

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
14 de Mayo de 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2009/060112 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*A61K 39/395* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 38/21* (2006.01)

de la Recherche Médicale [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac,  
F-75654 Paris Cédex 13 (FR).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2008/000693

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **MELERO  
BERMEJO, Ignacio Javier** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda.  
Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **DUBROT  
ARMENDÁRIZ, Juan** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío  
XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **HERVÁS  
STUBBS, Sandra** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII,  
53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **LE BON, Agnes  
Laurence** [FR/FR]; Institut Cochin INSERM U567,  
Maternité Port Royal-5ème étage., 123Bd de Port Royal,  
F-75014 Paris (FR).

(22) Fecha de presentación internacional:  
7 de Noviembre de 2008 (07.11.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
200702961.P  
7 de Noviembre de 2007 (07.11.2007) ES

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L.,  
Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid  
(ES).

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*):  
**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.** [ES/ES];  
Etxesakan, 28 - Oficina 5 - planta baja, E-31180 Cizur  
Mayor - Navarra (ES). **Institut National de la Santé et**

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección nacional admisible*): AE,  
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR CANCER TREATMENT

(54) Título: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

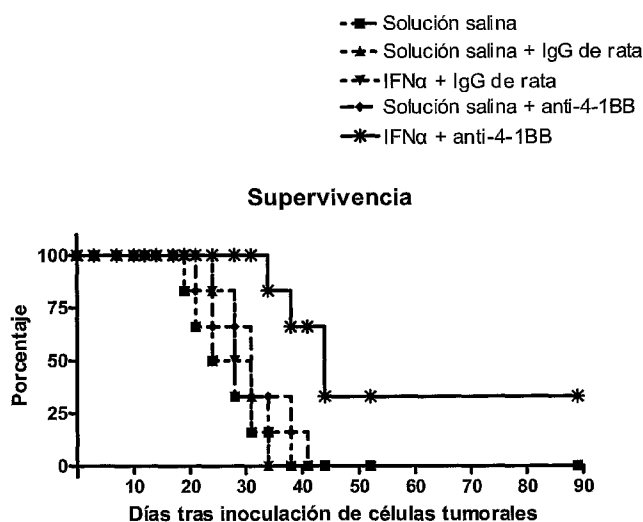


FIG. 1C

(57) Abstract: The invention relates to therapeutic compositions for the treatment of cancer and, more specifically, compositions containing an agonist ligand for receptor 4-1BB and a type-1 interferon, the simultaneous or sequential delivery of which results in a synergic antitumour effect in relation to the individual delivery of any of the components. The invention also relates to the therapeutic uses of the combinations of the invention for the treatment of cancer. The invention further relates to polynucleotides that code for compounds, vectors and cells containing same, as well as to the use thereof for the treatment of cancer.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2009/060112 A1



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

(57) **Resumen:** 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.

## COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5           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.

### ANTECEDENTES

10           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  
15           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  
20           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,  
25           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:

- 30           (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;
- 35           (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 and 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. and 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- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e interferón- $\omega$  (IFN- $\omega$ ). IFN- $\alpha$  y IFN- $\beta$  comparten un único receptor dimérico 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- $\beta$ , mientras que contienen 12 ó 13 genes funcionales que codifican IFN- $\alpha$ . 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  
5 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).

10 Como fármaco, el IFN- $\alpha$  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  $\alpha$  y  $\beta$  sobre líneas celulares de carcinoma hepatocelular, tales como efecto  
15 antiproliferativo, cambio del ciclo celular y apoptosis. El efecto antitumoral del IFN- $\alpha$  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- $\alpha$  en el tratamiento de tumores es muy limitada, de forma que el  
20 beneficio clínico comparado con los efectos adversos resulta poco favorable, y por ello su uso en oncología ha quedado muy limitado en la actualidad.

Existen numerosas referencias que recogen el tratamiento del cáncer mediante la administración combinada de distintos compuestos. Martinet, O. *et al.* (Journal of the  
25 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.* (Molecular Therapy, 2000, 2:39-46) han descrito una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> antitumoral efectiva gracias a la combinación de la terapia  
30 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 un incremento en la eficacia terapéutica con respecto a la eficacia alcanza cuando los compuestos se administran en solitario.

5

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

## 10 COMPENDIO DE LA INVENCION

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.

15

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.

20

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.

25

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

30

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,
- (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.

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.

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

(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.

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.

5

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.

10

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.

15

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.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

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

25

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-α4 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-α4 de ratón

30

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 1a 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.

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

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 dorsolumbar, de modo similar a los ratones de la Figura 1, pero en este caso de forma bilateral.**

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- $\alpha$  de ratón (como controles negativos del experimento) por vía intratumoral únicamente en una de las lesiones, o la administración de anticuerpo monoclonal 2A anti-4-1BB (CD137) (100 µg en 100 µl vía intraperitoneal) o las combinaciones de ambos tratamientos siempre inyectando el interferón- $\alpha$  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- $\alpha$  (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.

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

**Figura 3: Progresión tumoral en ratones quimeras de médula ósea con o sin expresión de receptor de interferón de tipo I en las células de estirpe hematopoyética.**

Grupos de ratones C57BL/6 *wild type* (WT) y ratones deficientes en el receptor de IFN de tipo I (IFNAR<sup>-/-</sup>) retrocurzados 12 veces al background C57Bl/6 recibieron una dosis de radiación letal de 600 rads. Tras 24 horas fueron transplantados con 2-5x10<sup>6</sup> células de la médula ósea de los ratones donantes. La médula ósea fue obtenida a partir del fémur y la tibia de ratones de edad inferior a 3 meses. De este modo, las poblaciones celulares de origen hematopoiético del ratón receptor procedían del ratón donante tras un periodo de reconstitución de 4-8 semanas. Por ello se considera un ratón con quimerismo completo en el compartimento hematopoiético. Entre 6 y 8 semanas después, una vez que la médula ósea donante ya se ha injertado, se comenzaron los protocolos de experimentación de inmunoterapia celular de modo similar a los descritos en la Figura 2. Los ratones quimera portadores de tumores subcutáneos derivados de la línea MC38 fueron tratados con tres dosis aplicadas los días 11, 14 y 17 tras la implantación subcutánea de las células tumorales, en ambos lados del lomo. Se inyectó el anticuerpo monoclonal anti-4-1BB (CD137) por vía sistémica (intraperitoneal) en combinación con IFN- $\alpha$  que se administraba intratumoralmente en la lesión tumoral del lado derecho. Del mismo modo, se aplicaron los tratamientos control tal y como se habían utilizado en los experimentos descritos anteriormente.

En las Figuras 3a, 3b, 3c y 3d se puede ver la progresión del tamaño tumoral tanto de los nódulos tratados directamente con IFN- $\alpha$  o el vehículo control como en los nódulos no inyectados. Los experimentos se realizaron de forma idéntica en los distintos tipos de quimera (combinaciones donante receptor). En la Figura se explicita el número de ratones con regresiones completas de ambos tumores en los distintos grupos.

En la Figura 3e se muestran estos resultados expresados como supervivencia en los grupos que habían recibido el tratamiento con el anticuerpo anti-4-1BB más IFN- $\alpha$  en los diferentes tipos de ratones quimera.

**Figura 4: Análisis de la población linfocitaria en ganglios linfáticos drenantes del tumor de ratones portadores de MC38.**

Tras la inyección de células tumorales MC38 vía subcutánea, se administraron las  
5 distintas combinaciones de tratamiento a días 9 y 12 de la misma manera que en lo  
descrito para los experimentos anteriores. Los ratones fueron sacrificados 24 horas  
después de la segunda dosis para la extracción de los ganglios linfáticos del lado donde  
portaban el tumor transplantado.

Tras procesar el tejido del ganglio linfático y obtener una suspensión celular libre  
10 de agregados, se realizó una tinción por inmunofluorescencia para citometría de flujo  
con el objetivo de analizar distintas poblaciones linfocitarias de interés. En la Figura 4a  
se muestran los porcentajes y números absolutos de linfocitos T  $CD8^{+}$  específicos de  
tumor en los ganglios de drenaje (LN) de los distintos grupos experimentales. Estos se  
definen mediante el doble marcaje para CD8 y la unión de un tetrámero de H2-Kb  
15 relegado con el péptido KSPWFTTL (SEQ ID NO: 7) que define un epítipo antigénico  
dominante del tumor MC38. También se observaron diferencias en la población de  
células dendríticas, tanto en las convencionales (cDC) definidas como  $CD11c^{+}B220^{-}$   
NK1.1- como en la plasmacitoideas (pDC) definidas como  $CD11c^{int} B220^{+} NK1.1^{-}$ , tal  
y como se muestra en la Figura 4b. En este experimento se contó además el número  
20 total de células de los ganglios de drenaje y las cifras revelaron diferencias importantes  
entre los grupos experimentales (Figura 4c).

**Figura 5: El tratamiento con IFN- $\alpha$  intratumoral en una lesión subcutánea y anticuerpos  
monoclonales anti-4-1BB por vía sistémica tiene un efecto terapéutico intenso frente a  
25 lesiones tumorales intrahepáticas concomitantes.**

En este experimento cada ratón fue inoculado con células tumorales MC38 por  
dos vías distintas. En primer lugar se les inyectó subcutáneamente de la misma manera  
que en los experimentos descritos anteriormente. Seguidamente los ratones fueron  
30 intervenidos por laparotomía para la inoculación intrahepática de las células tumorales.  
El tratamiento consistió en la inyección intraperitoneal del anticuerpo anti-4-1BB (o  
inmunoglobulina policlonal de rata como control) en combinación con la administración

intratumoral de IFN- $\alpha$  (o el vehículo control) en el nódulo subcutáneo los días 8, 10 y 13 tras la inoculación de los tumores.

Los resultados sobre el tumor hepático fueron observados a día 17 tras la inoculación tumoral mediante laparotomía exploradora (Figura 5a) que incluye los  
5 tamaños de las lesiones y fotografías representativas de cada grupo experimental. La progresión del tamaño de los nódulos subcutáneos se ve en la Figura 5b.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

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  
15 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- $\alpha$  tiene la capacidad de inducir modificaciones en el tejido maligno o en los  
20 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.

25 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.

30 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.

5

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-  
10 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*  
15 *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  
20 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  
25 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  
30 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 GenEMNBL 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 NO: 3 y 4 para las proteínas de origen humano y murino respectivamente) así como la región extracelular de las mismas (SEQ ID NO: 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 Fc (según se describe en US6355779), de una molécula de inmunoglobulina y versiones diméricas 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 estimular 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 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).

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.

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')<sub>2</sub>, 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.

En la presente invención, se entiende por “anticuerpo agonista del receptor 4-1BB” todo aquel anticuerpo 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 por el receptor 4-1BB y proteínas asociadas. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de la presente invención son, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos 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 monoespecíficos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una  
5 columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

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 and  
10 Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow and 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)].

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante  
15 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  
20 constante y la constante adyacente.

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  
25 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  
30 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.

5           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.

10           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.

15           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  
20           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 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  
25           biológicos y que tengan capacidad de producir alguna de las señales de coestímulo características del receptor 4-1BB.

          Los anticuerpos agonistas del receptor 4-1BB descritos en la presente invención pueden obtenerse por medio de técnicas convencionales de ingeniería genética o  
30           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  
5 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  
10 revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

- “Handbook of Therapeutic Antibodies”, de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);  
15
- “Antibodies: Volume 1: Production and Purification” de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use”, de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-  
20 0306483158);
- “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN  
25 978-0879695774).

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  
30 contenido se incluye en su integridad como referencia.

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- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\tau$  e IFN- $\omega$ .

- 5           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- $\alpha$ ) y el interferón-beta (IFN- $\beta$ ).

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

15           Una lista de especies de interferón tipo I, particularmente IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  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  
20           podría utilizarse una combinación de interferones, como por ejemplo IFN- $\alpha$ 1 (derivado linfoblastoide) o IFN- $\alpha$ 3 [combinación de interferones producida por leucocitos humanos estimulados con el virus Sendai (u otro virus) o partículas virales].

25           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 and 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  
30           otra técnica convencional descrita en el estado de la técnica.

          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- $\alpha$ 2a humano recombinante) y PEGASYS (IFN- $\alpha$  pegilado) de Hoffmann La Roche Inc., INTRON-A (IFN- $\alpha$ 2b humano recombinante) y PEG-INTRON (IFN- $\alpha$ 2b pegilado) de Schering Corp., ALFERON-N (IFN- $\alpha$ 3n, combinación de interferones de origen natural) de Interferon Sciences, o IFNERGEN (IFN- $\alpha$ con1) de InterMune Pharmaceuticals Inc., cuya secuencia es una secuencia consenso que no se corresponde exactamente con una secuencia natural. Se incluyen también formulaciones de IFN- $\beta$ , tales como por ejemplo AVONEX (IFN- $\beta$ 1a) de Biogen Idec, REBIF (IFN- $\beta$ 1a) de EMD Serono, Inc, y BETASERON (IFN- $\beta$ 1b) de Bayer Health Care.

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

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.

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.

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.

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

En el contexto de la invención se entiende por “tratamiento antitumoral”, “tratamiento del cáncer” o “prevención del cáncer”, a la administración combinada de  
10 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  
15 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.

El cáncer a tratar con la composición de la invención puede ser cualquier tipo de  
20 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  
25 (por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata), tumores óseos y tumores vasculares.

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,  
30 es un tumor sólido o, en otra realización particular, es carcinoma de colon.

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, 5 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).

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 10 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 15 antitumorales que pueden variar dentro de un amplio intervalo, pero siempre en cantidades terapéuticamente eficaces.

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 20 para provocar un retraso en el crecimiento tumoral o la inhibición del mismo, o de inducir un incremento de la respuesta inmunitaria antitumoral.

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 25 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.

30

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 farmaceuticamente aceptable.

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, gránulos, 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 farmaceuticamente 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.
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, 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.

30

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  
5 tipo I se selecciona del grupo que comprende el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$ .

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

10

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  
15 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.

20

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.

Adicionalmente, el kit de la invención puede contener instrucciones para la  
25 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.

30

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.

- 5 Como entiende el experto en la materia, las formulaciones farmacéuticas del kit de la invención, es decir, las formulaciones farmaceuticamente 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
- 10 formulación farmacéutica que comprende, al menos, un ligando agonista del receptor 4-1BB, estará formulada de forma adecuada para su administración sistémica, y la 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
- 15 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.

- Tal como se ha indicado anteriormente en la presente descripción y sin querer
- 20 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
- 25 receptor 4-1BB es administrado por vía parenteral o sistémica y el interferón de tipo I es 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
- 30 antitumoral de un ligando agonista del receptor 4-1BB.

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 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

- 10 (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.

15

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

20 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 tanto, dentro del término “variantes funcionalmente equivalentes”,  
25 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.

30 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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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  
30 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  $\alpha$ -actina esquelética, el promotor de la actina cardiaca,

promotor de la troponina C esquelética, promotor de la troponina C cardiaca 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  
5 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.

10 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 inmunoglobulina del tipo IgG-2A.

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención codifica un  
15 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.

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

25 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  
30 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  
5 convencionales conocidos por los técnicos en la materia y que pueden encontrarse en, por ejemplo, Sambrock *et al.*, 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

No obstante, en el ámbito de la presente invención, preferentemente el vector  
10 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,  
15 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  
20 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,  
25 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  
30 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.

5

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.

10

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.

15

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

20

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.

25

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.

30

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  
5 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  
10 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,  
15 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.

20

### **EJEMPLO**

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

#### **I. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **1.1 Cultivos celulares**

30

La línea MC38 (H-2<sup>b</sup>) obtenida del laboratorio de James Mulé originalmente se  
cultiva *in vitro* en medio RPMI1640 (GIBCO) suplementado con 10% v/v de suero de  
ternera fetal inactivado por calor (GIBCO), 50 µg/mL de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL  
de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. 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  $5 \times 10^5$  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. Para la inoculación intrahepática se utilizó una jeringuilla Hamilton #710 RN (100 $\mu$ L). Los animales se mantuvieron anestesiados mediante un equipo de anestesia inhalatoria con Isoflurano durante la laparoscopia. En este caso las células se inyectaron en el lóbulo izquierdo del hígado de los ratones.

### 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. Los ratones IFNAR-/- son comercializados por Jackson y cruzados en el animalario de nuestra institución.

### 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 2A (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

15

El IFN- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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 transgén. El plásmido pEE12 que codifica el cDNA de IFN- $\alpha$ 4 se utilizó para transfectar la línea celular de mieloma de ratón NSo. 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- $\alpha$ 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 Concentrate (1x; Life Technologies). El sobrenadante del cultivo recogido se analizó en su contenido de IFN- $\alpha$ 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- $\alpha$ 4 mostraron una actividad de  $2 \times 10^6$  U/ml. La concentración de IFN- $\alpha$  se verificó mediante IFN- $\alpha$  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- $\alpha$ 4 se cuantificó mediante ELISA en comparación con una recta patrón (R&D).

## 5 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- $\alpha$ 4 de ratón o del vehículo control se realizó en el interior del nódulo tumoral al que  
10 se accede mediante una jeringuilla de insulina 28G.

## 1.6 Obtención de la suspensión celular a partir de ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos de drenaje del tumor (ganglios inguinales), del mismo  
15 lado donde se inoculó éste, fueron incubados en colagenasa-DNAse (Roche, Basel, Suiza) durante 15 minutos a 37°C y disgregados mecánicamente antes de ser pasados a través de una malla estéril de nylon de 70  $\mu$ m de poro (BD Falcon). La suspensión celular fue teñida mediante inmunofluorescencia directa con combinaciones de varios anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos y analizada por  
20 citometría de flujo (FACS SCAllibur. BD Biosciences).

## 1.7 Anticuerpos y citometría de flujo

Las células aisladas a partir de los ganglios linfáticos ( $10^6$  células por muestra)  
25 fueron pretratados con anti-CD16/32 (clon 2.4G2; BD Biosciences-Pharmingen) para reducir uniones inespecíficas por unión a receptores para FC de inmunoglobulinas. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para la tinción de FACS: anti-CD8a-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (53-6.7; eBioscience), anti-CD3e alofococianina (APC) (145-2C11; BD Biosciences-Pharmingen), anti-CD11c APC (N418;  
30 eBioscience), anti-B220 FITC (RA3-6B2; BD Biosciences-Pharmingen), anti-NK1.1 ficoeritrina (PE) (12-5941; eBioscience). Para la identificación de linfocitos CD8 específicas de tumor, las células se marcaron con el tetrámero iTA<sub>g</sub> MHC Class I cargado con el péptido KSPWFTTL (SEQ ID NO: 7) de MC38 y conjugado con (PE)

(Beckman Coulter). Para la adquisición y análisis de las muestras se usó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

## II. RESULTADOS

5

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 µg de anticuerpo (dosis estándar en la literatura) por vía intraperitoneal los días 9, 13 tras la  
10 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-α4 (10<sup>4</sup> 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  
15 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  
20 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 µg 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  
25 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 resultó 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  
30 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.

Una vez comprobado que la combinación de los tratamientos mejora el efecto antitumoral de ambos administrados por separado, se realizaron experimentos para aclarar el/los mecanismo(s) por el cual tiene lugar el efecto terapéutico sinérgico. En primer lugar, se realizaron experimentos para clarificar las poblaciones celulares sobre las que era necesario el efecto del IFN $\alpha$ . Con este propósito se generaron ratones quiméricos cuya médula ósea provenía de un ratón singénico donante. Así se pudo obtener un ratón WT cuyas células hematopoiéticas, provenientes de la médula ósea, fueran deficientes en el receptor de los interferones de tipo I, y viceversa, un ratón knock out IFNAR<sup>-/-</sup> cuyas estirpes celulares hematopoyéticas procedieran de un ratón WT.

Siguiendo un protocolo de tratamiento similar al del experimento anterior, se comprobó cómo la carencia del receptor de IFN de tipo I en las células hematopoiéticas anulaba por completo el efecto antitumoral de los anticuerpos en combinación con el IFN $\alpha$  (Figura 3a). Sin embargo, en la situación contraria, cuando el ratón era IFNAR<sup>-/-</sup> pero había recibido un transplante de médula ósea normal sensible a interferón de tipo I (Figura 3c), se observó una respuesta parcial en el grupo que recibió el tratamiento respecto a los resultados obtenidos en las quimeras control (Figuras 3b y 3d).

Estos resultados indican que las acciones ejercidas por el IFN $\alpha$  sobre las células de origen hematopoyético son críticas para el rechazo de tumores inducida mediante la estrategia combinada de tratamiento entre IFN $\alpha$  y anticuerpos anti-4-1BB.

El análisis comparativo de las poblaciones celulares en los ganglios de drenaje de los ratones sometidos a estos tratamientos demostró cambios dependientes de los mismos relativos a una respuesta inmunitaria específica (Figura 4a). Se constató un aumento del tamaño de los ganglios que contenían un número de leucocitos 4-5 veces superior al de los ratones controles portadores de tumor (Figura 4c). Mediante ensayos de citometría de flujo se pudo verificar que tras el tratamiento combinado existe una tendencia a incrementar porcentualmente y en número absoluto el contenido de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que reaccionan con el antígeno tumoral KSPWFTTL (SEQ ID NO: 7) presentado por la molécula MHC de clase I H2-K<sup>b</sup>. estos resultados se obtuvieron

tras inmunotinciones con el tetrámero conjugado a PE combinado con anticuerpos anti CD8 (Figura 4a).

Las células profesionales encargadas de presentar antígenos a linfocitos (como por ejemplo antígenos tumorales) son las células dendríticas. Existen células dendríticas clasificadas en distintas subpoblaciones de las que destacan las células dendríticas mieloides o convencionales (cDC) y las células dendríticas plasmacitoides (pDC). Estas células pueden ser diferenciadas y enumeradas mediante tinciones con anticuerpos monoclonales. De estos análisis se observa que tanto la inyección intratumoral de IFN $\alpha$  como el tratamiento combinado IFN $\alpha$ +anti-4-1BB presentan incrementos numéricos y porcentuales que pueden estar implicados en la respuesta terapéutica (Figura 4b)

Para verificar la potencia de la estrategia de tratamiento combinado se procedió a preparar situaciones experimentales de los tumores de ratón en los que se consigue la presencia concomitante de lesiones tumorales transplantadas a partir de la línea MC38 en el hígado y en el tejido subcutáneo de los ratones. En la Figura 5a se puede observar como el tratamiento de las lesiones subcutáneas con IFN $\alpha$  y la administración por vía intraperitoneal de anti-4-1BB induce el rechazo de los tumores hepáticos que no se observa en los ratones del grupo no tratado (control). Además de la ausencia de lesiones hepáticas en la laparotomía exploradora se siguió el tamaño de las lesiones subcutáneas que en el experimento que se muestra en la Figura 5b fueron rechazados completamente en todos los casos, mientras que los del grupo control progresaron hasta que los ratones sucumbieron por efecto de las lesiones tumorales concomitantes presentes en el hígado.

**REIVINDICACIONES**

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.  
5
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.
4. Composición según la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.  
15
5. Composición según las reivindicaciones 2, 3 ó 4, en donde el anticuerpo anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado.
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.  
20
7. Composición según la reivindicación 6, en donde el interferón de tipo I es un interferón-alfa seleccionado del grupo de IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 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.
- 30 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende, además, un compuesto quimioterapéutico.
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.
- 5 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.
14. Una preparación farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de  
10 las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Un kit que comprende, en uno o varios contenedores,
- 15 (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, al menos, un  
20 compuesto quimioterapéutico.
16. Kit según la reivindicación 15, en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB.
- 25 17. Kit según la reivindicación 16 en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB.
18. Kit según la reivindicación 17 en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.
- 30 19. Kit según la reivindicación 16, 17 ó 18 en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado.

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.
21. Kit según la reivindicación 20 en donde el interferón de tipo I es un interferón-alfa  
5 seleccionado del grupo de IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 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.
- 10 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  
15 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.
- 20 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  
25 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  
30 del interferón de tipo I.

30. 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.
- 5 31. 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,
- 10 en donde ambas secuencias están precedidas por secuencias reguladoras de la expresión.
32. Polinucleótido según la reivindicación 31, en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es el ligando natural del receptor 4-1BB.
- 15 33. Polinucleótido según la reivindicación 31, en donde el ligando agonista del receptor 4-1BB es un anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB.
34. Polinucleótido según la reivindicación 33, en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.
- 20 35. Polinucleótido según las reivindicaciones 32, 33 ó 34, en donde el anticuerpo agonista anti-receptor 4-1BB es un anticuerpo humanizado.
- 25 36. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, en donde el interferón de tipo I se selecciona del grupo que comprende el interferón-alfa y el interferón-beta.
- 30 37. Polinucleótido según la reivindicación 36, en donde el interferón de tipo I es un interferón-alfa seleccionado del grupo de IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 8 y combinaciones de los mismos.

38. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 37 en donde el interferón de tipo I es un interferón pegilado.

39. Un vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de las  
5 reivindicaciones 31 a 38.

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

41. Un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 38, un vector según  
10 la reivindicación 39 o una célula según la reivindicación 40, para su uso en medicina.

42. Uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 38, un  
vector según la reivindicación 39 o una célula según la reivindicación 40 en la  
15 elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

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

44. Uso según la reivindicación 42, en donde el cáncer es un carcinoma de colon.  
20

45. Una preparación farmacéutica que comprende un polinucleótido según cualquiera  
de las reivindicaciones 31 a 38, un vector según la reivindicación 39 o una célula  
según la reivindicación 40 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 46. Un kit que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones  
31 a 38, un vector según la reivindicación 39 o una célula según la reivindicación  
40.

47. Kit según la reivindicación 46 para su uso en medicina.  
30

48. Uso de un kit según la reivindicación 46 para la elaboración de un medicamento en  
el tratamiento o prevención del cáncer.

49. Uso según la reivindicación 48, en donde el cáncer es un tumor sólido.
50. Uso según la reivindicación 48, en donde el cáncer es un carcinoma de colon.
- 5 51. 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.

1/15

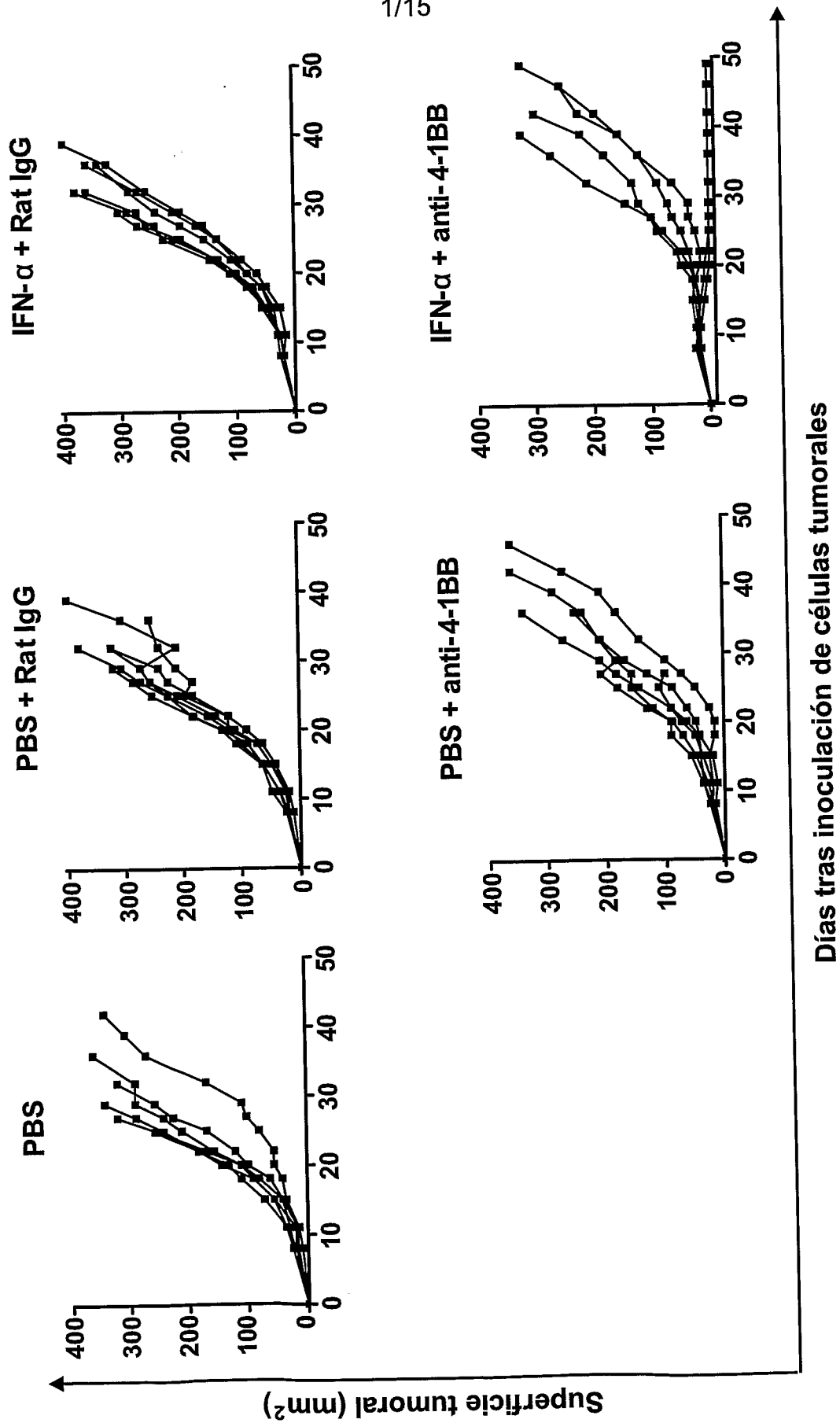


FIG. 1A

2/15

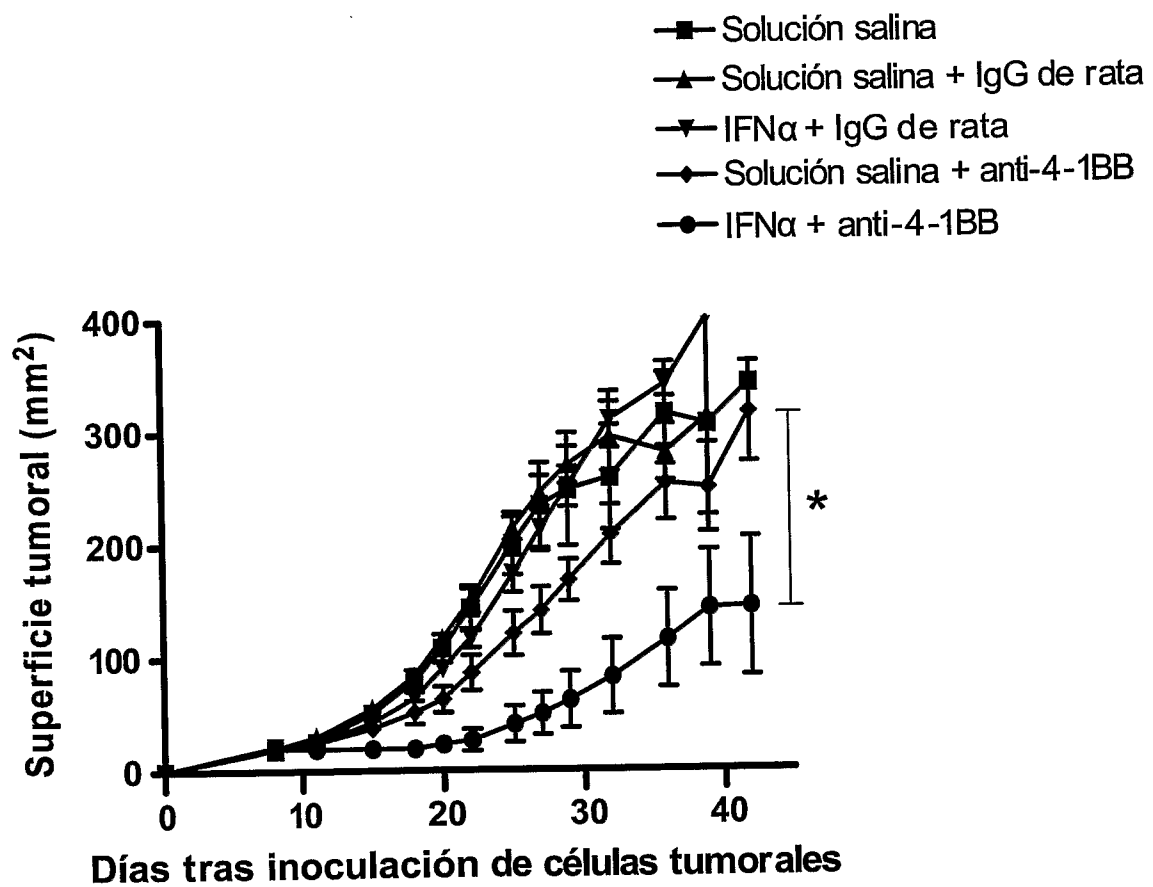


FIG. 1B

3/15

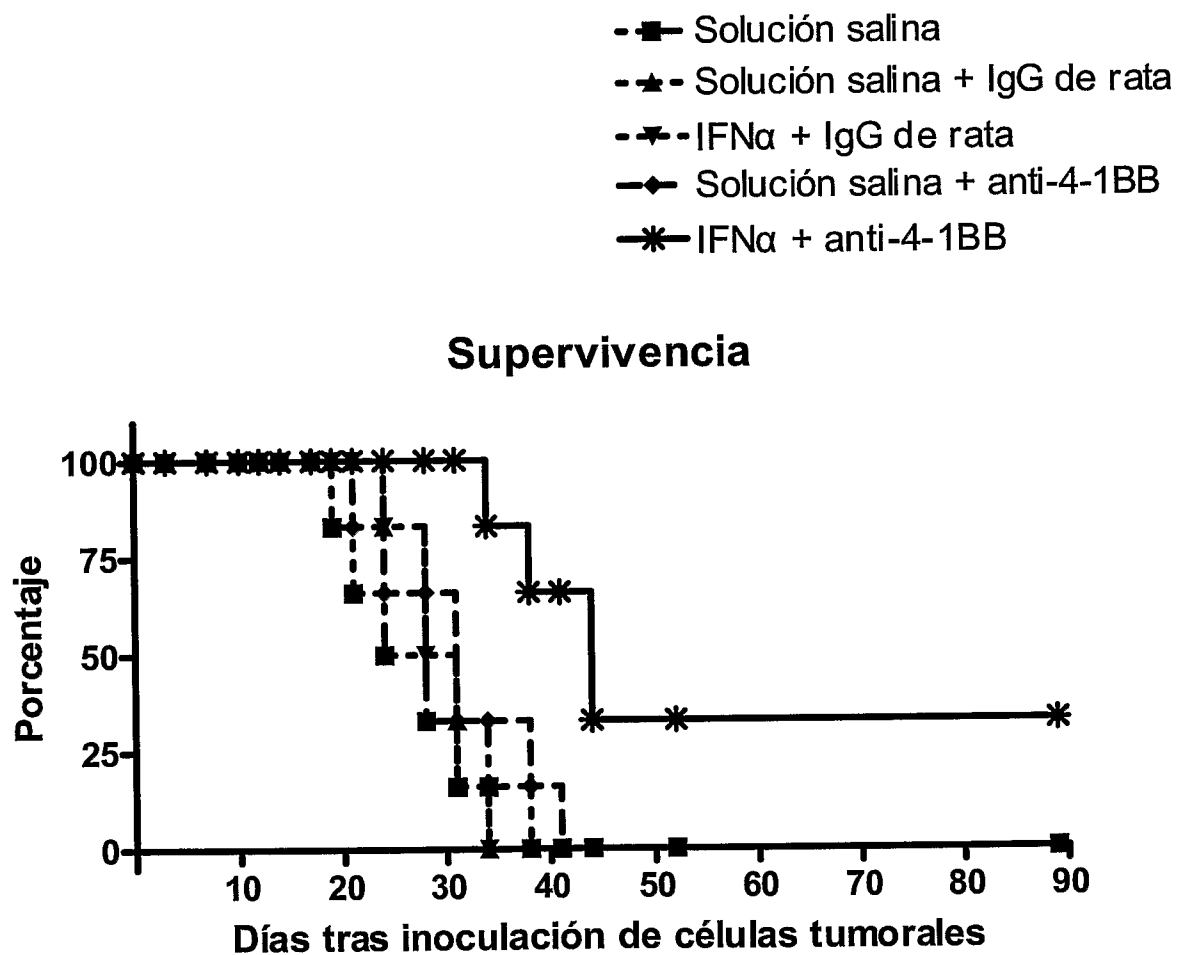


FIG. 1C

4/15

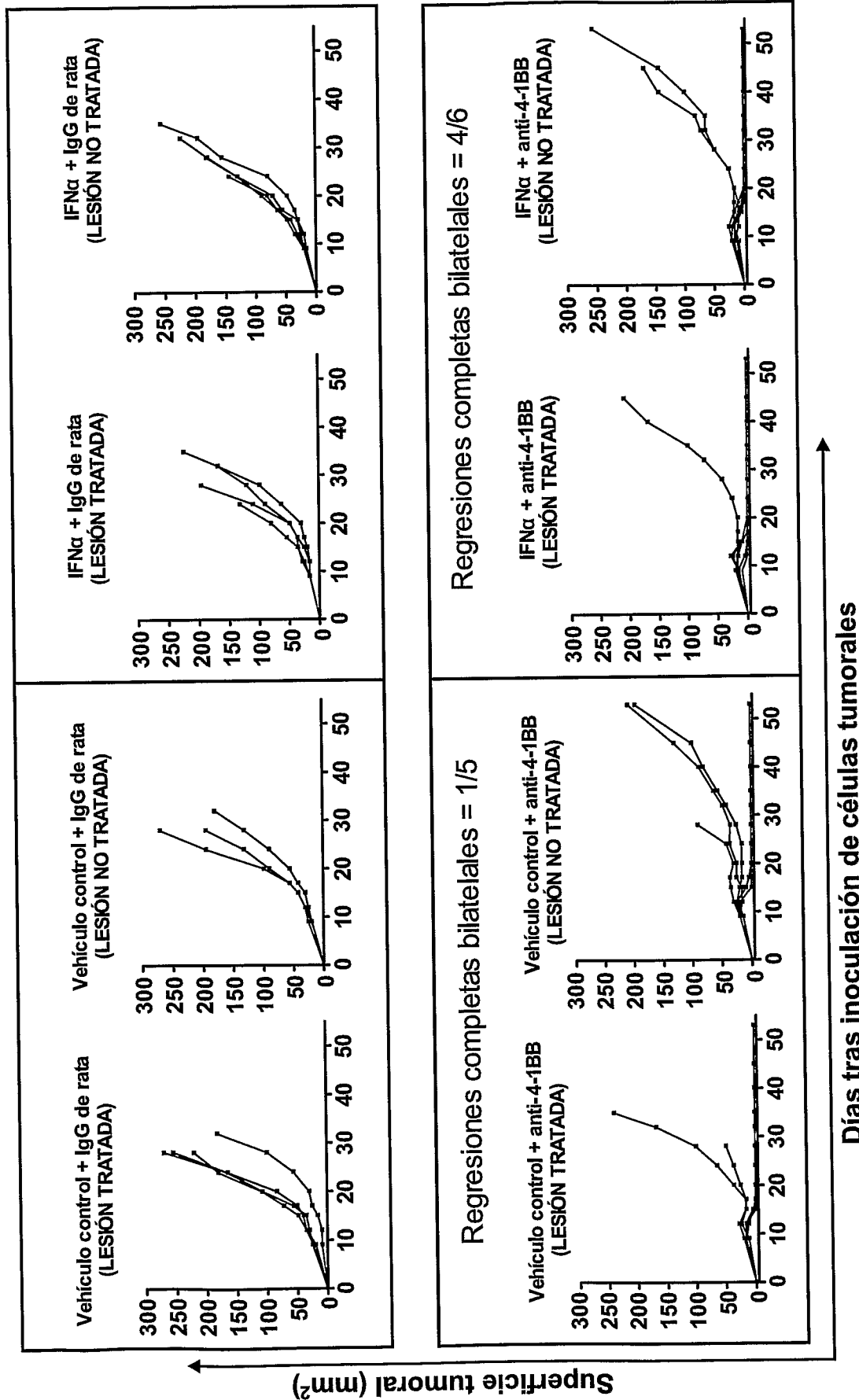


FIG. 2A

5/15

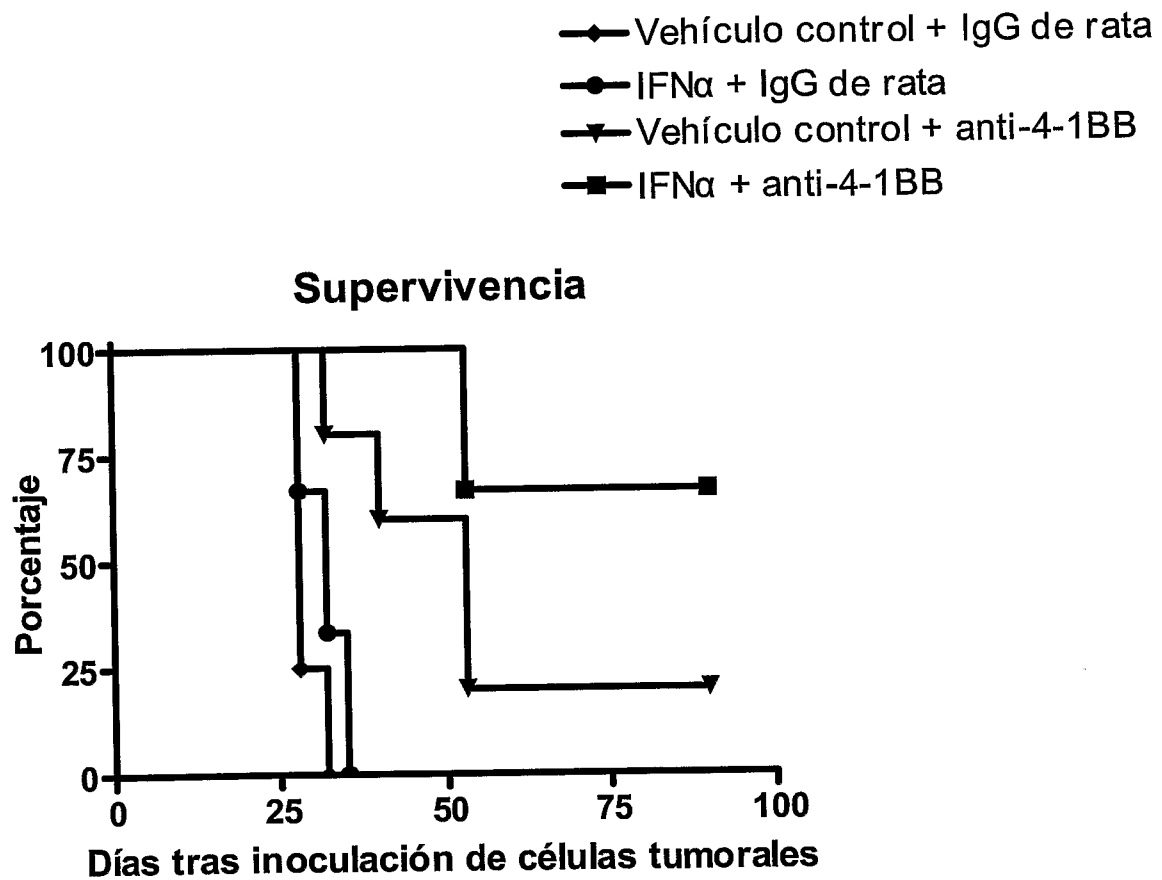


FIG. 2B

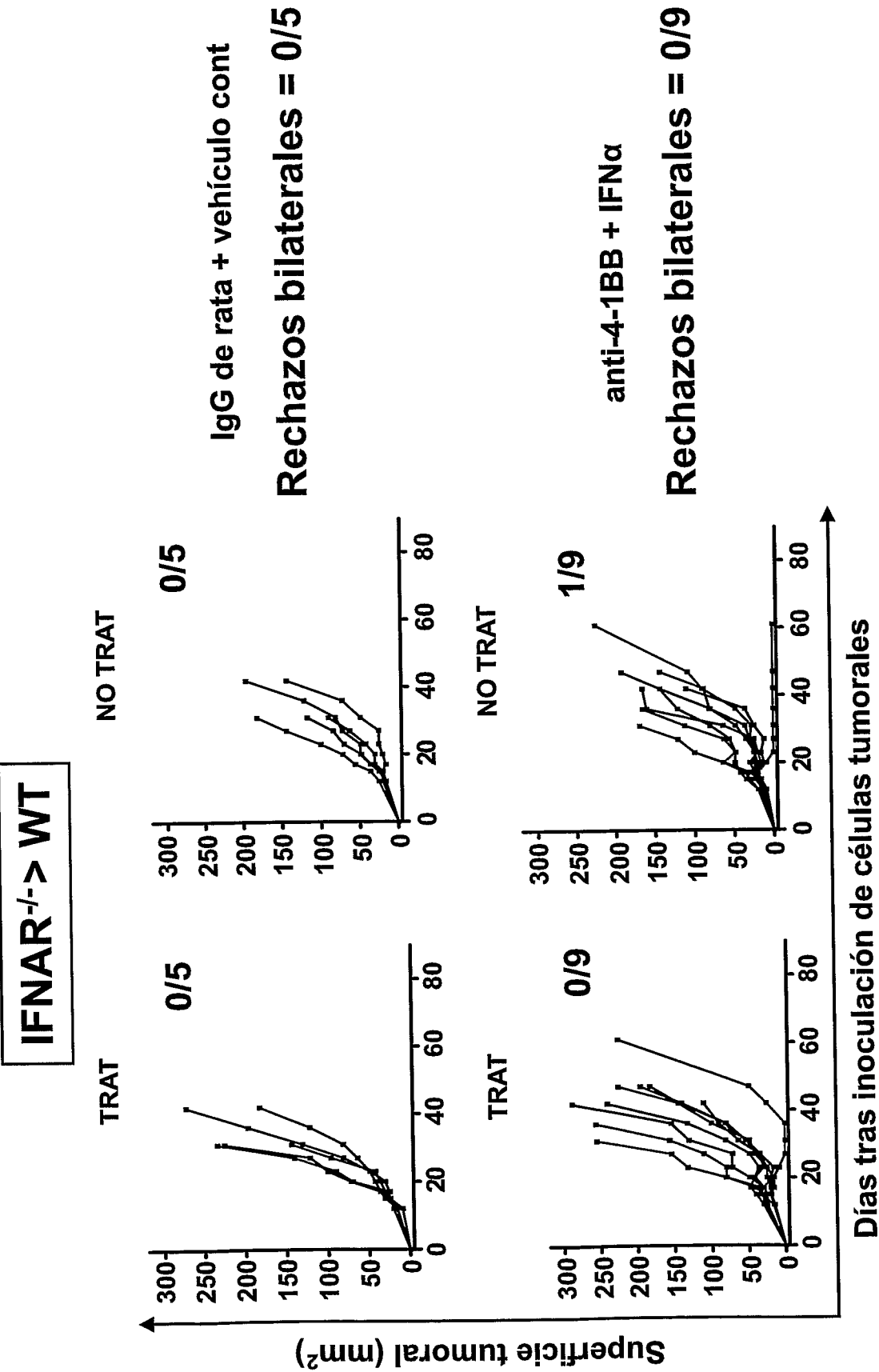


FIG. 3A

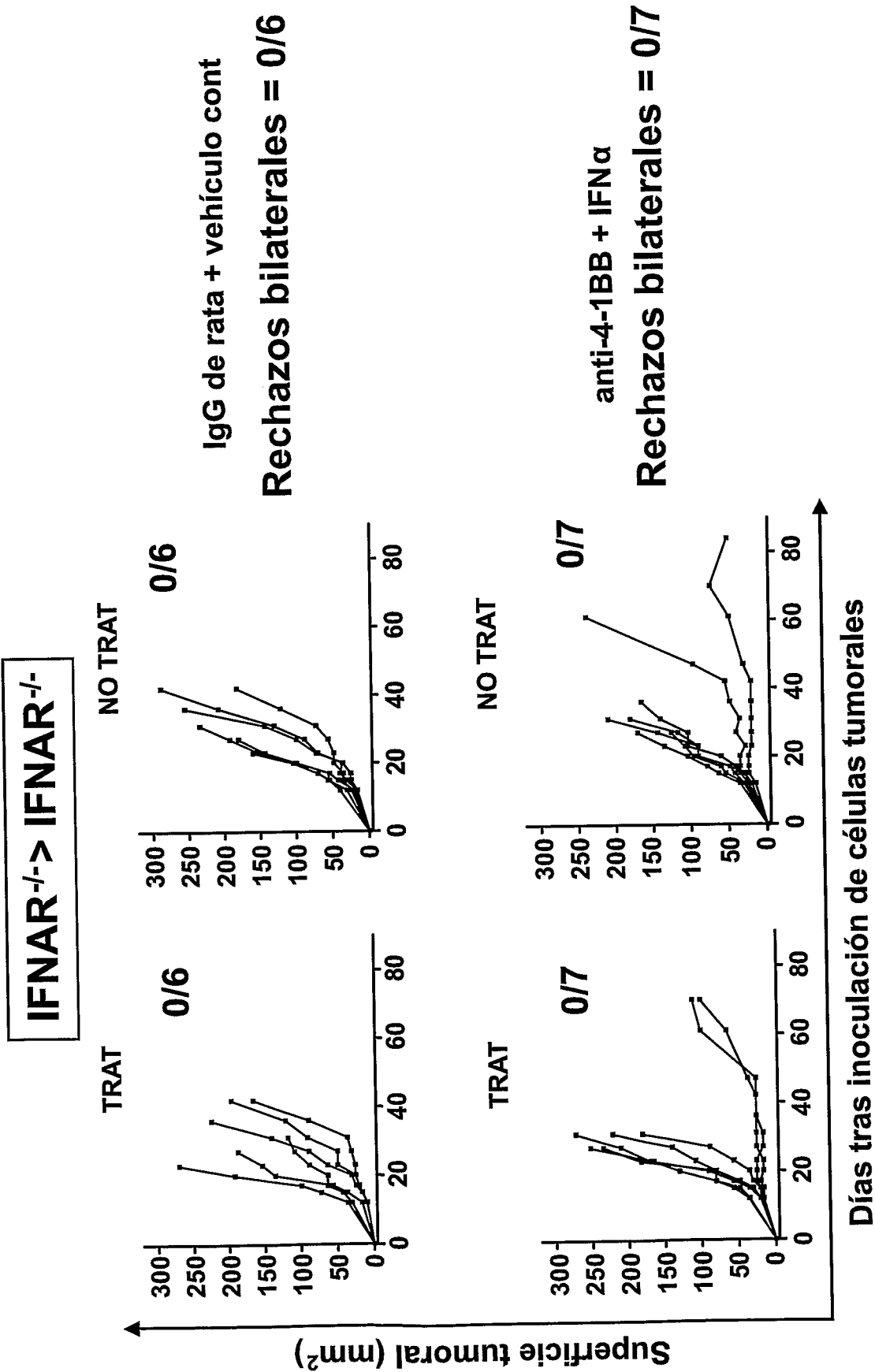


FIG. 3B

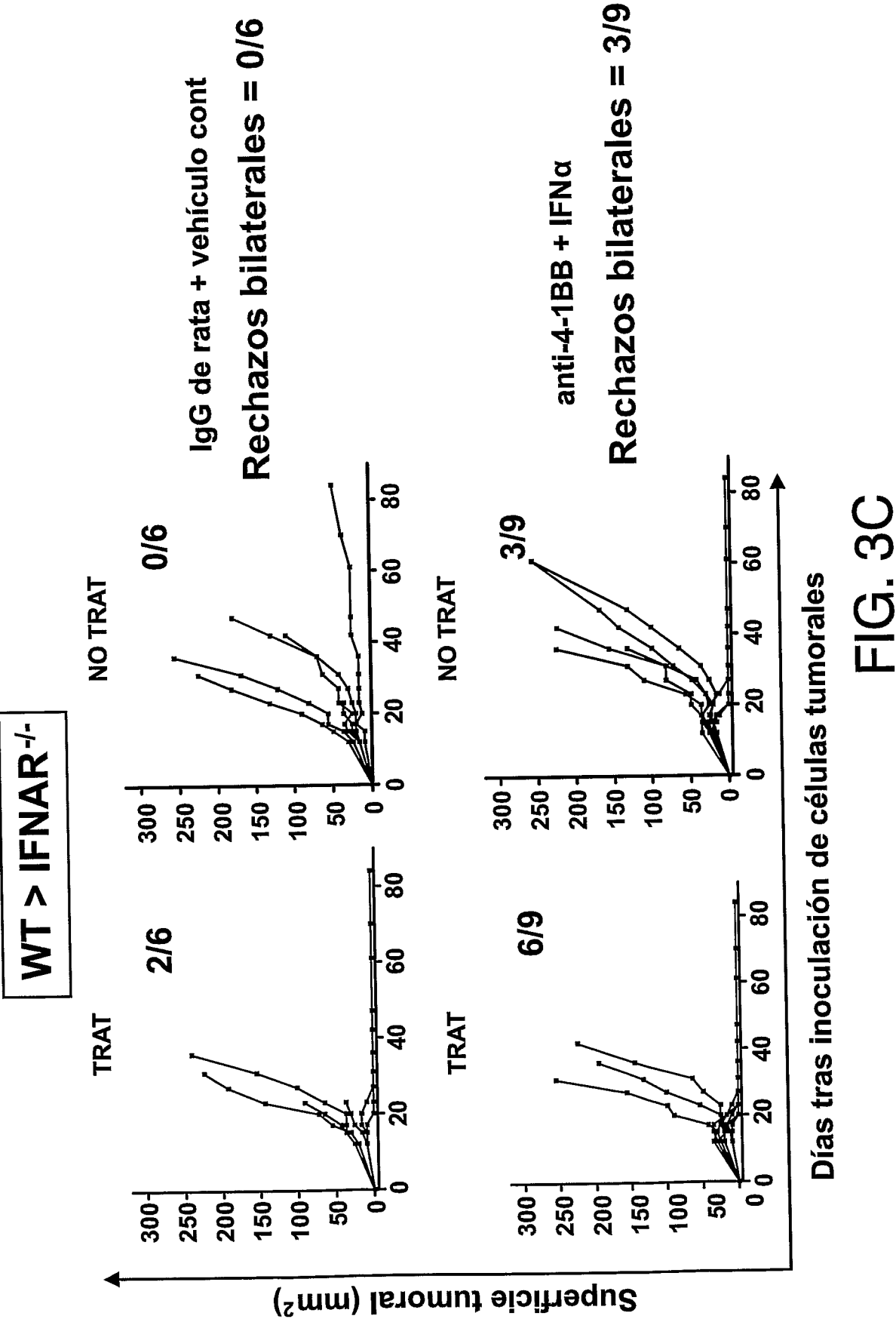


FIG. 3C

9/15

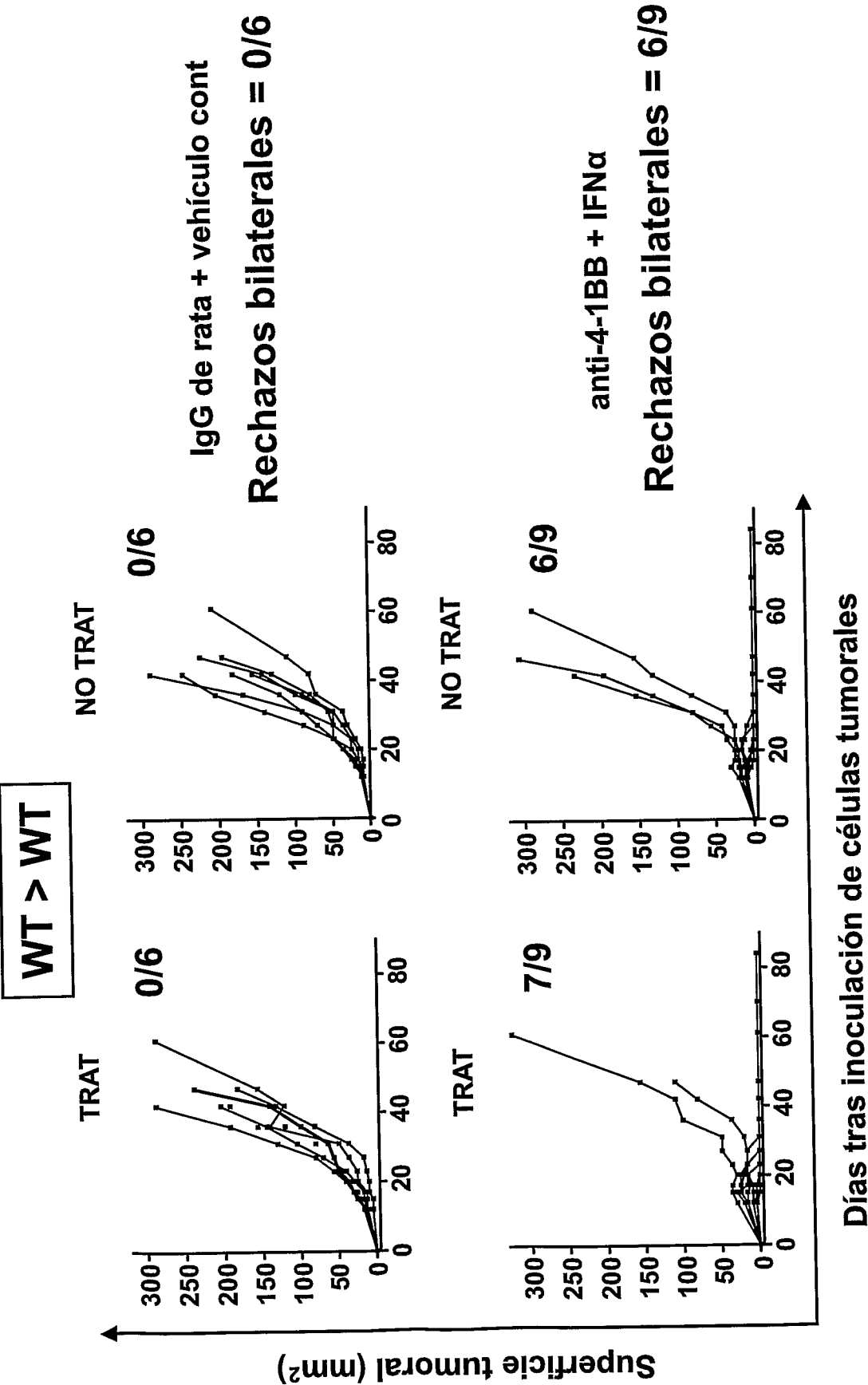


FIG. 3D

10/15

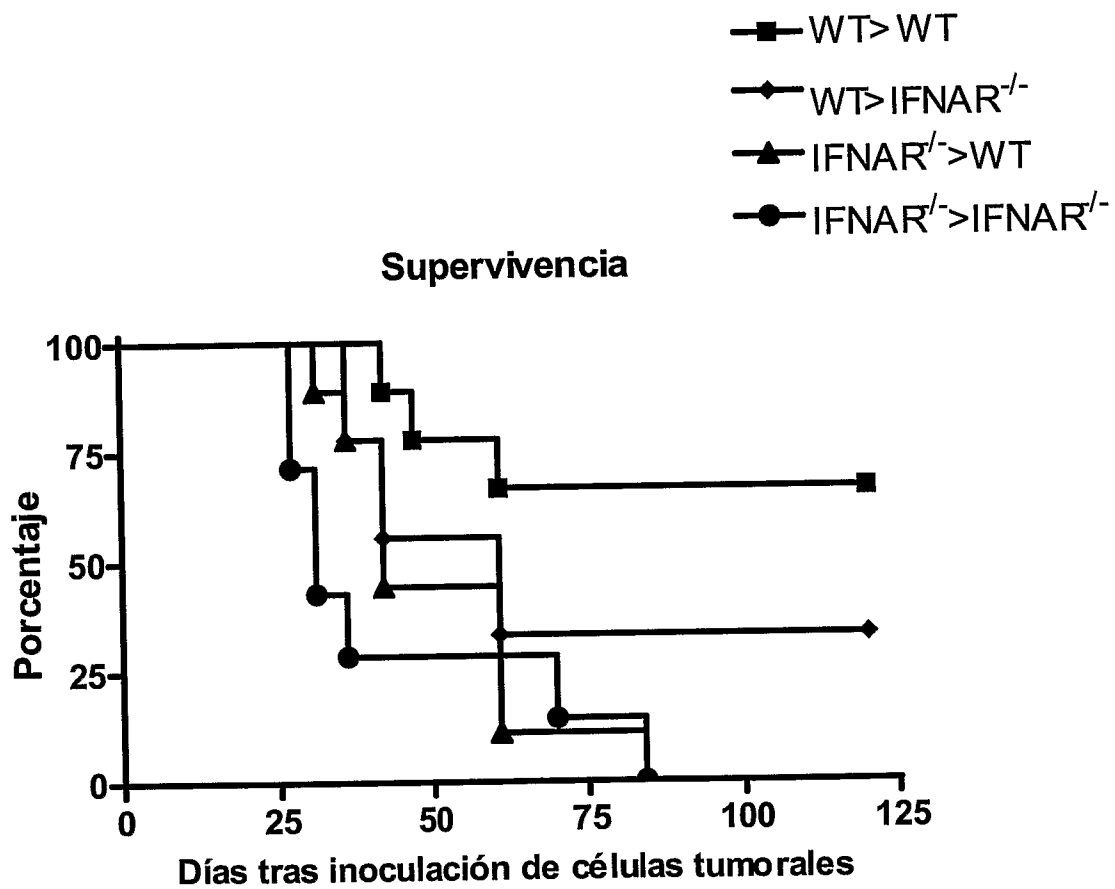


FIG. 3E

11/15

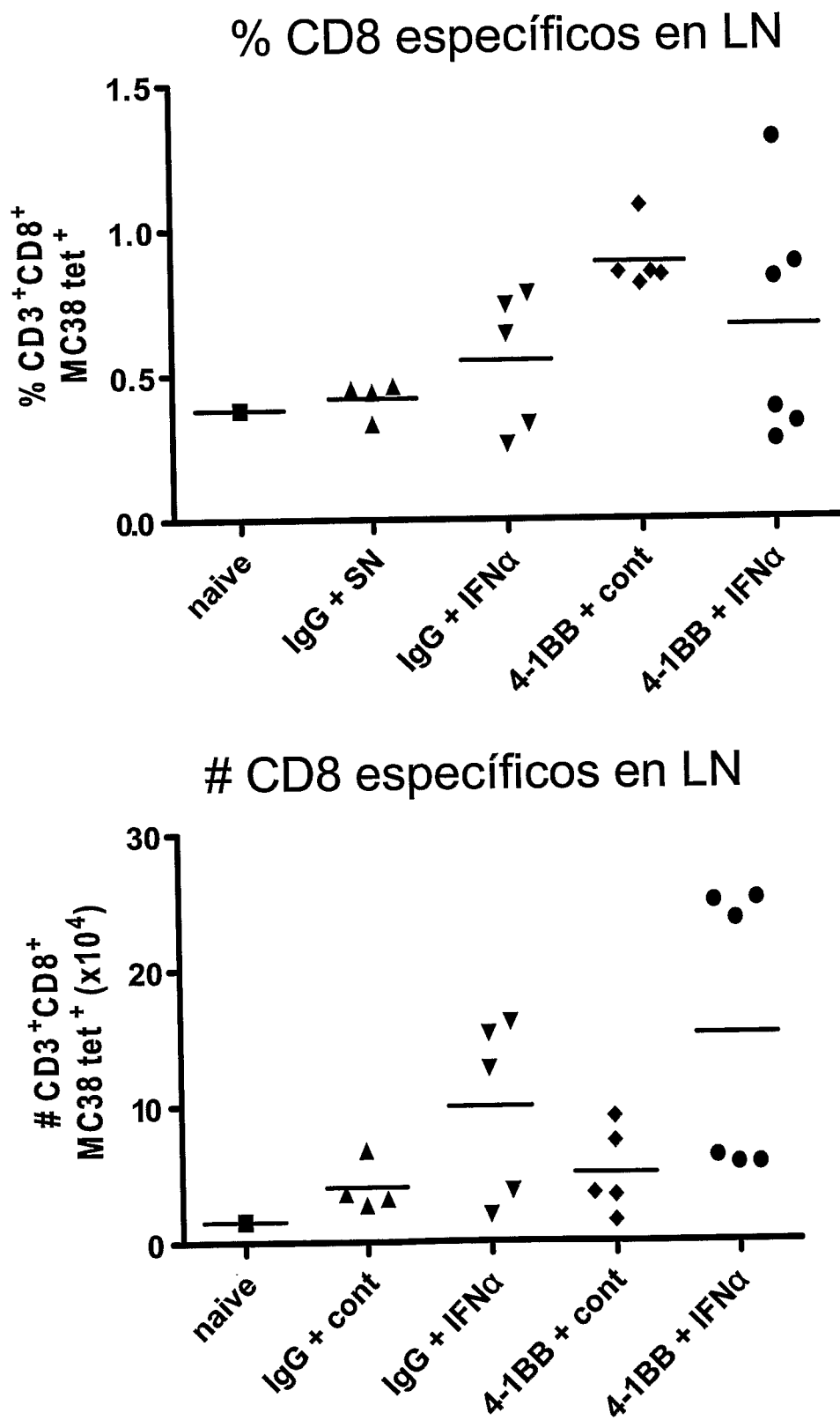


FIG. 4A

12/15

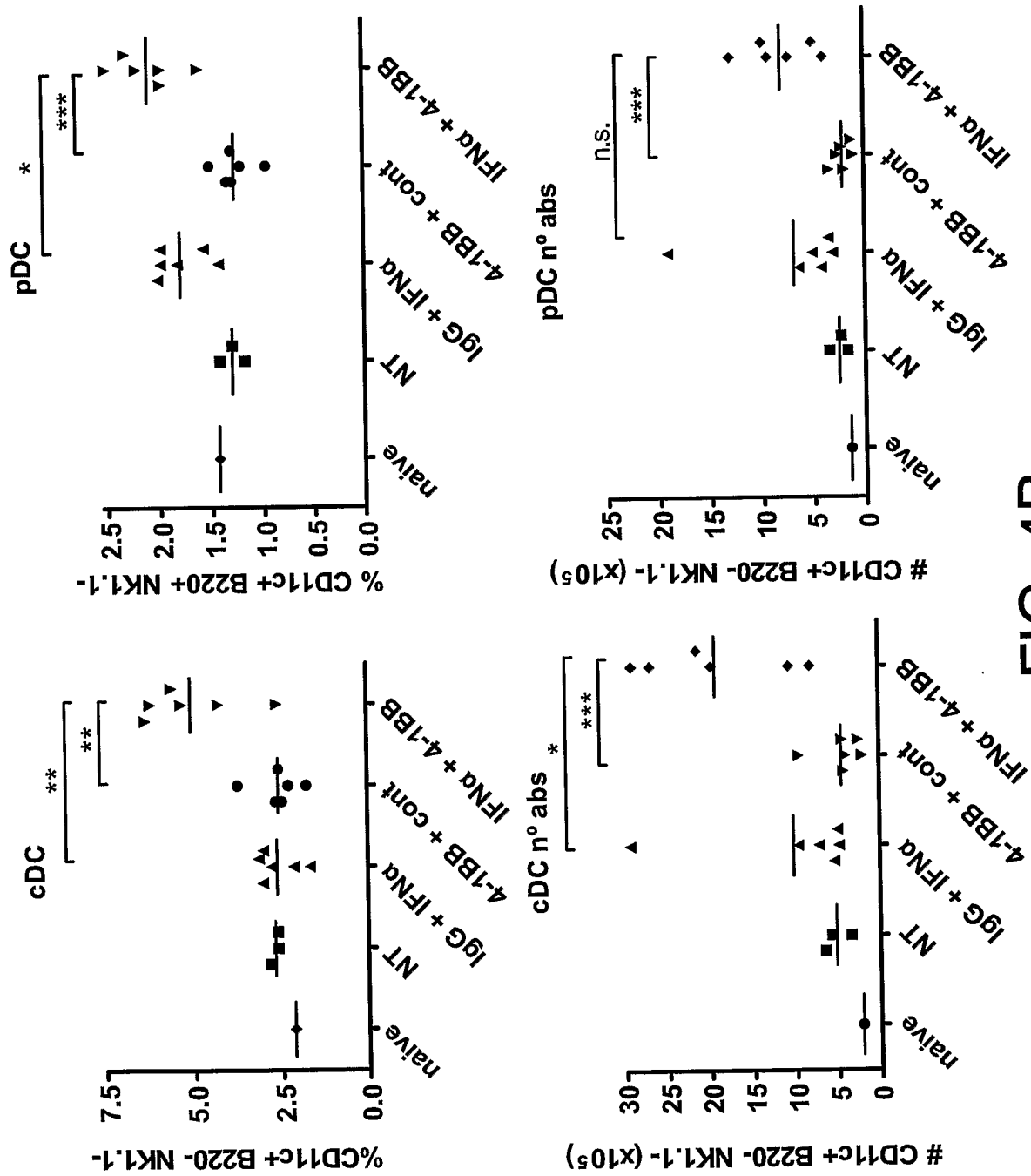


FIG. 4B

13/15

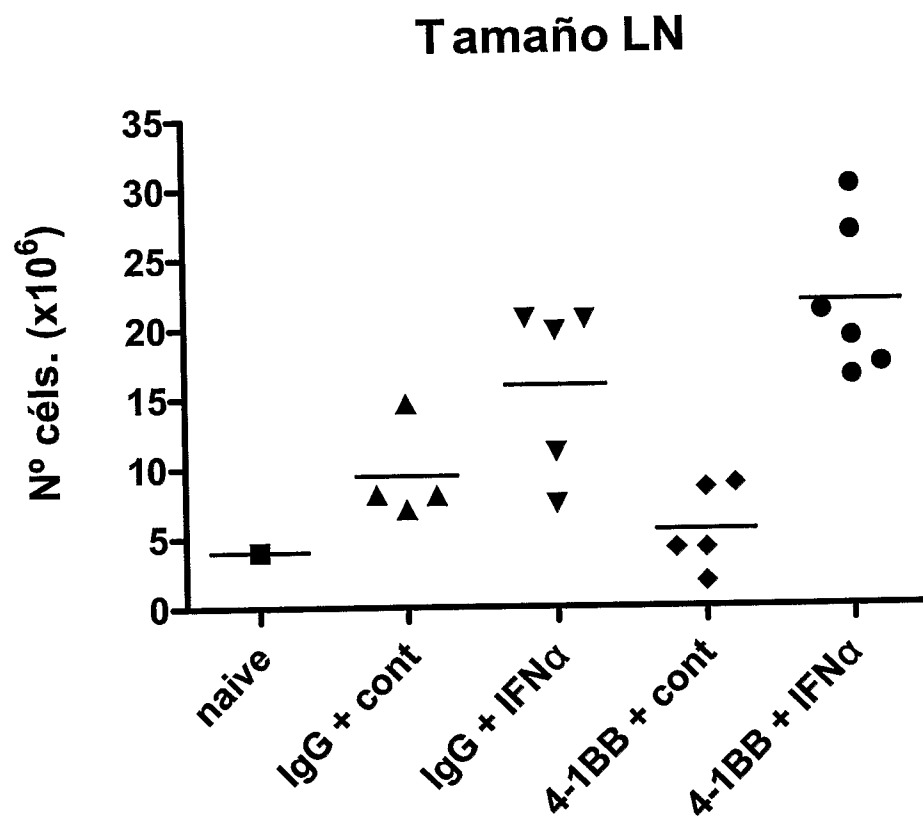


FIG. 4C

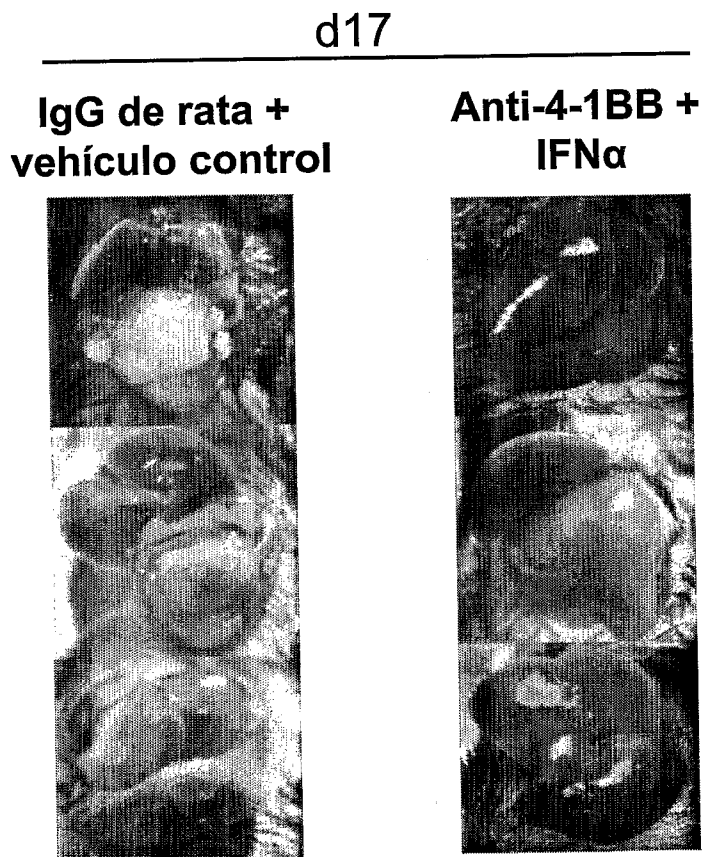
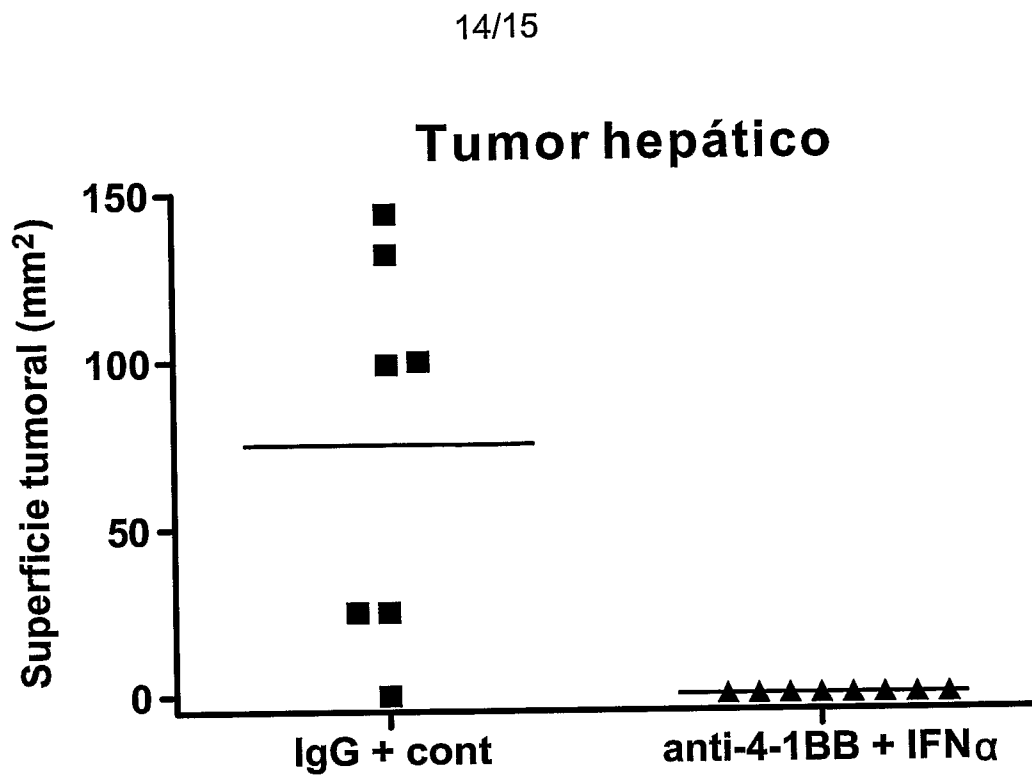


FIG. 5A

15/15

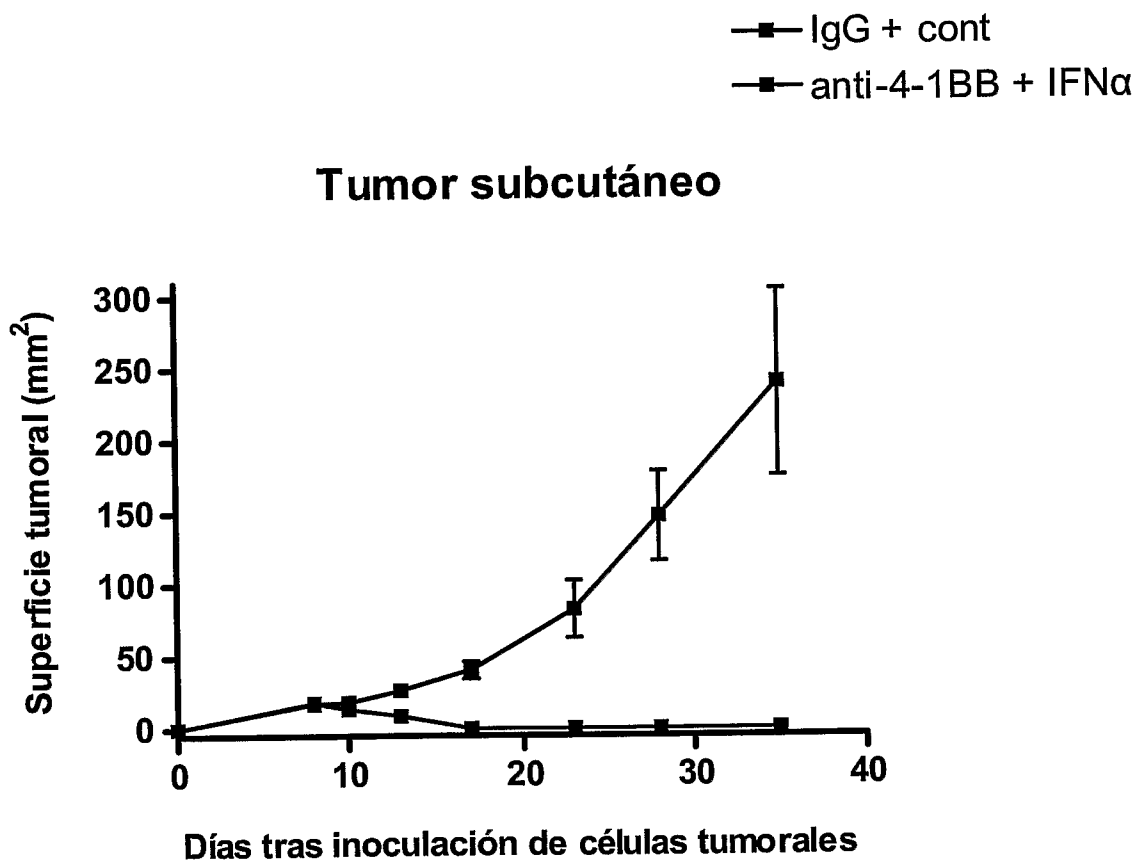


FIG. 5B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2008/000693

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 A61K38/21 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/048077 A (GTC BIOTHERAPEUTICS INC [US]; SCHINDLER DANIEL [US]; MEADE HARRY M [US] 26 April 2007 (2007-04-26) The whole document, in particular page 6, line 21 - page 7, line 29	1-51
Y	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 (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 FEB 2006, vol. 176, no. 4, 15 February 2006 (2006-02-15), pages 2074-2078, XP002516762 ISSN: 0022-1767 the whole document ----- -/--	1-51



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 March 2009

Date of mailing of the international search report

23/03/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chapman, Rob

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2008/000693

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LE BON AGNES ET AL: "Direct stimulation of T cells by type IIFN enhances the CD8(+) T cell response during cross-priming" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 176, no. 8, April 2006 (2006-04), pages 4682-4689, XP002516827 ISSN: 0022-1767 the whole document</p>	1-51
A	<p>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, vol. 83, no. 4, August 2005 (2005-08), pages 344-351, XP009112786 ISSN: 0818-9641 The whole document, in particular page 347, column 2, paragraphs 2,3</p>	
A	<p>DASS S VINAY ET AL: "Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 84, no. 9, 5 August 2006 (2006-08-05), pages 726-736, XP019401164 ISSN: 1432-1440 The whole document, in particular abstract</p>	
A	<p>LI Q ET AL: "Polarization effects of 4-1BB during CD28 costimulation in generating tumor-reactive T cells for cancer immunotherapy" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD.; US, vol. 63, no. 10, 15 May 2003 (2003-05-15), pages 2546-2552, XP002998019 ISSN: 0008-5472 the whole document</p>	
P,A	<p>MELERO I ET AL: "Multi-layered action mechanisms of CD137 (4-1BB)-targeted immunotherapies" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARTH, GB, vol. 29, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 383-390, XP023315631 ISSN: 0165-6147 [retrieved on 2008-07-01] the whole document</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International application No

PCT/ES2008/000693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007048077 A	26-04-2007	AU 2006304886 A1	26-04-2007
		CA 2626542 A1	26-04-2007
		EP 1945666 A2	23-07-2008
		KR 20080068089 A	22-07-2008
		US 2008118501 A1	22-05-2008

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°

<input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos	<input type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo
<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
N° de fax	N° de teléfono