



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 342 529**

⑫ Número de solicitud: 200802835

⑬ Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **07.10.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.07.2010

⑱ Solicitante/s:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5, Planta Baja
31180 Zizur Mayor, Navarra, ES

⑲ Inventor/es: **Aldabe Arregui, Rafael;**
González de la Tajada, Irazu;
Larrea Leoz, María Esther;
Prieto Valtueña, Jesús María y
Sarobe Ugarriza, Pablo

⑳ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

㉑ Título: **Oncostatina M como potenciador de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales humanas.**

㉒ Resumen:

Oncostatina M como potenciador de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales humanas.

La invención se refiere al uso de oncostatina M (OSM), un agonista de un receptor de OSM (OSMR), o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I (IFN tipo I); en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un humano.

ES 2 342 529 A1

DESCRIPCIÓN

Oncostatina M como potenciador de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales humanas.

5 **Campo de la invención**

El campo técnico de la invención es la inmunología.

Antecedentes de la invención

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La oncostatina M (OSM), una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 28.000, es una citoquina pleiotrópica del tipo IL-6 (siendo IL-6 la abreviatura para interleuquina 6), producida principalmente por células T, monocitos/macrófagos (Malik, 1989) y células dendríticas (Suda, *et al.*, 2002). Se aisló originalmente de células de leucemia humanas y se identificó por su capacidad para inhibir el crecimiento de células de melanoma *in vitro* (Zarling, *et al.*; 1986; Brown, *et al.*, 1987). La OSM activa la producción de IL-6, un importante regulador del sistema de defensa del huésped (Brown *et al.*, 1991), así como la expresión de proteínas de fase aguda (Hainrich, 1998). La OSM se considera actualmente como una citoquina multifuncional implicada en la activación, proliferación y diferenciación de diversos tipos de células, tales como hepatocitos, osteoblastos, o células epiteliales del pulmón (Grant *et al.*, 1999; Tanaka, *et al.*, 2003), participando también en las respuestas inflamatorias.

Además de sus actividades inhibitoras del crecimiento en melanoma A375 humano y células leucémicas de mieloides M1 de ratón, así como en otras células de tumores sólidos (Grant *et al.*, 1999; Gibbs *et al.*, 1998), OSM también presenta actividades estimuladoras del crecimiento en fibroblastos normales, células de sarcoma de kaposi-SIDA y una línea celular de eritroleucemia humana, TF-1 (Nair, *et al.*, 19992; Miles *et al.*, 1992). En WO 2006084092 se ha reivindicado el uso de anticuerpos de unión a la subunidad beta del receptor de OSM (OSMR β) para inhibir el crecimiento de células cancerígenas.

La OSM en combinación con interferón alfa también es conocida por sus actividades antivirales, particularmente en la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C (EP 1905447).

Zarling *et al.*, 1986, ya estableció el papel de OSM como mediador inflamatorio. Sin embargo, su efecto exacto en el sistema inmune sobre otras citoquinas no está suficientemente claro. Además, las diferencias entre los sistemas de señalización del receptor de OSM en ratones y humanos, desconocidas hasta 1997 (Ichihara *et al.*, 1997), han añadido confusión a la caracterización de las actividades biológicas de OSM.

Por un lado, Brown *et al.*, 1991, describieron las propiedades pro-inflamatorias de OSM en células endoteliales. Yao *et al.*, 1996, también describió que la estimulación de un cultivo endotelial primario (HUVEC) con OSM humana daba lugar a una regulación por incremento ("up-regulation") retrasada pero prolongada de P-selectina, que facilita la emigración de leucocitos a los sitios de inflamación crónica o alérgica. Por otro lado, se observó que la OSM reducía el grado de destrucción de las articulaciones en un modelo inducido por anticuerpos de artritis reumatoide, indicando una actividad anti-inflamatoria sin una inmunosupresión concordante (Wallace *et al.*, 1999). Hams *et al.*, 2008, concluyó que la señalización de OSMR β limitaba el reclutamiento de células monocíticas durante la inflamación aguda. Sin embargo, estos dos últimos estudios se realizaron en modelos murinos.

En seres humanos, la OSM señala a través de dos complejos de receptores diferentes: a) el receptor compartido LIF/OSM (siendo LIF la abreviatura de factor inhibidor de la leucemia), que comparte una unión con afinidad elevada con LIF-una proteína evolucionaría relacionada con estructura similar a OSM; y b) el receptor específico de OSM, que se une únicamente a OSM. Sin embargo, en ratones, la OSM sólo señala a través del homólogo murino del receptor específico de OSM. Además, la OSM humana, que se ha utilizado habitualmente en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones, se une sólo a los receptores de LIF murinos, mostrando de este modo sólo actividades biológicas que pertenecen a LIF, pero no a OSM (Bruce *et al.*, 2000). De este modo, con el objetivo de revelar actividades biológicas de OSM con una aplicación clínica en seres humanos, estudios correctamente diseñados deberían utilizar células humanas.

En EP422186, se describe el papel de OSM en la inhibición de la inmunogenicidad de tejido endotelial a linfocitos T auxiliares y efectores, con aplicaciones en el trasplante de órganos y el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

En Durda, *et al.*, la OSM se presenta como un modulador por disminución de la expresión de antígenos de melanocitos. Sin embargo, no se proporcionan datos concluyentes en cuanto a los efectos de esta menor expresión de antígenos en la respuesta inmune hacia células de melanoma.

En un esfuerzo por caracterizar adicionalmente las propiedades inmunológicas de OSM en modelos humanos, se ha observado sorprendentemente que la OSM potencia la capacidad de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) para estimular la producción de IFN- γ por células T citotóxicas (CTL) de manera más eficaz que cuando se utiliza IFN α 2 solo. El IFN- γ es un marcador utilizado habitualmente de la activación de linfocitos T después del reconocimiento de antígeno en la inmunidad mediada por células (Bosterhus *et al.*, 1999). Estos descubrimientos han revelado en concreto que la OSM aumenta la antigenicidad de células epiteliales infectadas o tumorales, es decir, mediante el incremento del procesamiento y la presentación de antígenos en estas células, haciendo que estas células sean más

visibles y reactivas a las respuestas inmunes en un mecanismo de tipo suicida que da lugar a una destrucción selectiva de las mismas células.

Los interferones de tipo I son una familia de polipéptidos con actividad citoquina que se descubrieron originalmente por su actividad inhibidora en la infección viral de líneas celulares *in vitro* (Pestka *et al.*, 2004).

Dependiendo de la homología de sus secuencias, los interferones de tipo I se clasifican en interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β) e interferón ω (IFN- ω). La función de estas citoquinas es muy importante en la respuesta inmune contra múltiples tipos de infecciones virales, ya que inician mecanismos que activan la muerte inducida por apoptosis de las células infectadas y la inhibición de la replicación viral a la vez que se favorece la presentación de antígenos. Recientemente, se ha descrito experimentalmente que también llevan a cabo sus funciones mediante la activación directa de células NK, B y T, así como de células dendríticas en la respuesta inmune (Le Bon A *et al.*, 2006; Le Bon A *et al.*, 2006; Le Bon A *et al.*, 2003).

Los interferones tipo I se han ensayado en una serie de estados de enfermedad clínica. El IFN- α se prescribe en el tratamiento de la hepatitis crónica viral y se utiliza en el tratamiento de varias enfermedades de tumores, tales como melanoma y leucemia mieloide crónica. Por ejemplo, Murate *et al.*, 2006, describen los efectos anti-tumorales de los interferones α y β en líneas celulares de carcinoma hepatocelular, tales como un efecto antiproliferativo, cambio del ciclo celular y apoptosis. El efecto anti-tumoral de IFN- α está mediado por efectos pro-apoptóticos directos en células tumorales, efectos anti-angiogénicos sobre células tumorales vasculares y efectos potenciadores en la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, las pruebas clínicas muestran que la eficacia de IFN- α en el tratamiento de tumores es muy limitada, de manera que las ventajas clínicas comparadas con los efectos adversos no es muy favorable y, por lo tanto, su uso en oncología actualmente está muy limitado. El uso de interferón beta humano está mejor establecido en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En una continua caracterización de las propiedades inmunológicas de OSM se ha observado sorprendentemente que la OSM sinergiza con IFN- α 2 en el aumento de la capacidad de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) para estimular la producción de IFN- γ por células T citotóxicas (CTL). La OSM sola o combinada con IFNs de tipo I son por tanto agentes útiles y potentes en la inmunoterapia del cáncer y las enfermedades infecciosas.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere al uso de oncostatina M (OSM), un agonista de receptor de OSM (OSMR) o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón de tipo I; en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. De manera similar, la presente invención se refiere a OSM, un agonista de OSMR o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con IFN de tipo I para su uso en el aumento de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. Se proporciona también un procedimiento de aumento de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano, que comprende la administración a dicho ser humano de una cantidad eficaz de OSM, un agonista de OSMR o una combinación de OSM y un agonista de OSMR con IFN de tipo I.

La presente invención se refiere además a un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica OSM o un agonista de OSM y, opcionalmente, un ácido nucleico que codifica el interferón de tipo I, unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la OSM o el agonista de OSMR, y opcionalmente el IFN de tipo I en un huésped de expresión adecuado. También se proporcionan células huésped transfectadas con el vector de expresión mencionado en la presente invención. Tanto los vectores como las células huésped transformadas se pueden utilizar en terapia génica, en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano.

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la preparación de linfocitos CD8+ estimulados para su uso en inmunoterapia adoptiva, comprendiendo dicho procedimiento:

a) tratar células o tejido epitelial derivados de un ser humano con una dosis eficaz de OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con IFN tipo I, o el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9;

b) irradiar las células o tejidos tratados obtenidos de la etapa a);

c) cocultivar las células o tejido irradiados obtenidos de la etapa b) con

- células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), o

- linfocitos CD8+ enriquecidos y opcionalmente células presentadoras de antígenos;

d) opcionalmente cocultivar los linfocitos CD8+ estimulados obtenidos de la etapa c) con células o tejido tratados e irradiados obtenidos de la etapa b);

en el que las PBMCs, los linfocitos CD8+ y las células o tejido epitelial derivan de mismo sujeto humano. También se describen linfocitos CD8+ estimulados obtenibles mediante un procedimiento *in vitro*, métodos de tratamiento y usos de estos linfocitos CD8+ estimulados como medicamento y en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Mecanismo de señalización Jak/STAT y activación de p38 MAPK en células Huh7 tratadas con IFN α 2, OSM o la combinación de los dos, para los periodos de tiempo indicados. (A) Análisis de transferencia Western representativo de los niveles de proteína fosforilada y total de STAT1, STAT2, STAT3, Tyk2 y Jak1 en células Huh7 cultivadas en medio solo o en presencia de IFN α 2 u OSM o IFN α 2 más OSM durante 1, 3, 24, 48 y 72 horas. (B) Análisis de transferencia Western representativo de los niveles de proteína fosforilada y total de p38 MAPK en células Huh7 no tratadas o tratadas con IFN α 2 u OSM o IFN α 2 más OSM durante 1, 3, 24, 48 y 72 horas. Los niveles de actina se muestran como control de carga.

Figura 2. La OSM regula por incremento genes que participan en la defensa natural contra la infección. La expresión transcripcional de MYD88 (una molécula adaptadora de TLR) (A), S100A9 (un modulador de la función de TLR) (B), ULBP2 (un ligando para NKG2D que activa células NK) (C), IL-32 (una molécula proinflamatoria que activa macrófagos) (D), IRF1 (E), GBP2 (F) y genes de quimioquinas CXCL1/2 y CXCL3 (G y H), se determinó mediante RT-PCR cuantitativa en células Huh7 tratadas para los periodos de tiempo indicados con IFN α 2, OSM o la combinación de las dos citoquinas o no tratadas. Los valores son las medias $\pm$ SD de tres experimentos realizados por quintuplicado * $p < 0,05$ frente a no tratada, IFN α 2 y OSM. ** $p < 0,05$ frente a no tratada y IFN α 2.

Figura 3. OSM presenta sinergia con IFN α en la inducción de genes implicados en el procesamiento y presentación de antígenos en células Huh7. La determinación mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de enzima UBE2L6 que se conjuga a ubiquitina (A), subunidades de inmunoproteasoma PSMB8 (B) y PSMB9 (C), transportadores asociados con el procesamiento de antígeno TAP1 (D) y TAP2 (E), HLA clase I A, B y C (F, G, H), microglobulina β 2 (B2M) (I) y la proteína de unión a TAP, TAPBP (J) en células Huh7 tratadas para los periodos de tiempo indicados con IFN α 2, OSM o ambos o no tratadas. Los valores son las medias $\pm$ SD de tres experimentos realizados por quintuplicado. La transferencia Western para TAP1, PSMB9, HLA-ABC y B2M en células Huh7 tratadas durante 3 y 4 días con IFN α 2, OSM o la combinación de las dos citoquinas o no tratadas. Los niveles de actina se muestran como control de carga (K). * $p < 0,05$ frente a no tratada, IFN α 2 y OSM. ** $p < 0,05$ frente a no tratada y IFN α 2. Los valores son las medias $\pm$ SD de tres experimentos realizados por quintuplicado.

Figura 4. La OSM regula por incremento genes que estimulan la inmunidad adaptativa y aumenta la transpresentación de IL-15 y la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales de hígado. Expresión transcripcional de ICAM-1 (A), IL-15R α (B) e IL-7 (C) en células Huh7 tratadas con IFN α 2, OSM, o ambos o no tratadas. Transferencia Western para ICAM-1 en células Huh7 tratadas con IFN α 2, OSM, o ambos o no tratadas (D). Los estudios de citometría de flujo para determinar ICAM-1 (E) en la superficie de células Huh7 tratadas con IFN α 2, OSM, o la combinación de las dos citoquinas durante cuatro días. Los valores representan el número de veces frente a células no tratadas. Actividad proliferativa de células CTLL-2 (una línea de células T CD8+ con dependencia de crecimiento con IL-15) incubadas con células Huh7 tratadas durante 3 días con IFN α 2, OSM, o ambos o no tratadas (F). Producción de IFN γ por CTLs sensibles al péptido GILGFVFTL del virus de la gripe incubadas en presencia de células HepG2 que presentan el péptido. Las células HepG2 se hablan tratado previamente durante 4 días con IFN α 2, OSM, o ambos o no tratadas (G). Determinación mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de HLA-A, HLA-B, HLA-C, IL-15R α e ICAM-1 (H-L) y transferencia Western para ICAM-1 y HLA-ABC (M) en células HepG2 tratadas para los periodos de tiempo indicados con IFN α 2, OSM o la combinación de las dos citoquinas o no tratadas. Estudios de citometría de flujo para determinar ICAM-1 (N) en la superficie de células HepG2 tratadas con IFN α 2, OSM o la combinación de las dos citoquinas durante cuatro días. Los valores son las medias $\pm$ SD de tres experimentos realizados por quintuplicado o sextuplicado. * $p < 0,05$ frente a no tratada, IFN α 2 y OSM. ** $p < 0,05$ frente a no tratada y IFN α 2. *** $p < 0,05$ frente a no tratada.

Figura 5. La OSM aumenta la regulación por incremento inducida por IFN β de genes implicados en el procesamiento y presentación de antígenos (PSMB9, TAP1), y genes implicados en la activación de la inmunidad adaptativa (IL-7). La determinación de la abundancia de ARNm se realizó mediante RT-PCR cuantitativa en células Huh7 tratadas para los periodos de tiempo indicados con IFN β , OSM o la combinación de las dos citoquinas o no tratadas. Los valores son las medias $\pm$ SD de dos experimentos realizados por sextuplicado. * $p < 0,05$ frente a no tratada, IFN β y OSM. ** $p < 0,05$ frente a no tratada y IFN β .

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de oncostatina M (OSM), un agonista de receptor de OSM (OSMR) o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón de tipo I; en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. De manera similar, la presente invención se refiere a OSM, un agonista de OSMR o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con IFN de tipo I para su uso en el aumento de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. Se proporciona también un procedimiento de aumento de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano, que comprende la administración a dicho ser humano de una cantidad eficaz de OSM, un agonista de OSMR

o una combinación de OSM y un agonista de OSMR con IFN de tipo I. El término “OSM solo o combinado con IFN de tipo I” se utiliza en la presente invención con la intención de comprender oncostatina M (OSM), un agonista de receptor de OSM (OSMR) o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón de tipo I.

- 5 El término “oncostatina M” u OSM, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una citoquina aislada originalmente de un medio acondicionado por células de leucemia histiocítica humana U-937 tratadas con PMA basadas en su capacidad para inhibir el crecimiento de células de melanoma A375. El ADNc de OSM humano codifica un polipéptido prep-pro-OSM de 252 aminoácidos con un péptido señal hidrofóbico de 25 residuos y un dominio C-terminal hidrofílico que se procesan proteolíticamente para generar la forma madura de OSM de 196 residuos.
- 10 El número de acceso indexado para esta proteína se puede encontrar en la base de datos de proteínas disponible públicamente en <http://www.expasy.org/uniprot/P13725>. La secuencia de aminoácidos de OSM humana es la siguiente representada mediante la SEC ID No. 1:

15 MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDP
YIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFPSSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQR
20 LPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQ
PPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGV
RRTRPSRKGRRLMTRGQLPR

- 25 Entre las OSMs adecuadas se incluyen, pero sin limitación, OSM humana de origen natural o OSM humana recombinante, disponible, por ejemplo, de R&D Systems.

- 30 Según la International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, un agonista es un ligando que se une a un receptor y altera el estado del receptor dando lugar a una respuesta biológica. Los agonistas convencionales aumentan la actividad del receptor, mientras que los agonistas inversos la reducen. Como tal, un agonista inverso se define como un ligando que mediante la unión a receptores reduce la fracción de los mismos en una conformación activa. Los agonistas inversos muestran una afinidad de unión preferencial por la conformación inactiva del receptor. En sistemas en los que se puede observar actividad constitutiva del receptor, los
- 35 agonistas inversos inducen a la acción opuesta a la de los agonistas.

- El término “agonista de OSMR” se refiere a un agonista convencional, es decir, un ligando que se une al receptor de OSM incrementando su actividad. Un ejemplo de un agonista de OSMR se proporciona en la publicación de patente
- 40 JP 2004026768 (Kanagawa Kagaku Gijutsu Akad).

- El término “ligando” significa cualquier molécula capaz de unirse específicamente al OSMR. Incluye péptidos, polipéptidos, moléculas asociadas a membrana o unidas a membrana, o complejos de los mismos, así como moléculas pequeñas.

- 45 “Moléculas pequeñas” se define como una molécula con un peso molecular que es inferior a 10 kD, habitualmente inferior a 2 kD, y preferiblemente inferior a 1 kD. Entre las moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitación, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radioactivo, moléculas sintéticas, miméticos de péptido y miméticos de anticuerpos.

- 50 El término “interferón tipo I”, “IFN tipo I”, o denominaciones equivalentes, se refiere a las proteínas interferón alfa (IFN- α) e interferón beta (IFN- β), y a la familia de proteínas específicas de especie altamente homologas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modulan la respuesta inmune.

- 55 El término “interferón alfa”, tal como se utiliza en la presente invención, comprende IFN- α de origen natural, así como proteínas recombinantes. Entre los ejemplos de IFN- α se incluyen interferón alfa-2b, tal como interferón Intrón-A disponible de Schering Corporation; interferón alfa-2a recombinante, tal como interferón Roferon disponible de Hoffman-La Roche; interferón alfa-2C recombinante, tal como interferón alfa 2 Berofer disponible de Boehringer Ingelheim; interferón alfa-n1, una mezcla purificada de interferones alfa naturales tales como Sumiferon disponible de Sumitomo o como interferón alfa-n1 Wellferon (INS) disponible de Glaxo-Wellcome; o un interferón alfa de consenso tal como los descritos en las Patentes Nos. US4897471 y US4695623 (especialmente los ejemplos 7, 8 ó 9 de los mismos), el producto específico disponible de Amgen; interferón alfa-5; o interferón alfa-n3, una mezcla de interferones alfa naturales fabricados por Interferón Sciences y disponibles de Purdue Frederick Co. bajo el nombre comercial de Alferon. Se prefiere el uso de interferón alfa-2a o alfa-2b. Dado que el interferón alfa-2b, entre todos los
- 60 interferones, tiene una mayor aceptación mundial, es por tanto el más preferido. La fabricación de interferón alfa 2b se describe en la Patente No. US4530901.
- 65

El término “interferón-beta” pretende comprender IFN- β de origen natural, así como proteínas recombinantes. Entre los ejemplos de IFN- β se incluyen, sin limitación, interferón-beta-1a e interferón-beta-1b. El interferón-beta-1a está comercializado por Biogen bajo la marca comercial Avonex, y por Serono bajo la marca comercial Rebif. La otra forma, interferón-beta-1b, está comercializado bajo la marca comercial Betaseron por Berlex. El IFN-beta-1a en Avonex[®] es la secuencia humana nativa glicosilada, mientras que el IFN-beta-1b en Betaseron[®] es la secuencia humana nativa no glicosilada sustituida con una serina en la posición 17.

Las proteínas OSM e IFN tipo I se pueden obtener de una serie de fuentes celulares que sintetizan las proteínas OSM e IFN tipo I incluyendo, por ejemplo, células que producen de manera natural estas proteínas, o células transfectadas con moléculas de ADN recombinante capaces de dirigir la síntesis o la secreción de las proteínas. Alternativamente, las proteínas OSM e IFN tipo I se pueden sintetizar mediante métodos de síntesis química, incluyendo, pero sin limitación, síntesis de péptidos en fase sólida.

El término “proteína recombinante”, tal como se utiliza en la presente invención, en relación con OSM e IFN de tipo I, se refiere a estas proteínas tal como se obtienen mediante técnicas recombinantes de ADN a partir de células huésped procariontas o eucariotas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos.

Habitualmente, la OSM recombinante, el IFN- α recombinante, y el IFN-beta-1b recombinante se pueden obtener de la bacteria *Escherichia coli* modificada genéticamente que comprende ADN que codifica para la proteína humana, seguido de la fermentación en un medio nutriente adecuado. EL IFN-beta-1a en Abonex[®] se produce en células de ovario de hámster chino utilizando tecnología de ADN recombinante.

El término “sales” hace referencia en la presente invención a sales de grupos carboxilo y a sales por adición de ácido de grupos amino de la OSM, agonistas de OSMR y moléculas de IFN tipo I o análogos de los mismos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar mediante medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina, procaina, y similares. Entre las sales por adición de ácido se incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Naturalmente, cualquiera de dichas sales debe mantener la actividad biológica de OSM o IFN tipo I. Para el uso terapéutico, las sales de OSM e IFN tipo I son aquellas en las que el contraíón es farmacéuticamente aceptable. Las sales no farmacéuticamente aceptables también están comprendidas en el alcance de la presente invención, ya que se pueden utilizar en la producción de productos finales farmacéuticamente aceptables.

“Derivados funcionales”, tal como se utiliza en la presente invención, cubre derivados que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los residuos o los grupos N o C-terminales, mediante medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención siempre y cuando sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad biológicas de las proteínas tal como se ha descrito anteriormente, es decir, la capacidad de unirse al correspondiente receptor e iniciar la señalización del receptor, y no confiera propiedades tóxicas en las composiciones que las contienen. Los derivados pueden tener grupos químicos, tales como residuos de carbohidratos o fosfato, siempre que dicho derivado mantenga la actividad biológica de la proteína y siga siendo farmacéuticamente aceptable.

Por ejemplo, los derivados pueden incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante la reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo o grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con grupos acilo (por ejemplo, grupos alcanoilos o aroilos carbocíclicos), o derivados O-acilo de grupo hidroxilo libre (por ejemplo, el de los residuos de serilo o treonilo) formado con grupos acilo. Dichos derivados también pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y extender la permanencia de la molécula en fluidos del organismo.

De particular importancia es una proteína que ha sido derivada o combinadas con un agente complejante para una mayor permanencia. Por ejemplo, según la presente invención se pueden utilizar versiones con PEG, o proteínas modificadas genéticamente para mostrar una actividad con mayor duración en el organismo.

Una “variante” según la presente invención se refiere a una molécula, que es sustancialmente similar a proteínas completas definidas anteriormente o a un fragmento de las mismas. Las variantes de péptidos se pueden preparar de manera práctica mediante síntesis química directa de la variante de péptido utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Naturalmente, dicha variante tendría una unión al receptor y una actividad de iniciación de la señal similares a la correspondiente proteína natural.

Las variaciones en la estructura primaria de la proteína, así como variaciones en niveles más elevados de organización estructural, por ejemplo la variación en el tipo de enlaces covalentes que unen los residuos de aminoácidos o adición de grupos a los residuos terminales de la proteína, se encuentran dentro del alcance de la invención. Además, las moléculas de proteína pueden incluir alteraciones conservativas o no conservativas en la secuencia de aminoácidos que dan lugar a cambios silenciosos que conservan la funcionalidad de la molécula incluyendo, por ejemplo, eliminaciones, adiciones y sustituciones. Dichas moléculas alteradas pueden ser deseables cuando proporcionen ciertas ventajas en su uso. Tal como se utiliza en la presente invención, las sustituciones conservativas implicarían la sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de la correspondiente proteína por otro aminoácido que tenga

unas características de polaridad y hidrofobicidad/hidrofiliidad similares dando lugar a una molécula funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones conservativas incluyen, pero sin limitación, sustituciones de los siguientes grupos de aminoácidos: glicina, alanina; valina, isoleucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; fenilalanina, tirosina; y metionina, norleucina.

5 Las variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína definida anteriormente se pueden preparar mediante mutaciones en los ADN que codifican los derivados sintetizados. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones o inserciones o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácidos. También se puede realizar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre y cuando la construcción final posea la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica la variante de péptido no deben alterar el marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm.

15 A nivel genético, estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis dirigida de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la molécula péptido, produciendo de este modo el ADN que codifica la variante y, a continuación, expresando el ADN en un cultivo de células recombinantes. Las variantes muestran normalmente la misma actividad biológica cualitativa que el péptido no variante.

20 Un “análogo” de las proteínas definidas anteriormente, según la presente invención, se refiere a una molécula no natural, que es sustancialmente similar a las moléculas completas o a un fragmento activo de las mismas. Dicho análogo mostraría la misma actividad que la correspondiente proteína natural.

25 Un “fragmento” según la presente invención se refiere a cualquier subconjunto de moléculas, es decir, un péptido más corto, que mantiene la actividad biológica deseada. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente mediante la eliminación de aminoácidos de cualquier extremo de la molécula y el ensayo de la molécula resultante por sus propiedades como receptor agonista. Las proteasas para eliminar un aminoácido por separado del N- terminal o del C-terminal de un polipéptido son conocidos en la técnica.

30 El término “actividad inmunoestimuladora de células epiteliales” se refiere al desarrollo de una respuesta celular inmune efectuada por las células epiteliales.

35 Una “respuesta celular inmune” se refiere a una respuesta inmune mediada por linfocitos T, por otros glóbulos blancos, o una combinación de los dos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T citotóxicas (CTL). Las CTL presentan especificidad por antígenos peptídicos que se presentan asociados con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan en las superficies de las células. Las CTL ayudan a inducir y activar la destrucción intracelular de patógenos intracelulares o la lisis de células infectadas con dichos patógenos. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función y centrar la actividad de células efectoras no específicas frente a células que expresan antígenos peptídicos en asociación con moléculas MHC en su superficie. Una “respuesta inmune celular” también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras de dichas moléculas producidas mediante células T activadas y otros glóbulos blancos, incluyendo los derivados de células T CD4+ y células T CD8+.

45 La OSM sola o combinada con IFN tipo I confieren propiedades inmunogénicas a las células epiteliales ya que estimulan el proceso de procesamiento y presentación de antígenos en dichas células.

50 El término “inmunogenicidad” se refiere a la capacidad de una sustancia particular, que se denomina el antígeno, para provocar una respuesta inmune (ver, por ejemplo, Roitt: Essential immunology (11th Edition, Blackwell) para una definición en detalle de inmunogenicidad). Cuando se utiliza en relación con la OSM sola o combinada con IFN tipo I, se indica la capacidad de estas proteínas para inducir una respuesta del sistema inmune mediante la activación de la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos en células epiteliales. La OSM sola o combinada con IFN tipo I también se puede considerar como sustancias que aumentan la inmunogenicidad de células epiteliales, ya que activan la producción de antígeno y se expresan en las membranas celulares, donde el antígeno finalmente provoca una respuesta inmune.

55 El proceso de procesamiento y presentación de antígenos en células epiteliales implica la generación de antígenos en dichas células, es decir, la fragmentación (proteólisis) de proteínas expresada por patógenos que han infectado la célula epitelial, así como proteínas aberrantes codificadas por genes mutantes, como por ejemplo genes mutados en células cancerígenas. Estos antígenos endógenos que se degradan en fragmentos (por ejemplo, péptidos) en la célula, se asocian a continuación con moléculas MHC y finalmente se muestran o expresan -se presentan- en la superficie de la célula junto con una molécula de histocompatibilidad de clase I, donde pueden ser reconocidos por el receptor de células T en una célula T, particularmente células T CD8+, que presentan la maquinaria para destruir la célula infectada o tumoral.

65 Como tal, la OSM sola o combinada con IFN tipo I aumentan la antigenicidad de las células epiteliales infectadas o tumorales, haciendo que estas células procesen y presenten más antígenos en sus superficies y, por tanto, se vuelvan más visibles y reactivas a respuestas inmunes, dando lugar finalmente a una destrucción selectiva de las mismas células.

Por lo tanto, la OSM sola o combinada con IFN tipo I representan un agente útil en la inmunoterapia del cáncer y enfermedades provocadas por patógenos infecciosos, tales como virus, bacterias, hongos y parásitos, ya que dichas proteínas pueden activar selectivamente el proceso de destrucción de únicamente aquellas células epiteliales que están infectadas con patógenos o que son tumorales.

El término “inmunoterapia”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un tratamiento terapéutico o profiláctico basado en la activación de una respuesta celular inmune.

En una realización de la presente invención, la respuesta celular inmune puede ser una respuesta inmune innata o una respuesta inmune adaptativa. Preferiblemente, la respuesta celular inmune es una respuesta inmune adaptativa.

En una realización de la presente invención, la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales comprende la proliferación de linfocitos T, la transpresentación de interleuquina 15 (IL-15) a células NK o CD8+, o la producción de interferón gamma (IFN- γ).

Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso de OSM, una agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I, en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano, donde las células epiteliales están infectadas con un patógeno celular o son células epiteliales tumorales.

El patógeno celular que infecta la célula epitelial pretende incluir virus patógenos, bacterias, hongos y parásitos, particularmente retrovirus, adenovirus, virus del papiloma, virus de herpes, citomegalovirus, virus adenoasociados, virus de la hepatitis, pneumovirus, norovirus, rotavirus, astrovirus, paramixovirus, virus de las paperas, proteínas virales, viroides, y similares; meningococos, micobacterias, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium sp.*, *Escherichia coli*, *Yersinia sp.*, *Bordetella pertussis*, *Treponema sp.*, y similares; parásitos, tales como *Leishmania sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Schistosoma sp.*, *Clonorchis sp.*, o *Plasmodium sp.*; u hongos, tales como *Histoplasma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Pneumocystis sp.*, y similares.

Las células epiteliales tumorales se pueden seleccionar de carcinomas, tales como adenocarcinoma (adenocarcinoma bronquiolo-alveolar, adenocarcinoma de células claras, adenocarcinoma folicular, adenocarcinoma mucino, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma escirro, adenocarcinoma sebáceo, adenocarcinoma adrenocortical, tumor carcinoide, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoide quístico, carcinoma ductal, carcinoma endometroide, adenocarcinoma pancreático, carcinoma gástrico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, carcinoma intraductal no infiltrante, carcinoma de células de los islotes, carcinoma lobular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma neuroendocrino, carcinoma de células renales, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma de apéndice cutáneo, colangiocarcinoma, coriocarcinoma, cistadenocarcinoma, tumor de Klatzkin, enfermedad de Paget extramamaria), carcinoma adenoescamoso; carcinoma de células basales, carcinoma basoescamoso; carcinoma de tumor de Ehrlich; carcinoma de células gigantes; carcinoma *in situ* (neoplasia interaepitelial cervical y neoplasia intraepitelial prostética); carcinoma de Krebs 2; carcinoma de células grandes; carcinoma de pulmón de Lewis; carcinoma de pulmón de células no pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas (enfermedad de Bowen); carcinoma de células transicionales; carcinoma verrucoso.

Las células epiteliales tumorales también se pueden seleccionar de neoplasmas adnexal y de apéndice cutáneo, tales como adenocarcinomas sebáceos, carcinoma de apéndice cutáneo; neoplasmas de células basales, tales como carcinomas de células basales (síndrome del nevo de células basales), carcinoma basoescamoso y pilomatrixoma; neoplasmas quísticos, mucinos y serosos, tales como adenocarcinomas mucinos, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de células en anillo de sello/tumor de Krukenberg), cistadenocarcinoma (cistadenocarcinoma mucino, cistadenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma seroso), cistadenoma (cistadenoma mucino, cistadenoma papilar, cistadenoma seroso), tumor mucoepidermoide y pseudomixoma peritoneal, neoplasmas ductal, lobular y medular, tales como carcinoma ductal (carcinoma ductal mamario, carcinoma ductal pancreático), carcinoma intraductal no infiltrante (enfermedad mamaria de Paget), carcinoma lobular, carcinoma medular, enfermedad extramamaria de Paget, papiloma intraductal; neoplasmas fibroepiteliales, tales como adenofibroma, tumor de Brenner; neoplasmas mesoteliales, tales como tumor adenomatoide, mesotelioma (mesotelioma quístico); y neoplasmas de células escamosas, tales como acantoma, carcinoma papilar, carcinoma de células escamosas (enfermedad de Bowen), carcinoma verrucoso, papiloma (papiloma invertido).

La OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I se pueden administrar juntos como formulaciones farmacéuticas separadas o como parte de la misma forma de dosificación unitaria. Alternativamente, la OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I se pueden administrar por separado pero como parte de una pauta terapéutica. Los dos componentes, si se administran por separado, no necesitan ser administrados esencialmente a la vez, aunque es posible si se desea. De este modo, la OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I se pueden administrar como dosificaciones o formas de dosificación separadas, pero a la vez. Opcionalmente, la administración separada de OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I se puede realizar a diferentes tiempos y en cualquier orden.

En una realización de la presente invención, se proporciona un producto que comprende OSM o un agonista de OSMR, e IFN tipo I como un preparado combinado para el uso simultáneo, separado o secuencial para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. En una realización adicional, se proporciona un producto que contiene OSM o un agonista de OSMR e IFN tipo I como un preparado combinado para el uso simultáneo, separado o secuencial para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano.

Como tal, la presente invención se refiere además a la combinación de formulaciones farmacéuticas separadas en forma de kit. Por ejemplo, un kit puede comprender dos formulaciones farmacéuticas separadas que comprenden: 1) OSM o un agonista de OSMR; y 2) IFN tipo I. El kit también comprende un recipiente para las formulaciones separadas, tales como una botella dividida o un envase de aluminio dividido. Algunos ejemplos adicionales de recipientes incluyen jeringas, cajas, bolsas y similares. Habitualmente, un kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferiblemente en formas de dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se administran a intervalos diferentes de dosis o cuando se desea una concentración de los componentes individuales de la combinación por el médico solicitante.

El producto o kit de la presente invención es particularmente adecuado para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. En una realización de la presente invención, el producto o kit que comprende OSM, un agonista de OSMR o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con interferón tipo I se utiliza en la inmunoterapia del cáncer y enfermedades provocadas por patógenos infecciosos, tales como virus, bacterias, hongos y parásitos.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a los usos mencionados anteriormente de OSM sola o combinada con IFN tipo I en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano, donde la OSM sola o combinada con IFN tipo I se formula en una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de OSM sola o combinada con IFN tipo I, y un portador farmacéuticamente aceptable. Una cantidad terapéuticamente eficaz en este contexto es una cantidad suficiente para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano, de una manera clínicamente significativa.

La OSM sola o combinada con IFN tipo I se puede formular en varias formas farmacéuticas para los fines de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones utilizadas habitualmente para la administración sistémica de fármacos. Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se combina una cantidad eficaz de OSM sola o combinada con IFN tipo I como principio activo en una mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, cuyo portador puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la manera de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en una forma de dosificación unitaria adecuada, particularmente, para la administración mediante vía oral, rectal, transdérmica, por inhalación o parenteral (es decir, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal). La OSM sola o combinada con IFN tipo I se puede administrar mediante vía oral en formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos, cápsulas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden administrar parenteralmente, en formas de dosificación de líquido estéril. Entre las vías de administración preferidas están las vías parenterales, particularmente mediante inyecciones intramuscular, intravenosa o subcutánea.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas para inyecciones estériles isotónicas. Se pueden preparar, por ejemplo, soluciones inyectables, en las que el portador comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden utilizar portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. También se incluyen preparados en forma sólida que pretenden convertirse, poco antes de su uso, en preparados en forma líquida. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, opcionalmente combinado con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, cuyos aditivos no introducen un efecto perjudicial significativo en la piel. Estos últimos aditivos adecuados pueden ser anti-oxidantes, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica y/o sustancias tampón.

Alternativamente, la OSM sola o combinada con IFN tipo I se puede liberar a las células epiteliales formuladas en liposomas. Los liposomas se pueden preparar utilizando técnicas convencionales incluyendo sonicación, diálisis con quelatos, homogenización, infusión de disolvente acoplada con extrusión, extrusión por congelación-descongelación, microemulsificación, así como otras. Los reactivos utilizados para reticular un liposoma u otro agente que contiene lípido a las proteínas de la presente invención comprenden un derivado de fosfolípido para anclarse a un extremo de la reticulación en la capa lipídica y un grupo reactivo en el otro extremo para proporcionar un punto de unión a la biomolécula diana. También se pueden utilizar liposomas polimerizados o liposomas recubiertos con polímero. Dichos polímeros pueden estabilizar el liposoma, reducir su depuración del cuerpo y/o reducir su inmunogenicidad. El liposoma se puede cargar con un grupo funcional tal como un agente de diagnóstico o terapéutico durante o después de su formación. El agente puede estar contenido en un núcleo acuoso del liposoma o se puede incorporar en o unido a su membrana circundante.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Ente los ejemplos de dichas formas de dosificación unitarias están los comprimidos (incluyendo comprimidos rayados o recubiertos), cápsulas, pastillas, supositorios, paquetes de polvos, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, y similares, y combinaciones múltiples separadas de los mismos.

La dosificación diaria de los compuestos según la presente invención variará con el modo de administración, el tratamiento deseado y la gravedad del trastorno.

En general, se contempla que una cantidad diaria eficaz de OSM puede variar desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 5,0 mg por paciente. En el caso de IFN tipo I, la cantidad diaria eficaz sería desde 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. El IFN α 2a se administra habitualmente en una cantidad de 11,1 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, 22,2 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, 33,3 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, diariamente o tres veces por semana. El IFN α 2b se administra habitualmente en una cantidad de 0,038 mg/1 mL, 0,069 mg/1 mL, 0,087 mg/1,5 mL, 0,144 mg/1,5 mL, 0,192 mg/1 mL, 0,288 mg/1,5 mL, mediante inyección de tres a cinco veces por semana. El IFN β 1a se administra habitualmente en una cantidad de 8,8 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, 22 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ ó 44 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, inyectado subcutáneamente tres veces por semana. El IFN β 1b se administra habitualmente en una cantidad de 0,0625 mg/0,25 mL y se incrementa hasta 0,25 mg/1 mL inyectado subcutáneamente en días alternativos.

Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como una, dos, tres, cuatro o más subdosis en los intervalos apropiados a lo largo del día. Además, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención. Por lo tanto, los intervalos de las cantidades diarias eficaces son sólo a modo de guía.

La OSM sola o combinada con IFN tipo I se puede disponer como polipéptidos, por ejemplo como proteínas recombinantes o, alternativamente, uno o ambos de dichos componentes se pueden disponer como un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dichos componentes.

En una realización preferida, el polinucleótido que codifica dichos componentes está comprendido en un vector. En una realización de la presente invención, se proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica OSM o un agonista de OSMR, y opcionalmente un ácido nucleico que codifica interferón tipo I, unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la OSM o el agonista de OSMR, y opcionalmente IFN tipo I en un huésped de expresión adecuado.

En algunos casos, el ácido nucleico que codifica las diferentes cadenas polipeptídicas de OSM o un agonista de OSM, y de IFN tipo I, se pueden disponer en el mismo vector de expresión.

Tal como comprenderá un experto en la materia, en lugar de la administración combinada de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica OSM o un agonista de OSM y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica IFN tipo I para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un humano, otra manera de implementar la presente invención consiste en administrar un vector de expresión recombinante que comprende ambos polinucleótidos, es decir un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica OSM o un agonista de OSMR y la secuencia de nucleótidos que codifica IFN tipo I. Cuando el vector se expresa en el huésped receptor producirá entonces las proteínas correspondientes que llevan cabo el efecto terapéutico mencionado anteriormente.

Los vectores adecuados para acomodar los polinucleótidos que forman las composiciones y kits de la presente invención incluyen un plásmido o un vector que, cuando se introducen en la célula huésped, se integra o no en el genoma de dicha célula. Dicho vector se puede obtener mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia y se pueden encontrar en, por ejemplo, (Sambrook *et al.*, 2001).

No obstante, en el ámbito de la presente invención, el vector de la presente invención es preferiblemente un vector viral o no viral adecuado para su uso en terapia génica; a modo de ilustración no limitante, dichos vectores pueden ser vectores virales basados en retrovirus, adenovirus, alfavirus, etc., o en el caso de vectores no virales, los vectores pueden ser complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. (Hung, 1999). Dichos vectores virales y no virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica OSM sola o combinada con IFN tipo I se pueden administrar directamente al cuerpo humano mediante procedimientos convencionales.

En una realización particular, el vector es un vector viral, el cual en otra realización particular es un alfavirus, tal como virus Semliki Forest, Sindbis y encefalitis equina venezolana (VEE); un adenovirus de capacidad elevada; un adenovirus condicionalmente replicativo; o un virus adenoasociado. En una realización particularmente preferida, el alfavirus es un virus Semliki Forest.

Dichos vectores se pueden utilizar alternativamente para transformar, transfectar o infectar células, preferiblemente células mamíferas, incluyendo células humanas, por ejemplo, *ex vivo*, y, posteriormente, implantarlas en el cuerpo

humano para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto, dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte de manera adversa a su viabilidad. Así mismo, tal como comprenderán los expertos en la materia, dicho vector puede comprender, entre otros, múltiples sitios de clonación, secuencias reguladoras de la expresión, orígenes de replicación adecuados para la célula huésped en los que se introduce el vector, marcadores de selección, etc.

El vector de la presente invención comprende una o más secuencias de control o reguladoras de la expresión antes del polinucleótido que están unidas operativamente a dicho polinucleótido para dirigir la producción de la OSM o el agonista de OSMR, y opcionalmente IFN tipo I, en un huésped de expresión adecuado. Tal como se utiliza en la presente descripción, la expresión “unida operativamente” significa que el polinucleótido que codifica la OSM o el agonista de OSMR y el polinucleótido que codifica el IFN tipo I se encuentran en el marco de lectura correcto para su expresión bajo el control de dichas secuencias de control o reguladoras de la expresión.

Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias promotoras nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/u otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea la expresión constante de la secuencia de ácido nucleico heteróloga, entonces se utiliza un promotor constitutivo. Entre los ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos se incluyen el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares. En la técnica se conocen otros ejemplos de promotores constitutivos y se pueden utilizar en la implementación de la invención. Si se desea la expresión controlada de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga, entonces debe utilizarse un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible debe ser “silencioso”. “Silencioso” se entiende que significa que en ausencia de un inductor, se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga; en presencia de un inductor, sin embargo, tiene lugar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga. El nivel de expresión se pueden controlar frecuentemente mediante la variación de la concentración del inductor. Mediante el control de la expresión, por ejemplo, variando la concentración del inductor de manera que un promotor inducible es estimulado de manera más o menos intensa, se puede influir en la concentración del producto transcrito de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga. En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifique un gen, se puede controlar la cantidad sintetizada de proteína. De este modo, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Entre los ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son un promotor sensible a andrógeno o estrógeno, un promotor sensible a doxiciclina, un promotor de metalotioneína o un promotor sensible a ecdisona. En la técnica se conocen otros ejemplos diversos y se pueden utilizar para implementar la invención. Además de promotores constitutivos e inducibles (que normalmente funcionan en una gran variedad de tipos de células o tejidos), se pueden utilizar promotores específicos de tejido para conseguir la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos heteróloga específica en células o tejidos. Entre los ejemplos conocidos de promotores específicos de tejido se incluyen promotores específicos de hígado tales como promotores de albúmina, alfa-1 antitripsina o hemopexina (Kramer *et al.*, 2003), varios promotores específicos de músculo que incluyen: promotor de α -actina esquelética, promotor de actina cardiaca, promotor de troponina C esquelética, promotor de troponina C cardiaca de contracción lenta y el promotor/potenciador de creatina quinasa, o promotores específicos de tumores tales como promotor de α -fetoproteína para carcinoma hepatocelular humana o promotor de antígeno específico de próstata para cáncer de próstata. En la técnica se conocen una serie de promotores específicos de músculo y se pueden utilizar en la implementación de la invención (para una revisión de los promotores específicos de músculo, véase, Miller *et al.*, 1993).

“Heterólogo/a”, tal como se utiliza en la presente invención, significa “de origen natural diferente” o representa un estado no natural. Por ejemplo, heterólogo/a se refiere a una secuencia de nucleótidos derivada del mismo tipo de células originales naturales e insertada en las mismas, pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo, un número de copias diferentes, o bajo el control de diferentes elementos reguladores. De manera similar, si una célula huésped se transforma con un ADN o gen derivado de otro organismo, particularmente de otra especie, este gen es heterólogo con respecto al de la célula huésped y también con respecto a los descendientes de la célula huésped que porta ese gen.

Los vectores de la presente invención se pueden liberar a las células huésped mediante transfección. Entre las técnicas de transfección convencionales se incluyen una serie de técnicas reconocidas en el sector para introducir ácido nucleico exógeno (por ejemplo ADN o ARN) en una célula huésped, incluyendo co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, (micro)inyección, o electroporación.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante tal como se ha definido anteriormente en la presente invención.

Una “célula huésped” se refiere a una célula procariota o eucariota que contiene ADN heterólogo que ha sido introducido en la célula mediante cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral, y similar.

Los vectores de expresión recombinantes y las células huésped de la presente invención son, por tanto, útiles en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano. Como tal, se pueden acondicionar de manera adecuada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, constituyendo de este modo una formulación farmacéutica.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la preparación de linfocitos CD8+ estimulados para su uso en inmunoterapia adoptiva, comprendiendo dicho procedimiento:

5 a) tratar células o tejido epitelial derivados de un ser humano con una dosis eficaz de OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con IFN tipo I, o el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9;

b) irradiar las células o tejidos tratados obtenidos de la etapa a);

10 c) cocultivar las células o tejido irradiados obtenidos de la etapa b) con

- células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), o

15 - linfocitos CD8+ enriquecidos y opcionalmente células presentadoras de antígenos;

d) opcionalmente cocultivar los linfocitos CD8+ estimulados obtenidos de la etapa c) con células o tejido tratados e irradiados obtenidos de la etapa b);

20 en el que las PBMCs, los linfocitos CD8 + y las células o tejido epitelial derivan de mismo sujeto humano.

Los procedimientos de utilización de linfocitos CD8+ para terapia celular adoptiva en el tratamiento de sujetos humanos son conocidos por los médicos expertos en la materia. En dichos procedimientos se pueden utilizar los linfocitos CD8+ preparados según los procedimientos descritos en la presente invención y conocidos en la técnica. Por ejemplo, la terapia celular adoptiva que utiliza líneas de células T citotóxicas antitumorales se ha ensayado en clínica en pacientes con neoplasia sólida (Turín *et al.*, 2007).

La presente invención proporciona procedimientos para aumentar la inmunoterapia adoptiva mediante la disposición de un paciente con un nivel de inmunidad aumentada estimulando células *ex vivo* y, a continuación, readministrándolas al paciente. Las células son histocompatibles con el sujeto y pueden ser alogénicas o autólogas. Preferiblemente derivan del mismo paciente a tratar.

El procedimiento de preparación *in vitro* de linfocitos CD8+ estimulados comprende aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un paciente; aislar células epiteliales del mismo paciente y tratarlas con una dosis eficaz de OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con un IFN tipo I, o el vector de expresión recombinante de la presente invención; irradiar las células tratadas; y expandir las células en el cultivo a cantidades muy elevadas en un medio de cultivo. Estas células expandidas que comprenden linfocitos CD8+ estimulados se pueden entonces reintroducir a continuación de nuevo en el paciente para fines inmunoterapéuticos.

En otra realización, una vez se han aislado las PBMC, estas células se pueden aislar posteriormente para proporcionar un cultivo más homogéneo o enriquecido en linfocitos CD8+ y, a continuación, estas células se readministran al paciente.

45 Alternativamente, los linfocitos CD8+ estimulados obtenidos en la etapa c) del procedimiento descrito anteriormente se pueden co-cultivar con células o tejido tratados e irradiados obtenidos de la etapa b) anterior tantas veces como sea necesario con el fin de obtener cantidades suficientemente elevadas de linfocitos CD8+ estimulados para su uso en inmunoterapia del paciente en cuestión.

50 La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* de preparación de linfocitos CD8+ estimulados para su uso en un inmunoterapia adoptiva que comprende aislar células epiteliales de un paciente y tratarlas con una dosis eficaz de OSM, un agonista de OSMR, o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con un IFN tipo I, o el vector de expresión recombinante de la presente invención; irradiar las células tratadas; co-cultivar el material tratado e irradiado del paciente con linfocitos CD8+ enriquecidos y opcionalmente células presentadoras de antígenos (APCs), tales como células dendríticas autólogas, monocitos, células B, líneas de células B transformadas con EBV, líneas de células B alogénicas transformadas con EBV que expresan el alelo limitativo compartido, células presentadoras de antígenos artificiales; y expandir estas células en el cultivo. Estas células expandidas que comprenden linfocitos CD8+ estimulados se pueden entonces reintroducir de nuevo en el paciente.

60 La presente invención se refiere además a linfocitos CD8+ estimulados obtenibles mediante los procedimientos descritos en la presente invención, así como al uso de estos linfocitos CD8+ estimulados como medicamento, o en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas. De manera equivalente, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa en un ser humano, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad eficaz de linfocitos CD8+ estimulados obtenibles según los procedimientos descritos en la presente invención.

La OSM, un agonista de OSMR o una combinación de OSM o un agonista de OSMR con IFN- α son, por tanto, útiles como potenciadores *in vitro* de la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales humanas.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Para analizar las propiedades inmunoestimuladoras de OSM en células diana, se utilizaron células de hepatoma tratadas con citoquinas pulsadas con un péptido antígeno para estimular linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno. La activación de linfocitos se midió mediante el análisis de su producción de IFN- γ , un marcador utilizado habitualmente en el cebado de linfocitos T. La producción de esta citoquina Th1 después del reconocimiento de antígeno por células T se ha considerado habitualmente como un dato de lectura que se correlaciona con propiedades efectoras de linfocitos útiles en estrategias inmunoterapéuticas en infecciones virales y cáncer (Brosterhus *et al.*, 1999).

Material y métodos

Extracción de ARN y RT-PCT a Tiempo Real

La extracción total de ARN se realizó utilizando la Solución de Lisis para la Purificación de Ácidos Nucleicos (Applied BioSystems) y el sistema semiautomático ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied BioSystems). La RT-PCR a Tiempo Real se realizó tal como se ha descrito (Larrea, *et al.*, 2006) utilizando cebadores específicos para cada gen. (Tabla 1).

Transferencia Western

Para el análisis de Transferencia Western, se sembraron $1,5 \times 10^4$ células Huh7 o HepG2 en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células se dejaron sin tratar o se trataron con 50 IU/ml de IFN α 2 (Sicor) o 20 ng/ml de OSM (R&D Systems) o 50 IU/ml de IFN α 2 más 20 ng/ml de OSM. Después de diferentes puntos de tiempo, las células se lavaron con PBS y se recogieron en 150 μ l de tampón de carga de proteínas (62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, glicerol al 10%, 5% de 2-ME, 2% de SDS, 0,006% de azul de bromofenol). La transferencia Western se realizó (Larrea *et al.*, 2006) utilizando anticuerpos específicos: Anti-fosfo-STAT1tyr701, anti-fosfo-STAT3tyr705, anti-fosfo-JAK1tyr1022/1023, anti-fosfo-Tyk2tyr1054/1055, anti-fosfo-p38thr180/tyr182 MAPK y anti-conejo IgG unida a HRP se adquirieron de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos anti-STAT3, anti-Tyk2, anti-STAT2, anti-fosfo-STAT2tyr689 eran de Upstate Biotechnology. Los anticuerpos anti-p38 MAPK, anti-STAT1 eran de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-Tap1, anti-ICAM-1, anti-PSMB9, anti B2M y anti-HLA-ABC eran de Abcam. Los anticuerpos anti-actina y anti-ratón IgG unida a HRP eran de Sigma-Aldrich.

Análisis por microarray

Las células Huh7 se sembraron a razón de 1×10^6 células/placa en DMEM más 10% de FBS. Después de 18 horas, las células se dejaron sin tratar o se trataron con IFN α 2 (50 IU/ml), u OSM (20 ng/ml) o IFN α 2 (50 IU/ml) combinado con OSM (20 ng/ml). Tres días después, las células se recogieron en 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado. A continuación, las muestras se procesaron en Progenika Biopharma S.A. siguiendo las recomendaciones de Affymetrix y se hibridó el ARNc al array Affymetrix humano U133A 2.0. Tanto la corrección del ruido de fondo como la normalización se realizaron utilizando el algoritmo de Robust Multichip Average. Después del cálculo de la expresión para cada grupo de sondas en todos los microarrays, se realizó un proceso de filtración para eliminar los grupos de sondas con una expresión baja. Aplicando el criterio de un valor de expresión superior a 16 en el 17% de las muestras, se seleccionaron 17.927 grupos de sondas para el análisis estadístico. Se utilizaron Modelos Lineales para Datos de Microarray con el fin de encontrar los grupos de sondas que permitían una expresión diferencial significativa entre las condiciones experimentales. Los genes afectados por los tratamientos con IFN α 2 u OSM o la combinación de IFN α 2 más OSM, se identificaron como significativos utilizando un corte estadístico B ($B > 0$). Los genes descritos se seleccionaron en base al criterio del número de cambios y un enriquecimiento de las categorías funcionales, estudiados mediante los softwares de Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) y Webgestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>).

Ensayo de presentación de antígenos

Las PBMC obtenidas de un donante sano de HLA-A2+ se pulsaron con 1 μ g/ml de péptido 58-66 (GILGFVFTL) de la matriz del virus de la gripe A limitado a HLA-A2- durante 2 horas a 37°C, se lavaron y se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 3×10^6 células/pocillo. Tres días después, se añadió IL-2 (10 U/ml) y las células se cultivaron durante 5 días adicionales. En el día 8, las células recuperadas se cocultivaron (10^5 /célula) con células HepG2 (5×10^4 /célula) tratadas previamente durante 4 días con 50 IU/ml de IFN α 2 ó 20 ng/ml de OSM ó 50 IU/ml de IFN α 2 más 20 ng/ml de OSM o células no tratadas, en presencia o ausencia de 1 μ g/ml de péptido GILGFVFTL en

placas de cultivo de base redonda de 96 pocillos. Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes para medir la producción de IFN- γ mediante ELISA (BD Biosciences).

5 Ensayo de la actividad de IL-15R α

Se estimó la funcionalidad de IL-15R α expresada en células Huh7 para transpresentar IL-15 a células CTLL-2. Para este objetivo, se sembraron células Huh7 y se trataron con 50 IU/ml de IFN α 2, 20 ng/ml de OSM o la combinación de ambos tratamientos durante tres días. A continuación, se recogieron las células Huh7 y se incubaron durante una hora con o sin 50 ng/ml de IL-15 exógena, se lavaron tres veces y se irradiaron a 15000 cGys en un Gammacell 3000 Elan. A continuación, se cocultivaron 3x10⁴ células Huh7 irradiadas con 1x10⁴ células CTLL-2 en placas de 96 pocillos. En el día 2, las células se pulsaron con 0,5 μ Ci/pocillo de timidina tritiada durante 8 horas, se recogieron y se midió la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Topcount, Packard).

15 Análisis de citometría de flujo

Se estudió la expresión de la molécula de superficie ICAM1 en células Huh7 y HepG2 no tratadas o tratadas con 50 IU/ml de IFN α 2 ó 20 ng/ml de OSM ó 50 IU/ml de IFN α 2 más 20 ng/ml de OSM durante cuatro días. A continuación, las células se recuperaron en PBD-EDTA y se tiñeron con anti-ICAM1 humano marcado con PE o control de isotipo IgG-PE (BD Biosciences). Después de 30 minutos, las células se lavaron y analizaron utilizando un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

25 Análisis estadístico

Los métodos estadísticos utilizados fueron los descritos previamente (Larrea *et al.*, 2006). Los datos eran la media $\pm$ SD; un valor $p < 0,05$ se consideraba como significativo.

TABLA 1

Cebadores utilizados en este estudio

Gen	Cebador de sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
B2M	AGGCTATCCAGCGTACTCCA	ATCTTTTTTCAGTGGGGGTGA
Cxcl1/2	CACCCCAAGAACATCCAAAG	AGCCACCAGTGAGCTTCCTC
Cxcl3	CAAACCGAAGTCATAGCCAC	TTCTCTCCTGTCAGTTGGTG
GBP2	TGGCTCCAGAGATCAACTTG	TTCCCTTGGTGTGAGACTTC
HLA-A	GATAATGTATGGCTGCGACG	GTGGGTCATATGTGTCTTGG
HLA-B	ACCAAACCTCAGGACACTGAG	ATGACCACAACCTGCTAGGAC
HLA-C	AGACACAGAAGTACAAGCGC	TGTAATCCTTGCCGTCGTAG

5	IL-32	CAGTGGCGGCTTATTATGAG	GTTGCGGGATCCTCAACATC
	IL-7	CCCTGATCCTTGTCTCTGTTG	AAATTGCCTCAACTTGCGAG
	IL-15R α	GGAACCACAGAGATAAGCAG	CCTTGACTTGAGGTAGCATG
	IRF1	CTGATACCTTCTCTGATGG	TCCAGGTTTATTGAGTAGG
10	ICAM-1	CCGAGCTCAAGTGTCTAAAG	CCTTTTGGGCCTGTTGTAG
	MYD88	TTGAGTACTTGGAGATCCGG	ACCTGTAAAGGCTTCTCAGC
15	PSMB8	CAGAATTCTTCCAGTCCCTG	AGTACAGCCTGCATTCCTTG
	PSMB9	CATCATGGCAGTGGAGTTTG	TGAGATGTGCAGACAAGTCC
	S100A9	CTTGCAAAATGTCGCAGCTG	CATGATGAACTCCTCGAAGC
20	TAPBP	TGATGGTCAGCATATCCAGC	AAGTCCAGCAGAGCATCTTG
	TAP1	TCGTTGTCAGTTATGCAGCG	CCCGTAAAGAATGGAATGGC
25	TAP2	GGACCAGGTGAACAACAAAG	CAAAGGAGAAGAGGCACATG
	UBE2L6	ACAACCAAGATCTACCACCC	ATTCTGTGTCAGCAGGTCAG
	ULBP2	GCTACCAAGATCCTTCTGTG	AGTCTTTTCATCCACCTGGC
30	β -actina	AGCCTCGCCTTTGCCGA	CTGGTGCCTGGGGCG

35 *Preparación de PBMCs*

Se obtienen grandes cantidades de PBMCs de pacientes mediante una leucaferesis que se realiza con un dispositivo Spectra Cobe (Lakewood Co., Estados Unidos) utilizando el programa MNC (método semiautomático) y procesando por lo menos un volumen de sangre.

40 *Estimulación in vitro de linfocitos CD8+*

Las células o tejido epitelial tumorales derivados de humano se obtienen de un paciente mediante cirugía. El tejido extraído del cuerpo humano se procesa para eliminar el tejido graso y necrótico. Se prepara una suspensión de células individuales mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como disgregación mecánica o digestión enzimática secuencial.

Las células epiteliales tumorales se tratan durante 4 días con OSM, un agonista de OSM, o una combinación de OSM o un agonista de OSM con un IFN tipo I.

Las células epiteliales tumorales tratadas (TTEC) se siembran a razón de $0,5-1 \times 10^6$ células/mL en CellGro SCGM (Cell Genix, Alemania), suplementado con FBS al 10% y se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante un periodo de 2 semanas. Se extrajeron las TTECs no viables a cada cambio de medio (días alternativos). Cuando las TTECs cubren por lo menos el 70% de la superficie de crecimiento y está disponible una cantidad adecuada de TTECs, se realiza una selección negativa con micropartículas anti-fibroblasto (Mini-Macs, Miltenyi Biotec, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante. Cuando está disponible la efusión neoplásica, se centrifuga la muestra, y las TTECs obtenidas mediante selección negativa se siembran en matraces de cultivo a razón de $1-5 \times 10^6$ células/mL en CellGro SCGM y se cultivan tal como se ha descrito anteriormente. En las fases iniciales y periódicamente durante el subcultivo, las TTECs son caracterizadas ampliamente mediante una serie de criterios de evaluación (es decir, análisis morfológico y fenotípico y redistribución génica) para establecer la correlación con el tejido de origen.

En la fase inicial, en lugar de en las fases a largo plazo, las TTECs se utilizan para minimizar la posibilidad de modificar las características primarias como consecuencia del recultivo extensivo *in vitro*. Las líneas de TTEC, después del análisis morfológico y fenotípico, se criopreservan hasta su uso como células estimuladoras y diana (pureza > 98%).

Las células enriquecidas con CD8 (10^6 células/mL) se cocultivan en placas de 48 pocillos (volumen final de 1 mL) con células dendríticas (2×10^5 células/mL), y TTECs ($0,5-1 \times 10^5$ células/mL) irradiadas (20000 rads). Después de 7-10 días, los cultivos se reestiman con TTECs irradiadas (5×10^5 células/mL). El mismo protocolo se utiliza para un ciclo adicional de estimulación específica de tumores.

Resultados

Señalización de Jak/STAT en células Huh7 tratadas con IFN α y/u OSM

Para analizar los mecanismos de señalización celular activados por el efecto combinado de OSM e IFN α , se realizó un análisis de inmunotransferencia de proteínas Jak/STAT en células Huh7 tratadas durante 1, 3, 24, 48 y 72 horas, con IFN α 2 u OSM o ambos. Tal como se muestra en la figura 1, la STAT2 sólo fue activada por IFN α 2 o por su combinación con OSM, siendo la activación transitoria y no detectable antes de 24 horas. De manera similar, la STAT1 se fosforiló fuertemente mediante IFN α 2 después de 1 y 3 horas, pero su activación ya no estaba presente a las 24 horas. Sin embargo, el IFN α 2 provocó un aumento de la proteína STAT1 total que fue evidente desde las 24 horas en adelante. La OSM activó la STAT1 después de 1 hora y la señal fue desapareciendo durante los siguientes puntos de tiempo pero permaneció hasta las 72 horas. La OSM también incrementó, aunque moderadamente, los niveles de proteína STAT1 total. Cuando se combinó IFN α 2 con OSM, se observó un efecto aditivo de las dos citoquinas que dio como resultado un aumento de los niveles de STAT1 total y prolongó la activación de esta molécula conduciendo a una fuerte señal de activación de STAT1 que duraba hasta las 72 horas. En cuanto a STAT3, el IFN α 2 provocó sólo una activación leve y transitoria de la molécula que no se detectó más después de 1 hora. En cambio, la OSM sola y la combinación de OSM más IFN α 2 indujeron una activación rápida y muy robusta de STAT3 que persistió a las 72 horas. Esto se vio acompañado por niveles más elevados de la proteína STAT3 desde las 24 horas hacia adelante. Además, la OSM, sola o en combinación con IFN α 2, provocó una activación más fuerte y prolongada de Jak1 que cuando se utilizaba IFN α 2 solo (Figura 1A).

A partir de estos descubrimientos, parece posible que la activación más larga y fuerte de Jak1, STAT1 y STAT3 cuando se utiliza OSM más IFN α 2 pueda facilitar una formación duradera de homodímeros y heterodímeros de STAT1 y STAT3.

Dado que se ha observado que la activación de p38 MAPK facilita la expresión génica dirigida por IFN α 2 mediante elementos ISRE y GAS (Parmar, 2003), se analizó el efecto de las dos citoquinas en la activación de esta molécula de señalización. Se observó que en las células Huh7, el IFN α no conseguía inducir la fosforilación de p38, mientras que OSM más/menos IFN α provocó una activación destacada de p38 durante por lo menos 72 horas (Figura 1B). Parece posible que este efecto de OSM sobre p38 pueda contribuir a aumentar la expresión de genes sensibles a IFN α cuando las dos citoquinas se utilizan combinadas.

Análisis por microarrays de genes inducidos por IFN α y/u OSM

Para llegar a entender bien el programa transcripcional puesto en marcha mediante la acción de unión de IFN α 2 más OSM, se estudió el transcriptoma de células Huh7 incubadas durante 72 horas en medio basal o en presencia de IFN α 2 (50 IU/ml) u OSM (20 ng/ml) o ambos. Después de los estudios de análisis funcional con los genes diferentemente expresados, se observó un enriquecimiento de algunas categorías biológicas que incluían genes antivirales, genes implicados en la presentación de antígenos y genes que codifican los factores inmunoreguladores claves. La validación de estos genes se realizó mediante RT-PCR cuantitativa después de la extracción de ARN de células Huh7 tratadas con IFN α 2, OSM o ambos durante 24, 48 y 72 horas. Los genes validados se podían agrupar en dos grupos: a) genes sensibles o no a IFN α que no mostraron cambios o muy pocos con OSM sola, pero manifestaron una regulación por incremento vigorosa mediante el tratamiento de combinación; B) genes que fueron inducidos por OSM, así como mediante la combinación de las dos citoquinas. El Grupo A comprendía principalmente genes antivirales y genes implicados en el procesamiento y presentación de antígenos. El grupo B incluía genes que codifican moléculas relevantes para la inmunidad innata, genes implicados en la activación y expansión de linfocitos, así como genes antivirales específicos y genes implicados en la presentación de antígenos.

OSM induce elementos claves de la inmunidad innata

Los datos de los estudios de validación por microarray y RT-PCR indicaron que la OSM participa en la inmunidad innata no sólo mediante el aumento de la expresión de genes antivirales estimulados por IFN α , sino también mediante la inducción directa de moléculas que son esenciales en la defensa natural contra la infección incluyendo MYD88, S100A9, ULBP2, IL-32, IRF1 y GBP2 y los genes de quimioquinas CXCL1, CXCL2 y CXCL3 (Figura 2). Para varios de estos genes, la combinación de OSM más IFN α aumentó su expresión en niveles más elevados que con OSM sola.

Regulación por incremento de moléculas implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos mediante el efecto combinado de OSM e IFN α o mediante OSM sola

Tal como se ha indicado previamente, se reguló por incremento de manera severa un grupo de genes que codificaban moléculas con funciones esenciales en el procesamiento y presentación de antígenos cuando las células Huh7 se trataron con OSM más IFN α 2. Estos genes incluían: a) miembros del sistema ubiquitina-inmunoproteasoma UBE2L6, PSMB8 y PSMB9, implicados en la generación de péptidos de proteínas citosólicas, b) transportadores de péptidos

en el retículo endoplasmático para la asociación con moléculas MHC clase I, concretamente TAP1 y TAP2, c) genes HLA clase I, especialmente HLA-A, HLA-B y HLA-C, y B2M (Figura 3 (a-I) que codifica la microglobulina β_2 , una molécula esencial para la expresión estable de las moléculas de clase I en las superficies celulares (Rizvi, *et al.*, 2006).

- 5 Por otro lado, se observó que la OSM *per se* inducía otros genes que son críticos para la presentación de antígenos, tales como TAPBP (Figuras 3J), cuyo producto génico media en la interacción entre TAP1 y HLA clase I (Rizvi *et al.*, 2006).

- 10 En un análisis por transferencia Western de PSMB9 y TAP1 en células Huh7 se mostró que el tratamiento con IFN α 2 más OSM indujo fuertemente la expresión de estas moléculas en los días 3 y 4 de incubación, mientras que cada citoquina sola provocó un leve incremento de las mismas proteínas (Figura 3K). Las proteínas HLA clase I experimentaron una regulación por incremento principalmente con IFN α 2 y menos con OSM con un efecto aditivo de las dos citoquinas que fue evidente en el día 3, pero no en puntos posteriores en el tiempo (Figura 3K). La proteína B2M mostró una regulación por incremento principalmente por IFN α 2 en el día 3 y por el tratamiento combinado en el día 4 (Figura 3K).

- Estos resultados indican que la acción concertada de IFN α 2 y OSM en células epiteliales de hígado estimulan fuertemente la maquinaria responsable de la generación y presentación de péptidos antigénicos a los efectores de la respuesta inmune adaptativa. Este efecto es de considerable importancia para facilitar la depuración inmune de las células infectadas con virus.

OSM aumenta la función estimuladora de células Huh7 y su capacidad para transpresentar IL-15

- Además de los hallazgos anteriores, se observó que la OSM induce en células Huh7 genes que codifican moléculas que favorecen la activación y expansión de linfocitos, concretamente ICAM-1, IL-15R α e IL-7 (Figura 4, A-C). El análisis por transferencia Western indicó que la OSM sola o combinada con IFN α 2 provocó la regulación por incremento de ICAM-1 con un patrón de bandas múltiples consistente con la hiperglicosilación (Figura 4D), un efecto asociado con una actividad estimuladora más elevada de la proteína (Diamond, *et al.*, 1991). En concordancia con estos resultados, los estudios de citometría de flujo mostraron que la OSM y el tratamiento combinado con IFN α 2 aumentaban la abundancia de ICAM-1 en la membrana celular de células Huh7 (Figura 4E). Otra molécula relevante que confiere propiedades inmunoestimuladoras a las células epiteliales es IL-15R α , la cual es esencial para la transpresentación esencial de IL-15 a células T CD8+. Para establecer la función de OSM en el aumento de la expresión de la IL-15R α funcional, se estudió el efecto de OSM, IFN α 2 u OSM más IFN α 2 en la capacidad de células Huh7 pulsadas con IL-15 para mantener la proliferación de células CTLL-2 (una línea celular sensible a IL-15). Tal como se representa en la Figura 4F, se observó que la OSM sola o combinada con IFN α 2 provoca una estimulación significativa de la proliferación de CTLL-2, mientras que el crecimiento celular era similar con todas las formas de tratamiento en ausencia de IL-15. Nuestros datos muestran que la OSM aumenta la transpresentación de IL-15 por células hepatocíticas y que este efecto es más potente que el mostrado por IFN α .

- Se investigó además si la OSM sola o combinada con IFN α 2 era capaz de aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales del hígado. Para este objetivo, se incubaron células HepG2 con medio que contenía OSM, o IFN α 2 o en combinación o en medio solo y, a continuación, las células se pulsaron con un péptido del virus de la gripe A presentado por HLA-A2. Estas células se utilizaron para estimular la producción de IFN γ por CTL sensibilizado. En este experimento, se utilizaron células HepG2 ya que son HLA-A2+ y se observó que respondían a OSM con una regulación por incremento de genes implicados en la presentación e inmunoestimulación con antígenos de la misma manera que las células Huh7 (Figura 4H-N). En concordancia con los datos anteriores, se observó que el pretratamiento con OSM o la combinación de OSM más IFN α 2 aumentó la capacidad de las células HepG2 para estimular la producción de IFN γ por CTL de manera más eficaz que cuando se utiliza IFN α 2 solo (Figura 4G).

- La interacción positiva de OSM con INF tipo I en la inducción de moléculas inmunoregulatoras se observó no sólo con IFN α , sino también con IFN β (Figura 5).

Referencias

- 55 **Auernhammer C J** [*et al.*] The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells // *J Endocrinol.*- 2004.- 3: Vol. 180.- pp. 479-86.
- Blais Marie-Ève** T-Cell Development: An Extrathymic Perspective.- 2006.- Vol. 209.- pp. 103-14.
- 60 **Brosterhus H** [*et al.*] Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion.- *Eur J Immunol.* 1999.- 12: Vol. 29.- pp. 4053-9.
- Brown T J** [*et al.*] Regulation of IL-6 expression by oncostatin M // *J Immunol.*- 1991.- 7: Vol. 147.- pp. 2175-80.
- 65 **Brown T J, Lioubin M N** en Marquardt H Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells // *J Immunol.*- 1987.- 9: Vol. 139.- pp. 2977-83.

Bruce A G en **Rose T M** Oncostatin // Cytokine reference.- J. Oppenheim and M. Feldmann, 2000.

Castelruiz Y [*et al.*] Interferón alfa subtypes and levels of type I interferons in the liver and peripheral mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C and controls // *Hepatology*.- 1999.- Vol. 29.- pp. 1900-1904.

Chou T C en **Talalay P** Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of múltiple drugs or enzyme inhibitors // *Adv Enzyme Regul.*- 1984.- Vol. 22.- pp. 27-55.

Diamond M S [*et al.*] Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation // *Cell*.- 1991.- Vol. 65.- pp. 961-971.

Durda Paul J [*et al.*] Induction of "Antigen Silencing" in Melanomas by Oncostatin M: Down-Modulation of Melanocyte Antigen Expression // *Molecular Cáncer Research*.- 2003.- Vol. 1.- pp. 411-9.

Gibbs P, Chen Q en **Robinson W A** Effects of oncostatin M and tamoxifen on human melanoma cells // *Melanoma Res.*- 1998.- Vol. 8.- pp. 221-226.

Grant S L en **Begley C G** The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? // *Mol Med Today*.- 1999.- 9: Vol. 5.- pp. 406-12.

Hams Emily [*et al.*] Oncostatin M Receptor-Beta Signaling Limits Monocytic Cell Recruitment in Acute Inflammation. // *Journal of Immunology*.- 2008.- pp. 2174-80.

Heinrich P C Interleukin-6 and related cytokines: effect on the acute phase reaction // *Z Ernährungswiss.*- 1998.- Suppl 1: Vol. 37.- pp. 43-9.

Hung M-C Nonviral Vectors for Gene Therapy: *Academic Press*, 1999.

Ichihara M Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice // *Blood*.- 1997.- 1: Vol. 90.- pp. 165-73.

Kramer M G [*et al.*] *In vitro* and *in vivo* comparative study of chimeric liver-specific promoters // *Molecular Therapy*.- 2003.- 3: Vol. 7.- pp. 375-85.

Larrea E [*et al.*] Altered expression and activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in hepatitis C virus infection: *in vivo* and *in vitro* studies // *Gut*.- 2006.- Vol.55.- pp. 1188-1196.

Larrea E [*et al.*] IFN-alpha5 mediates stronger Tyk2-stat-dependent activation and higher expression of 2',5'-oligoadenylate synthetase than IFN-alpha2 in liver cells. // *J Interferón Cytokine Res.*- 2004.- Vol. 24.- pp. 497-503.

Le Bon A [*et al.*] Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferón // *Nat Immunol.*- 2003.- 10: Vol. 4.- pp. 1009-15.

Le Bon A, Durand V, Kamphuis E, Thompson C, Bulfone-Paus S, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming // *J Immunol.*- 2006.- 8: Vol. 176.- pp. 4682-9.

Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E, Durand V, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN // *J Immunol.*- 2006.- 4: Vol. 176.- pp. 2074-8.

Malik N Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin // *M. Mol Cell Biol.*- 1989.- 7: Vol. 9.- pp. 2847-53.

Mather Jennie P: WO2006/084092.- 2006.

Miles S A [*et al.*] Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells// *Science*.- 1992.- Vol. 255.- pp. 1432-1434.

Miller J B [*et al.*] Cellular and molecular diversity in skeletal muscle development: news from *in vitro* and *in vivo* // *Bioessays*.- 1993.- 3: Vol. 15.- pp. 191-6.

Modur V [*et al.*] Oncostatin M is a proinflammatory mediator: *in vivo* effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesión molecules // *J. Clin. Invest.*- 1997.- Vol. 100.- pp. 158-168.

Murata M, Nabeshima S, Kikuchi K, Yamaji K, Furusyo N, Hayashi J A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines - *Cytokine* 2006.- 3: Vol. 33.- pp. 121-8.

Nair B C [*et al.*] Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M // *Science*.- 1992.- Vol. 255.- pp. 1430-1432.

Nishimoto N, Ogata A and Shima Y Oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin 6 induce the proliferation of human plasmacytoma cells via the common signal transducer, gp130// *J Exp Med*.- Apr 1, 1994.- 4: Vol. 179.- pp. 1343-7.

Parmar S., and L.C. Platanius Interferons: mechanisms of action and clinical applications// *Curr Opin Oncol*.- 2003.- Vol. 15.- pp. 431-439.

Pestka S, Krause C D en Walter M R Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors // *Immunol Rev*.- 2004.- Vol. 202.- pp. 8-32.

Pietschmann T [*et al.*] Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture // *J Virol*.- 2002.- Vol. 76.- pp. 4008-4021.

Rizvi S M en Raghavan M Direct peptide-regulatable interactions between MHC class I molecules and tapasin // *Proc Natl Acad Sci*.- 2006.- Vol. 103.- pp. 18220-18225.

Rose T M en Bruce A G Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6 // *Proc. Nat. Acad. Sci*.- 1991.- Vol. 88.- pp. 8641-8645.

Sambrook J en Russell D W Molecular cloning: a laboratory manual: *Cold Spring Harbor Laboratory*, 2001.- 3rd.

Sarobe P [*et al.*] Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins // *J Virol*.- 2002.- Vol. 76.- pp. 5062-5070.

Suda T [*et al.*] Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products // *Cytokine*.- 2002.- 6: Vol. 17.- pp. 335-40.

Tanaka M en Miyajima A Oncostatin M, a multifunctional cytokine // *Rev Physiol Biochem Pharmacol*.- 2003.- Vol. 149.- pp. 39-52.

Turin, I., Pedrazzoli, P., Tullio, C., Montini, E., La Grotteria, M Carmela, Schiavo, R., Perotti, C., Locatelli, F., Carretto, E., Maccario, R., Siena, S. and Montagna, D. GMP production of anti-tumor cytotoxic T-cell lines for adoptive T-cell therapy in patients with solid neoplasia // *Cytotherapy* - 2007 - Vol. 9:5 - pp. 499-507.

Wallace Philip M [*et al.*] Regulation of Inflammatory Responses by Oncostatin M // *The Journal of Immunology*.- 1999.- Vol. 162.- pp. 5547-5555.

Yao L Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells // *J Exp Med*.- 1996.- 1: Vol. 184.- pp. 81-92.

Zarling J M [*et al.*] Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells // *Proc. Nat. Acad. Sci*.- 1986.- Vol. 83.- pp. 9739-9743.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de oncostatina M (OSM), o una combinación de OSM con interferón tipo I (IFN tipo I); en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un humano.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la respuesta inmune es una respuesta inmune adaptativa.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la actividad inmunoestimuladora de las células epiteliales comprende la proliferación de linfocitos T, la transpresentación de interleuquina 15 (IL-15) a células NK o CD8+, o la producción de interferón gamma (IFN- γ).
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células epiteliales están infectadas con un patógeno celular o son células epiteliales de un tumor.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4, en el que el patógeno celular se selecciona entre un virus, una bacteria, un hongo y un parásito.
- 20 6. Vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica OSM, y opcionalmente un ácido nucleico que codifica interferón tipo I, unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de la OSM, y opcionalmente IFN tipo I en un huésped de expresión adecuado.
7. Célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 6.
- 25 8. Célula huésped según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped es una célula procariota o eucariota.
9. Uso del vector de expresión recombinante según la reivindicación 6, o una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales en un ser humano.
- 30 10. Formulación farmacéutica que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 6, o una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 11. Procedimiento *in vitro* para la preparación de linfocitos CD8+ estimulados para su uso en inmunoterapia adoptiva, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a) tratar células o tejido epitelial derivados de un ser humano con una dosis eficaz de OSM, o una combinación de OSM con IFN tipo I, o el vector de expresión recombinante según la reivindicación 6;
 - 40 b) irradiar las células o tejidos tratados obtenidos de la etapa a);
 - c) cocultivar las células o tejidos irradiados obtenidos de la etapa b) con
 - células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), o
 - 45 - linfocitos CD8+ enriquecidos y opcionalmente células presentadoras de antígenos;
 - d) opcionalmente cocultivar los linfocitos CD8+ estimulados obtenidos de la etapa c) con células o tejido tratados e irradiados obtenidos de la etapa b);
 - 50 en el que las PBMCs, los linfocitos CD8+ y las células o tejido epitelial derivan del mismo sujeto humano.
- 55 12. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 11, en el que las células presentadoras de antígenos en la etapa c) son células dendríticas.
13. Linfocitos CD8+ estimulados obtenibles mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-12.
- 60 14. Uso de los linfocitos CD8+ estimulados según la reivindicación 13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas.
15. Uso *in vitro* de OSM, o una combinación de OSM con IFN tipo I, como potenciadores de la actividad estimuladora de células epiteliales humanas.

Figura 1

A

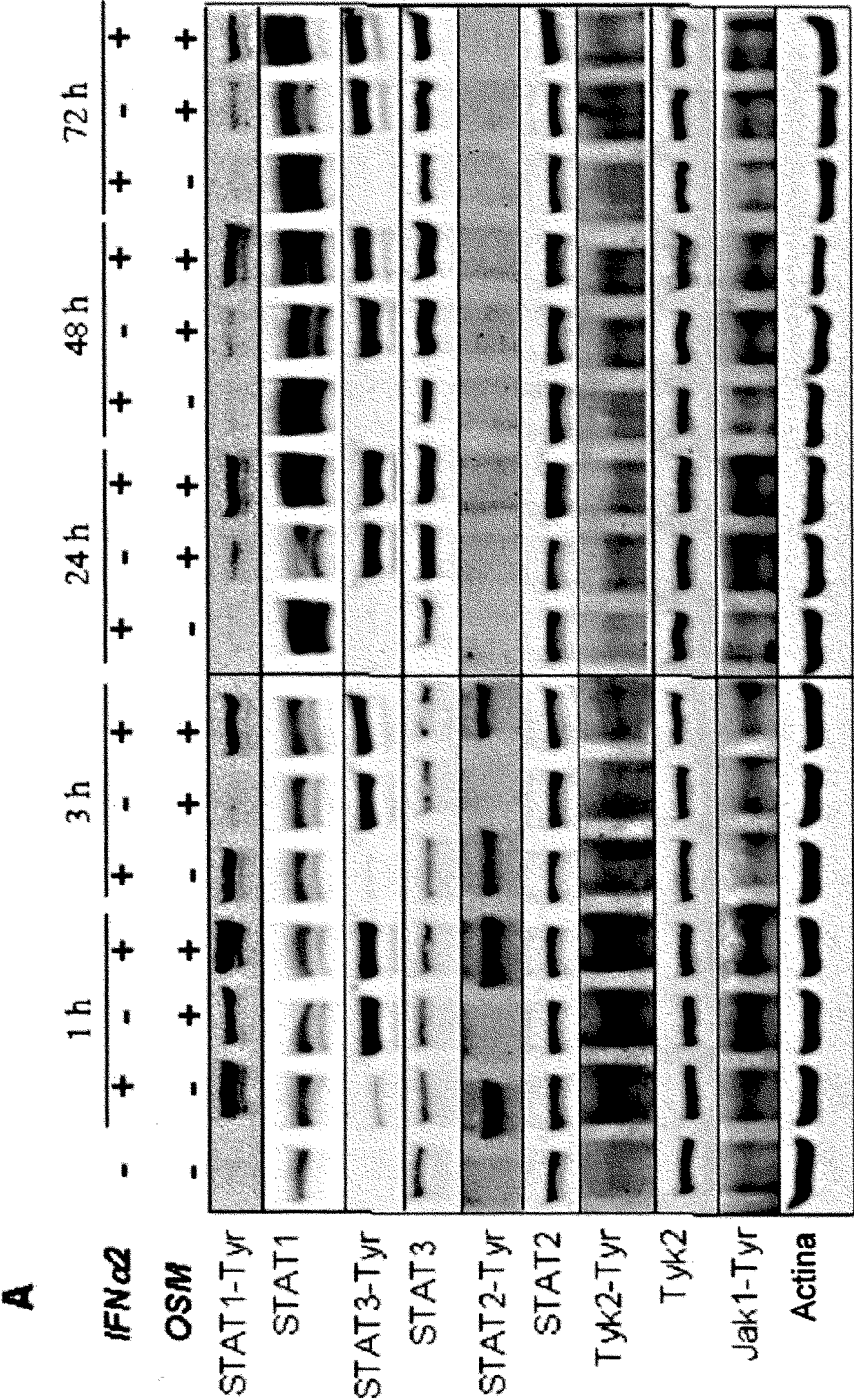


Figura 1 (continuación)

B

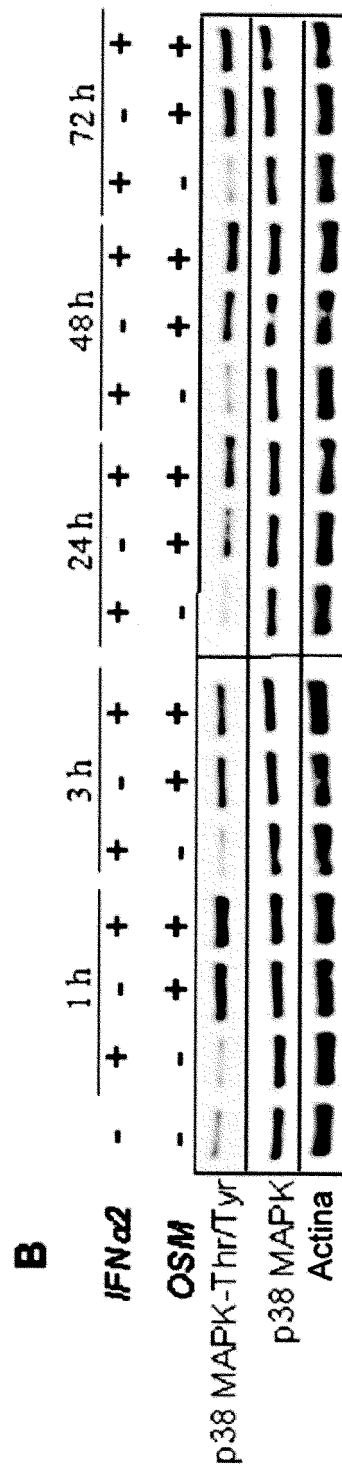


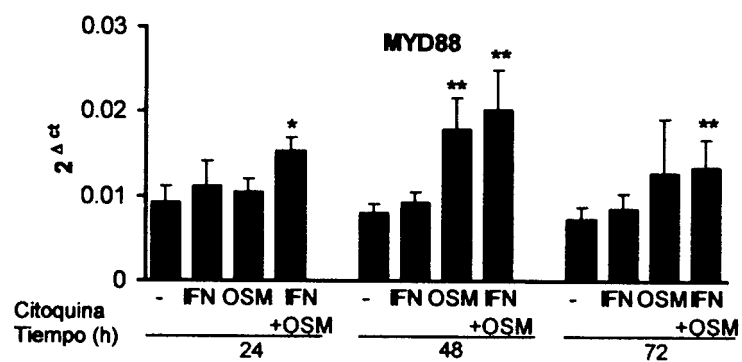
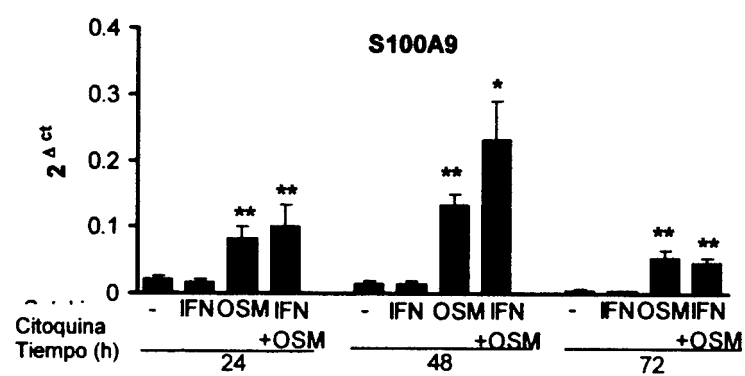
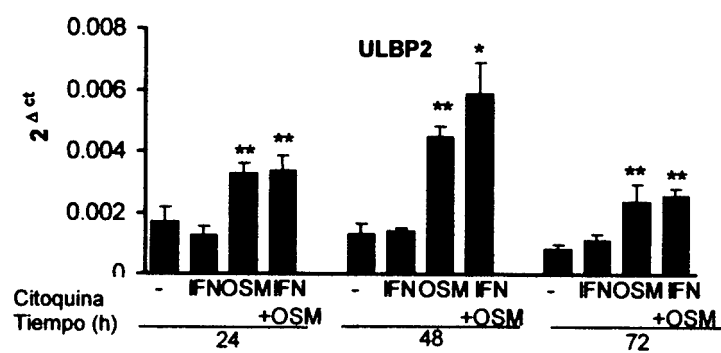
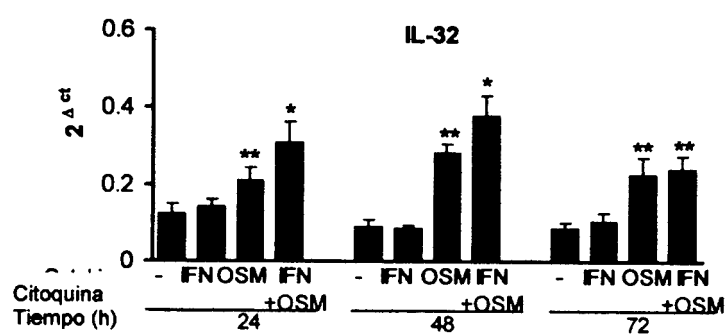
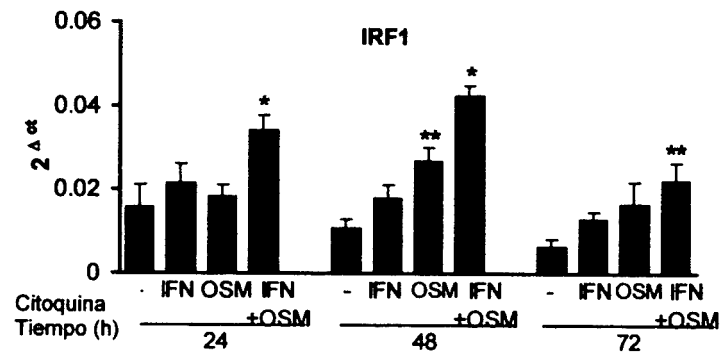
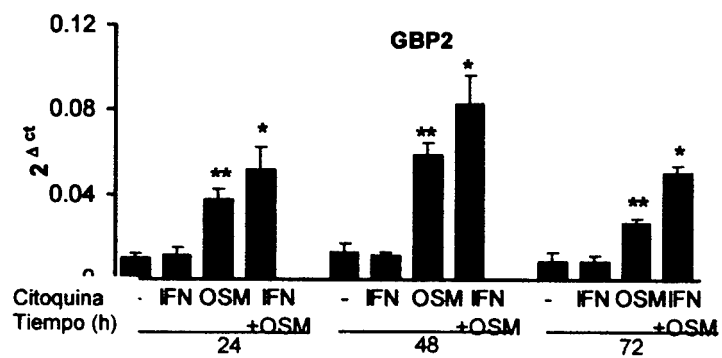
Figura 2**A****B****C****D**

Figura 2 (continuación)

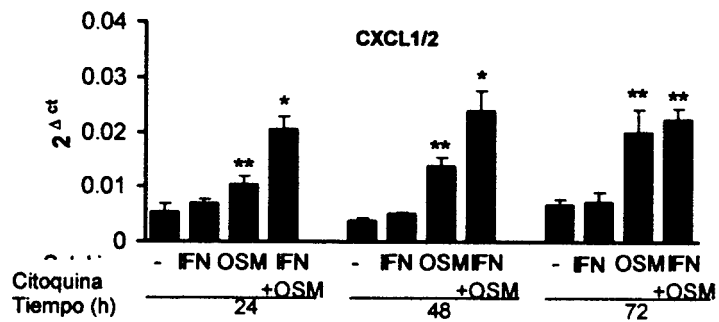
E



F



G



H

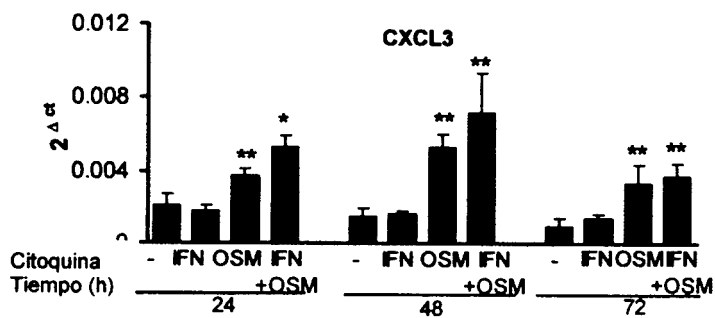
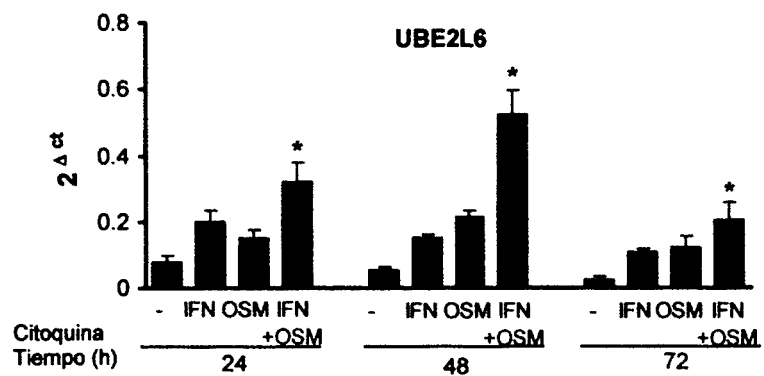
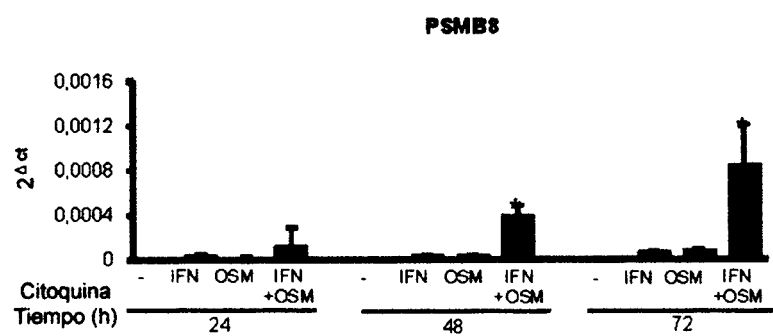


Figura 3

A



B



C

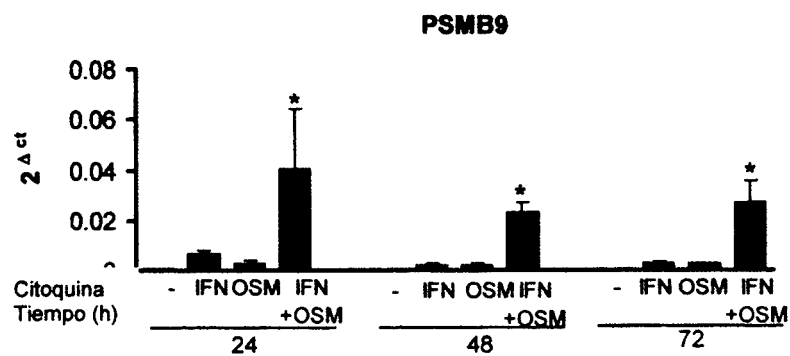
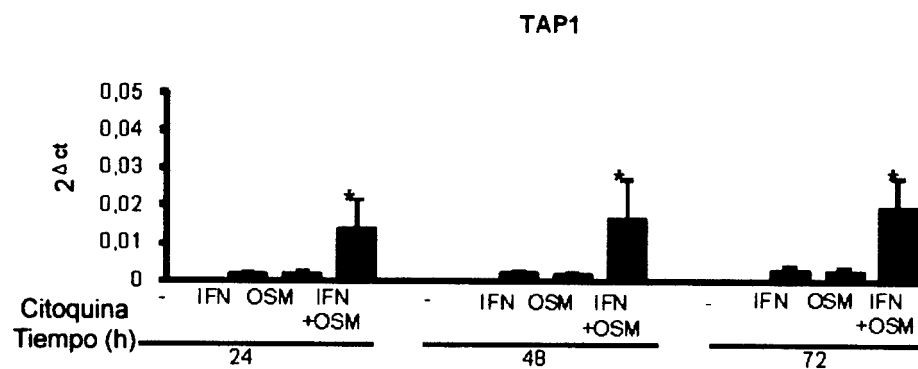
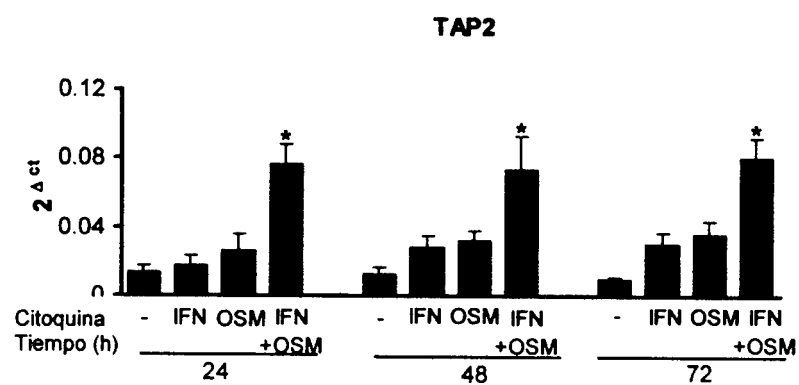


Figura 3 (continuación)

D



E



F

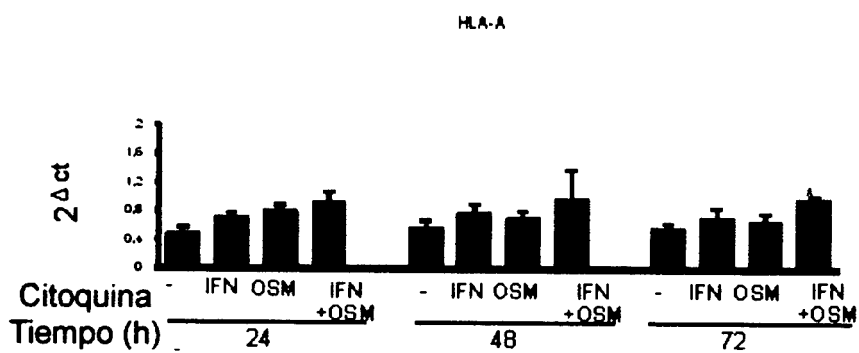
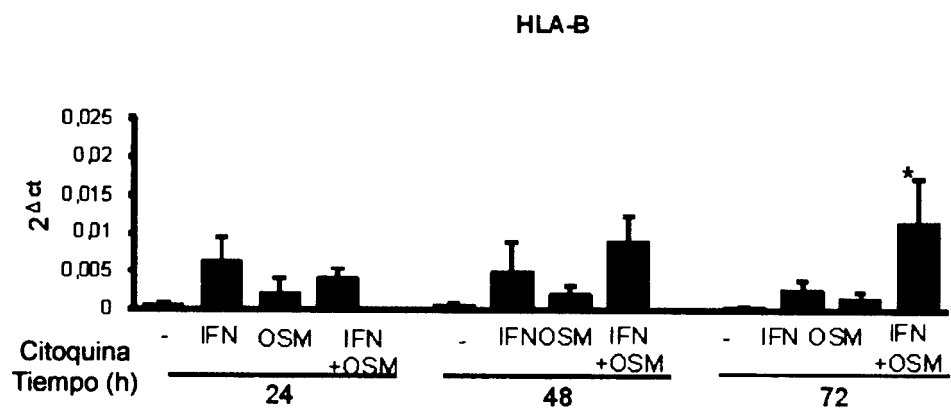
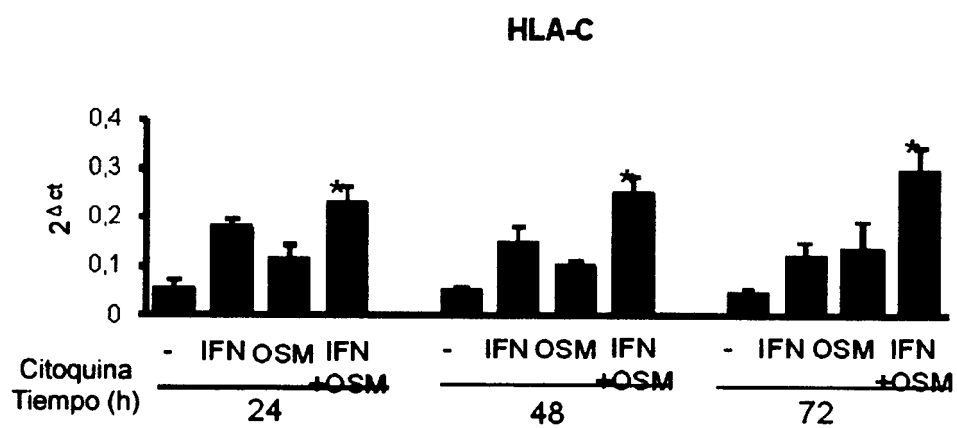


Figura 3 (continuación)

G



H



I

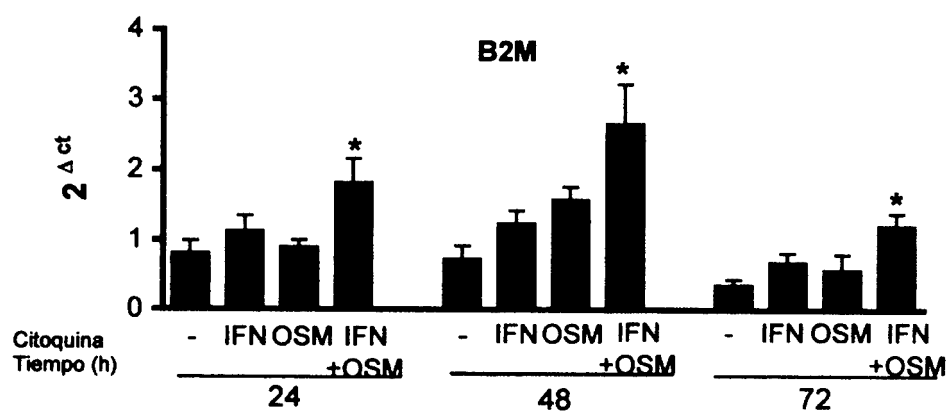


Figura 3 (continuación)

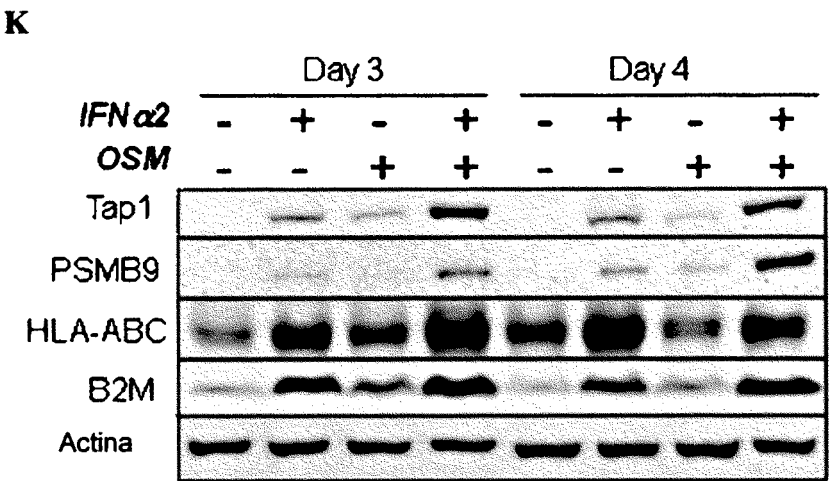
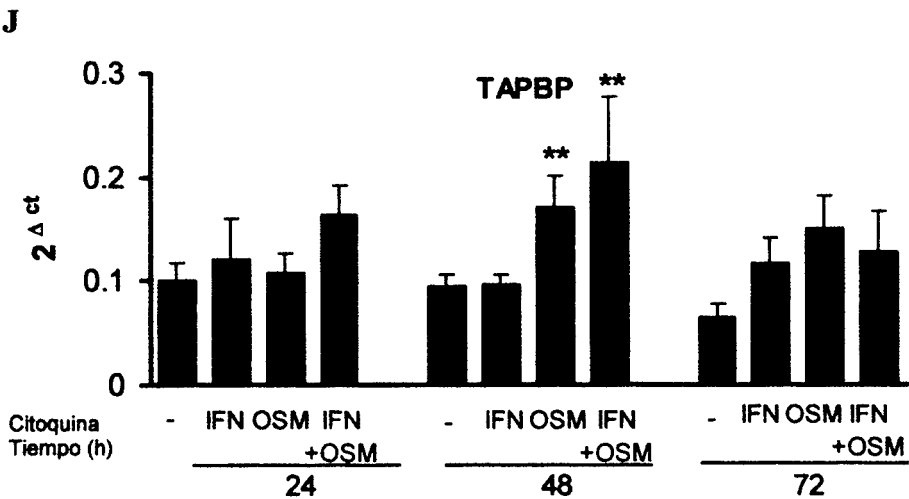


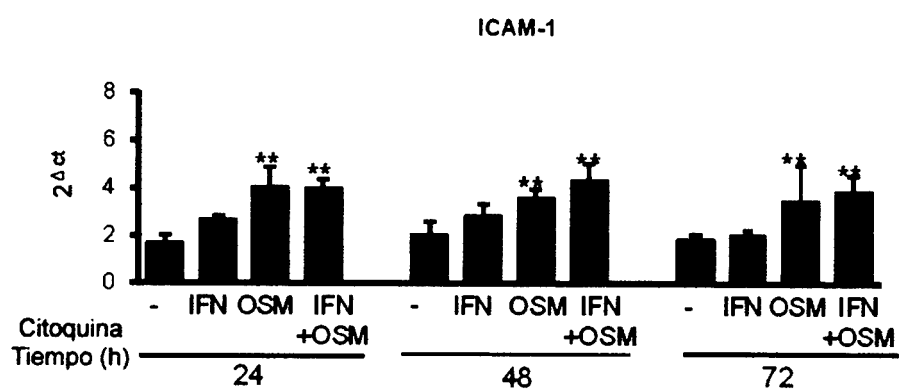
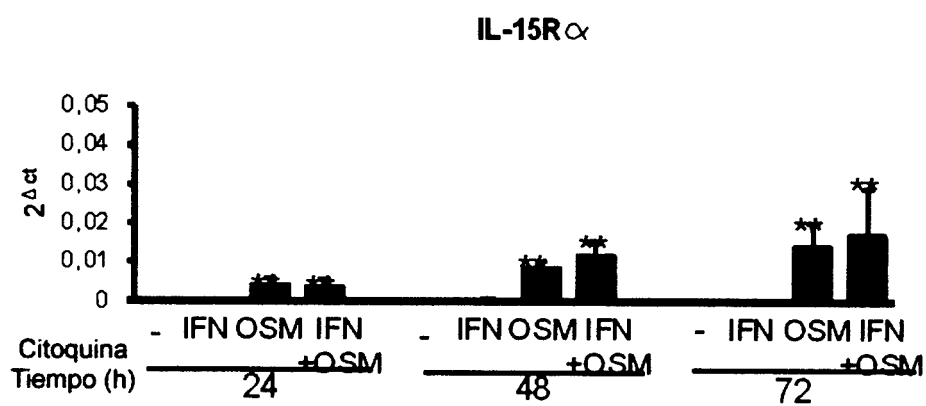
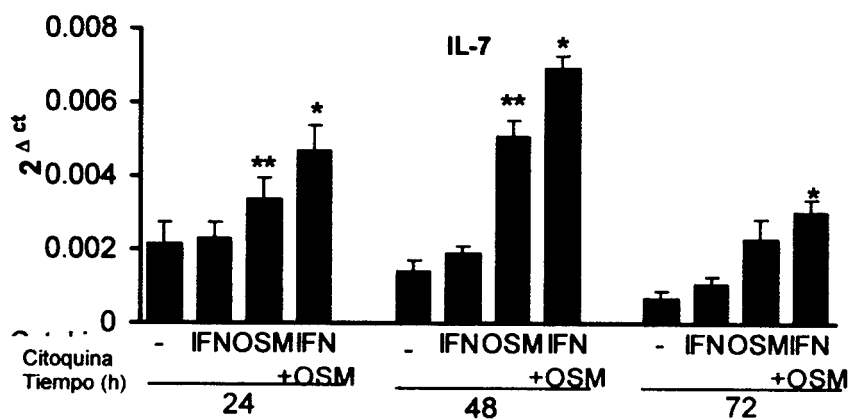
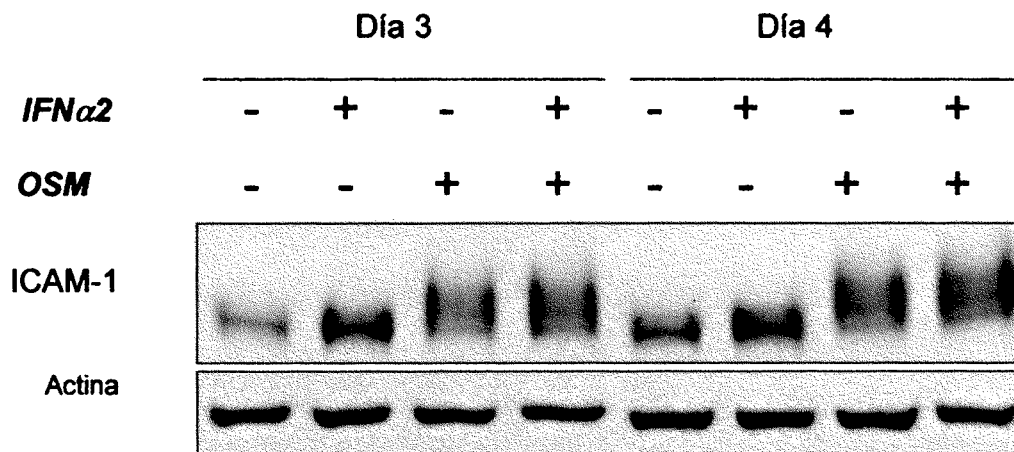
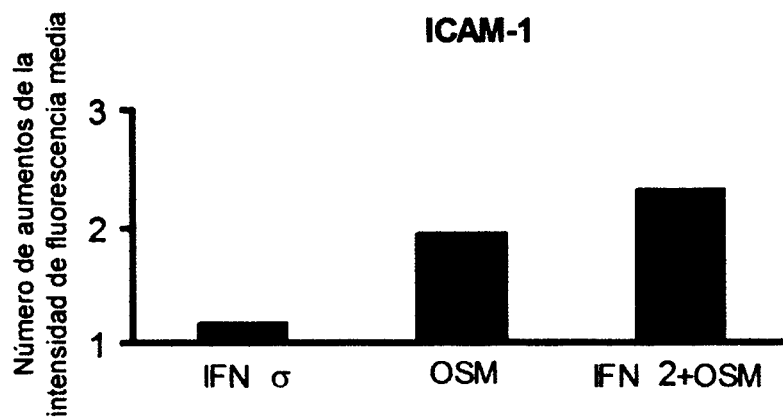
Figura 4**A****B****C**

Figura 4 (continuación)

D



E



F

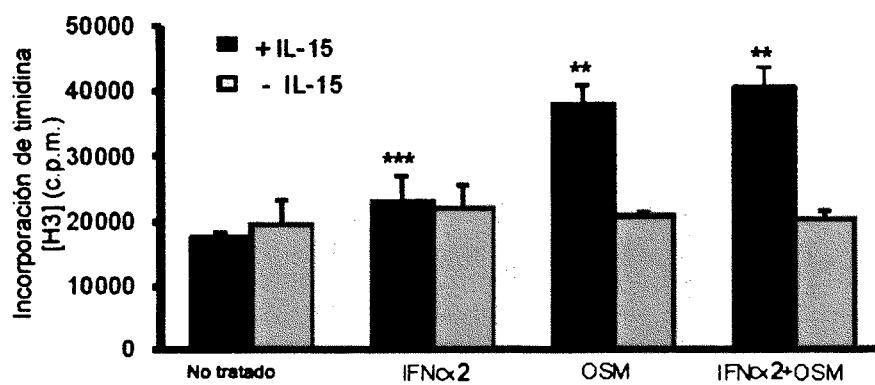
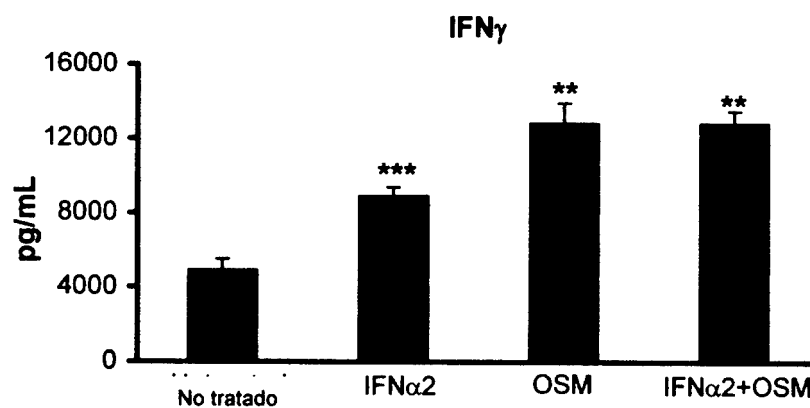
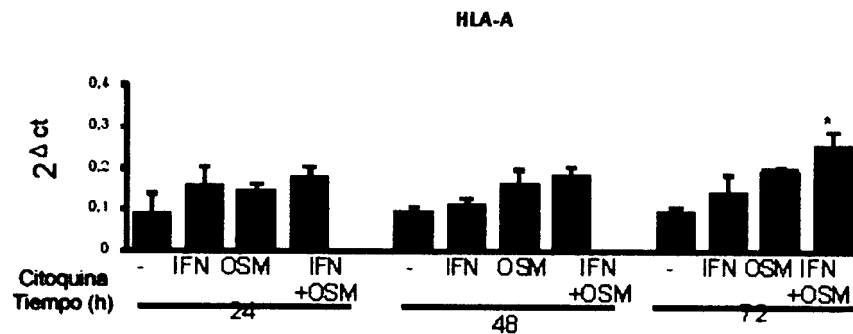


Figura 4 (continuación)

G



H



I

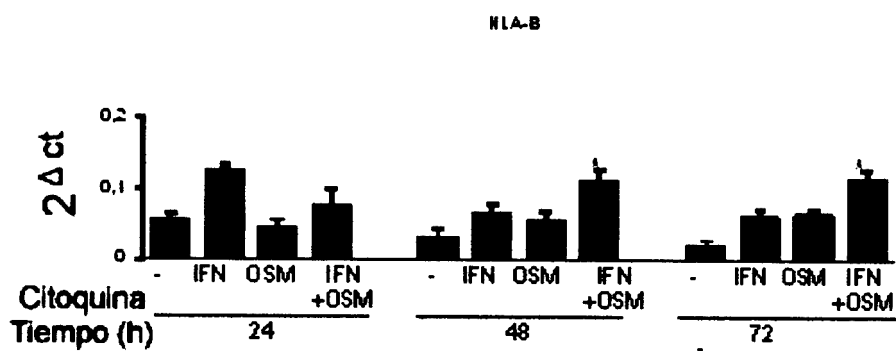


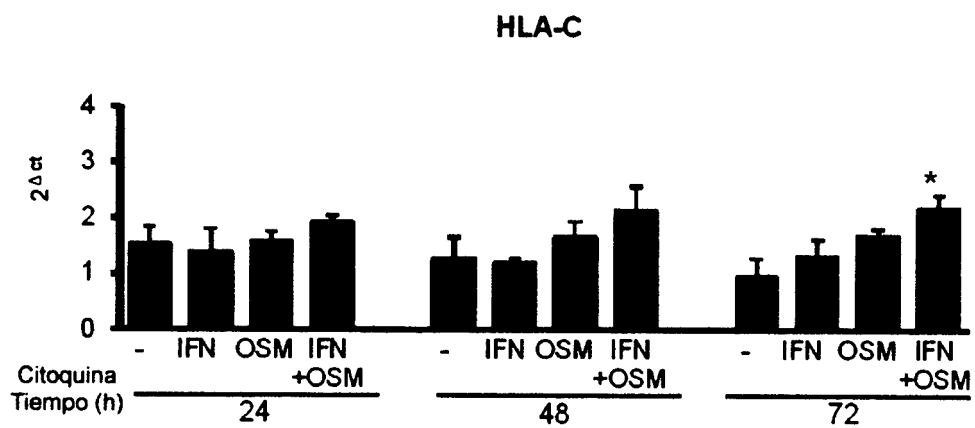
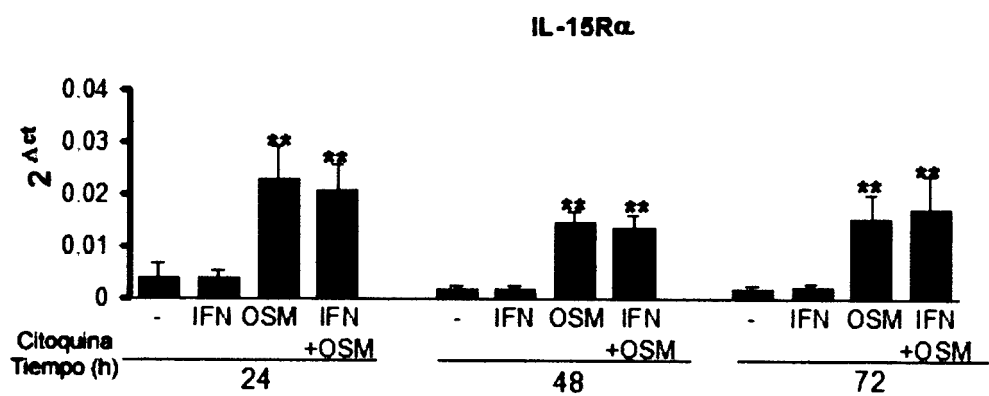
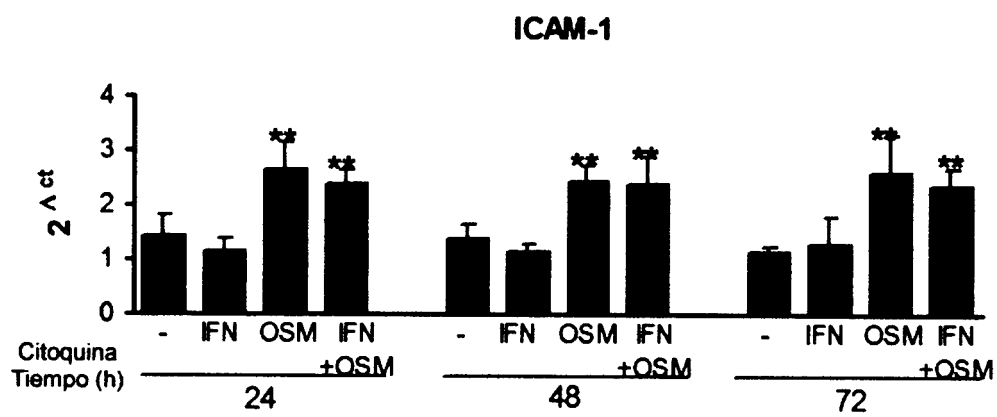
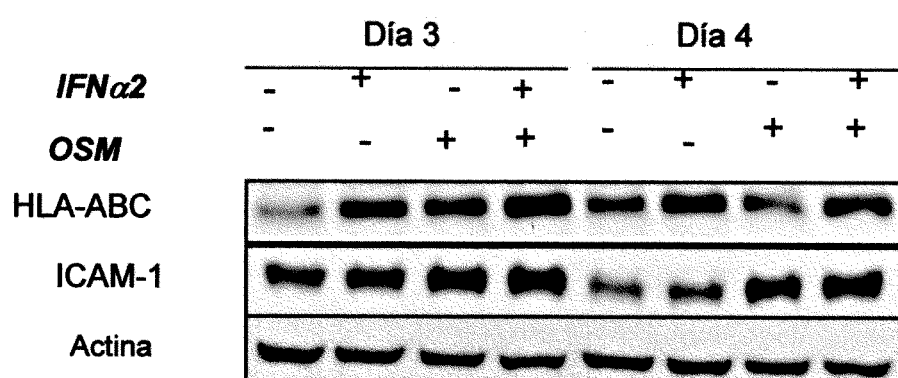
Figura 4 (continuación)**J****K****L**

Figura 4 (continuación)

M



N

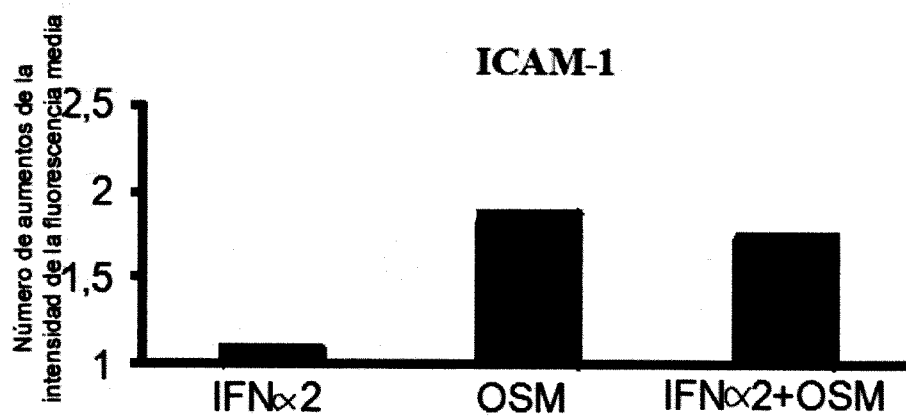
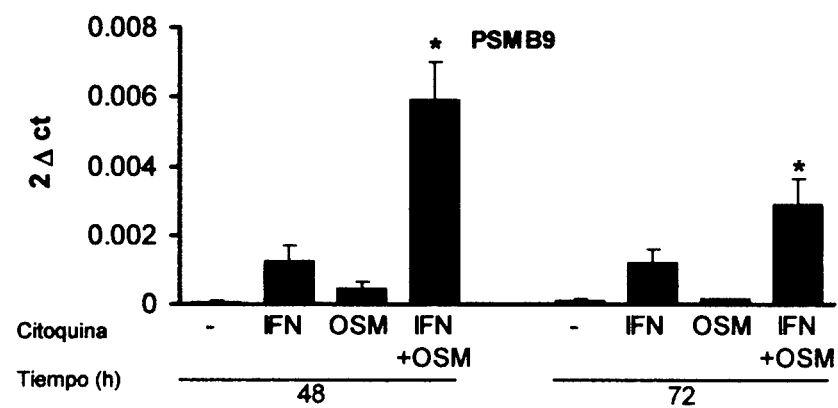
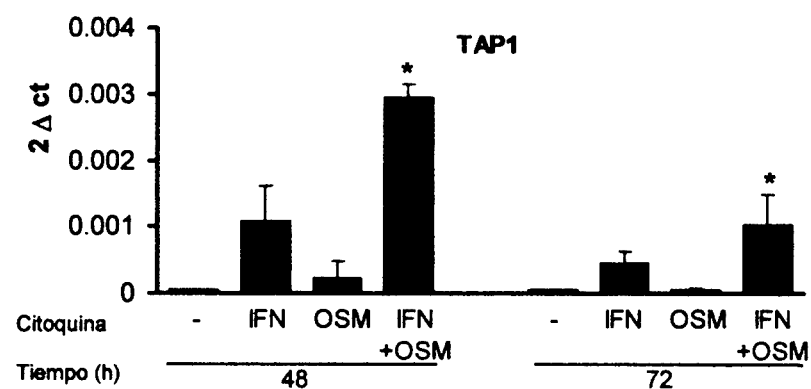


Figura 5

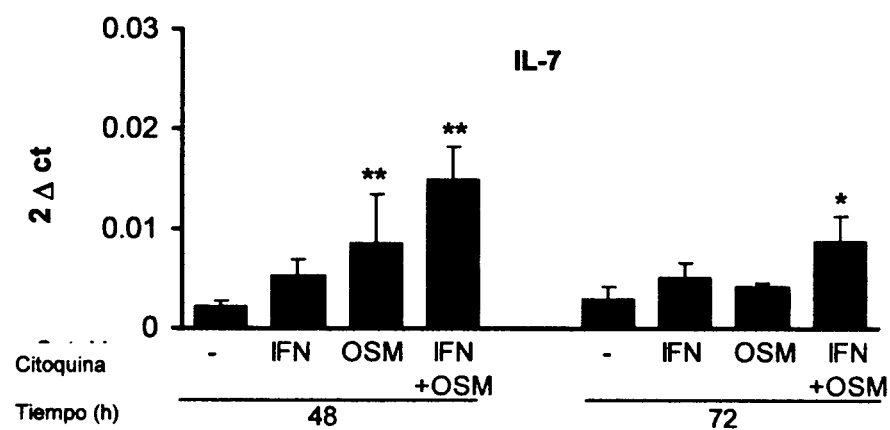
A



B



C





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 342 529

⑫ Nº de solicitud: 200802835

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2006134195 A2 (PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.) 21.12.2006, página 16, líneas 1-20; Tabla 3; reivindicaciones.	1-10
X	WO 2004053113 A1 (THE CORPORATION OF THE TRUSTEES OF THE ORDER OF THE SISTERS OF MERCY IN QUEENSLAND) 24.06.2004, ejemplos; reivindicaciones.	13,14
X	US 20020119121 A1 (VITIELLO, M.A. et al.) 29.08.2002, resumen.	13,14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.06.2010

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 38/19 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

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

A61K, C12N, A61P

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, WPI, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	11, 12, 15	SÍ
	Reivindicaciones	1-10, 13, 14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	11, 12, 15	SÍ
	Reivindicaciones	1-10, 13, 14	NO

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

Base de la Opinión:

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

Consideraciones:

La invención consiste en el uso de la oncostatina M (OSM) o una combinación de OSM con interferón tipo I, en la fabricación de un medicamento para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales de un humano que están infectadas por un patógeno celular o son células tumorales; también forman parte de la invención un procedimiento in vitro para la preparación de linfocitos CD8+ estimulados para su uso en inmunoterapia adoptiva y los linfocitos CD8+ obtenidos por dicho procedimiento.

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006134195 A2	21-12-2006
D02	WO 2004053113 A1	24-06-2004
D03	US 20020119121 A1	29-08-2002

Observaciones sobre documentos:

El documento D01, de los solicitantes de la presente solicitud, describe el uso combinado de OSM e IFN- γ para tratar la hepatitis C.

El documento D02, describe la obtención de células CD8+ activadas para ser utilizadas en terapia adoptiva. El método consiste en cultivar células dendríticas y células CD4+ en presencia de antígenos diana, IL-7 e IL-2, para inducir células T CD8+ citotóxicas específicas para ese antígeno. Se pueden obtener células CD8+ reactivas contra virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y células tumorales.

El documento D03, describe un método similar al anterior, para obtener células CD8+ activadas con reactividad inmunológica frente a antígenos diana relacionados con enfermedades infecciosas o tumorales.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**Reivindicaciones 1-10.**

El uso de la OSM, sola o combinada con interferón tipo I para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células epiteliales, ha sido descrita previamente. El documento D01, describe el uso de OSM e interferón I alfa para tratar la hepatitis C en las mismas dosis que la presente solicitud; por tanto, las reivindicaciones 1-10, carecen de novedad.

No se ha descrito previamente, dicho uso para aumentar la actividad inmunoestimuladora de células tumorales.

Reivindicaciones 13, 14.

Los documentos D02, y D03, describen procedimientos para obtener linfocitos CD8+ activados con reactividad inmunológica frente a antígenos diana relacionados con enfermedades infecciosas o tumorales. Los procedimientos descritos no utilizan OSM, aunque el documento D03 en el párrafo [0074], menciona que factores que pueden ser útiles como aditivos en el "método de la invención" son citoquinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación, proteínas implicadas en el mantenimiento de la diferenciación celular y factores que estimulan la apoptosis entre los que se cita el interferón I alfa. Los linfocitos CD8+ obtenidos por el procedimiento de la invención, no son diferentes de los obtenidos en los procedimientos descritos en D02 y D03, por lo que las reivindicaciones 13 y 14 carecen de novedad.

Las reivindicaciones 1-10, 13 y 14 no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.

Reivindicaciones 11, 12 y 15.

No se ha encontrado en el Estado de la Técnica, un procedimiento de obtención de linfocitos CD8+, en el que las células epiteliales con antígenos diana, relacionadas con enfermedades infecciosas o tumorales son tratadas con OSM e IFN-I alfa para potenciar su actividad inmunoestimuladora. Las reivindicaciones 11, 12 y 15 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.