯基乙醇中培养 3 天。在培养期结束时,收获 NK 细胞,洗涤细胞、对细胞计数,将 NK 细胞用于抗体依赖性细胞毒性裂解 (ADCC) 测定法,使用淋巴瘤细胞系 DOHH2 (Kluin-Nelemans, H. C 等人 *Leukemia* 5:221-224 1991; Drexler, H. G. 等人 *DSMZ Catalogue of Cell Lines*, 第 7 版, Braunschweig, Germany, 1999) 作为细胞裂解靶。在测定前,通过在 37°C 下在含有 5% FBS (HBSSF) 和 25 μ M 钙黄绿素 AM (Molecular Probes) 的 Hanks 缓冲盐溶液中温育 30 分钟来标记 DOHH2 细胞。靶细胞吸收了荧光染料 (钙黄绿素 AM) 并通过细胞质将其转变成活性荧光染料,该染料只在细胞裂解后才从细胞释放。裂解的细胞将荧光染料释放入上清液中,然后收获上清液,在荧光计中对荧光的量进行定量。在不同量的 NK 细胞 (效应器) 存在或不存在的条件下温育 3 小时后,根据存在于上清液中的荧光量计算细胞裂解的百分比。为进行 ADCC 测定法,使用未加入抗体的靶、靶和 2 μ g/mL 无关的 IgG、或靶和 0.002、0.02、0.2 或 2 μ g/mL 利妥昔单抗。

[0117] 结果产生自两个供体,表示为效应器:靶 (E:T) 比例和裂解百分比。当和未加入抗体的或加入无关的 IgG 对照相比,在 2 μ g/mL 利妥昔单抗存在的条件下,在两个供体中,抗 DOHH2 细胞的细胞毒性活性得到明显增强 (在 E:T=3 时,6-11 倍)。在 2 μ g/mL 和 0.2 μ g/mL 下,利妥昔单抗的增强作用相同,在 0.02 μ g/mL 时,在最高的受试 E:T (4 或 6) 下,增强开始减少,在 0.002 μ g/mL 时,在所有受试 E:T 下,增强显著更低。当 NK 细胞在细胞裂解测定前,在 IL-21 存在的条件下培养 3 天,利妥昔单抗依赖性细胞裂解活性的增强作用在所有受试利妥昔单抗剂量上获得增加 (在 E:T=3 时超过利妥昔单抗增加的活性 1.5-3 倍)。

[0118] 实施例 2

[0119] IL-21 在人 NK 细胞中上调粒酶 B 的表达

[0120] 使用磁珠分离试剂盒 (Miltenyi Biotech, CA),通过负选择从经 Ficoll-Paque 纯化的单核细胞中分离人 NK 细胞。然后单独地在培养基中或在 20ng/mL 人 IL-21 存在的条件下在培养基中培养纯化的 NK 细胞。收获细胞、洗涤细胞,然后用表面标志物对细胞进行染色。在表面标志物染色后,洗涤细胞,然后用 Cytofix/Cytoperm™ 缓冲液 (BD Biosciences, San Jose, CA) 透化细胞 20 分钟。然后用 Perm/Wash 缓冲液中的 APC 标记的抗人粒酶 B 抗体或同种型对照抗体 (Caltag, Burlingame, CA) 对细胞进行染色。洗涤细胞,然后在 FACSCalibur™ 流式细胞仪上读数。使用 Cellquest™ 软件 (BD Biosciences) 分析数据。

[0121] 图 1 显示,在 IL-21 存在的条件下温育人 NK 导致在粒酶 B (NK 细胞杀伤的重要介导者) 的表达上产生巨大的增加。这表明,通过上调粒酶 B, IL-21 增强了 NK 细胞杀死其靶细胞的能力。

[0122] 实施例 3

[0123] IL-21+ 利妥昔单抗增加了用 HS Sul tan 淋巴瘤细胞注射的小鼠的存活率

[0124] 进行研究以评估在这样的 CB-17SCID 小鼠中,肿瘤的生长是否被延缓,所述小鼠是用 HS-Sultan 细胞注射的、经利妥昔单抗、小鼠 IL-21(mIL-21) 或 mIL-21 和利妥昔单抗的组合处理的小鼠。设计研究以表征各处理组中负荷 HS-Sultan 的小鼠的存活率。

[0125] 所述实验方案和本领域已知的实验方案(参见,Cattan 等人 *Leuk Res.* 18(7):513-522, 1994;Ozaki 等人, *Blood* 90(8):3179-86, 1997) 相似。给 CD17-SCID 小鼠施用 20 μ g 的利妥昔单抗(每 4 天给一次药,总共 5 次注射)、100 μ g mIL-21(进行 5 天给药)或通过腹膜内途径注射施用利妥昔单抗和 mIL-21 的组合(每次处理给药 5 次)。

[0126] 就濒死或非存活的病症例如麻痹或快速体重减轻监控小鼠。在研究期间,每周两次采集体重。记录所有小鼠的存活时间,通过绘制卡普兰-迈耶存活曲线和计算对数秩统计量(log rank statistics)(Statview, SAS Institute, Cary, NC) 来比较处理组之间的存活时间。

[0127] 使用下列组:

[0128] 组 1(n=10) 从第 1 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0129] 组 2(n=10) 从第 3 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0130] 组 3(n=10) 从第 6 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0131] 组 4(n=10) 第 1-5 天,通过腹膜内途径施用载体对照(PBS)。

[0132] 组 5(n=10) 从第 1 天开始,每天通过腹膜内途径施用 100 μ g mIL-21,进行 5 天。

[0133] 组 6(n=10) 从第 1 天开始,每天施用 100 μ g mIL-21,进行 5 天,从第 3 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0134] 将小鼠(雌性, C. B-17SC ID, 9 周大小;Harlan, Madison, WI) 分成 6 组。在第 0 天,从培养物中收获 HS-Sultan 细胞(ATCC No. CRL-1484),通过尾静脉,将其经静脉内途径注射入所有小鼠(每只小鼠 1,000,000 细胞)。然后使用上面的处理组描述中所描述的剂量和给药方案用利妥昔单抗、mIL-21 或这两种试剂的组合处理小鼠。以 0.1mL 的体积通过腹膜内注射进行所有处理。

[0135] 在用利妥昔单抗处理的小鼠的组中,当在第 1 天或第 3 天而不是第 6 天开始给药时,观察到显著的存活益处。单独的鼠类 IL-21 没有给荷瘤小鼠提供存活益处。用 mIL-21(100ug/天,第 1-5 天)和利妥昔单抗(20ug/天,第 3、7、11、15、19 天)的组合处理的小鼠具有高度显著的存活益处($P < 0.0001$,和载体对照相比, $P < 0.02$;和第 3 天开始的利妥昔单抗相比;Log rank 检验)。在研究的第 120 天,和只施用利妥昔单抗的组中的 20% 的累积存活率相比,mIL-21+ 利妥昔单抗组中的累积存活率为 70%。

[0136] 实施例 4

[0137] IL-21+ 利妥昔单抗增加用 Raji 肿瘤细胞注射的小鼠的存活率

[0138] 进行研究以评估在这样的 CD-17SCID 小鼠中,肿瘤生长是否被延缓,所述小鼠是用 Raji 细胞注射的、经利妥昔单抗、mIL-21 或 mIL-21 和利妥昔单抗的组合处理的小鼠。设计研究以表征各处理组中负荷 Raji 的小鼠的存活率。

[0139] 实验方案描述于实施例 3 中。

[0140] 使用下列组:

[0141] 组 1(n=8) 第 3-7 天,通过腹膜内途径施用载体对照 PBS。

[0142] 组 2(n=8) 从第 1 天开始,每天通过腹膜途径施用 100 μ g mIL-21,进行 5 天。

[0143] 组 3(n=8) 从第 3 天开始,每天 100 μ g mIL-21,进行 5 天。

[0144] 组 4(n=9) 从第 3 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0145] 组 5(n=9) 从第 5 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0146] 组 6(n=9) 从第 1 天开始,每天经腹膜内途径注射 100 μ g mIL-21,从第 3 天开始,每隔 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0147] 组 7(n=9) 从第 3 天开始,每天经腹膜内途径注射 100 μ g mIL-21,进行 5 天,从第 5 天开始,每 4 天 20 μ g 利妥昔单抗,总共 5 次注射。

[0148] 将小鼠(雌性,C.B-17SCID,9 周大小;Harlan, Madison, WI) 分成 7 组。在第 0 天,从培养物中收获 Raji 细胞(ATCC No. CCL-86),通过尾静脉将其经静脉内途径注射入所有小鼠(每只小鼠 1,000,000 细胞)。然后使用上面的处理组描述中所描述的剂量和给药方案用利妥昔单抗、mIL-21 或这两种试剂的组合处理小鼠。以 0.1mL 的体积通过腹膜内注射进行所有处理。

[0149] 在用利妥昔单抗处理的小鼠的组中,当在第 3 天或第 5 天开始给药时,观察到显著的存活益处。单独的鼠类 IL-21 没有给荷瘤小鼠提供存活益处。用 mIL-21(100ug/天,第 3-7 天)和利妥昔单抗(20ug/天,第 5、9、13、17、21 天)的组合处理的小鼠具有高度显著的存活益处($P<0.0001$,和载体对照相比; $P<0.03$,和第 5 天开始的利妥昔单抗相比;Logrank 检验)。在研究的第 100 天,和只施用利妥昔单抗的组中的 10% 的累积存活率相比,mIL-21+利妥昔单抗组中累积存活率为 55%。

[0150] 实施例 5

[0151] 非人灵长类动物中的 IL-21+ 利妥昔单抗研究

[0152] 通过静脉内途径给由 3 只雄性短尾猴组成的组群共施用利妥昔单抗和 rIL-21,进行由每个给药周期 1 周组成的 3 个给药周期。在给药的第 2 个周和第 3 个周之间有 1 周没有给药。在各给药周期的第 1 天施用利妥昔单抗,从各给药周期的第 1 天开始,施用 rIL-21,进行 3 天。给药的例外是用对照药品 0.9% 氯化钠给药的对照组,只用利妥昔单抗给组 3 给药,组 2 只接受 rIL-21。只在各给药周期的第 1 天用 rIL-21 给组 5 给药,然而总的周剂量和接受 rIL-21 的其他组的剂量相等。用 rIL-21 经皮下而不是经静脉内给组 7 给药。在第 3 个给药周期期间没有给组 4 给药;在第 10 天接受最后的给药。对于所有其他组,最后的给药是在第 24 天。使用静脉内注射,注射入头部静脉、隐静脉或其他合适的静脉;皮下注射,注射入肩胛区域或其他合适的位点来给动物施药。

[0153] 表 3

[0154] 研究日程表和组

[0155]

组	处理	途径	剂量水平 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	剂量体积 ^b (mL/kg)	给药时间
<u>1</u>	<u>对照品</u>	<u>IV</u>	<u>0.0</u>	<u>0.0</u>	<u>3.0</u> <u>0.5</u>	<u>1, 8, 22</u> <u>2, 3, 9, 10, 23, 24</u>
<u>2</u>	<u>rIL-21</u> <u>对照品</u>	<u>IV</u>	<u>0.5</u> <u>0.0</u>	<u>1.0</u> <u>0.0</u>	<u>0.5</u> <u>2.5</u>	<u>1-3, 8-10, 22-24</u> <u>1, 8, 22</u>
<u>3</u>	<u>对照品</u> <u>Rituxan^c</u>	<u>IV</u>	<u>0.0</u> <u>0.05</u>	<u>0.0</u> <u>0.1</u>	<u>0.5</u> <u>0.5</u>	<u>1-3, 8-10, 22-24</u> <u>1, 8, 22</u>
<u>4</u>	<u>rIL-21</u> <u>Rituxan</u>	<u>IV</u> <u>IV</u>	<u>0.5</u> <u>10</u>	<u>1.0</u> <u>4.0</u>	<u>0.5</u> <u>2.5</u>	<u>1-3, 8-10</u> <u>1, 8</u>
<u>5</u>	<u>rIL-21</u> <u>对照品</u> <u>Rituxan^c</u>	<u>IV</u> <u>IV</u> <u>IV</u>	<u>1.5</u> <u>0</u> <u>0.05</u>	<u>3.0</u> <u>0.0</u> <u>0.1</u>	<u>0.5</u> <u>0.5</u> <u>0.5</u>	<u>1, 8, 22</u> <u>2, 3, 9, 10, 23, 24</u> <u>1, 8, 22</u>
<u>6</u>	<u>rIL-21</u> <u>Rituxan^c</u>	<u>IV</u> <u>IV</u>	<u>0.5</u> <u>0.05</u>	<u>1.0</u> <u>0.1</u>	<u>0.5</u> <u>0.5</u>	<u>1-3, 8-10, 22-24</u> <u>1, 8, 22</u>
<u>7</u>	<u>rIL-21</u> <u>Rituxan^c</u>	<u>SC</u> <u>IV</u>	<u>0.5</u> <u>0.05</u>	<u>3.0</u> <u>0.1</u>	<u>0.17</u> <u>0.5</u>	<u>1-3, 8-10, 22-24</u> <u>1, 8, 22</u>

[0156] ^a 在使用 rIL-21 和 Rituxan 共施用的组中, 在 rIL-21 之前施用 Rituxan。

[0157] ^b 基于最近的体重计算单个动物的给药体积(mL)。将剂量体积四舍五入至注射器的下一个稍大的读数。

[0158] ^c 施用 Rituxan 剂量后, 再用 3.0ml/kg 的盐水冲洗。

[0159] 使用流式细胞仪分析外周血细胞亚型。在第 8 天的适应期间一次, 在第 1、8 和 22 天给药前和给药后 6 小时, 将大约 1.3ml 收集的血液置于用 EDTA-2K 处理的管中。在第 3、10 和 24 天采集给药前的样品。在第 7、14、17 和 42 天采集样本一次。将大约 0.5ml 的样品等分以用于血液学分析, 剩下的样品保持在室温下直至进行流式细胞仪分析。

[0160] 在第 8 和第 4 天的适应期, 将大约 2.0ml 全血收集入装有肝素锂的管中。也在第 3、10、22 和 24 天给药之前收集样品, 和在第 7 天和第 14 天采集样本一次。将样品贮存在室温下直至进行流式细胞仪分析和 ADCC 活性分析。

[0161] 表 4

[0162]

抗原标志物	鉴定的细胞类型
CD45/CD20/CD21/CD40	CD45 ⁺ /CD20 ⁻ /CD21 ⁺ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ⁺ /CD21 ⁻ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ⁺ /CD21 ⁺ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{high} B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{high} /CD21 ⁻ /CD40 ⁻ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{high} /CD21 ⁻ /CD40 ⁺ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{high} /CD21 ⁺ /CD40 ⁺ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{low} B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{low} /CD21 ⁻ /CD40 ⁺ B 细胞 CD45 ⁺ /CD20 ^{low} /CD21 ⁺ /CD40 ⁺ B 细胞
CD45/CD14/CD16/CD64	CD45 ⁺ /CD14 ⁻ /CD16 ⁺ 天然杀伤细胞 CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD16 ⁻ 单核细胞 CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD16 ⁺ 单核细胞 CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD64 ⁻ 单核细胞 CD45 ⁺ /CD14 ⁺ /CD64 ⁺ 单核细胞 CD45 ⁺ /CD64 ⁻ 粒细胞 CD45 ⁺ /CD64 ⁺ 粒细胞
CD45/CD3/CD8/CD11b + 11c	CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁻ T 辅助细胞 CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺ T 细胞毒性细胞 CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD8 ⁺ NK 细胞 CD45 ⁺ /CD14 ⁻ /CD16 ⁺ NK 细胞 All CD45 ⁺ /CD11b + 11c ^{dim} 细胞 All CD45 ⁺ /CD11b + 11c ^{bright} 细胞 CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD11b + 11c ^{dim} 细胞 CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD11b + 11c ^{bright} 细胞 CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD11b + 11c ^{neg} 细胞

[0163] IL-21 处理对循环的白细胞的表型和数量具有明显的作用。在用 IL-21 处理后很短的时间内,所有淋巴细胞群体减少。B 细胞比 T 细胞和 N 细胞恢复更快。在给药后 4-6 天, T 细胞恢复至基线水平,在第二轮 IL-21 处理后 4-6 天, T 辅助细胞稍微提高。NK 细胞在所有组中都降低,只在给药周期之间部分恢复。在 IL-21 处理后,循环的单核细胞的数量增加,单核细胞和粒细胞都增加 Fc 受体的表达。

[0164] A. 淋巴细胞效应

[0165] 利妥昔单抗的亚临床剂量在给药的 6 小时内将循环的 B 细胞的数量减少至最低值,比基线下降 70%。单独使用 rIL-21 的处理一开始减少循环的 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞,然后在第二次给药周期之前,持续地增加和溶解。基于淋巴细胞减少的快速逆转和以前的使用 rIL-21 的淋巴样滤泡去除的观察资料,该效应解释为增加的从淋巴组织至血液的循环和激活的淋巴细胞的短暂迁移(margination)。外周 B 细胞的增加在用 rIL-21 和利妥昔单抗处理的动物中大大减少,相对于单独用利妥昔单抗或 rIL-21 处理的组,观察到相应的

更低的 B 细胞最低值。利妥昔单抗处理不改变由 rIL-21 诱导的其他淋巴细胞亚型中的变化。

[0166]

表 5
外周血中的 CD201ow B 细胞 (每 u1 计数)

处理	Day -8	Day 1	Day 1.25	Day 3	Day 7	Day 8	Day 8.25	Day 10	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.25	Day 24	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42
对照	918	605	1183	855	620	791	1285	965	805	863	1145	1240	838	777	815	882	739
对照	1545	980	1464	1416	1035	934	1999	1233	1050	1099	1027	1507	1235	1151	1202	947	909
对照	1044	876	1648	1182	1179	807	1827	1145	1275	1046	888	1732	1161	897	1053	1205	944
IL-21 0.5 mg/kg	677	650	461	598	1043	731	292	1241	871	835	507	231	307	717	553	380	426
IL-21 0.5 mg/kg	3159	2254	1684	3418	9268	4208	2136	9414	8355	5929	3887	1235	4702	7469	3657	3214	4338
IL-21 0.5 mg/kg	1310	1107	858	1486	4748	2378	1176	5343	6210	4139	1970	769	1562	4227	3122	2298	2292
Ritux 0.05 mg/kg	549	599	369	449	441	325	227	305	331	397	390	669	394	634	381	534	419
Ritux 0.05 mg/kg	2150	1892	657	1459	1993	1872	648	1580	1830	1810	1965	1572	1757	2133	1949	1820	1446
Ritux 0.05 mg/kg	1430	1103	879	936	920	893	407	617	648	861	1015	1127	834	1160	1103	818	657
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	687	407	36	9	4	3	2	0	2	2	2	2	1	7	15	2	5
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	1214	1116	69	5	1	1	1	2	1	6	12	3	3	9	59	102	182
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	2072	1846	157	17	2	4	3	0	0	3	12	12	12	110	192	564	707
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 0.05 mg/kg	597	603	283	356	1578	1386	14	511	646	488	512	169	222	699	564	546	540
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 0.05 mg/kg	897	782	331	1375	1622	1247	49	1393	944	661	540	148	726	468	354	798	706
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 0.05 mg/kg		729	134	565	1560	1779	9	533	780	745	669	148	812	1119	845	902	928

[0167]

表6
外周血中的CD20high B细胞 (每ul计数)

处理	Day -8	Day 1	Day 1.25	Day 3	Day 7	Day 8.25	Day 10	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.25	Day 24	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42
对照	509	408	493	447	491	607	440	425	386	393	594	423	430	387	496	523
对照	2243	1808	1705	1764	1938	2594	1624	1482	1510	1529	1662	1578	1461	1542	1645	1626
对照	1414	1245	1384	1190	1438	1248	1225	1173	1277	1183	1134	1418	1238	1080	1334	1147
IL-21 0.5 mg/kg	949	701	576	452	581	584	242	396	391	518	412	209	226	470	592	354
IL-21 0.5 mg/kg	1945	1784	932	488	1790	1014	773	1582	2542	2886	2241	819	1468	1897	1956	996
IL-21 0.5 mg/kg	448	418	262	164	681	399	592	779	1370	909	562	181	499	701	750	338
Ritux 0.05 mg/kg	541	500	0	4	57	57	0	3	67	78	160	224	147	97	304	299
Ritux 0.05 mg/kg	810	721	2	11	89	101	8	24	95	44	49	25	145	9	96	31
Ritux 0.05 mg/kg	2144	1579	0	18	170	141	1	16	79	68	88	380	265	32	167	227
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	618	518	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	954	882	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	4
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 10 mg/kg	1538	1333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	18	16
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
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
IL-21 0.5 mg/kg + Ritux 0.05 mg/kg		163	0	7	24	99	0	5	63	102	161	46	18	1	5	7

[0168]

表7
外周血中的细胞毒性T细胞(CTLs) (每ul计数)

处理	Day -8	Day 1	Day 1.253	Day 7	Day 8	Day 8.2510	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.2524	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42			
对照	2760	2206	2498	2867	2629	2502	2433	2688	2301	2926	3523	2705	2388	2064	2126	2662	2005
对照	3335	1891	1522	2212	2222	2051	2001	2099	2023	2438	1930	1983	2059	2141	2299	1977	2189
对照	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
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

[0169]

表8
外周血中的T-辅助细胞(每ul计数)

处理	Day -8	Day 1	Day 1.253	Day 7	Day 8	Day 8.2510	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.2524	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42			
对照	2163	2052	2156	2044	2178	2543	2676	2499	2404	2504	3328	2392	2485	2254	2342	2692	1949
对照	4533	3187	2327	3400	3515	3659	3062	3303	3409	3845	3183	2768	3460	3493	3772	3244	3483
对照	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
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

[0170] B. ADCC 效应

[0171] 通过菲可密度梯度制备 MNC 制剂。在本研究的过程中,就免疫表型和离体 ADCC 活

性表征来自所有经处理的动物的 MNC 制剂。在测定前,用钙黄绿素 AM 装载靶细胞,以在 3 小时温育期间细胞内染料的特异性释放作为测定终点。

[0172] 用 rIL-21 处理短尾猴导致外周血中 NK 细胞计数上的改变和 MNC 制剂中 NK 细胞的百分比改变。最初,在处理后,NK 细胞减少,在给药周期之间朝向基线方向减少。

[0173] 来自用 IL-21、或利妥昔单抗和 rIL-21 一起处理的短尾猴的 MNC,和来自载体对照和只用利妥昔单抗处理的动物的 MNC 相比,显示增加的离体 ADCC 活性。在第 3 天的裂解活性较低,这与 MNC 制剂中非常少的 NK 细胞关联。在第 7 和第 10 天,在 rIL-21 处理的动物中 ADCC 增加超过基线,在用 rIL-21+ 利妥昔单抗处理的动物中观察到类似的趋势。尽管 MNC 制剂中存在较少数量的 NK 细胞,但在第 14 天每个 NK 细胞的裂解活性仍然保持着。

[0174]

表 9
外周血中的NK细胞数量 (计数/u1)

处理	Day -8	Day 1	Day 3	Day 7	Day 8	Day 8.25	Day 10	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.25	Day 24	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42
对照	210	211	224	224	326	223	202	147	204	368	196	181	126	190	149	180
对照	209	160	232	177	221	285	147	187	135	121	181	127	60	95	128	200
对照	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	1839		1220	927	198	550	1057	1249	1036	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
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	294	290	225	268	223	175	210	276

[0175] 表 10

[0176] NK 细胞,表示为总 MNC 制剂中的百分比

[0177]

Day-Num	Day -8	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day 22	Day 24
对照	3.6	3.2	3.5	2.9	3.05	4.5	6.6
对照	3.73	4.05	4.8	4.9	4.9	4.65	6.05
对照	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

[0178]

表11
用 rIL-21 处理的短尾猴中的 ADCC。
在25的E: T比例下，来自总MNC制剂的裂解百分比。

处理	Cyno_ID	靶标	效应器	Day -4	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day 22	Day 24
对照	Cyno 1	BT474-2	MNC	8.53	3.87	12.24	10.49	12.16	13.74	15.7
对照	Cyno 2	BT474-2	MNC	17.07	12.93	18.02	16.42	11.17	19.27	13.41
对照	Cyno 3	BT474-2	MNC	18.57	6.85	9.38	6.71	13.67	16.36	19.63
rIL-21 0.5 mg/kg	Cyno 4	BT474-2	MNC	23.13	9.45	46.34	25.28	29.78	24.14	9.72
rIL-21 0.5 mg/kg	Cyno 5	BT474-2	MNC	30.73	2.24	48.52	13.76	26.92	29.34	
rIL-21 0.5 mg/kg	Cyno 6	BT474-2	MNC	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	Cyno 16	BT474-2	MNC	28	8.52	28.87	45.03	24.43	28.44	8.5
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 17	BT474-2	MNC	26.9	1.57	17.7	13.61	10.23	14.8	2.21
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 22	BT474-2	MNC	33.07	7.55	17.63	20.92	19.81	14.48	8.95
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Cyno 10	BT474-2	MNC	34.37	7.19	34	27.55	20.57	23.22	18.01
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Cyno 11	BT474-2	MNC	33.82	5.87	29	20.84	15.24	30.09	22.44
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Cyno 12	BT474-2	MNC	13.43	9.42	19.69	15.35	8.03	9.31	7
Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 7	BT474-2	MNC	27.91	15.51	30.78	25.22	33.84	25.26	25.86
Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 8	BT474-2	MNC	27.98	17.37	23.59	19.79	16.26	29.7	19.69
Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 9	BT474-2	MNC	33.81	6.78	20.15	16.21	14.52	17.47	26.16

[0179]

表12

使用 ADCC 在经 rIL-21 处理的短尾猴中测量的特异性裂解百分比。

E: T 为 2 时的受 NK 调节的 ADCC。

处理	Cyno_ID	Target	Effector	Day -4	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day 22	Day 24
对照	Cyno 1	BT474-2	NK_L	9.43	4.71	16.24	18.46	14.41	14.35	15.83
对照	Cyno 2	BT474-2	NK_L	19.07	15.09	21.23	20.38	11.17	21.93	14.04
对照	Cyno 3	BT474-2	NK_L	18.45	7.12	8.98	7.51	13.77	16.47	18.88
rIL-21 0.5 mg/kg	Cyno 4	BT474-2	NK_L	23.11	15.98	52.37	63.06	31.84	23.77	10.28
rIL-21 0.5 mg/kg	Cyno 5	BT474-2	NK_L	30.52	2.99	57.41	49.07	29.02	29.32	
rIL-21 0.5 mg/kg	Cyno 6	BT474-2	NK_L	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	Cyno 16	BT474-2	NK_L	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	Cyno 17	BT474-2	NK_L	27.14	1.57	19.63	20.07	10.23	17.33	
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 22	BT474-2	NK_L	31.2	7.57	23.16	21.63	21.63	14.48	8.95
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Cyno 10	BT474-2	NK_L	33.53	9.87	46.66	30.62	26.89	25.51	19.54
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Cyno 11	BT474-2	NK_L	33.5	6.71	37.37	27.43	15.89	31.52	22.95
rIL-21 0.5 mg/kg + Rituxan 10 mg/kg	Cyno 12	BT474-2	NK_L	13.43	15.24	37.3	15.56		9.31	7
Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 7	BT474-2	NK_L	27.7	16.68	32.32	27.36	33.62	25.26	25.82
Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 8	BT474-2	NK_L	26.03	18.13	23.11	21.31	16.24	29.56	19.67
Rituxan 0.05 mg/kg	Cyno 9	BT474-2	NK_L	34.07	7.69	25.72	22.44	15.06	21.03	26.84

[0180] C. 其他终点

[0181] 在 rIL-21 给药后,可溶性 IL-2R α (sCD25) 即免疫活化标志,迅速增加,细胞内穿孔素即裂解性粒酶,较慢地增加,在第二次剂量给药间隔后具有最高的表达。在单核细胞和粒细胞中 Fc γ RI (CD64) 和 Fc γ RIII (CD16) 都被上调。

[0182] 通过流式细胞仪测量 MNC 制剂中的穿孔素。为测量 sCD25, 在第 8 天适应期间和第 17、29、37 和 42 天收集血液一次。也在第 1、8 和 22 天给药前、给药后 5 分钟、30 分钟、2 小时和 6 小时采集血液。在第 3、10 和 24 天, 在给药后 30 分钟采集血液。

[0183] 将大约 0.75ml 的血液转移至 SST 凝结管中。使样品在室温下凝结大约 40-60 分钟。通过离心(在 2-8℃ 下、2000xg 下进行大约 15 分钟)获得血清, 将血清在 -70℃ 下冷冻贮存。使用鼠类单克隆抗 sCD25 的抗体捕获存在于血清中的可溶性 CD25, 用生物素化的山羊多克隆抗 sCD25 的抗体检测。链霉抗生物素蛋白 -HRP 和底物 TMB 允许对存在于样品和标准中的 sCD25 进行比色定量。

[0184]

表13

血清中 sCD25 的浓度 (ng/ml)																			
Day_num		Day -8	Day 1	Day 3	Day 8	Day 10	Day 17	Day 22	Day 24	Day 29									
对照		0	0	0	0.79	0.69	0.73	0	0	0.67									
对照		1.01	1.14	0.91	1.08	1.12	1.2	1.14	1.08	1.04									
对照		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		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									
IL-21 0.5 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									

[0185]

表14

穿孔素表达呈阳性的 CTL 的百分比										
Day_Num	Day -8	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day 22	Day 24	Day 29		
对照	0.9	1.6	0.2	0	0.4	0	0	0.4		
对照	2.3	1	1.2	1.1	5.9	0.1	0.2	5.9		
对照	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 low	1.7	0.1	0.1	1	0.4	0.1	0	1.7		
Rituxan low	1.3	0.3	0.1	2.4	1	0	0.1	3.9		
Rituxan low	2.6	1.3	0.6	0.4	7.2	0	0.1	5.9		
Rituxan high + IL-21 0.5 mg/kg	0.3	0.2	1.2	16.8	26.8	0	0.1	0.9		
Rituxan high + IL-21 0.5 mg/kg	2.1	1.8	5.1	13.8	25.2	0.1	0.2			
Rituxan high + IL-21 0.5 mg/kg	1.1	14.8	4.6	18.7	9.8	0	0	9.8		
Rituxan low + IL-21 0.5 mg/kg	3.1	16.5	16.2	34.6	51.6	0.2	19	58		
Rituxan low + IL-21 0.5 mg/kg	0.7	3.7	1.9	5.8	9	0.1	5.8	12.9		
Rituxan low + IL-21 0.5 mg/kg	3	6.5	7	12.4	20.8	0.1	3.7	15		

[0186]

表15

穿孔素表达呈阳性的 NK 细胞的百分比										
Day_Num	Day -8	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day 22	Day 24	Day 29		
对照	0.6	23.2	0.9	1.8	2.4	1.7	0.5	2.3		
对照	3.5	4.5	3.1	3.3	22.2	3.1	0.6	13		
对照	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 low	2.1	0.3	0.9	1.9	1.4	1.3	0.4	5.8		
Rituxan low	1.8	0.9	0.4	7	2.4	1.5	0.2	10.3		
Rituxan low	2.6	1.4	1.6	3.2	13.2	4.7	0.3	5.7		
Rituxan high + IL-21 0.5 mg/kg	0.5	6.8	4.5	16.1	49.6	2.1	0.6	2.5		
Rituxan high + IL-21 0.5 mg/kg	3.3	18.1	4.1	4.4	51.1	1.7	1.5			
Rituxan high + IL-21 0.5 mg/kg	0.8	25.9	3.2	3	22.3	7.7	6.7	32.6		
Rituxan low + IL21 0.5 mg/kg	2.1	15	7.1	14.5	73.7	2.9	9.6	66		
Rituxan low + IL21 0.5 mg/kg	1.1	19.8	2.7	8.9	8.2	4.7	9.6	10.9		
Rituxan low + IL21 0.5 mg/kg	6.2	20.3	7.3	13.5	49	8.7	9.9	22.7		

[0187]

表16

粒细胞 - CD64 MFI中相对于基线的百分比变化

Day	Day 3	Day 7	Day 8	Day 8.25	Day 10	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.25	Day 24	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42
对照	-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
对照	-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
对照	-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
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	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 +														
IL-21 0.5 mg/kg	-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

[0188]

表17
单核细胞 - CD64 MFI中相对于基线的百分比变化

Day	Day 3	Day 7	Day 8	Day 8.25	Day 10	Day 14	Day 17	Day 22	Day 22.25	Day 24	Day 29	Day 32	Day 37	Day 42
对照	-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
对照	-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
对照	-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 0.5 mg/kg	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 0.5 mg/kg	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	148.7	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

[0189] 实施例 6

[0190] IL-21 和曲妥单抗介导的对表达 Her-2/neu 的乳腺癌细胞系的杀伤

[0191] A.

[0192] 从捐赠计划中获得 200mL 人血液。将 180mL 血液收集在柠檬酸葡萄糖管中,将来自相同供体的 20mL 收集在凝结管 (BD Biosciences) 中。将凝结管中的血液在 2800rpm 下离心 30 分钟。从上部收集血清并将其用于培养基 (参见下面)。将 ACD 管中的 180mL 血液汇合,在磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、2% 牛血清白蛋白 (FBS) 中以 1:2 稀释。将 30mL 的血液等分放入 50mL 的管中。12mL Ficoll-Paque PLUS (AmershamBiosciences) 在各 50mL 管的血液的底部铺层。在 1800rpm 下离心成管的血液 30 分钟。从各 50mL 管收集棕黄层界面并混合在一起。用总共 100x 细胞体积的 PBS, 2%FBS 洗涤混合物 2-3 次。将最终洗涤的沉淀重悬浮于 2mL PBS, 2%FBS 中。在血细胞计数器上对细胞进行计数。

[0193] 在 37° C 下,在加入或不加入 20ng/mL 人 IL-21 的情况下,将如上所述纯化的 MNC 细胞以 5×10^6 细胞 /mL 在含有 4% 自体血清的 SF Complete (α MEM 和核苷, 50 μ M β -巯基乙醇, 1:100 胰岛素, transferrin, 硒母液 (Invitrogen), 150 μ g/mL 其他转铁蛋白, 5mg/mL 牛血清白蛋白) 中培养 4 天。第 4 天,收获细胞,在血细胞计数器上进行计数,在含有 5% 胎牛血清 (FBS) 的 Hank's 缓冲盐溶液 (不含 Ca 或 Mg 的 HBSS, 现称为 HBSSF) 中进行洗涤。将细胞沉淀重悬浮于 HBSSF, 达到 5×10^6 细胞 /mL 的密度。

[0194] 在 37° C 下用 10 μ M HBSSF 中的钙黄绿素标记乳腺癌靶细胞系 1 小时,包括 BT-474 (ATCC No. HTB-20)、SK-BR-3 (ATCC No. HTB-30) 或 MCF-7 (ATCC No. HTB-22)。然后在 1100rpm 下在 10 倍体积的 HBSSF 中洗涤靶 8 分钟。将细胞沉淀重悬浮于 HBSSF 中,达到 50,000 细胞 /mL。将如上所述用或不用人 IL-21 预处理 4 天的 MNC 效应器细胞在 1100rpm 下离心 8 分钟,将细胞沉淀重悬浮于 HBSSF 中,达到大约 5×10^6 细胞 /mL。将效应器在 96 孔圆底板中以 1:3 进行系列稀释,重复两份。在 2 μ g/mL 人 IgG、或 2.5 μ g/mL 曲妥单抗存在的情况下向各小孔中加入 100 μ l 靶。在 500rpm 下离心 96 孔板 3 分钟。将板在 37° C 下温育 3 小时,然后在 1000rpm 下离心 5 分钟。将来自各孔的 100 μ l 上清液转移至 96 孔平底板中,在 Wallac 荧光计 (Wallac) 上在 485/535 处,使用 1 秒的间隔读数。

[0195] 和高水平表达 Her-2/neu 抗原的 BT-474 细胞系相比,MCF-7 乳腺癌细胞系以低水平表达该抗原。在上述的 ADCC 测定法中,当以效应器:靶 (E:T) 为 3 的比例使用 MCF-7 靶时,在该测定中,在曲妥单抗存在的情况下未处理的效应器具有不超过使用 IgG 的未处理的效应器的细胞裂解活性。在曲妥单抗存在的情况下,在 E:T 为 10 的情况下,用 IL-21 预处理的效应器具有超过未处理的效应器 4 倍的细胞裂解活性。在 E:T 为 10 时,在 IgG 存在的情况下,经 IL-21 预处理的效应器在细胞裂解活性上超过未处理的效应器 0.5 倍。当 BT-474 细胞为靶时,在曲妥单抗存在的情况下,在 E:T 为 10 时,测定中,和未处理的并处于 IgG 存在的情况下的效应器相比,未处理的效应器在细胞裂解活性上具有 7 倍的增长。在 E:T 为 10 时,IL-21 预处理增强该细胞裂解活性 2 倍。这些结果支持这样的事实,即 MCF-7 细胞系是低抗原表达者,因为单独的曲妥单抗在增强对该细胞系的效应器细胞裂解活性上无效。单独的曲妥单抗在增强效应器对 BT-474 靶的细胞裂解活性上有效。IL-21 预处理进一步增加了效应器对这两种细胞系的细胞裂解活性。

[0196] 表 18

[0197] NK 细胞抗乳腺癌靶的 ADCC 活性。终点是在 E:T 比例为 3 时的裂解百分比。

[0198]

供体	靶	对照	rIL-21 预处理
A74	MCF-7	11.2943	22.71177
A74	SKBr3	12.12149	39.34667
A74	MCF-7	0	25.9
B202	HCC1428	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	HCC1428	18.60837	50.02053
C025	HCC1428	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

[0199] B.

[0200] 从捐赠计划中获得 200mL 人血液。将 180mL 血液收集在柠檬酸葡萄糖管中,将来

自相同供体的 20mL 收集在凝结管 (BD Biosciences) 中。将凝结管中的血液在 2800rpm 下离心 30 分钟。从上部收集血清并将其用于培养基 (参见下面)。将 ACD 管中的 180mL 血液汇合,以 1:2 在磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、2% 胎牛血清 (FBS) 中稀释。将 30mL 血液等分放入 50mL 的管中。12mL Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) 在各 50mL 管的血液的底部铺层。在 1800rpm 下离心成管的血液 30 分钟。从各 50mL 管收集棕黄层界面并混合在一起。用总共 100x 细胞体积的 PBS, 2%FBS 洗涤混合物 2-3 次。将最终洗涤的沉淀重悬浮于 2mL PBS, 2%FBS 中。在血细胞计数器上对细胞进行计数。

[0201] 将 MNC 以 $5-10 \times 10^7$ 细胞 /mL 稀释于 PBS, 2%FBS 中。使用 StemCell Technologies Enrichment of Human NK Cell 试剂盒纯化 NK 细胞。在 1100rpm 下离心 NK 细胞 8 分钟,重悬浮于 .5mL PBS、2%FBS 中并在血细胞计数器上计数。

[0202] 将 BT-474 细胞 (ATCC No. HTB-20) 在 12 孔板中以 1.25×10^6 细胞 /mL 培养在 DMEM (Gibco), 10%FBS 中, 并让其附着 3 小时。将如上所述纯化的 NK 细胞在 SF Complete (α MEM 和核苷, $50 \mu\text{M}$ β -巯基乙醇, 1:100 胰岛素, transferring, 硒贮存液 (Invitrogen) $150 \mu\text{g/mL}$ 其他转铁蛋白, 5mg/mL 牛血清白蛋白) 和 4% 热失活的人 AB 血清中稀释至 $1-2 \times 10^6$ 细胞 /mL。将培养基吸离 BT-474 细胞, 向 BT-474 细胞中加入 2mL 稀释的 NK 细胞, 建立共培养。向共培养物中不加入东西、加入 $2 \mu\text{g/mL}$ 曲妥单抗、加入 20ng/mL 人 IL-21 或 $2 \mu\text{g/mL} + 20\text{ng/mL}$ 人 IL-21。将共培养物在 37°C 下温育过夜。在过夜共培养后, 收获细胞并在血细胞计数器上进行计数。在 HBSSF (参见下面) 中洗涤细胞, 将细胞沉淀重悬浮于 1mL HBSSF。

[0203] 向 100L HBSSF 中的 100,000-200,000 个 NK 细胞中加入 $20 \mu\text{g/mL}$ 小鼠 γ 球蛋白 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA) 和 1:100 缀合的抗体。抗体组合包括 CD25FITC、CD56PE、CD16Cychrome 和 CD8APC (BD Pharmingen)。同种型对照包括 100,000 至 200,000 个混合的细胞, 所述细胞来自单独地具有各缀合的抗体的 NK 共培养物。将细胞在黑暗处在 4°C 下温育 30 分钟。在 PBS, 2%FBS 中洗涤细胞 1 次, 置于 200L PBS, 2%FBS 中。加入多聚甲醛至 0.2% 以固定细胞, 将细胞保持在 4°C 直至准备进行 FACS 分析。在进行固定的 3 至 4 天内 Becton Dickinson FACS Calibur 上进行 FACS 分析。使用 Cellquest 软件分析流式数据。通过将每 mL 的细胞数目乘以培养物体积来计算总细胞数目。

[0204] 在所有 4 个受试的供体中, 当曲妥单抗和 IL-21 存在于 NK 细胞和乳腺癌细胞系 BT-474 的共培养物中时, 细胞的 CD56+/CD25+ 群体增加。明确地, 当和只具有培养基的共培养物 (如上所述) 相比, 单独的曲妥单抗导致 2-20 倍的增加, 单独的 IL-21 导致 2-4 倍的增加, 当 IL-21 和曲妥单抗同时存在时, CD56+/CD25+ 群体增加 4-50 倍。在所有供体中, 在 IL-21 和曲妥单抗存在的情况下, CD56+/CD25+ 群体的增加超过所有其他共培养条件。

[0205] C.

[0206] 从室内 (in house) 捐赠计划中获得 200mL 人血液。将 180mL 血液收集在 ACD 管中, 将来自相同供体的 20mL 收集在凝结管中。将凝结管中的血液在 2800rpm 下离心 30 分钟。从上部收集出血清并将其用于培养基 (参见下面)。混合 ACD 管中的 180mL 血液, 以 1:2 在磷酸缓冲溶液 (PBS)、2% 胎牛血清 (FBS) 中稀释。将 30mL 血液等分放入 50mL 的管中。12mL Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences cat. No. 17-1440-03) 在各 50mL 管的血

液的底部铺层。在 1800rpm 下离心成管的血液 30 分钟。从各 50mL 管收集棕黄层界面并混合在一起。用总共 100x 细胞体积的 PBS, 2%FBS 洗涤混合物 2-3 次。将最终洗涤的沉淀重悬浮于 2mL PBS, 2%FBS 中。在血细胞计数器上对细胞进行计数。

[0207] 在 37° C 下, 在加入或不加入 20ng/mL 人 IL-21 的情况下, 将如上所述纯化的 MNC 细胞以 0.5×10^6 细胞 /mL 在含有 4% 自体血清的 SF Complete (α MEM 和核苷, 50 μ M β -巯基乙醇, 1:100 胰岛素, transferrin, 硒母液 (Gibco), 150 μ g/mL 其他转铁蛋白, 5mg/mL 牛血清白蛋白) 中培养 4 天。第 4 天, 收获细胞, 在血细胞计数器上进行计数, 在含有 5% 胎牛血清 (FBS) 的 Hank's 缓冲盐溶液 (不含 Ca 或 Mg 的 HBSS, 现称为 HBSSF) 中进行洗涤。将细胞沉淀重悬浮于 HBSSF, 达到 $.5 \times 10^6$ 细胞 /mL。

[0208] 在 37° C 下用 10 μ M HBSSF 中的钙黄绿素标记乳腺癌靶细胞系, 包括 BT-474 或 MCF-7。然后在 1100rpm 下在 10 倍体积的 HBSSF 中洗涤靶 8 分钟。将细胞沉淀重悬浮于 HBSSF 中, 达到 50,000 细胞 /mL。将如上所述用或不用人 IL-21 预处理 4 天的 MNC 效应器细胞在 1100rpm 下离心 8 分钟, 将细胞沉淀重悬浮于 HBSSF 中, 达到大约 0.5×10^6 细胞 /mL。将靶在 96 孔圆底板中按 1:3 进行系列稀释, 进行双份试验。在 2 μ g/mL 人 IgG、或 10、5、2.5、1.25、.62、.31 μ g/mL 曲妥单抗存在的情况下, 向各小孔中加入 100 μ l 靶。在 500rpm 下离心 96 孔板 3 分钟。将板在 37° C 下温育 3 小时, 然后在 1000rpm 下离心 5 分钟。将来自各孔中的 100 μ l 上清液转移至 96 孔平底板中, 在 Wallac 荧光计上在 485/535 处, 使用 1 秒的间隔读数。

[0209] 使用 BT-474 或 MCF-7 细胞系作为 ADCC 测定中的靶, 在所有受试的曲妥单抗浓度上, 用 IL-21 预处理的 MNC 具有比未处理的 MNC 更高的活性或比当 IgG 存在于测定中的时的活性更高。在效应器:靶 (E:T) 为 3 时, 当使用 BT-474 时, 细胞裂解活性在 5 μ g/mL 曲妥单抗处为最大值。当使用 MCF-7 时, 在 E:T 为 3 时, 细胞裂解活性在 1.25 μ g/mL 处为最大值。

[0210] D.

[0211] 从短尾猴采集外周血, 放入具有肝素锂的 5ml 管中, 并在室温下贮存直至进行样品处理。用包含 1mM EDTA 的 PBS 稀释样品, 通过在 95% 的菲可中离心收集单核细胞 (MNC) 级分。洗涤后, 在含有 IL-21 20ng/ml 的培养基中或对照培养基中培养所述细胞 3 天。温育后, 洗涤细胞并进行计数, 对等分进行染色以通过流式细胞仪确定免疫表型。如下使用细胞等分进行抗体依赖性细胞毒性测定。在 37° C 下, 用钙黄绿素 AM 染料装载 BT-474 乳腺癌靶细胞 60 分钟, 洗涤细胞, 将 1000 个靶细胞置于含有 2 μ g/ml 曲妥单抗和 50,000、25,000、12,500、6250、3125、1563 或 781 个 MNC 的小孔中。在 37° C 下在黑暗中温育测定物 3 小时。该温育后, 测量钙黄绿素 AM 至上清液中的释放, 基于通过总 (去垢剂) 裂解产生的释放和在任何 MNC 效应器细胞不存在的情况下产生的非特异性释放来计算特异性裂解。对 8 只短尾猴供体中的每一只重复实验 2 次。基于流式细胞仪分析, 数据表示为在 E:T 比例为 25 时, 每 MNC 的特异性裂解百分比, 或将数据标准化以反映 MNC 群体中实际的 NK 细胞数目。为获得受 NK 调整的数据, 使用 4 参数 S 型曲线使 E:T 比例针对裂解百分比进行拟合, 使用希尔方程确定在 E:T 比例为 3 时每 BT-474 靶的裂解百分比。

[0212] 使用 rIL-21 的短尾猴的体外处理在使用 BT-474 乳腺癌靶的曲妥单抗介导的 ADCC 测定法中增加了 ADCC 活性。一些动物比其它动物对 rIL-21 具有更大的反应, 该可变反应

在重复的实验中对动物来说是一致的。使用**SAS®** (Littell 等人 SAS System for Mixed Models; SAS Institute, 1996) 中的 Proc MIXED 使混合效应模型拟合作为供体的固定效应和随机效应的处理和通过供体相互作用进行的处理。使用**SAS®**中的 Kenward Roger 选项确定计算处理的 P 值的分母自由度。处理项(treatment term)是高度显著的。

[0213] 表 19

[0214] 来自抗 BT-474 乳腺癌靶的短尾猴 MNC 制剂的 ADCC 活性。

[0215] 终点是 E:T 比例为 25 时的裂解百分比。

[0216]

	对照 - 无处理	rIL-21 预处理		
动物	Cont-run1	Cont-run2	rIL21-run1	rIL21-run2
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

[0217] 表 20

[0218] 来自抗 BT-474 乳腺癌靶的短尾猴 MNC 制剂的 ADCC 活性。

[0219] 终点是受 NK 调节的 E:T 比例为 3 时的裂解百分比。

[0220]

	对照 - 无处理	rIL-21 预处理		
动物	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

[0221] 实施例 7

[0222] 去除 CD4/CD8 的小鼠模型

[0223] 多年来一直使用利用抗细胞表面受体的抗体进行的细胞去除来了解这些细胞在免疫机制中的特定作用。当将抗 T 淋巴细胞上的 CD4 和 CD8 抗原的抗体注射入小鼠时,其通过涉及 ADCC 和补体的机制去除特定的 T 细胞亚型。将低剂量的抗体注射入小鼠中以去除 20 至 50% 的 CD4 或 CD8T 细胞。给成组的小鼠施用 IL-21,通过流式细胞仪跟踪 T 细胞来研究其增强去除的能力。增加的使用 IL-21 的 T 细胞的去除表明 IL-21 在体内增强抗体介导的细胞去除的能力。

[0224] 使用大鼠抗小鼠 CD4(克隆 GK1.5, ATCC) 或大鼠抗小鼠 CD8(克隆 53-6.72, ATCC) 进行去除研究。在第 0 天用对照抗体、5-50 μ g 抗 CD4 或抗 CD8mAb 经腹膜内途径注射成组的 8-12 周大小的 C57BL/6 小鼠(Charles River Laboratories)。从放血前 2 天开始,成组的小鼠腹膜内接受 PBS 或 25 μ g mL-21,直至第 1 天。在第 1、4 和 7 天给小鼠放血。通过流式细胞仪测定血液 CD4 和 CD8T 细胞数目。

[0225] 增加的使用 IL-21 的 T 细胞的去除显示 IL-21 在体内增强抗体介导的去除细胞的能力,表明 IL-21 可增强抗体介导的效应。

[0226] 实施例 8

[0227] 肺清除测定法

[0228] 肺清除测定法已被用来在体内研究 NK 细胞的功能。将铬-51(^{51}Cr) 标记的 RAJI 细胞经静脉内途径注射入小鼠。成组的小鼠接受 PBS、mIL-21、单独的利妥昔单抗或利妥昔单抗 +IL-21。在经静脉内途径注射后 5-8 小时杀死小鼠,使用 γ 计数器就放射性的量对肺进行测定。肺内放射性的降低是通过 NK 细胞获得的增加的肿瘤细胞的清除(杀死)的指示。在利妥昔单抗存在的情况下,IL-21 增强肿瘤细胞的清除的能力表示 IL-21 在体内增强抗体介导的裂解活性的能力。

[0229] 在 37 $^{\circ}$ C 下用 100 μ Ci ^{51}Cr 标记 RAJI 细胞 2 小时。用 PBS 洗涤细胞 2 次,重悬浮于无菌 PBS, pH7.2。在时间 0 ($t=0$) 时,用 1 千万个标记的 RAJI 细胞经静脉内(i.v.)途径注射入小鼠。在 $t=10$ 分钟时,成组的小鼠经腹膜内途径接受 20 μ g 对照抗体或利妥昔单抗。在 $t=-24$ 小时、 $t=0$ 小时和 $t=4$ 小时,成组的小鼠接受 PBS 或 25 μ g mL-21。在肿瘤注射后 5 至 8 小时之间杀死小鼠,分离肺并在 γ 计数器上进行计数。将放射性标绘为对照注射(单独的标记的细胞)的百分比。

[0230] 肺中减少的放射性表示通过 NK 细胞产生的增加的肿瘤细胞的清除(杀死)。在利妥昔单抗存在的情况下,IL-21 增强肿瘤细胞的清除的能力表示 IL-21 在体内增强抗体介导的裂解活性的能力。

[0231] 实施例 9**[0232] 去除 Raji/SCID 巨噬细胞的研究**

[0233] IL-21+ 利妥昔单抗 (利妥昔单抗) 的组合在扩散型 Raji/SCID 肿瘤模型中具有协同的抗肿瘤活性。据认为 ADCC 在利妥昔单抗的体内抗肿瘤活性中起着重要作用, 巨噬细胞在该过程中是非常重要的效应器细胞。IL-21 可在小鼠中影响巨噬细胞的 ADCC 活性, 导致和利妥昔单抗的协同作用。为了检验巨噬细胞在 IL21+ 利妥昔单抗的抗肿瘤作用中的重要性, 使用氯膦酸脂质体 (Sigma, St. Louis, MO) 在小鼠中去除巨噬细胞。实验通过证明去除巨噬细胞群体的小鼠相对于未去除的小鼠具有缩短的存活时间来证明巨噬细胞对于 IL21+ 利妥昔单抗的协同的抗肿瘤活性是至关重要的。

[0234] 为研究巨噬细胞在 IL21+ 利妥昔单抗抗 SCID 小鼠中的 Raji 细胞的抗肿瘤活性中的重要性, 进行下列实验。延缓使用利妥昔单抗的处理以减少其功效 (Funakoshi, Longo et al. Blood, 83(10):2787-94, 1994), 连续 5 天注射 mIL-21, 包括第 1 次利妥昔单抗注射。使用 HS-Sultan 和 Raji 细胞, 因为其不通过 STAT1 或 STAT3 进行信号传导和其生长在体内或体外不受 IL-21 抑制。

[0235]

组	品系	小鼠数目	处理
1.)	SCID	10 (1481-90)	氯膦酸脂质体+IL-21+利妥昔单抗
2.)	SCID	10 (1491-1500)	PBS脂质体+IL-21+ 利妥昔单抗
3.)	SCID	9 (1501-09)	氯膦酸脂质体+ 利妥昔单抗
4.)	SCID	9 (1510-18)	PBS脂质体+ 利妥昔单抗
5.)	SCID	9 (1519-28)	氯膦酸脂质体+PBS

[0236] 在研究的第 0 天经静脉内途径注射 1×10^6 Raji 细胞

[0237] 在第 3-7 天经腹膜内途径施用 100g IL-21。

[0238] 在第 5、9、13、17 和 21 天经腹膜内途径施用 20g 利妥昔单抗。

[0239] 经静脉内途径施用脂质体:

[0240] 第 3 天 -0.2ml100% 脂质体

[0241] 第 9 天 -0.2ml50% 脂质体

[0242] 第 15 天 -0.2ml50% 脂质体

[0243] 第 21-0.2ml50% 脂质体

[0244] 图 1 显示, 当和用 PBS 脂质体注射的小鼠相比时, 使用氯膦酸脂质体 (例如 Clod. IL21+R) 的巨噬细胞去除显著地减少了荷 Raji 淋巴瘤细胞的小鼠的存活益处。和非去除小鼠 (分别使用 PBS. IL21+R 和 PBS. R) 相比, 使用 IL-21+ 利妥昔单抗 (Clod. IL21+R) 或利妥昔单抗 (Clod. R) 处理的巨噬细胞去除小鼠具有显著缩短的存活时间 (平均死亡时间)。

[0245] 实施例 10**[0246] IL-21+ 利妥昔单抗处理后, 去除了粒细胞的 SCID 小鼠中的肿瘤清除**

[0247] IL-21 和利妥昔单抗一起能够在体内比单独的利妥昔单抗更有效地清除 RAJI 肿瘤细胞。将 RAJI 细胞注射入已去除粒细胞的 CB17SCID 小鼠中。研究单独的利妥昔单抗或

和 IL-21 组合的利妥昔单抗的作用。

[0248] 经静脉内途径用 1×10^6 个 Raji 细胞注射 CB17-scid 小鼠。此外,用单克隆抗体 Gr-1 (BD Biosciences, Palo Alto, CA) 注射其中一些小鼠。通过腹膜内途径注射的方式用 20g Rituxan、100g mL-21 或 Rituxan 和 mL-21 的组合处理小鼠。

[0249] 就这些方面监控小鼠,所述方面是 1) 体重保持恒定或 20% 的快速体重减轻,2) 麻痹或不能保持直立位或运动,3) 呼吸沉重 - 特别是伴随着鼻涕或青紫时,4) 嗜眠或不能对温和的刺激产生反应。对满足上面标准的小鼠实施无痛致死术。

[0250] 在第 5、9、13、17 和 21 天对组 1-6 给药以进行 Ab 处理。在第 12、19、26、33 和 40 天处理组 7-10。对于组 1-6 在第 3-7 天施用蛋白,在第 10-14 天对组 7-10 施用蛋白。

[0251]

小鼠	数目	去除	Ab 处理	蛋白
1) C. b-17 SCID	8	无	PBS	PBS
2) C. B-17 SCID	8	无	20 μ g 利妥昔单抗	PBS
3) C. B-17 SCID	8	无	20 μ g 利妥昔单抗	100 ug IL-21
4) C. B-17 SCID	8	Gr-1	PBS	PBS
5) C. B-17 SCID	8	Gr-1	20 μ g 利妥昔单抗	PBS
6) C. B-17 SCID	8	Gr-1	20 μ g 利妥昔单抗	100 μ g IL-21

[0252] 图 2 显示,IL-21+ 利妥昔单抗的协同性抗肿瘤活性受到使用抗 Gr-1MAb 的粒细胞去除的削弱。对于去除粒细胞的 SCID 小鼠(虚线),当和非去除小鼠(实线)相比,荷 Raji 的 SCID 小鼠的存活时间(在第 100 天时的存活比例)显著降低。

[0253] 实施例 11

[0254] IL-21 和抗 CTLA4 的抗体组合

[0255] A. RENCA 细胞肿瘤模型

[0256] 为检验 IL-21 和抗 CTLA4mAb 一起对小鼠中肿瘤的生长是否具有作用,使用 RENCA 细胞肿瘤模型。已显示使用 Renca 细胞注射的肾细胞癌小鼠模型建立了这样的肾细胞转移性肿瘤,该肿瘤对使用免疫治疗剂例如 IL-12 和 IL-2 的治疗具有反应 (Wigginton 等人, J. of Nat. Cancer Inst. 88:38-43, 1996)。在第 0 天用 RENCA 肿瘤经皮下途径注射成组的小鼠。然后用单独的载体、50ug 或 100ug 抗 CTLA4MAb (克隆 9H10, eBiosciences, San Diego, CA)、单独的 25ug mL-21、或 50ug 或 100ug 抗 CTLA4 和 25ug mL-21 的组合注射小鼠。使用在该模型中通常不具有有效的抗肿瘤效果的 25ug 的低剂量 mL-21。

[0257] 在第 0 天用 0.1×10^6 个 RENCA 细胞在右肋腹经皮下途径注射 10 周大小的雌性 BALB/c 小鼠 (Charles River Laboratories)。在第 5-9、19-23 天, 成组的小鼠接受单独的载体 (PBS, pH7.2) 或 25ug mIL-21。在第 0、4 和 8 天, 其它组分别接受 50ug 或 100ug 单独的抗 CTLA-4MAb, 或在第 0、4 和 8 天接受抗 CTLA4MAb (50ug 或 100ug) 和在第 5-9、19-23 天接受抗 CTLA4MAb 和 25ug mIL-21 的组合。所有注射通过腹膜内途径施用。使用卡尺测量法监控肿瘤生长, 每周 3 次, 进行 5 周。使用公式 $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 计算肿瘤体积。

[0258] 单独的 mIL-21 或单独的两种浓度的抗 CTLA4MAb 的注射对肿瘤的生长没有显著的影响。相反地, 和对照相比 (图 1), mIL21 和两种浓度中任一浓度的抗 CTLA4MAb 的组合显示在肿瘤的体积上具有显著的减小。这些数据表明 IL21 和抗 CTLA4MAb 的组合具有协同的抗肿瘤活性, 是针对癌症的可能的组合疗法。

[0259] B. 和抗小鼠 CTLA4 组合的小鼠 IL-21 的治疗性施用在 RENCA 模型中抑制肿瘤生长。

[0260] 为检验当使用治疗方案进行施用, 将 IL-21 和抗 CTLA4mAb 组合是否对肿瘤的生长具有影响, 在第 0 天, 用 RENCA 肿瘤注射成组的小鼠。然后从肿瘤体积为 $60-80mm^3$ 开始, 用单独的载体、50ug 或 100ug 抗 CTLA4mAb (克隆 9H10, eBiosciences)、单独的 25ug mIL-21、或 50ug 或 100ug 抗 CTLA4MAb 和 25ug mIL-21 的组合注射小鼠。使用在该模型中通常不具有有效的抗肿瘤效果的 25ug 的低剂量 mIL-21。在已达到 $60-80mm^3$ 的肿瘤体积后的第 1、5、9 和 13 天, 施用抗 CTLA4mAb。在肿瘤体积已达到 $60-80mm^3$ 后的第 5-9、19-23 天或从第 1 至 10 天注射 mIL-21。在组合 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组中看到的抗肿瘤效果表明当按治疗方案施用, 在该模型中存在协同性的抗肿瘤作用。

[0261] 在第 0 天用 0.1×10^6 个 RENCA 细胞在右肋腹经皮下途径注射 10 周大小的雌性 BALB/c 小鼠 (Charles River Laboratories)。成组的小鼠在肿瘤体积已达到 $60-80mm^3$ 后的第 5-9、19-23 天或从第 1 至第 10 天接受单独的载体 (PBS, pH7.2) 或 25ug mIL-21。在第 1、5、9 和 13 天其它组分别接受 50ug 或 100ug 单独的抗 CTLA-4MAb, 或在肿瘤体积已达到 $60-80mm^3$ 后的第 1、5、9 和 13 天接受抗 CTLA4MAb (50ug 或 100ug), 在第 5-9、19-23 天或从第 1 至 10 天接受 25ug mIL-21 的组合。所有注射都通过腹膜内途径施用。使用卡尺测量法监控肿瘤生长, 每周 3 次, 进行 5 周。使用公式 $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 计算肿瘤体积。

[0262] 在组合 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组中看到的抗肿瘤效果表明当按治疗方案施用, 在该模型中存在协同性的抗肿瘤作用。这些数据表明 IL21 和抗 CTLA4MAb 的组合具有协同的抗肿瘤活性, 是针对癌症的可能的组合疗法。

[0263] C. 使用 mIL-21 和抗小鼠 CTLA4C 的组合治疗在 E. G7 胸腺瘤模型中抑制肿瘤生长

[0264] 为检验 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组合是否诱导抗肿瘤活性, 在第 0 天使用 E. G7 肿瘤经皮下途径注射成组的小鼠 (Shrikant, P 和 Mescher, M., J. Immunology 162:2858-2866, 1999)。然后用单独的载体、50ug 或 100ug 抗 CTLA4mAb (克隆 9H10, eBiosciences)、单独的 25ug mIL21、或 50ug 或 100ug 抗 -CTLA4 和 25ug mIL21 的组合注射小鼠。使用在该模型中通常不具有有效的抗肿瘤效果的 25ug 的低剂量 mIL-21。在第 0、4 和 8 天施用抗 CTLA4mAb。在第 5-9、19-23 天或从第 2-20 天每隔一天 (EOD) 注射 mIL21。在组合 mIL-21 和抗 CTLA4 的组中看到的抗肿瘤效果表明在该模型中存在协同的抗肿瘤作用。

[0265] 在第 0 天用 0.4×10^6 个 E. G7 细胞 (ATCC No. CRL-2113) 在右肋腹经皮下途径注射 10 周大小的雌性 C57BL/6 小鼠 (Charles River Laboratories)。然后用单独的载体、50ug 或 100ug 抗 CTLA4mAb (克隆 9H10, eBiosciences)、单独的 25ug mIL21、或 50ug 或 100ug 抗 CTLA4 和 25ug mIL21 的组合注射小鼠。使用在该模型中通常不具有有效的抗肿瘤效果的 25ug 的低剂量 mIL-21。在第 0、4 和 8 天施用抗 CTLA4mAb。在第 5-9、19-23 或是在第 2-20 天每隔一天 (EOD) 注射 mIL-21。以 200ul 的总体积进行腹膜内注射。通过腹膜内注射施用所有试剂。使用卡尺测量法监控肿瘤生长, 每周 3 次, 进行 5 周。使用公式 $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 计算肿瘤体积。

[0266] 在组合 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组中看到的抗肿瘤效果表明在该模型中存在协同的抗肿瘤作用。这些数据表明 IL21 和抗 CTLA4mAb 的组合具有协同的抗肿瘤活性, 是针对癌症的可能的组合疗法。

[0267] D. 使用 mIL-21 和抗小鼠 CTLA4MAb 的组合疗法在 B16 黑色素瘤模型中抑制肿瘤生长。

[0268] 为检验 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组合是否在其它肿瘤中诱导抗肿瘤活性, 在第 0 天使用 B16-F10 黑色素瘤细胞 (ATCC No. CRL-6475) 经皮下途径注射成组的小鼠。然后用单独的载体、50ug 或 100ug 抗 CTLA4mAb (克隆 9H10, eBiosciences)、单独的 25ug mIL-21、或 50ug 或 100ug 抗 CTLA4 和 25ug mIL-21 的组合注射小鼠。在第 0、4 和 8 天施用抗 CTLA4mAb。在第 5-9、19-23 天或是在第 2-20 天每隔一天 (EOD) 注射 mIL21。在组合 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组中看到的抗肿瘤效果表明在该模型中存在协同的抗肿瘤作用。

[0269] 在第 0 天用 0.5×10^6 个 B16 黑色素瘤细胞在右肋腹经皮下途径注射 10 周大小的雌性 C57BL/6 小鼠 (Charles River Laboratories)。然后用单独的载体、50ug 或 100ug 抗 CTLA4mAb (克隆 9H10, eBiosciences)、单独的 25ug mIL21、或 50ug 或 100ug 抗 CTLA4mAb 和 25ug mIL21 的组合注射小鼠。在第 0、4 和 8 天施用抗 CTLA4mAb。在第 5-9、19-23 或是在第 2-20 天每隔一天 (EOD) 注射 mIL-21。以 200ul 的总体积进行腹膜内注射。通过腹膜内注射施用所有试剂。使用卡尺测量法监控肿瘤生长, 每周 3 次, 进行 4 周。使用公式 $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 计算肿瘤体积。

[0270] 在组合 mIL-21 和抗 CTLA4MAb 的组中看到的抗肿瘤效果表明在该模型中存在协同的抗肿瘤作用。这些数据表明 IL21 和抗 CTLA4mAb 的组合具有协同的抗肿瘤活性, 是针对癌症的可能的组合疗法。

[0271] 根据上面的内容, 要理解, 尽管为了举例说明, 已在此描述了本发明的特定实施方案, 但可进行各种改变而不偏离本发明的精神和范围。因此, 本发明, 除了如所附的权利要求所限定的外, 是非限定性的。

tttcttttgta ttccaagtgg aggagcccta ttaaattata taaagaaata 642

<210> 2

<211> 162

<212> PRT

<213> 智人

<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														

巨嗜细胞去除: Raji/SCID模型
IL-21+利妥昔单抗

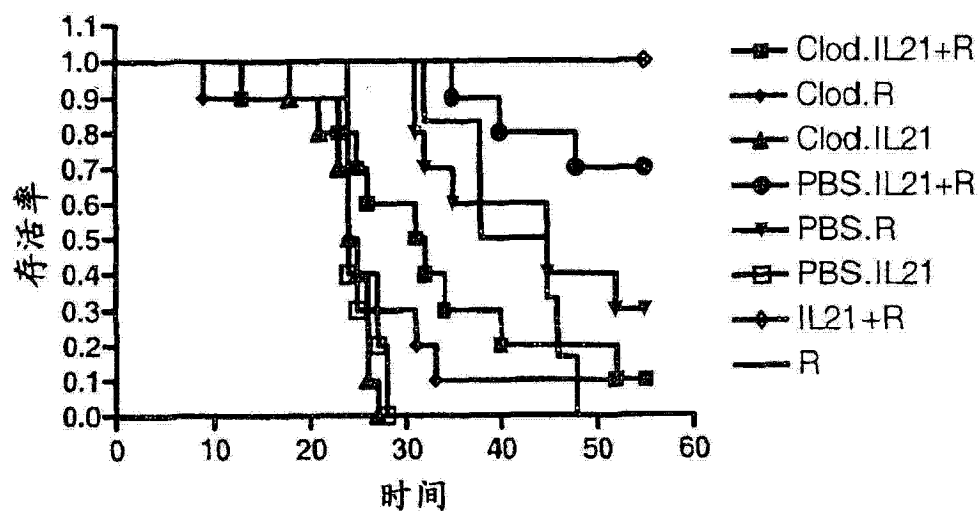


图 1

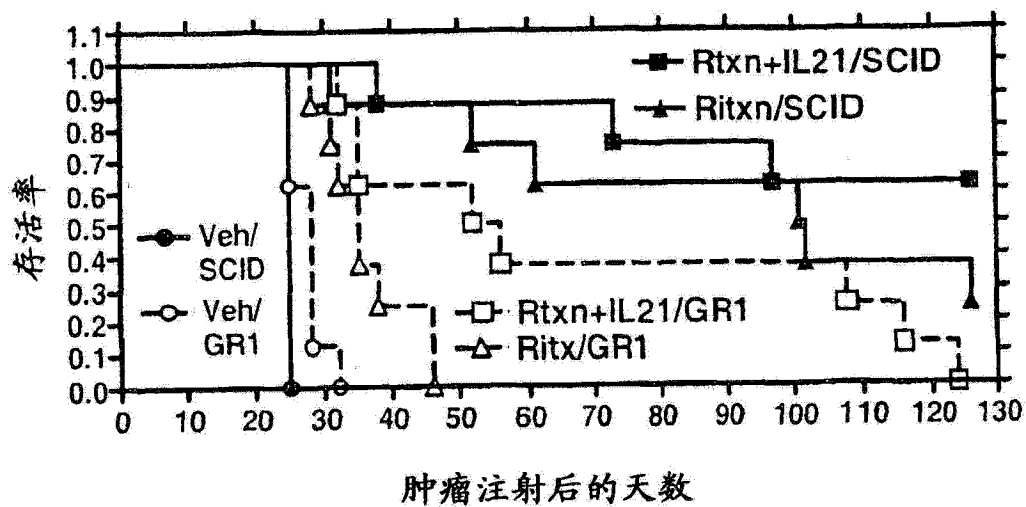
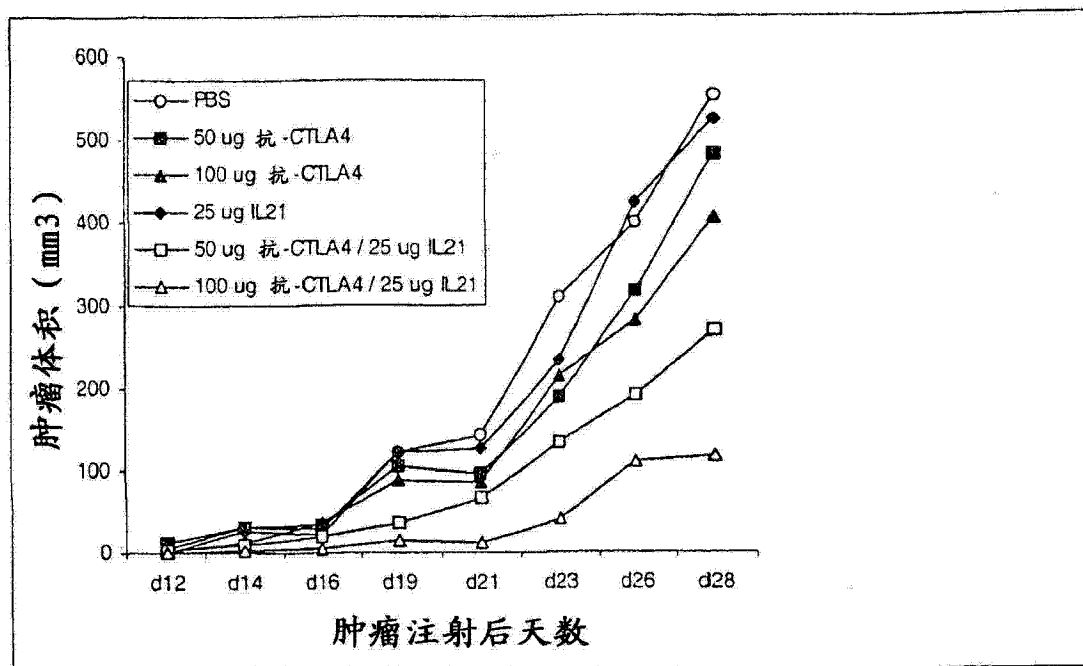


图 2



$p < 0.001$, 对于第28天的100ug抗CTLA4+IL-21
 $p = 0.012$, 对于第28天的50ug CTLA4+IL21

图 3