



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 336 873**

② Número de solicitud: 200702961

⑤ Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01) **C07K 14/56** (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **07.11.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.2010

⑦ Solicitante/s:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5 - Planta Baja
31180 Cizur Mayor, Navarra, ES
Institut National de la Santé et de la Recherche
Médicale

⑦ Inventor/es: **Melero Bermejo, Ignacio Javier;**
Dubrot Armendáriz, Juan;
Hervás Stubbs, Sandra y
Le Bon, Agnes Laurence

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer.**

⑤ Resumen:

Composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer. La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer y, más concretamente, con composiciones que comprenden un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I cuya administración simultánea o secuencial resulta en un efecto antitumoral sinérgico con respecto a la administración de cualquiera de los componentes de forma individual. La invención se relaciona también con usos terapéuticos de las combinaciones de la invención para el tratamiento del cáncer. Por último la invención se relaciona con polinucleótidos que codifican para ambos compuestos, vectores y células que los comprenden así como su uso para el tratamiento del cáncer.

ES 2 336 873 A1

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer y, más concretamente, con composiciones que comprenden un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I.

10 **Antecedentes**

Actualmente, los tratamientos médicos habituales para el cáncer, tales como quimioterapia, cirugía, radioterapia y terapia celular, tienen claras limitaciones respecto a su eficacia y toxicidad de dichos tratamientos. Hasta la fecha, estas estrategias han dado lugar a diferentes grados de éxito dependiendo del tipo de cáncer, salud general del paciente, estado de la enfermedad en el momento de la diagnosis, etc.

Es conocido del estado de la técnica que el sistema inmune desempeña un papel crítico en la patogénesis de una amplia variedad de cáncer. Cuando el cáncer progresa, se piensa que se debe a un fallo en la respuesta inmune, lo que permite el crecimiento de éste. Una posible estrategia en el tratamiento del cáncer consiste en estimular el sistema inmune para que ataque específicamente las células tumorales.

4-1BB (CD137) es un receptor de coestímulo principalmente expresado en la membrana de linfocitos T y de células asesinas o NK (Natural Killer) tras su activación, respectivamente, por antígenos o citoquinas, aunque también se encuentra en la superficie de otros leucocitos de estirpe mieloide. Las señales de coestimulación a través de este receptor inducidas con el ligando natural 4-1BB-Ligando (4-1BB-L) o con anticuerpos agonistas pueden ser:

- (i) potenciar la proliferación y supervivencia de los linfocitos estimulados en cultivo;
- (ii) estimular la expansión de linfocitos T activados por antígeno, particularmente linfocitos T CD8+;
- (iii) favorecer la supervivencia (inhibición de la apoptosis) de dichos linfocitos T;
- (iv) inducir respuestas T citotóxicas (CTL); y
- (v) activar la función de linfocitos asesinos o Natural Killer (NK).

La administración sistémica de anticuerpos agonistas anti-4-1BB potencia la respuesta de linfocitos T citotóxicos frente a antígenos tumorales, lo que determina la erradicación en ratones de tumores transplantables con cierto grado de inmunogenicidad basal (Melero *et al.*, Nat Med. 1997. 3(6):682-5), y potencia la actividad de la vacunación con antígenos tumorales o la transferencia adoptiva de linfocitos T con reactividad antitumoral (Wilcox, R.A. *et al.*, J Clin Invest. 2002. 109(5):651-9). Como continuación de estos descubrimientos e invenciones, se están realizando ensayos clínicos en los que se está administrando a pacientes portadores de diferentes neoplasias un anticuerpo monoclonal humanizado anti-4-1BB (clinicaltrials.gov: NTC00309023 y NTC00351325). En las solicitudes de patente WO200544996 y WO2006088447 se describe la utilidad de agonistas del receptor 4-1BB en el tratamiento del cáncer.

Los estudios preclínicos sugieren que el tratamiento con anticuerpos anti-4-1BB presenta un perfil toxicológico seguro, aunque aparecen algunos efectos adversos en forma de infiltración linfocitaria hepática y mielodepresión a dosis altas repetidas. Existen tumores transplantables de ratón resistentes al tratamiento con estos anticuerpos anti-4-1BB empleados como monoterapia. Por tanto, es posible que en los pacientes con cáncer avanzado y elevada carga tumoral, exista una situación de inmunodepresión o tolerancia que dificulte la respuesta inmunitaria frente a los antígenos tumorales.

Numerosas citoquinas han demostrado jugar un papel primordial en la regulación de la respuesta inmune. Los interferones (IFN) de tipo I son una familia de polipéptidos con actividad citoquina que fueron originalmente descubiertos en virtud de su actividad inhibidora sobre la infección viral de líneas celulares *in vitro* (Pestka, S., Krause, C.D. y Walter, M.R. 2004. Immunol Rev. Vol. 202:8-32). En función de la homología de sus secuencias, los interferones de tipo I se clasifican en interferón- α (IFN- α), interferón- β (IFN- β) e interferón-co (IFN- ω). IFN- α y IFN- β comparten un único receptor dímérico que se expresa en la superficie de la mayor parte de las células nucleadas. Tanto el genoma humano como el de ratón contienen un único gen que codifica IFN- β , mientras que contienen 12 ó 13 genes funcionales que codifican IFN- α . La función de estas citoquinas es de gran importancia en la respuesta inmune frente a múltiples tipos de infecciones virales, puesto que ponen en marcha mecanismos que promueven la muerte por apoptosis de las células infectadas y la inhibición de la replicación viral al tiempo que favorece la presentación antigénica. Recientemente se ha documentado experimentalmente que también ejerce sus funciones activando directamente las actividades de linfocitos T, B y NK así como de células dendríticas en la respuesta inmunitaria (Le Bon A. *et al.*, 2003. Nat. Immunol. Vol.: 4(10): 1009-15; Le Bon A. *et al.*, 2006. J. Immunol. Vol: 176(8):4682-4689; Le Bon A. *et al.*, 2006. J Immunol. Vol:176(4):2074-8).

Como fármaco, el IFN- α está indicado en el tratamiento de las hepatitis virales crónicas y se utiliza en el tratamiento de algunas enfermedades malignas como por ejemplo el melanoma y la leucemia mieloide crónica. En Murata, M. *et al.*, 2006. Cytokine, Vol. 33: 121-128, se describen los efectos antitumorales de los interferones α y β sobre líneas celulares de carcinoma hepatocelular, tales como efecto antiproliferativo, cambio del ciclo celular y apoptosis.

5 El efecto antitumoral del IFN- α está mediado por efectos directos proapoptóticos sobre las células tumorales, efectos anti-angiogénicos sobre las células vasculares del tumor y efectos potenciadores sobre la respuesta inmunitaria antitumoral. Sin embargo, los ensayos clínicos demuestran que la eficacia del IFN- α en el tratamiento de tumores es muy limitada, de forma que el beneficio clínico comparado con los efectos adversos resulta poco favorable, y por ello su uso en oncología ha quedado muy limitado en la actualidad.

10 Existen numerosas referencias que recogen el tratamiento del cáncer mediante la administración combinada de distintos compuestos. Martinet, O. *et al.* (Journal of the National Cancer Institute, 2000, 92: 931-936) han descrito la remisión de la metástasis hepática en un ratón modelo mediante terapia génica, gracias a la administración de un adenovirus que transporta los genes que codifican interleuquina 12 (IL-12) y el ligando de 4-1BB. Chen, S. *et al.*

15 (Molecular Therapy, 2000, 2:39-46) han descrito una respuesta de células T CD8+ antitumoral efectiva gracias a la combinación de la terapia génica con IL-12 y la liberación sistémica de un anticuerpo monoclonal agonista contra 4-1BB. Tras el tratamiento combinado de IL-12 y anti-4-1BB, la dosis efectiva de IL-12 pudo reducirse hasta 18 veces y se alcanzó mayor eficacia que cuando se administra en solitario la máxima dosis de IL-12. En la solicitud de patente WO2004/093831, se describe la administración combinada de una vacuna celular que expresa citoquinas y, al menos, un agente terapéutico contra el cáncer, en donde la administración combinada de ambos compuestos supone

20 un incremento en la eficacia terapéutica con respecto a la eficacia alcanza cuando los compuestos se administran en solitario.

25 Por estos motivos, las estrategias que incluyen la combinación de la manipulación de la respuesta inmune al cáncer con los tratamientos médicos habituales, pueden ser el medio de mejorar la eficacia del tratamiento y bajar la toxicidad del mismo.

Compendio de la invención

30 En un aspecto la invención se relaciona con una composición que comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB o una variante funcionalmente equivalente del mismo y, al menos, un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

35 Debido a las aplicaciones terapéuticas de la composición según la presente invención, en otro aspecto la invención se relaciona con una composición que comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB o una variante funcionalmente equivalente del mismo y, al menos, un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en medicina.

40 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición según la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende una composición según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende, en uno o varios contenedores, de

- (i) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB o una variante funcionalmente equivalente del mismo,
- 50 (ii) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y opcionalmente,
- (iii) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un compuesto quimioterapéutico.

55 Los usos del kit descrito en la presente invención constituyen aspectos inventivos adicionales. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit según la invención para su uso en medicina o su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un interferón de tipo I, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, para promover el efecto antitumoral de un ligando agonista del receptor 4-1BB.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que comprende

- 65 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un ligando agonista del receptor 4-1BB o un variante funcionalmente equivalente del mismo, y

- (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

en donde ambas secuencias están precedidas por secuencias reguladoras de la expresión.

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende un polinucleótido descrito en la presente invención así como con una célula que comprende un vector de la invención.

Los usos del polinucleótido, vector y célula de la invención constituyen otro aspecto de la invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y una célula de la invención para su uso en medicina, con el uso del polinucleótido, vector y célula para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer así como con preparaciones farmacéuticas que comprenden el polinucleótido de la invención, el vector de la invención y la célula de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula según la invención para su uso en medicina así como con el uso de dicho kit para la elaboración de un medicamento en el tratamiento o prevención del cáncer.

20

Por último, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que codifica un interferón de tipo I, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, para promover el efecto antitumoral de un ligando agonista del receptor 4-1BB.

25

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Seguimiento del tamaño individual de nódulos tumorales subcutáneos (superficie de la lesión tumoral expresada en mm^2) resultado de la inoculación intradérmica de 5×10^5 células MC38 en ratones hembra C57BL/6.

30

En la Figura 1A se muestra la progresión de los tumores individuales tras ser tratados con dos dosis de los distintos tratamientos aplicadas en los días 9 y 13 tras el inoculo celular tumoral. Las dosis administradas en los distintos grupos fueron las siguientes: 50 μl de solución salina PBS intratumoral; una inmunoglobulina G policlonal de rata de especificidad irrelevante (100 μg en 100 μl vía intraperitoneal); el anticuerpo monoclonal anti-4-1BB (CD137) de ratón 2A (100 μg en 100 μl vía intraperitoneal); IFN- $\alpha 4$ de ratón recombinante ($0,5 \times 10^4$ U por vía intratumoral) en combinación con una inmunoglobulina G policlonal de rata de especificidad irrelevante (100 μg en 100 μl vía intraperitoneal), o la combinación de IFN- $\alpha 4$ de ratón recombinante ($0,5 \times 10^4$ U por vía intratumoral) más la administración del anticuerpo anti 4-1BB 2A (100 μg en 100 μl vía intraperitoneal). En la última gráfica de la Figura la se puede apreciar como el tratamiento combinado de IFN- $\alpha 4$ de ratón recombinante más la administración del anticuerpo anti 4-1BB 2A tiene un efecto terapéutico superior que se manifiesta en la supervivencia libre de tumor de 2 de seis ratones.

35

40

En la Figura 1B, donde se representa la superficie tumoral de cada grupo de experimentación (media \pm SEM) tras la inoculación de células tumorales.

45

En la Figura 1C, se puede apreciar como el tratamiento combinado de IFN- $\alpha 4$ de ratón recombinante más la administración del anticuerpo anti 4-1BB 2A tiene un efecto terapéutico superior, que se manifiesta en la supervivencia libre de tumor de 2 de seis ratones.

Figura 2: Estudios en ratones portadores de dos lesiones de tumores MC38 implantados simultáneamente por vía intradérmica en lados opuestos de la región dorso lumbar, de modo similar a los ratones de la figura 1, pero en este caso de forma bilateral.

50

En estos casos, los ratones fueron tratados con tres dosis aplicadas los días 9, 12 y 15 a contar tras la implantación bilateral de las células tumorales MC38. Los tratamientos consistieron en la inyección de Inmunoglobulina policlonal de rata vía intraperitoneal y el vehículo o medio en que se encuentra disuelto el Interferón- α de ratón (como controles negativos del experimento) por vía intratumoral únicamente en una de las lesiones, o la administración de anticuerpo monoclonal 2A anti-CD137 (4-1BB) (100 μg en 100 μl vía intraperitoneal) o las combinaciones de ambos tratamientos siempre inyectando el interferón- α o su vehículo en el grupo control correspondiente por vía intratumoral únicamente en uno de los nódulos (nódulo derecho). En la tercera pareja de gráficas de la Figura 2A, el número relativo de ratones con regresiones completas de ambos nódulos tumorales tanto en el grupo experimental tratado con anti-4-1BB intraperitoneal más vehículo control intratumoral fue 1/5, en comparación con el grupo experimental que recibe anticuerpo anti-4-1BB intraperitoneal mas la inyección intratumoral de interferón- α (cuarta pareja de gráficas de las Figura 2A), en donde el número relativo de ratones con regresiones completas de ambos nódulos tumorales fue 4/6.

55

60

65

En la Figura 2B se muestra la supervivencia de los ratones tras la inoculación de células tumorales y después del tratamiento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con el tratamiento del cáncer mediante el empleo de distintos agentes terapéuticos. Los inventores de la presente invención han descubierto que, de forma sorprendente, la administración combinada de un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I tiene un efecto netamente muy superior a cada tratamiento por separado en conseguir la erradicación de tumores múltiples establecidos en ratones.

Sin querer estar vinculados a ninguna teoría, se piensa que la administración de IFN- α tiene la capacidad de inducir modificaciones en el tejido maligno o en los linfocitos del sujeto portador del tumor que favorecen la inducción de una respuesta inmunitaria que, en el caso del tratamiento combinado, es amplificada en presencia de un ligando agonista del receptor 4-1BB, tal como un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB.

Así, la presente invención se relaciona con el tratamiento del cáncer mediante la administración combinada de un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I, consiguiendo con ello un efecto terapéutico mayor que si dicho ligando e interferón se administran por separado.

Por tanto, en un aspecto la invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante, composición de la invención, que comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB y, al menos, un interferón de tipo I.

En la presente invención, el ligando agonista del receptor 4-1BB y el interferón de tipo I se consideran “agentes antitumorales” o “ingredientes activos” o “principios activos” de la composición de la invención y, por tanto, dichas expresiones son empleadas indistintamente a lo largo de la descripción para referirse a ellos.

En la presente invención se entiende por “ligando agonista del receptor 4-1BB” al ligando que se une específicamente al receptor 4-1BB (también conocido como receptor CD137) y que al unirse es capaz de estimular algunas de las señales de coestimulación características de la unión de dicho receptor con su ligando natural (4-1BBL o CD137-L) u otras señales que resultan de la unión de dicho receptor con un anticuerpo agonista de 4-1BB.

Existen una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar la actividad de ligandos agonistas del receptor 4-1BB, tales como la coestimulación *in vitro* del crecimiento de células T descrito en Wilcox, R. *et al.* 2002, J. Clin. Invest. Vol. 109(5): 651-659. Brevemente, dicho ensayo consiste en colocar un cultivo de células T en presencia de un ligando agonista de 4-1BB, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-4-1BB, y medir la proliferación de las células T mediante la incorporación de tritio. Alternativamente, es posible detectar la actividad agonística de un ligando agonista 4-1BB mediante la detección de cambios en los niveles de expresión de la ciclina D2 en células T tras ser expuestas a dicho ligando, tal y como se describe en WO2005035584.

Ejemplos de ligandos agonistas del receptor 4-1BB son (i) el ligando natural del propio receptor 4-1BB, o una variante funcionalmente equivalente del mismo que conserve la capacidad de unirse al receptor 4-1BB e inducir señales de coestímulo sobre él, o (ii) un anticuerpo agonista frente al receptor 4-1BB, o una variante funcionalmente equivalente del mismo capaz de unirse específicamente al receptor 4-1BB y, más particularmente, al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir algunas de las señales de coestimulación controladas por este receptor y proteínas asociadas. La especificidad de unión puede ser para el receptor 4-1BB humano o para un receptor 4-1BB homólogo al humano de una especie diferente.

Así, en una realización particular de la composición de la invención, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Los ligandos naturales del receptor 4-1BB de origen humano y murino son conocidos en el estado de la técnica. El ligando del receptor 4-1BB humano corresponde al polipéptido de 254 amino ácidos cuya secuencia se representa en la base de datos Uniprot con el número de acceso P41273 y que está codificado por el polinucleótido cuya secuencia se representa en la base de datos GenEMBL bajo el número de acceso U03398 (SEQ ID NO:1). El ligando del receptor 4-1BB de ratón corresponde al polipéptido cuya secuencia viene indicada en la base de datos Uniprot con el número de acceso P41274 y que está codificado por el polinucleótido cuya secuencia se representa en la base de datos GenEMBL bajo el número de acceso L15435 (SEQ ID NO:2). El ligando del receptor 4-1BB es una proteína de membrana de tipo II. Por tanto, la invención contempla el uso de la proteína completa (SEQ ID Nos:3 y 4 para las proteínas de origen humano y murino respectivamente) así como la región extracelular de las mismas (SEQ ID Nos:5 y 6 para las proteínas de origen humano y murino respectivamente). Así, la invención contempla el uso de una forma soluble del ligando del receptor 4-1BB que comprende amino ácidos 106 a 309 de la proteína de origen murino (según se describe en US6355779), de proteínas de fusión entre la forma soluble de 4-1BB y la región Fe (según se describe en US6355779), de una molécula de inmunoglobulina y versiones dimericas de las mismas (según se describen en US6355779), de trímeros de la fracción soluble del ligando del receptor de 4-1BB (según se describen en WO2007000675), de trímeros de proteínas de fusión formadas por el dominio extracelular del ligando del receptor 4-1BB, un enlazador y la región correspondiente a las regiones variables de las cadenas ligera y pesadas de una inmunoglobulina específica para un receptor presente en las células T y capaz de promover la activación de éstas, tales como han sido descritos en WO2004069876.

Por variante funcionalmente equivalente del ligando natural del receptor 4-1BB se entiende cualquier polipéptido cuya secuencia se pueda obtener mediante inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de las secuencias de la secuencia del ligando natural de 4-1BB y que conserve al menos parcialmente la capacidad de esti-

ES 2 336 873 A1

5 mular el receptor 4-1BB, determinado mediante el ensayo mencionado anteriormente. Preferiblemente, las variantes del ligando natural de 4-1BB tienen una identidad de secuencia con dicho ligando de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. La determinación del grado de identidad entre las
5 variantes y el ligando natural se lleva a cabo usando métodos y algoritmos informáticos ampliamente conocidos para el experto en la materia. Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de amino ácidos se determina usando el algoritmo BLASTP (BLASTManual, Altschul, S., *et al*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990).

10 En otra realización particular de la composición de la invención, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB el cuál, puede ser de cualquier clase o subclase de inmunoglobulinas, tales como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En una realización particular, al menos uno de dichos anticuerpos agonistas anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.

15 En la presente invención, el término “anticuerpo” ha de ser interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos (F(ab')₂, Fab, siempre que sean capaces de reconocer al antígeno de interés, es capaz de unirse específicamente al receptor 4-1BB o al dominio extracelular de dicho receptor.

20 En la presente invención, se entiende por “anticuerpo agonista del receptor 4-1BB” todo aquel anticuerpo que es que es capaz de unirse específicamente al receptor 4-1BB, o al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir algunas de las señales de coestimulación controladas pro el receptor 4-1BB y proteínas asociadas. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de a presente invención son, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos
25 totalmente humanos, etc.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.
30

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas, por ejemplo en Köhler y Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow y Lane [“Using Antibodies. A Laboratory Manual” de E. Harlow y D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].
35

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.
40

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas. Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (por ejemplo ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo (en la presente invención con el receptor 4-1BB). Estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en bibliotecas de fagos (phage display) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (display) conocido por el experto en la materia, de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.
45
50
55

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR.

60 Así, en una realización particular de la composición de la invención, al menos, un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado. Ejemplos de anticuerpos humanizados específicos para el receptor 4-1BB se han descrito en WO200410947.

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, dentro del término “anticuerpo” también se incluyen variantes con un patrón de glucosilación alterado, tal y como se ha descrito en WO2006088447 así como fragmentos de anticuerpos, obtenidos a partir de la proteína o mediante tecnología recombinante, glicosilados o no glicosilados, que pueden consistir (i) en zonas variables de los anticuerpos unidas entre sí por un péptido de unión (scFv), (ii) en la zona variable junto a la constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas
65

o mediante péptidos de unión y puente disulfuro (scFab), (iii) nuevas variantes, como cadenas pesadas solas, o (iv) cualquier modificación que se haga de los fragmentos de anticuerpo con el fin de hacerlos más afines, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en fluidos biológicos y que tengan capacidad de producir alguna de las señales de coestímulo características del receptor 4-1BB.

5

Los anticuerpos agonistas del receptor 4-1BB descritos en la presente invención pueden obtenerse por medio de técnicas convencionales de ingeniería genética o recombinante, de producción de anticuerpos, de extracción y purificación a partir de fluidos o tejidos biológicos, o por cualquier otra técnica convencional para la obtención de proteínas y anticuerpos las cuales, son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Cuando los agonistas del receptor 4-1BB son anticuerpos, para su producción pueden utilizarse, sin que esto suponga limitación alguna, entre otras: técnicas de inmunización en animales, incluidos animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados frente al antígeno de interés y que podrían ser seleccionadas mediante muy diferentes métodos de presentación o “display” (phage display, ribosome display, etc.) y posteriormente, mediante técnicas de ingeniería genética podrían ser rediseñadas y expresadas en vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

10

15

20 ■ “Handbook of Therapeutic Antibodies”, de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);

20

■ “Antibodies: Volume 1: Production y Purification” de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1 st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);

25

■ “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies y Therapeutic Use”, de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158);

■ “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

30

Más específicamente, para la producción y obtención de anticuerpos que se unen específicamente al receptor 4-1BB pueden utilizarse cualquiera de los métodos descritos en WO98/16249, WO2004/010947, US2004/0109847 y US2005/0013811, cuyo contenido se incluye en su integridad como referencia.

35

Tal como se ha indicado anteriormente, la composición de la invención comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I. Al menos, un interferón de los empleados en la preparación del medicamento de la invención es cualquier clase de interferón de tipo I, tal como IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ e IFN- ω .

40

En una realización particular, al menos un interferón de tipo I comprendido en la composición de la invención se selecciona del grupo que comprende el interferón-alfa (IFN- α) y el interferón-beta (IFN- β).

Cuando el interferón de tipo I es IFN- α , éste puede corresponder a cualquier interferón codificado por cualquier gen miembro de la familia de genes del IFN- α humano. En una realización particular, al menos, un interferón de tipo I es un IFN- α seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8 y combinaciones de los mismos, incluyendo su combinación con otras sustancias en formulaciones farmacéuticas.

45

Una lista de especies de interferón tipo I, particularmente IFN- α e IFN- β que pueden emplearse de acuerdo con la invención, puede encontrarse en Bekisz *et al.* (Growth Factors, 2004; 22: 243-251) y en Petska *et al.* (Immunological Reviews, 2004; 202: 8-32). Adicionalmente, para la preparación de la composición de la invención podría utilizarse una combinación de interferones, como por ejemplo IFN- α n1 (derivado linfoblastoide) o IFN- α 3 [combinación de interferones producida por leucocitos humanos estimulados con el virus Sendai (u otro virus) o partículas virales].

50

El origen del interferón de tipo I empleado no constituye un aspecto crítico de la invención. Este puede ser de origen natural, extraído y purificado a partir de fluidos o tejidos biológicos, o producidos mediante métodos convencionales de ingeniería genética y recombinante, como los descritos en Sambrook y Russel (“Molecular Cloning: a Laboratory manual” de J. Sambrook, D.W. Russel Eds. 2001, tercera edición, Cold Spring Harbor, New York), por procedimientos de síntesis o por cualquier otra técnica convencional descrita en el estado de la técnica.

55

En una realización particular de la invención, al menos, un interferón de tipo I comprendido en la composición de la invención se encuentra en forma pegilada. Algunos ejemplos para la preparación de formas pegiladas de interferón pueden encontrarse en US5762923 y US5766582. Por otra parte, también es posible emplear algunas de las formas de interferón ya disponibles comercialmente, bien sean formas pegiladas o no. Entre estas se incluyen, sin que suponga limitación alguna, ROFERON-A (IFN- α 2a humano recombinante) y PEGASYS (IFN- α pegilado) de Hoffmann La Roche Inc., INTRON-A (IFN- α 2b humano recombinante) y PEG-INTRON (IFN- α 2b pegilado) de Schering Corp., ALFERON-N (IFN- α 3n, combinación de interferones de origen natural) de Interferón Sciences, o IFNERGEN (IFN- α con1) de InterMune Pharmaceuticals Inc., cuya secuencia es una secuencia consenso que no se corresponde exac-

60

65

ES 2 336 873 A1

tamente con una secuencia natural. Se incluyen también formulaciones de IFN- β , tales como por ejemplo AVONEX (IFN- β 1a) de Biogen Idec, REBIF (IFN- β 1a) de EMD Serono, Inc. y BETASERON (IFN- β 1b) de Bayer Health Care.

5 En otra realización particular, la composición de la invención comprende, además, un compuesto quimioterapéutico.

10 En la presente invención, se entiende por “compuesto quimioterapéutico” a aquellos compuestos o agentes empleados en el tratamiento del cáncer, tales como agentes alquilantes, alcaloides, antimetabolitos, anticuerpos antitumorales, nitrosoureas, agonistas/antagonistas análogos, inmunomoduladores, enzimas y otras. En las tablas 1 y 2 la solicitud de patente WO2004/093831 se describen agentes quimioterapéuticos útiles en la puesta en práctica de la presente invención.

15 De acuerdo a la presente invención, la administración combinada de un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I en el tratamiento del cáncer, tiene un efecto terapéutico mayor que si dicho ligando e interferón se administran por separado.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición según la presente invención para su uso en medicina.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición según la presente invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición según la presente invención para el tratamiento o la prevención del cáncer.

30 En el contexto de la invención se entiende por “tratamiento antitumoral”, “tratamiento del cáncer” o “prevención del cáncer”, a la administración combinada de un ligando agonista del receptor 4-1BB y del interferón tipo I para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos del cáncer o tumor, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión, como por ejemplo, la aparición de metástasis. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico, para retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos, o un tratamiento terapéutico para suprimir o aliviar los síntomas después de manifestarse la enfermedad o en relación con su tratamiento quirúrgico o radioterápico.

35 El cáncer a tratar con la composición de la invención puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor. Entre estos tumores o cáncer se incluyen, sin limitación, cánceres hematológicos (por ejemplo, leucemias o linfomas), tumores neurológicos (por ejemplo, astrocitomas o glioblastomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (por ejemplo, cáncer de estómago, páncreas o colon), cáncer de hígado, cáncer de células renales, tumores genitourinarios (por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata), tumores óseos y tumores vasculares.

40 Así, en una realización particular, el cáncer que se va a tratar o prevenir usando la composición de la invención o el medicamento elaborado a partir de dicha composición, es un tumor sólido o, en otra realización particular, es carcinoma de colon.

45 La administración de la composición de la invención se puede efectuar por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial, y se puede administrar local o sistémicamente o directamente al sitio objetivo. Una revisión de las distintas vías de administración de principio activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faullí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

55 El régimen de dosificación lo determinará el médico y los factores clínicos. Como se sabe bien en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores que incluyen las características físicas del paciente (edad, tamaño, sexo), la vía de administración utilizada, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular empleado y de las propiedades farmacocinéticas del individuo.

La composición de la invención puede contener una cantidad de agentes antitumorales que pueden variar dentro de un amplio intervalo, pero siempre en cantidades terapéuticamente eficaces.

60 En la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente eficaz” a la cantidad de un ligando agonista del receptor 4-1BB y de interferón de tipo I suficiente para provocar un retraso en el crecimiento tumoral o la inhibición del mismo, o de inducir un incremento de la respuesta inmunitaria antitumoral.

65 Así, la composición de la invención puede contener una cantidad de los agentes antitumorales que oscila entre 0,1 y 2.000 mg, preferiblemente en el rango de 0,5 a 500 mg y, aún más preferiblemente, entre 1 y 200 mg. Dosis apropiadas de las composiciones pueden oscilar entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente, entre 0,5 y 20 mg/kg de peso corporal. La composición se puede administrar un número variable de veces al día, particularmente de 1 a 4 dosis al día.

ES 2 336 873 A1

La composición según la presente invención ha demostrado ser útil en el tratamiento antitumoral. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende la composición de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Para uso en medicina, las combinaciones de compuestos de la invención pueden encontrarse en forma de prodroga, sal, solvato o clatrato, bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales. Las combinaciones de compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser formuladas conjuntamente con un excipiente que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, granulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000) Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

En otro aspecto la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante, kit de la invención, que comprende uno o varios contenedores de

- (i) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB o una variante funcionalmente equivalente del mismo
- (ii) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo y, opcionalmente,
- (iii) una formulación farmacéuticamente aceptable de un compuesto quimioterapéutico.

En la presente invención se entiende por "kit", un producto que contiene los distintos principios activos que forman la composición empaquetados para permitir su transporte, almacenamiento y su administración de forma simultánea o secuencial. Así, los kits de la invención pueden contener una o más suspensiones, comprimidos, cápsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares que contienen los principios activos de la invención y que se pueden encontrar preparadas en una dosis única o como múltiples dosis. Adicionalmente, el kit puede contener un vehículo adecuado para la resuspensión de las composiciones de la invención tales como medios acuosos tales como solución salina, solución Ringer, solución Ringer lactato, dextrosa y cloruro sódico, medios solubles en agua, tales como alcohol, polietilenglicol, propil etilenglicol y vehículos insolubles en agua tales como aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato bencílico. Otro componente que puede estar presente en el kit es un empaquetamiento que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de unos límites determinados. Materiales adecuados para la preparación de tales empaquetamientos incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, sobres y similares.

En una realización particular del kit de la invención, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB.

En otra realización particular del kit de la invención, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB que, en otra realización todavía más particular, es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A o un anticuerpo humanizado.

En otra realización particular del kit de la invención, al menos, un interferón de tipo I se selecciona del grupo que comprende el IFN- α y el IFN- β .

En otra realización particular del kit de la invención, al menos, un interferón de tipo I es un IFN- α seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8 y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular del kit de la invención, al menos, un interferón de tipo I es un interferón pegilado.

Los distintos usos del kit de la invención, constituyen aspectos adicionales de la misma. Así, en un aspecto la invención se relaciona con un kit según la presente invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit según la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

ES 2 336 873 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer. En una realización particular, dicho cáncer es un tumor sólido o un carcinoma de colon.

5 Adicionalmente, el kit de la invención puede contener instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de las distintas formulaciones farmacéuticas que se encuentran en el kit. Por tanto, en una realización particular, el kit de la invención comprende, además, instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de los distintos componentes.

10 Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones.

15 Como entiende el experto en la materia, las formulaciones farmacéuticas del kit de la invención, es decir, las formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB o, al menos, un interferón de tipo I o un agente quimioterapéutico, estarán formuladas de acuerdo a la vía de administración que vaya a emplearse. Así, en una realización particular, la formulación farmacéutica que comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB, estará formulada de forma adecuada para su administración sistémica, y la
20 formulación farmacéutica que comprende, al menos, un interferón de tipo I estará formulada de forma adecuada para su administración intratumoral. Adicionalmente, en el contexto de la presente invención, la formulación farmacéutica que comprende el interferón de tipo I estará formulada, preferentemente, en una forma adecuada que favorezca su permanencia en el sitio administrado, como el tejido tumoral, o retarden su eliminación del mismo.

25 Tal como se ha indicado anteriormente en la presente descripción y sin querer estar vinculado a ninguna teoría, se postula que la administración intratumoral de un interferón de tipo I induce modificaciones en el tejido maligno que favorecen la inducción de una respuesta inmunitaria que, en el caso del tratamiento combinado, es amplificada en presencia del ligando agonista del receptor 4-1BB. Por tanto, preferentemente, en el contexto de la presente invención, el ligando agonista del receptor 4-1BB es administrado por vía parenteral o sistémica y el interferón de tipo I es
30 administrado por vía intratumoral.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un interferón de tipo I, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, para promover el efecto antitumoral de un ligando agonista del receptor 4-1BB.

35 Como entiende el experto en la materia, en lugar de administrar de forma combinada un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I para el tratamiento del cáncer, otra manera de poner en práctica la presente invención consiste en la administración de un vector que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I. De este modo, cuando el vector se exprese en el organismo receptor, producirá las correspondientes proteínas que ejercerán el efecto terapéutico anteriormente comentado
40 para el tratamiento del cáncer.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido, de aquí en adelante polinucleótido de la invención, que comprende

45 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un ligando agonista del receptor 4-1BB o un variante funcionalmente equivalente del mismo, y

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

50 en donde ambas secuencias están precedidas por secuencias reguladoras de la expresión.

La definición de “variante funcionalmente equivalente” coincide con la aportada anteriormente en relación con las
55 composiciones que contienen el polipéptido correspondiente el ligando 4-1BB.

El experto en la materia entiende que, mutaciones en la secuencia de nucleótidos del ligando agonista del receptor 4-1BB que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Por
60 tanto, dentro del término “variantes funcionalmente equivalentes”, están también incluidas (ii) variantes de un ligando agonista del receptor 4-1BB obtenidas a partir de la secuencia de aminoácidos de un ligando agonista del receptor 4-1BB mediante la sustitución, delección o inserción de uno o mas aminoácidos y (ii) que mantienen sustancialmente la función de la proteína original.

65 Por otro lado, las secuencias reguladoras de la expresión que preceden a las secuencias de nucleótidos del polinucleótido de la invención, están operativamente unidas a dichas secuencias de nucleótidos. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “operativamente unida” significa que las secuencias de nucleótidos están en el marco de lectura correcto para su expresión bajo el control de dichas secuencias reguladoras.

Las secuencias reguladoras de utilidad para la presente invención pueden ser secuencia promotores nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras (“enhancer”) y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea expresión constante de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares. Numerosos otros ejemplos de promotores constitutivos son bien conocidos en la técnica y se pueden emplear en la práctica de la invención. Si desea la expresión controlada de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se debe utilizar un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible está “silencioso”. Mediante “silencioso” se quiere decir que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico; en presencia de un inductor, sin embargo, se produce la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Con frecuencia, se puede controlar el nivel de expresión variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo variando la concentración del inductor de modo que un promotor inducible se estimula de forma más fuerte o más débil, se puede afectar la concentración del producto transcrito de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En el caso en el que la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un gen, se puede controlar la cantidad de proteína que se sintetiza. De esta manera, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: un promotor de estrógeno o andrógeno, un promotor de metalotioneína, o un promotor que responde a ecdisona. Otros ejemplos numerosos son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la práctica de la invención. Además de los promotores constitutivos e inducibles (que suelen funcionar en una gran variedad de tipos de células o tejidos), se pueden utilizar promotores específicos de tejido para alcanzar expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico específica en células o tejidos. Ejemplos bien conocidos de promotores específicos de tejido incluyen varios promotores específicos de músculo incluyendo: el promotor de la α -actina esquelética, el promotor de la actina cardíaca, promotor de la troponina C esquelética, promotor de la troponina C cardíaca de de contracción lenta, y el promotor/potenciador de la creatina quinasa. Existen numerosos promotores específicos de músculo que son bien conocidos en la técnica y que se pueden emplear en la práctica de la invención (para una revisión en promotores específicos de músculo ver Miller *et al.*, (1993) *Bioessays* 15: 191-196).

En una realización particular, el polinucleótido de la invención codifica el ligando natural del receptor 4-1BB.

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención codifica un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB que, en otra realización más particular, dicho anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es una inmuno globulina del tipo IgG-2A.

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención codifica un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB humanizado.

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención codifica un interferón de tipo I seleccionado del grupo que comprende el interferón-alfa y el interferón-beta.

En otra realización particular del polinucleótido de la invención, el interferón de tipo I es un interferón-alfa seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8 y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular del polinucleótido de la invención, el interferón de tipo I es un interferón pegilado.

El polinucleótido de la invención puede estar contenido dentro de un vector apropiado para su clonaje en una célula huésped. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante vector de la invención, que comprende un polinucleótido según la presente invención.

La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en el que se va a introducir. A modo de ejemplo, el vector de la invención puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. Las obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia y que pueden encontrarse en, por ejemplo, Sambrock *et al.*, 2001. “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Yol. 1-3.

No obstante, en el ámbito de la presente invención, preferentemente el vector de la invención es un vector viral o no viral adecuado para su empleo en terapia génica; a modo ilustrativo, no limitativo, dichos vectores pueden ser vectores virales basados en retrovirus, adenovirus, etc., o en caso de los no virales, los vectores pueden ser complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase “Nonviral Vectors for Gene Therapy”, editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores, virales y no virales, que contienen el polinucleótido de la invención, pueden ser administrados directamente al cuerpo humano o animal por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, incluido el hombre, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto, dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a su viabilidad.

Asimismo, como entiende el experto en la materia, dicho vector puede contener, entre otras cosas, sitios de clonaje múltiple, secuencias reguladoras de la expresión, orígenes de replicación adecuados a la célula huésped donde se va a introducir el vector, marcadores de selección, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende el vector de la invención.

Como se ha explicado anteriormente, otra manera de poner en práctica la presente invención consiste en la administración de un vector que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I. Así, cuando el vector se exprese en el organismo receptor, producirá las correspondientes proteínas que ejercerán el efecto terapéutico anteriormente comentado para el tratamiento del cáncer.

Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con el polinucleótido de la invención, con el vector de la invención o con la célula de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del polinucleótido de la invención, del vector de la invención o de la célula de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

En una realización particular, el cáncer es un tumor sólido o un carcinoma de colon.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende el polinucleótido de la invención, con el vector de la invención o con la célula de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende el polinucleótido de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende el polinucleótido de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende el polinucleótido de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento en el tratamiento o prevención del cáncer.

En una realización particular, el uso de un kit que comprende el polinucleótido de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento va dirigido al tratamiento o prevención de un tumor sólido o un carcinoma de colon.

Por último, en otro aspecto la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que codifica un interferón de tipo I, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, para promover el efecto antitumoral de un ligando agonista del receptor 4-1BB.

Adicionalmente, la invención se relaciona con un método para el tratamiento o la prevención del cáncer que comprende (i) la administración combinada, en una cantidad terapéuticamente eficaz, de un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I junto con, opcionalmente, un compuesto quimioterapéutico, o (ii) la administración de un polinucleótido, un vector o una célula según la presente invención. Dicho método puede comprender la administración separada, secuencial o simultánea, de dichos ligando e interferón, lo que permite emplear distintas vías de administración para cada componente.

El siguiente Ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo

Retraso del crecimiento de tumores en ratones mediante la administración combinada de un ligando agonista del receptor 4-1BB y un interferón de tipo I

I. Materiales y métodos

1.1 Cultivos celulares

La línea MC38 obtenida del laboratorio de James Mulé originalmente se cultivó *in vitro* en medio RPMI1640 (GIBCO) suplementado con 10% v/v de suero de ternera fetal (GIBCO). Las células son adherentes y, por tanto, se despegaron de los frascos de cultivo (GREINER) mediante incubación durante 5 minutos con una solución de tripsina (GIBCO) a temperatura ambiente. Las células tras ser lavadas, se dividieron para cultivo o se resuspendieron en suero salino para su inyección. El número de células se determinó mediante microscopía en cámaras de Neubauer.

1.2 Inoculación de las células tumorales

La inoculación de células tumorales MC38 en los animales de experimentación se realizó mediante una jeringuilla de insulina con aguja 28G aplicada de forma intradérmica, y con un trayecto subcutáneo suficiente para evitar el escape de la suspensión celular.

1.3 Obtención de los animales de experimentación

Los ratones singénicos respecto a la línea celular tumoral C57BL/6 (hembras de 6-9 semanas de edad) estuvieron en un estabulario libre de patógenos específicos bajo supervisión veterinaria. Los nódulos tumorales implantados en los ratones se siguieron y monitorizaron mediante medición con un calibre digital, y el área tumoral se calculó mediante la multiplicación de dos diámetros perpendiculares expresados en milímetros.

1.4 Obtención de los agentes antitumorales

1.4.1 Anticuerpo monoclonal anti-4-1BB

El anticuerpo monoclonal anti-4-1BB fue producido por el hibridoma 2 A (subclase de inmunoglobulina IgG2A) obtenido por el Dr. Lieping Chen en la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, Estados Unidos) que reconoce el receptor 4-1BB de ratón y produce sobre ella efectos agonistas (Wilcox RA, *et al.* 2002. J Clin Invest. 109(5):651-9).

El anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de las células del hibridoma mediante cromatografía de afinidad sobre columnas empaquetadas con proteína G sefarosa siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia). El anticuerpo en solución se dializó frente a buffer fosfato salino (PBS), y la concentración de anticuerpo se determinó mediante espectrometría analizando la absorbancia de la solución de anticuerpo a 280 nM en comparación con el tampón salino. El anticuerpo se preservó a -80°C hasta su utilización tras verificar su capacidad de unión al antígeno sobre células T activadas de ratón y determinar la ausencia de endotoxina contaminante. El anticuerpo control utilizado es una inmunoglobulina G de rata policlonal producida por SIGMA y preservada de modo similar.

1.4.2 Interferón de tipo I

El IFN- α 4 de ratón se produjo en una línea de hibridoma transfectada establemente con un plásmido de expresión (Le Bon A. *et al.* 2003. Nature Immunology, Vol. 4:1009-1015). El gen que codifica para IFN- α 4 se clonó en el plásmido de expresión pEE12 plasmid (Celltech). Después de su amplificación en *Escherichia coli* se purificó el plásmido y se secuenció el transgen. El plásmido pEE12 que codifica el cDNA de IFN- α 4 se utilizó para transfectar la línea celular de mieloma de ratón NS0. Las colonias (clones) se sometieron a screening tras crecimiento en medio de cultivo de selección y se eligió una única colonia de células transfectantes por su alta expresión de IFN- α 4. Las células se cultivaron durante 10-15 días a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/ml en medio libre de suero suplementado con Cholesterol Lipid Concéntrate (1x; Life Technologies). El sobrenadante del cultivo recogido se analizó en su contenido de IFN- α 4 mediante un ensayo de inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular sobre células L en cultivo en monocapa microplacas Falcon (Becton Dickinson). Las preparaciones de IFN- α 4 mostraron una actividad de 2×10^6 U/ml. La concentración de IFN- α se verificó mediante IFN- α enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PBL Biomedical Laboratories).

Un medio idéntico de cultivo pero en el que no han proliferado los transfectantes utilizados se utilizó como control (vehículo control). El IFN- α 4 se cuantificó mediante ELISA en comparación con una recta patrón (R&D).

1.5 Administración de los agentes antitumorales

La inyección de los anticuerpos se realizó por punción intraperitoneal e inyección de la solución que contiene el anticuerpo a la cavidad peritoneal. La inyección del IFN- α 4 de ratón o del vehículo control se realizó en el interior del nódulo tumoral al que se accede mediante una jeringuilla de insulina 28G.

II. Resultados

Según se observa en los resultados presentados en la Figura 1, la administración repetida del anticuerpo 2A anti-4-1BB retrasa ligeramente el crecimiento de tumores derivados de MC38. En un grupo de 6 ratones singénicos tratados con 100 μ g de anticuerpo (dosis estándar en la literatura) por vía intraperitoneal los días 9, 13 tras la implantación de las células tumorales, se observó la regresión tumoral de los tumores derivados de MC38. En cambio la administración repetida en día 9 y 12 en el interior nódulo tumoral de IFN- α 4 (10^4 U/dosis) un grupo similar de ratones no altera la progresión de los tumores comparada con los grupos control. Sin embargo cuando un grupo de ratones recibe éstos tratamientos de forma combinada, el efecto antitumoral es manifiesto, retrasándose el crecimiento de los tumores que en dos de seis casos se reducen hasta desaparecer definitivamente.

Para comprobar si el efecto antitumoral es sistémico, es decir, el efecto se ejerce a distancia sobre nódulos tumorales no tratados intratumoralmente con interferón de tipo I, se procedió a implantar dos nódulos subcutáneos derivados de células MC38 situadas a distancia en ambos lados del ratón (Figura 2). En estas condiciones, los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal en tres dosis de 100 μ g aplicadas los días 9, 12 y 15 tras la implantación de las células tumorales y se analizó el crecimiento de los dos nódulos tumorales concomitantes. En dichas condiciones experimentales, se comprobó un efecto retardante en el crecimiento del tumor con el tratamiento con anti-4-1BB y el tratamiento intratumoral unilateral con el vehículo control que resulto en un ratón de seis rechazando ambos nódulos tumorales. Sin embargo, el grupo tratado con tres dosis de interferón- α intratumoral de modo unilateral y dosis idénticas de anticuerpo monoclonal anti-4-1BB por vía intraperitoneal resultó en el rechazo completo bilateral de los tumores en cuatro de seis ratones. Estos datos analizados en curvas de supervivencia indican el efecto sinérgico de ambos tratamientos para inducir el rechazo de tumores.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB o una variante funcionalmente equivalente del mismo y, al menos, un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
2. Composición según la reivindicación 1 en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1 en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo anti-receptor 4-1BB.
- 15 4. Composición según la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.
5. Composición según las reivindicaciones 2, 3 ó 4, en donde el anticuerpo anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el interferón de tipo I se selecciona del grupo que comprende el interferón-alfa y el interferón-beta.
7. Composición según la reivindicación 6, en donde el interferón de tipo I es un interferón-alfa seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8 y combinaciones de los mismos.
- 25 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, al menos, un interferón de tipo I es un interferón pegilado.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende, además, un compuesto quimioterapéutico.
- 30 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en medicina.
11. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.
- 35 12. Uso según la reivindicación 11, en donde el cáncer es un tumor sólido.
13. Uso según la reivindicación 11, en donde el cáncer es un carcinoma de colon.
- 40 14. Una preparación farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Un kit que comprende, en uno o varios contenedores,
- 45 (i) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB, o una variante funcionalmente equivalente del mismo,
- (ii) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un interferón de tipo I, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y opcionalmente,
- 50 (iii) una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un compuesto quimioterapéutico.
- 55 16. Kit según la reivindicación 15, en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB.
17. Kit según la reivindicación 16 en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB.
- 60 18. Kit según la reivindicación 17 en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.
19. Kit según la reivindicación 16, 17 ó 18 en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado.
- 65 20. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 en donde el interferón de tipo I se selecciona del grupo que comprende el interferón-alfa y el interferón-beta.

ES 2 336 873 A1

21. Kit según la reivindicación 20 en donde el interferón de tipo I es un interferón-alfa seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8 y combinaciones de los mismos.

22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21 en donde el interferón de tipo I es un interferón pegilado.

23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22 para su uso en medicina.

24. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23 que comprende, además, instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de los distintos componentes.

25. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

26. Uso según la reivindicación 25, en donde el cáncer es un tumor sólido.

27. Uso según la reivindicación 26, en donde el cáncer es un carcinoma de colon.

28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en donde la administración separada de los distintos componentes comprende la administración sistémica del ligando agonista del receptor 4-1BB.

29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en donde la administración separada de los distintos componentes comprende la administración intratumoral del interferón de tipo I.

30. Un polinucleótido que comprende

(i) una secuencia de nucleótidos que codifica un ligando agonista del receptor 4-1BB o un variante funcionalmente equivalente del mismo, y

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un interferón de tipo I o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

en donde ambas secuencias están precedidas por secuencias reguladoras de la expresión.

31. Polinucleótido según la reivindicación 30, en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB.

32. Polinucleótido según la reivindicación 30, en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB.

33. Polinucleótido según la reivindicación 32, en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.

34. Polinucleótido según las reivindicaciones 31, 32, ó 33, en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado.

35. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, en donde el interferón de tipo I se selecciona del grupo que comprende el interferón-alfa y el interferón-beta.

36. Polinucleótido según la reivindicación 35, en donde el interferón de tipo I es un interferón-alfa seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8 y combinaciones de los mismos.

37. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 36 en donde el interferón de tipo I es un interferón pegilado.

38. Un vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 37.

39. Una célula que comprende un vector según la reivindicación 38.

40. Un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 37, un vector según la reivindicación 38 o una célula según la reivindicación 39, para su uso en medicina.

41. Uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 37, un vector según la reivindicación 38 o una célula según la reivindicación 39 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

42. Uso según la reivindicación 41, en donde el cáncer es un tumor sólido.

ES 2 336 873 A1

43. Uso según la reivindicación 41, en donde el cáncer es un carcinoma de colon.

5 44. Una preparación farmacéutica que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 37, un vector según la reivindicación 38 o una célula según la reivindicación 39 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45. Un kit que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 37, un vector según la reivindicación 38 o una célula según la reivindicación 39.

10 46. Kit según la reivindicación 45 para su uso en medicina.

47. Uso de un kit según la reivindicación 45 para la elaboración de un medicamento en el tratamiento o prevención del cáncer.

15 48. Uso según la reivindicación 47, en donde el cáncer es un tumor sólido.

49. Uso según la reivindicación 47, en donde el cáncer es un carcinoma de colon.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

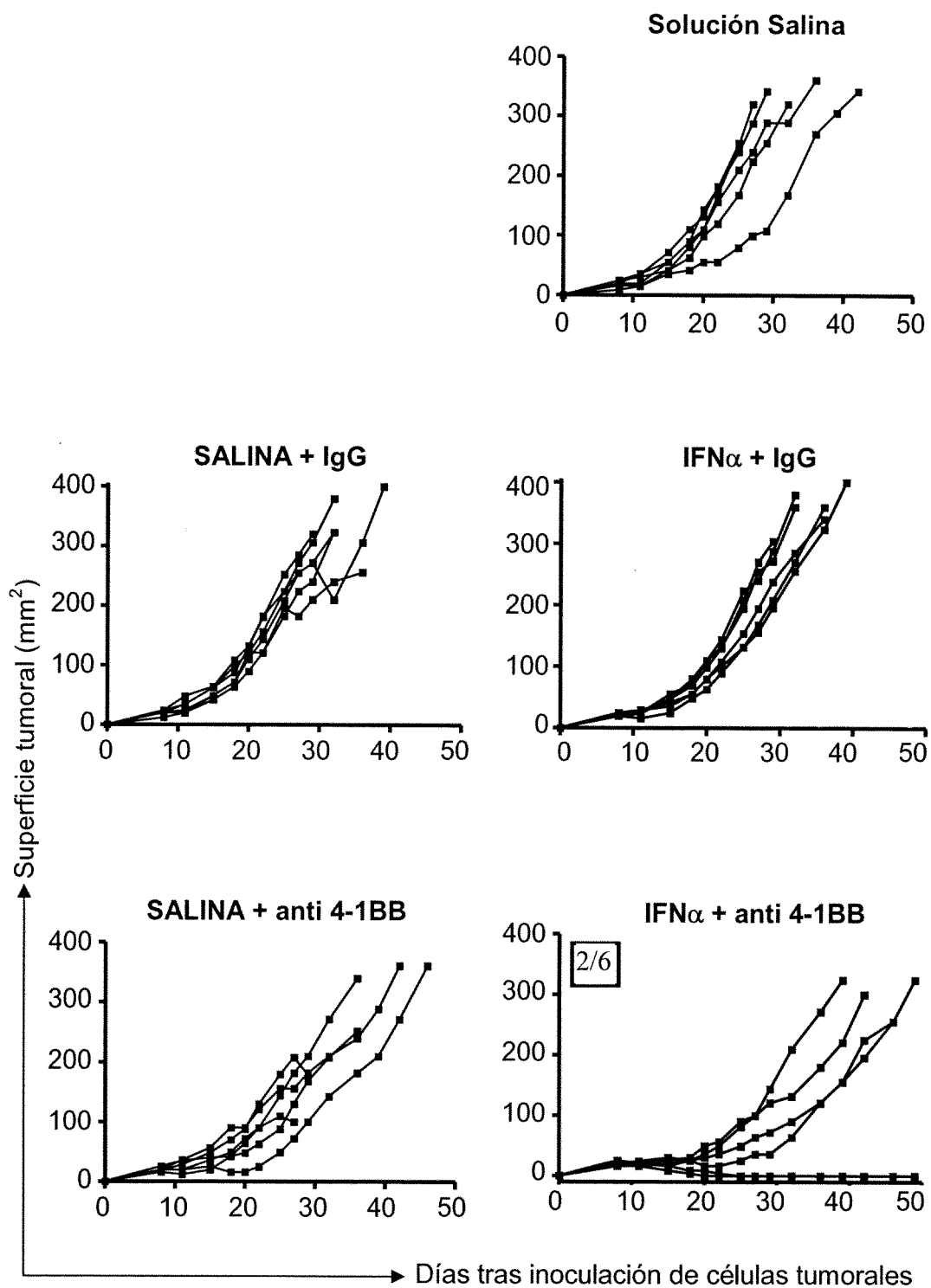


Figura 1A

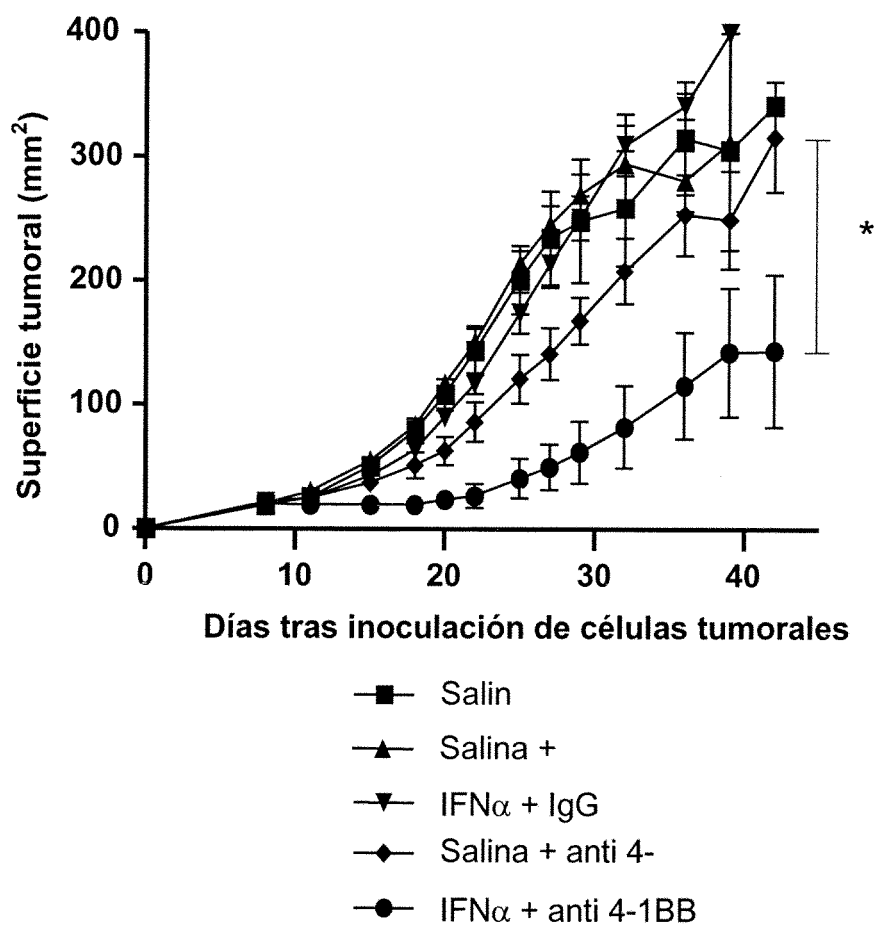


Figura 1B

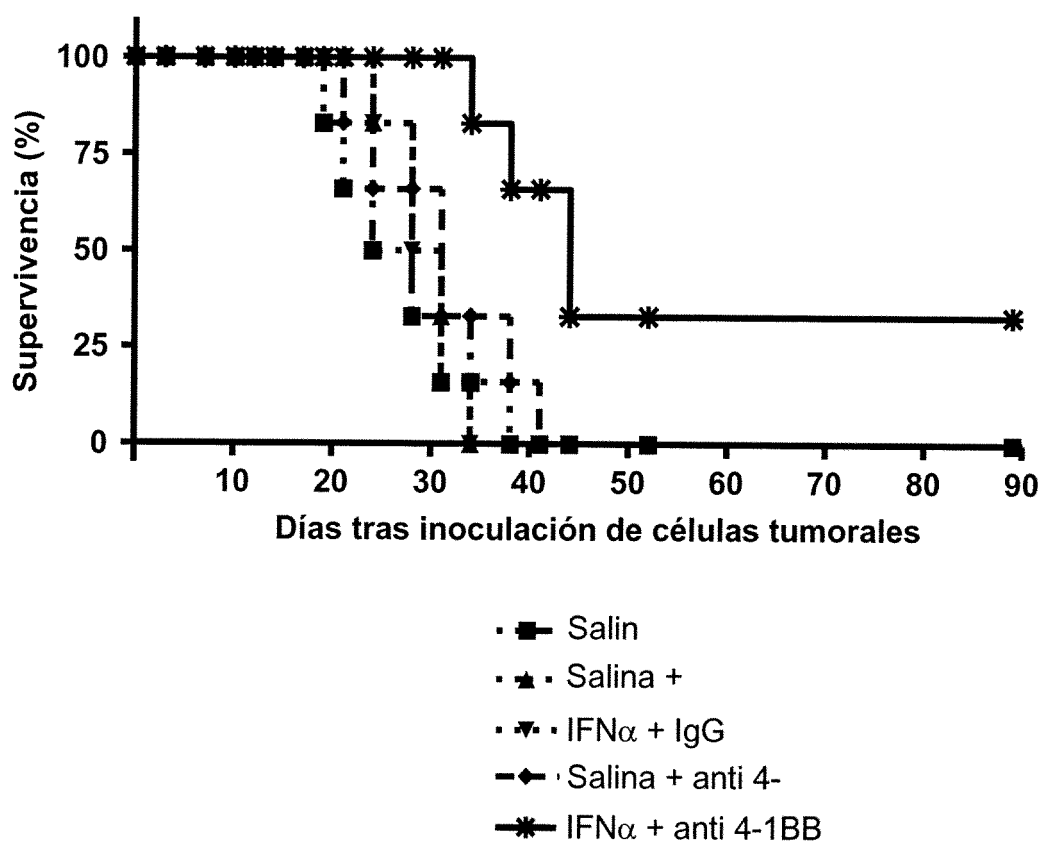


Figura 1C

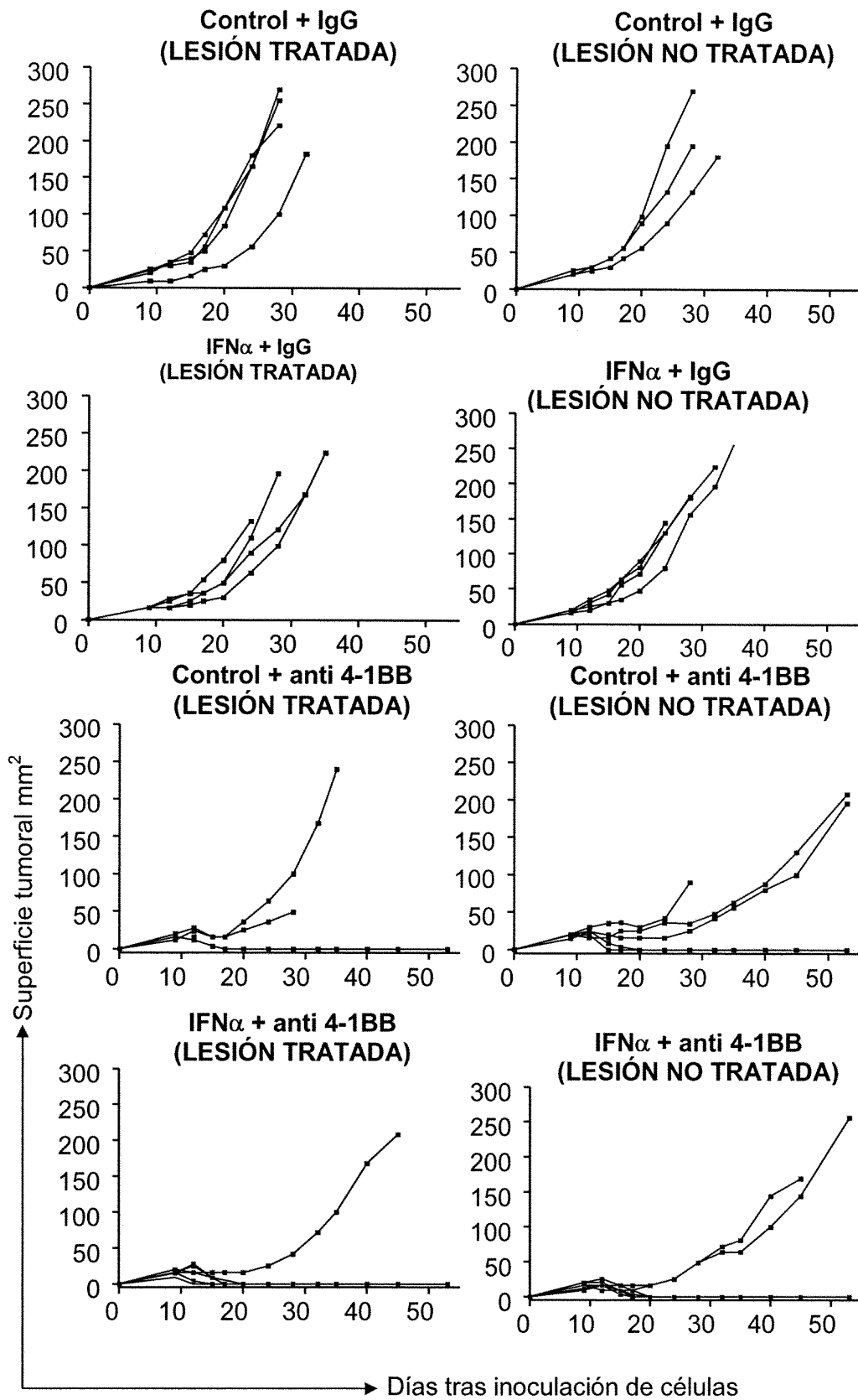


Figura 2A

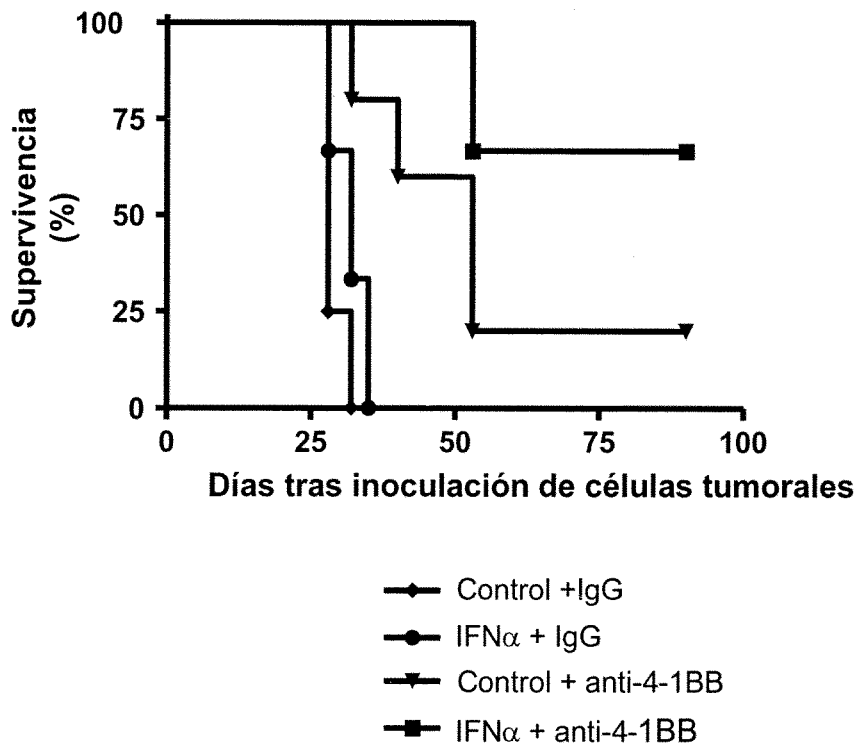


Figura 2B

ES 2 336 873 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Proyecto de Biomedicina CIMA, S.L.
Institut National de la Santé et de la Reserche Médicale

5

<120> COMPOSICIÓN FARMACEÚTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> P3297ES00

10

<140> P200702961.8

<141> 2007-11-07

15

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 1619

<212> DNA

25

<213> *H. sapiens*

<400> 1

30	gtcatggaat acgcctctga cgcttcactg gaccccgaag ccccgaggcc tcccgcgccc	60
	cgcgctcgcg cctgcccgt actgccttgg gcctggctcg cggggctgct gctgctgctg	120
	ctgctcgctg ccgcctgcgc cgtcttcctc gctgcccct gggcctgtgc cggggctcgc	180
35	gcctcgcccg gctccgcggc cagcccgaga ctccgcgagg gtcccagct ttcgcccagc	240
	gatcccgcgg gcctcttggc cctgcggcag ggcatgtttg cgcagctggt ggcccaaat	300
	gttctgctga tcgatgggcc cctgagctgg tacagtacc caggcctggc aggcgtgtcc	360
40	ctgacggggg gcctgagcta caaagaggac acgaaggagc tgggtggtggc caaggctgga	420
	gtctactatg tcttctttca actagagctg cggcgcgtgg tggccggcga gggctcaggc	480
45	tccgtttac ttgcgctgca cctgcagcca ctgcgctctg ctgctggggc cgcgcctctg	540
	gctttgaccg tggacctgcc accgcctcc tccgaggtc ggaactcggc cttcggtttc	600
	cagggccgct tgctgcacct gaggccggc cagcgcctgg gcgtccatct tcacactgag	660
50	gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc cagggcgcca cagtcttggg actcttccgg	720
	gtgacccccg aaatcccagc cggactccct tcaccgaggt cgggaataacg cccagcctgg	780
55	gtgcagccca cctggacaga gtccgaatcc tactccatcc ttcattgaga cccctgggtc	840
	tgggtccctg ctgctttctc tacctcaagg ggcttggcag gggccctgc tgctgacctc	900
	ccctgagga ccctcctcac cactccttc cccaagttgg accttgatat ttattctgag	960
60	cctgagctca gataatata tatatatatt atatatatat atatatttct atttaagag	1020
	gatcctgagt ttgtgaatgg acttttttag aggagttgtt ttgggggggg ggtcttcgac	1080
	attgccgagg ctggtcttga actcctggac ttagacgatc ctctgcctc agcctcccaa	1140
65	gcaactggga ttcattcctt ctattaattc attgtactta tttgcctatt tgtgtgtatt	1200

ES 2 336 873 A1

	gagcatctgt aatgtgccag cattgtgccc aggctagggg gctatagaaa catctagaaa	1260
	tagactgaaa gaaaatctga gttatggtaa tacgtgagga atttaaagac tcatccccag	1320
5	cctccacctc ctgtgtgata cttgggggct agcttttttc tttctttctt ttttttgaga	1380
	tggctctgtt ctgtcaacca ggctagaatg cagcggtgca atcatgagtc aatgcagcct	1440
10	ccagcctcga cctcccgagg ctcaggtgat cctcccatct cagcctctcg agtagctggg	1500
	accacagttg tgtgccacca cacttggtta actttttaat ttttttgagg agacgggtatt	1560
15	gctatgttgc caaggttgtt tacatgccag tacaatttat aataaacact catttttcc	1619

<210> 2

<211> 1239

20 <212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 2

	agcctataaa gcacggggcac tggcgggaga cgtgcactga cgcaccgtgg taatggacca	60
	gcacacactt gatgtggagg ataccgcgga tgccagacat ccagcaggta cttcgtgccc	120
30	ctcggatgcg gcgctcctca gagataccgg gctcctcggc gacgctgcgc tcctctcaga	180
	tactgtgcgc cccacaaatg ccgcgctccc cacggatgct gcctaccctg cggttaatgt	240
35	tcgggatcgc gaggccgcgt ggccgcctgc actgaacttc tgttcccgcc acccaaagct	300
	ctatggccta gtcgctttgg ttttgctgct tctgatcgcc gcctgtgttc ctatcttcac	360
40	ccgcaccgag cctcggccag cgctcacaat caccacctcg cccaacctgg gtaccggaga	420
	gaataatgca gaccaggtca ccctgtttc ccacattggc tgcccccaaca ctacacaaca	480
45	gggctctcct gtgttcgcca agctactggc taaaaaccaa gcatcgttgt gcaatacaac	540
	tctgaactgg cacagccaag atggagctgg gagctcatac ctatctcaag gtctgaggta	600
	cgaagaagac aaaaaggagt tggtggtaga cagtcccggg ctctactacg tatttttgga	660
50	actgaagctc agtccaacat tcacaaacac aggccacaag gtgcagggct gggctctctct	720
	tgttttgcaa gcaaagcctc aggtagatga ctttgacaac ttggccctga cagtggaact	780
	gttcccttgc tccatggaga acaagttagt ggaccgttcc tggagtcaac tgttgctcct	840
55	gaaggctggc caccgcctca gtgtgggtct gagggttat ctgcatggag cccaggatgc	900
	atacagagac tgggagctgt cttatcccaa caccaccagc tttggactct ttcttgtaa	960
60	acccgacaac ccatgggaat gagaactatc cttcttgtga ctctagttg ctaagtcctc	1020
	aagctgctat gttttatggg gtctgagcag gggcccttc catgacttcc tcttgtcttt	1080
	aactggactt ggtatttatt ctgagcatag ctgagacaag actttatata attcactaga	1140
65	tagcattagt aaactgctgg gcagctgcta gataaaaaa aatttctaaa tcaaagttta	1200
	tatttatatt aatatataaa aataaatgtg tttgtaaat	1239

ES 2 336 873 A1

<210> 3

<211> 254

<212> PRT

5 <213> *H. sapiens*

<400> 3

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

ES 2 336 873 A1

Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175

5 Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val
 180 185 190

10 Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro
 195 200 205

15 Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val
 210 215 220

20 Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu Thr
 225 230 235 240

25 Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser
 245 250 255

30 Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly
 260 265 270

35 Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu
 275 280 285

40 Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro
 290 295 300

40 Asp Asn Pro Trp Glu
 305

45 <210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> Región transmembrana proteína humana

55 <400> 5
 Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
 1 5 10 15

60 Gln Asn Val Leu Leu Ile
 20

65 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT

ES 2 336 873 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Región transmembrana proteína ratón

<400> 6

10 Ala Ala Leu Leu Arg Asp Thr Gly Leu Leu Ala Asp Ala Ala Leu Leu
1 5 10 15

15 Ser Asp Thr Val Arg Pro Thr
20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 873

② Nº de solicitud: 200702961

③ Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007048077 A2 (GTC BIOTHERPAUTICS INC [US]; SCHINDLER DANIEL [US]; MEADE HARRY M [US]) 26.04.2007, páginas 6-7,16-19,30-34,36-38,46.	1-29
A	LE BON AGNES et al. "Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN." Journal of immunology (2006) Vol. 176, no. 4, páginas 2074-2078. Páginas 2074-2075.	1-49
A	LE BON AGNES et al. "Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8(+) T cell response during cross-priming." Journal of immunology (2006) Vol. 176, no. 8, páginas 4682-4689. Páginas 4682-4684,4687-4688.	1-49
A	JU SEONG-A et al. "Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes." Immunology and Cell Biology (2005) Vol. 83, páginas 344-351. Páginas 344,347-351.	1-49

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.03.2010

Examinador

M. Jesús García Bueno

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI , TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	8, 22, 30-49	SÍ
	Reivindicaciones	1-7, 9-21, 23-29	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	30-49	SÍ
	Reivindicaciones	1-29	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007/048077 A2 (GTC BIOTHERAPEUTICS INC [US]; SCHINDLER DANIEL [US]; MEADE HARRY M [US]) 26 April 2007.	04-2007
D02	LE BON AGNES ET AL. "Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN." Journal of immunology (2006) Vol. 176, pages 2074-2078.	2006
D03	LE BON AGNES ET AL. "Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8(+) T cell response during cross-priming." Journal of immunology (2006) Vol. 176, no. 8, pages 4682-4689.	2006
D04	JU SEONG-A ET AL. "Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes." Immunology and Cell Biology (2005) Vol. 83, pages 344-351.	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en una composición que comprende un ligando agonista del receptor 4-1BB que puede ser un ligando natural del receptor 4-1BB o un anticuerpo humanizado anti-receptor 4-1BB, del tipo IgG2A, y, al menos, un interferón de tipo I o una variante funcionalmente del mismo, de los tipos ? y ? y al menos un interferón es pegilado (reivindicaciones 1-8). Dicha composición comprende además un compuesto quimioterapéutico y tiene uso en medicina (reivindicaciones 9-10), en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de colon (reivindicaciones 11-13).

La preparación farmacéutica reivindicada en la presente solicitud comprende el compuesto anteriormente citado y un vehículo farmacéuticamente aceptable (reivindicación 14).

La presente solicitud de invención también consiste en un kit que comprende una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos un ligando agonista del receptor 4-1BB, una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos un interferón de tipo I y una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un compuesto quimioterapéutico, para su uso en medicina y que comprende instrucciones para una administración simultánea, secuencial o separada de los distintos componentes (reivindicaciones 15-24).

El uso de dicho kit es para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de colon, en donde la administración separada de los distintos componentes comprende la administración sistémica del ligando agonista del receptor 4-1BB o la administración intratumoral del interferón de tipo I (reivindicaciones 25-29).

La presente solicitud de invención también consiste en un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ligando agonista del receptor 4-1BB y una secuencia de nucleótidos que codifica un interferón de tipo I, en donde ambas secuencias están precedidas por secuencias reguladoras de la expresión (reivindicaciones 30-37).

También se reivindica un vector que comprende dicho nucleótido (reivindicación 38) y una célula que comprende el vector (reivindicación 39), todo ello para su uso en medicina, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de colon (reivindicaciones 40-43).

Por último se reivindica una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido, el vector o la célula, anteriormente citados y un vehículo farmacéuticamente aceptable (reivindicación 44) y un kit que comprende el polinucleótido, el vector o la célula, para su uso en medicina en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de colon (reivindicaciones 45-49).

El documento D01 divulga la administración de una composición proporcionando una cantidad efectiva para aumentar la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC), para tratar enfermedades como el cáncer de colon.

Hoja adicional

En otra realización, se administra un agente terapéutico adicional, que puede ser un agente anticancerígeno o un inmunomodulador, como un interferón.

Numerosos estudios han demostrado que la estimulación de CD137 mediante su ligando natural o por un anticuerpo agonista potenciaba una respuesta antitumoral.

El documento D02 divulga la inducción rápida de IFN tipo I por una infección, desempeñando un papel dominante en la respuesta innata antiviral. Pero IFN-?? también ejerce un efecto estimulante en el sistema inmune adaptativo, aumentando la respuesta de los anticuerpos y células T. La inyección de IFN aumenta la respuesta del anticuerpos contra antígenos. Los efectos aumentados de IFN-?? incluyen la producción de IgM y de todas las subclases de IgG y se observa que no sólo ocurre cuando IFN-?? es inyectado al mismo tiempo que el antígeno, sino también cuando IFN es inyectado 1 ó 2 días después de administrar el antígeno (ver páginas 2074-2075).

El documento D03 divulga que el interferón IFN I, que se produce rápidamente en respuesta a una infección, juega un papel importante en la inmunidad innata y también actúa como estímulo para la respuesta inmune adaptada. Se ha investigado cómo IFN-?? lo induce, comparándolo con las respuestas de linfocitos T CD8+ generadas contra antígenos en presencia o ausencia de IFN-?? (ver páginas 4682-4684, 4687-4688).

El documento D04 divulga la inhibición del crecimiento del tumor y de la metástasis es resultado de un aumento en el número de células T CD8+ el cual aumenta la expresión de MHC-I en las células B16F10 como consecuencia del incremento de la producción de IFN-gamma en respuesta al anticuerpo monoclonal de anti-4-1BB (ver página 344, 347-351).

Los documentos D02, D03 y D04 sólo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia.

1.- NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986) .

Reivindicaciones 1-29:

El documento D01 se considera el más próximo del estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 1-7, 9-21 y 23-29, y divulga una composición que comprende un ligando agonista del receptor 4-1BB, en concreto un ligando natural del receptor 4-1BB o un anticuerpo humanizado anti-receptor 4-1BB, del tipo IgG2A, y el interferón IFN-?2a (ver página 6, línea 21-página 7, línea 19, página 16, líneas 22-23, página 18, líneas 23-26, página 19, líneas 20-26). Dicha composición comprende además un compuesto quimioterapéutico y tiene uso en medicina, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de colon (ver página 6, líneas 26-30, página 30, líneas 23-34, página 32, línea 23-página 34, línea 7).

La preparación farmacéutica reivindicada en la presente solicitud comprende el compuesto anteriormente citado y un vehículo farmacéuticamente aceptable (ver página 36, línea 8-página 38, línea 2).

El documento D01 también divulga un kit que comprende una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos un ligando agonista del receptor 4-1BB (IgG2), una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos un interferón de tipo I (IFN-?2a) y una formulación farmacéuticamente aceptable de, al menos, un compuesto quimioterapéutico, para su uso en medicina y que comprende instrucciones para una administración simultánea, secuencial o separada de los distintos componentes El uso de dicho kit es para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de colon, en donde la administración separada de los distintos componentes comprende la administración sistémica del ligando agonista del receptor 4-1BB o la administración intratumoral del interferón de tipo I (ver página 46, líneas 3-8).

Las características de las reivindicaciones 1-7, 9-21 y 23-29 ya son conocidas en el documento D01. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas y no implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

La característica del interferón pegilado reivindicado en las reivindicaciones 8 y 22 es simplemente una de varias posibilidades evidentes que un experto en la materia seleccionaría según las circunstancias, sin el ejercicio de la actividad inventiva. Por consiguiente, se considera que las reivindicaciones 8 y 22 no implican actividad inventiva en el sentido del art.8 de la Ley11/1986.

Reivindicaciones 30-49:

Ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 30-49. Así, la invención reivindicada en las reivindicaciones 30-49 es, con referencia a los documentos D01, D02, D03 y D04, nueva y se considera que implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.