



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 550**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/715** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06763042 .6**  
96 Fecha de presentación : **18.04.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1877439**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Variantes de la IL-21.**

30 Prioridad: **18.04.2005 DK 2005 00562**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.04.2011**

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**  
**Novo Allé**  
**2880 Bagsverd, DK**

72 Inventor/es: **Hjorth, Siv, Annegrethe;**  
**Bodensgaard, Kent y**  
**Madsen, Dennis**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 357 550 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Variantes de la IL-21

**Campo de la Invención**

5 [0001] La presente invención se refiere a nuevas variantes de la IL-21, siendo dichas variantes útiles para terapia.

**Antecedentes de la Invención**

10 [0002] Los péptidos de IL-21 se describieron por primera vez en el documento WO 00/53761 como SEQ ID No: 2. El propéptido es un péptido de 161 restos de aminoácidos. Por conveniencia, la secuencia se repite en la presente solicitud como SEQ ID No: 1. Se creyó inicialmente que el péptido maduro era el péptido que consistía en los aminoácidos nº 33 a 162 del SEQ ID No: 1, sin embargo, más recientemente (documento WO 2004/112703) se ha sugerido que el péptido maduro de hecho son los aminoácidos nº 30 a 162, que se describen como SEQ ID No: 11 con una metionina N-terminal adicional, en la presente solicitud.

15 [0003] La IL-21 es una citoquina. Las citoquinas en general estimulan la proliferación, diferenciación y/o activación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmunitaria o inflamatoria del cuerpo. Las interleuquinas son una familia de citoquinas que median respuestas inmunológicas produciendo diferentes citoquinas, y producen un efecto de inmunidad adquirida contra antígenos. Los linfocitos T maduros pueden ser activados, es decir, por un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citoquinas, moléculas de señalización bioquímicas, o receptores que después influyen en el destino de la población de los linfocitos T.

20

[0004] Las citoquinas producidas por los linfocitos T se han clasificado como de tipo 1 y tipo 2 (Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76: 300-317, 1998). Las citoquinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ , y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad vírica, inmunidad parasitaria intracelular y rechazo de aloinjerto. Las citoquinas de tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y están implicadas en respuestas humorales, respuesta inmunitaria helmíntica y alérgica. Las citoquinas compartidas entre el tipo 1 y 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- $\alpha$ . Hay algunas pruebas que sugieren que las poblaciones de linfocitos T que producen tipo 1 y tipo 2 migran preferentemente a diferentes tipos de tejidos inflamados.

25

[0005] Los linfocitos T maduros pueden ser activados, es decir por un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citoquinas, moléculas de señalización bioquímica, o receptores que influyen además en el destino de la población de linfocitos T.

30

[0006] Los linfocitos B pueden ser activados por receptores en su superficie celular incluyendo el receptor de linfocitos B y otras moléculas accesorias para realizar funciones celulares accesorias, tales como la producción de citoquinas y anticuerpos.

35

[0007] Los linfocitos citolíticos naturales (NK) tienen una célula progenitora común con los linfocitos T y linfocitos B, y tienen una función en la vigilancia inmunitaria. Las células NK, que comprenden hasta 15% de los linfocitos de la sangre, no expresan receptores de antígenos, y por lo tanto no usan el reconocimiento del MHC como requisito para la unión a una célula diana. Las células NK están implicadas en el reconocimiento y la muerte de determinadas células tumorales y células infectadas por virus. Se cree que in vivo las células NK requieren activación, sin embargo, in vitro, las células NK han mostrado que matan algunos tipos de células tumorales por activación dependiente del ligando KIR.

40

[0008] A pesar de la eficacia mostrada por la IL-21 en el tratamiento de diferentes enfermedades, sigue existiendo la necesidad de variantes de la IL-21 con mejores propiedades o propiedades alternativas, tales como actividad, selectividad, estabilidad y tiempo en la circulación o semivida biológica, para satisfacer las necesidades médicas.

45

**Resumen de la Invención**

50 [0009] Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que la actividad de la IL-21 se mantiene en gran medida o incluso mejora cuando se suprimen y/o sustituyen los aminoácidos en la región del 66 al 98. En el presente contexto, la numeración de los aminoácidos es con respecto al péptido maduro de 133 aminoácidos (aminoácidos nº 33 a 162 del propéptido, SEQ ID No: 1). Esta secuencia se da como SEQ ID No: 11, que incluye una metionina N-terminal adicional dando un péptido de 134 aminoácidos. El SEQ ID No: 2 son los aminoácidos nº 30 a 162 del propéptido, el SEQ ID No: 1 sin una metionina N-terminal adicional dando un péptido de 133

aminoácidos. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

5 **[0010]** En una realización, la invención se refiere a un péptido que comprende los SEQ ID No. anteriores con una Met N-terminal adicional.

**[0011]** En una realización, la invención se refiere al uso del péptido de la presente invención para fabricar un medicamento para el tratamiento del cáncer.

10 **[0012]** En una realización, la invención se refiere a la construcción de ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención; a vectores que comprenden dichas construcciones; y a células huésped que comprenden dichos vectores.

## Figuras

### [0013]

15 **Figura 1.** Análisis de Baf3/hIL-21 R/Stat-Luc de variantes de IL-21. Los líquidos sobrenadantes de células HEK293-FS transfectadas con las construcciones de IL-21 indicadas se analizaron en el ensayo indicador de Baf3-hIL-21 R/Stat-Luc. El contenido de proteínas se calculó por ELISA.

■ IL-21 natural; ▲ --- mutante de eliminación de IL-21 [A83 - R86] (SEQ ID No: 3); y Δ variante de IL-21 en la que se ha sustituido la secuencia [K77 - T92] (SEQ ID No: 7).

**Figura 2.** Curvas de dosis-respuesta para hIL-WT y ChimIL-21/4.

20 Se analizaron las proteínas purificadas en un ensayo indicador usando las células Baf3/hIL-21 Ra. Las curvas representan una suma de experimentos independientes (n = 4) realizados todos por triplicado. La actividad se expresa como porcentaje de la respuesta máxima. Se presentan los valores de CE50 ± D.T.M obtenidos. Chim-IL21 es la IL-21 sust. [K77 - T92].

## 25 Definiciones

**[0014]** En el presente contexto “un”, “una”, se pretende que indique uno o más.

30 **[0015]** En el presente contexto, el término “péptido” se pretende que indique dos o más aminoácidos que están unidos por un enlace peptídico. Dichos aminoácidos pueden ser codificantes o no codificantes, y el término también incluye derivados de péptidos, en los que uno o más aminoácidos en el péptido se ha sustituido químicamente, por ejemplo, con PEG o un grupo lipófilo. Los términos “péptido” y “polipéptido” se usan de forma intercambiable y se pretende que indiquen lo mismo.

35 **[0016]** En el presente contexto, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” se pretende que indique sales que no son dañinas para el paciente. Dichas sales incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de metales farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como de ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, 40 malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilen-salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico y similares. Otros ejemplos de sales de adición de ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable incluyen las sales farmacéuticamente aceptables listadas en *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 2, que se incorpora en el presente documento por referencia. Los ejemplos de sales de metales incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Los ejemplos de sales de amonio y amonio alquilado incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares.

50 **[0017]** Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un péptido como se usa en el presente documento, significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como “cantidades terapéuticamente eficaces”. Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán del tipo y la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y el estado

general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación adecuada se puede lograr usando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y probando diferentes puntos de la matriz, lo cual está dentro de las capacidades de un médico o veterinario experimentado.

5 **[0018]** Los términos “tratamiento” y “tratar” como se usan en el presente documento, significan el tratamiento y el cuidado de un paciente con el propósito de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. Se pretende que los términos incluyan el espectro completo de  
10 tratamientos para una afección dada que puede parecer el paciente, tal como la administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o las complicaciones, para retrasar el avance de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar los síntomas y complicaciones, y/o para curar o eliminar  
15 la enfermedad, trastorno o afección así como para prevenir la afección, en el que la prevención debe entenderse como el tratamiento y cuidado de un paciente con el propósito de combatir la enfermedad, afección o trastorno, e incluye la administración del péptido activo para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones. El paciente que se va a tratar preferiblemente es un mamífero, en particular un ser humano, pero también puede incluir animales, tales como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos. Debe entenderse que los regímenes terapéuticos y profilácticos (preventivos) representan aspecto separados de la presente invención.

### Descripción de la Invención

**[0019]** Está concedida una patente solo para la materia objeto de las reivindicaciones.

**[0020]** La memoria descriptiva describe un péptido que comprende  
20 a) una primera secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consta del aminoácido nº 65 al aminoácido nº 96 del SEQ ID No: 2; o  
b) una secuencia obtenida por la sustitución de forma conservativa de hasta 10 aminoácidos en dicha primera secuencia. En particular se han suprimido y/o sustituido al menos 2, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6 aminoácidos en  
25 dicha primera secuencia.

**[0021]** La memoria descriptiva también describe péptidos obtenidos por sustituciones conservativas de la realizaciones más específicas del péptido de la presente invención descritas a continuación.

**[0022]** En particular, se pueden sustituir de forma conservativa hasta 10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos. En el presente contexto, una sustitución es conservativa cuando un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido del mismo grupo, es decir por otro resto de aminoácido con propiedades similares. Los aminoácidos se pueden dividir convenientemente en los siguientes grupos basándose en sus propiedades: aminoácidos básicos (tales como arginina y lisina),  
30 aminoácidos ácidos (tales como ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (tales como glutamina, histidina, metionina y asparagina), aminoácidos alifáticos o hidrófobos (tales como alanina, leucina, y isoleucina, valina), aminoácidos aromáticos (tales como fenilalanina, triptófano, tirosina) y aminoácidos pequeños (tales como glicina, alanina, serina y treonina).

**[0023]** La memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 86 del SEQ ID No: 2.  
40

**[0024]** La memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 88 del SEQ ID No: 2.

**[0025]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 90 del SEQ ID No: 2.  
45

**[0026]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 82 al aminoácido nº 88 del SEQ ID No: 2.

50 **[0027]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.

**[0028]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 71

al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.

- [0029]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 65 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- 5 **[0030]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 96 del SEQ ID No: 2.
- [0031]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 86 del SEQ ID No: 1.0
- [0032]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 88 del SEQ ID No: 2.
- [0033]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 90 del SEQ ID No: 2. 1.5
- [0034]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 82 al aminoácido nº 88 del SEQ ID No: 2.
- 2.0 **[0035]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- [0036]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 71 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2. 2.5
- [0037]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 65 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- [0038]** Esta memoria descriptiva describe un péptido que comprende la secuencia obtenida por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 96 del SEQ ID No: 2. 3.0
- [0039]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 86 del SEQ ID No: 2.
- 3.5 **[0040]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 88 ID NO: 2.
- [0041]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 90 del SEQ ID No: 2.
- 4.0 **[0042]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 82 al aminoácido nº 88 del SEQ ID No: 2.
- [0043]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2. 4.5
- [0044]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 71 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- 5.0 **[0045]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 65 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.

- [0046]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 96 del SEQ ID No: 2.
- 5 **[0047]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 86 del SEQ ID No: 2.
- [0048]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 88 SEQ ID No: 2.
- [0049]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 83 al aminoácido nº 90 del SEQ ID No: 2.
- 10 **[0050]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por eliminación de uno o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 82 al aminoácido nº 88 del SEQ ID No: 2.
- [0051]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- 15 **[0052]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 71 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- [0053]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 65 al aminoácido nº 92 del SEQ ID No: 2.
- 20 **[0054]** La memoria descriptiva describe un péptido obtenido por sustitución y eliminación de dos o más aminoácidos en la región que consiste del aminoácido nº 77 al aminoácido nº 96 del SEQ ID No: 2.
- [0055]** Como se ha discutido antes, la IL-21 se expresa como un péptido de 161 aminoácidos, pero es procesada postraduccionalmente eliminando los aminoácidos nº 1 a 29 o eliminando los aminoácidos nº 1 a 31. La memoria descriptiva describe péptidos que comprenden la secuencia obtenida separando y/o eliminando uno o más aminoácidos de la región que consta del aminoácido nº 65 al aminoácido nº 96, en la que el extremo N se ha extendido mediante 29 aminoácidos N-terminales del SEQ ID No: 1 o con los 31 aminoácidos N-terminales del SEQ ID No: 1.
- 25 **[0056]** Cuando los péptidos se expresan en células de mamífero, tales como células CHO, a menudo se elimina un péptido señal N-terminal mediante una llamada señal peptidasa conduciendo al péptido maduro. Se sabe bien en la técnica que para expresar los mismos péptidos heterólogos en células procariontas, tales como p. ej. *E. coli*, a menudo es necesario introducir, mediante tecnología recombinante bien conocida para los expertos en la materia, una metionina N-terminal a la secuencia del péptido maduro. Por lo tanto, se pretende que la presente invención incluya los péptidos mencionados antes con o sin una metionina N-terminal.
- 30 **[0057]** En una realización, la invención se refiere a péptidos seleccionados de
- A) SEQ ID No: 3 (eliminación A83-R86), SEQ ID No: 4 (eliminación A83-K88), SEQ ID No: 5 (eliminación A83-R90), y SEQ ID No: 6 (eliminación N82-K88); y
- 40 B) los péptidos de A) con una Met N-terminal adicional. En una realización, la invención se refiere a péptidos seleccionados de
- D) SEQ ID No: 7 (sustitución K77-T92), SEQ ID No: 8 (sustitución 171-T92), SEQ ID No: 9 (sustitución R65-T92), y SEQ ID No: 10 (sustitución K77-C96); y
- E) los péptidos de D) con una Met N-terminal adicional.
- 45 **[0058]** La memoria descriptiva describe sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos anteriores.
- [0059]** Los péptidos de la presente invención se pueden derivatizar además por la unión de grupos que realizarán una prolongación del tiempo en la circulación en el plasma y/o de la semivida biológica, o que reducirán cualquier inmunogenicidad. Se sabe bien en la técnica que dichos efectos se pueden obtener por la unión de determinados grupos, tales como polietilenglicol (PEG); grupos lipófilos, tales como ácidos grasos; proteínas plasmáticas, tales como albúmina; o restos de unión a la
- 50

albúmina. Para ejemplos de la técnica véase, p. ej. los documentos WO 01/79271, US 5.739.208 y WO 03/44056.

5 **[0060]** Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de ácido nucleico" se pretende que indique cualquier molécula de ácido nucleico de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u origen de ARN. El término "construcción" se pretende que indique un segmento de ácido nucleico que puede ser de cadena sencilla o doble, y que se puede basar en una secuencia de nucleótidos natural completa o parcial que codifica una proteína de interés. La construcción puede contener opcionalmente otros segmentos de ácido nucleico.

10 **[0061]** La construcción de ácido nucleico de la invención que codifica la proteína de la invención puede ser de forma adecuada de origen genómico o de ADNc, por ejemplo obtenida preparando una biblioteca genómica o de ADNc y cribando las secuencias de ADN que codifican todo o parte de la proteína, por hibridación usando sondas de oligonucleótido sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (consultar, Sambrook y col., véase antes). Para el propósito presente, la secuencia de ADN que codifica la proteína, preferiblemente es de origen humano, es decir obtenida de un ADN genómico humano o biblioteca de ADNc. En particular, la secuencia de ADN puede ser de origen humano, p. ej., ADNc de un órgano o tipo de célula humanos particulares o un gen derivado de un ADN genómico humano.

20 **[0062]** La construcción de ácido nucleico de la invención que codifica el péptido también se puede preparar de forma sintética por procedimientos estándar establecidos, p. ej. el procedimiento de la fosforamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869, o el procedimiento descrito por Matthes y col., *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. De acuerdo con el procedimiento de la fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se reasocian, se ligan y se clonan en vectores adecuados.

25 **[0063]** Además, la construcción de ácido nucleico puede ser de origen mixto sintético y genómico, mixto sintético y de ADNc o mixto genómico y de ADNc, preparada por ligado de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea adecuado), correspondiendo los fragmentos a diferentes partes de la construcción de ácido nucleico entera, de acuerdo con técnicas estándar.

30 **[0064]** La construcción de ácido nucleico también se puede preparar por la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4.683.202 o Saiki y col., *Science* 239 (1988), 487 - 491.

**[0065]** La construcción de ácido nucleico preferiblemente es una construcción de ADN cuyo término se usará exclusivamente a continuación.

#### **Vector Recombinante**

35 **[0066]** En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector recombinante que comprende una construcción de ADN que la invención. El vector recombinante en el que se inserta la construcción de ADN de la invención puede ser cualquier vector que se pueda someter de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante, y con frecuencia la elección del vector dependerá de la célula huésped en la que se va a introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que cuando se introduce en una célula huésped es integrado en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado.

45 **[0067]** El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica la proteína de la invención se une operativamente a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión se obtiene de plásmido o ADN vírico, o puede contener elementos de ambos. La expresión "operativamente unido" indica que los segmentos están dispuestos de forma que funcionan de forma concertada para los propósitos pretendidos, p. ej., 50 inicia la transcripción en un promotor y avanza por la secuencia de ADN que codifica la proteína.

**[0068]** El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida y se puede obtener de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas para la célula huésped.

55 **[0069]** Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la proteína de la invención en células de mamíferos son el promotor SV40 (Subramani y col., *Mol. Cell Biol.* 1 (1981), 854 -864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneina) (Palmiter y col., *Science*

222 (1983), 809 - 814) o el promotor principal tardío 2 de adenovirus.

5 **[0070]** Un ejemplo de un promotor adecuado para usar en células de insecto es el promotor de la polihedrina (documento US 4.745.051; Vasuvedan y col., *FEBS Lett.* 311, (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.M. Vlak y col., *J. Gen. Virology* 69, 1988, pág. 765-776), el promotor de la proteína básica del virus de la poliedrosis de *Autographa californica* (documento EP 397485), el promotor temprano inmediato del gen 1 de baculovirus (documentos US 5.155.037; US 5.162.222), o el promotor temprano retrasado del gen 39K de baculovirus (documentos US 5.155.037; US 5.162.222).

10 **[0071]** Los ejemplos de promotores adecuados para usar en células huésped de levaduras incluyen promotores de genes glicolíticos de levaduras (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 12073 - 12080; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1 (1982), 419 - 434) o genes de la alcohol deshidrogenasa (Young y col., en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals* (Hollaender y col., eds.), Plenum Press, New York, 1982), o los promotores TPI1 (documento US 4.599.311) o ADH2-4c (Russell y col., *Nature* 304 (1983), 652 - 654).

15 **[0072]** Los ejemplos de promotores adecuados para usar en células huésped de hongos filamentosos son, por ejemplo el promotor ADH3 (McKnight y col., *The EMBO J.* 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor tpiA. Son ejemplos de otros promotores útiles los derivados del gen que codifica la TAKA-amilasa de *A. oryzae*, aspártico proteinasa de *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. niger*,  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de *A. niger*, glucoamilasa (gluA) de *A. niger* o *A. awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosafosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*. Se prefieren los promotores de TAKA-amilasa y gluA.

20

**[0073]** Los ejemplos de promotores adecuados para usar en células huésped bacterianas incluyen el promotor del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, el gen de BAN amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis*, o el gen de la xilosidasa de *Bacillus pumilus*, o los promotores P<sub>R</sub> o P<sub>L</sub> del fago Lambda o los promotores lac, trp o tac de *E. coli*.

25

**[0074]** La secuencia de ADN que codifica la proteína de la invención, si es necesario, también se puede conectar de forma operativa a un terminador adecuado, tal como un terminador de la hormona del crecimiento humana (Palmiter y col., citado antes) o (para huéspedes fúngicos) los terminadores TPI1 (Alber y Kawasaki, citado antes) o ADH3 (McKnight y col., citado antes). El vector puede comprender además elementos tales como señales de poliadenilación (p. ej., SV40 o la región 5' Elb de adenovirus), secuencias potenciadoras de la transcripción (p. ej., el potenciador de SV40) y secuencias potenciadoras de la traducción (p. ej., las que codifican los ARN VA de adenovirus VA).

30

**[0075]** El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de dicha secuencia (cuando la célula huésped es una célula de mamífero) es el origen de replicación del SV40.

35

**[0076]** Cuando la célula huésped es una célula de levadura, las secuencias adecuadas que permiten que el vector se replique son los genes de replicación REP 1-3 del plásmido de levadura de 2  $\mu$ m y el origen de replicación.

40 **[0077]** Cuando la célula huésped es una célula bacteriana, las secuencias que permiten que el vector se replique son genes que codifican el complejo de la ADN polimerasa III y el origen de replicación.

**[0078]** El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (descrito por P.R. Russell, *Gene* 40, 1985, pp. 125-130), o uno que confiere resistencia a un fármaco, p. ej., ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato. Para los hongos filamentosos, los marcadores seleccionables incluyen amdS, pyrG, argB, niaD y sC.

45

**[0079]** Para dirigir una proteína de la presente invención a la ruta secretora de las células huésped, se puede proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica la proteína en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras normalmente están situadas 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica la proteína. La secuencia señal secretora puede estar normalmente asociada con la proteína o puede ser de un gen que codifica otra proteína secretada.

50

55 **[0080]** Para la secreción de células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal que asegure la dirección eficaz de la proteína expresada en la ruta secretora

de la célula. El péptido señal puede ser un péptido señal natural o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético. Se ha encontrado que los péptidos señal adecuados son los péptido señal del factor  $\alpha$  (consultar el documento US 4.870.008), el péptido señal de la amilasa salivar de ratón (consultar O. Hagenbuchle y col., *Nature* 289, 1981, pág. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (consultar L.A. Valls y col., *Cell* 48, 1987, pág. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (consultar el documento WO 87/02670), o el péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (consultar M. Egel-Mitani y col., *Yeast* 6, 1990, pp. 127-137).

**[0081]** Para la secreción eficaz en levaduras, también se puede insertar una secuencia que codifica un péptido líder en la dirección 3' de la secuencia señal y en la dirección 5' de la secuencia de ADN que codifica la proteína. La función del péptido líder es permitir que la proteína expresada sea dirigida desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y después a una vesícula secretora para la secreción al medio de cultivo (es decir, exportación de la proteína a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular al espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el líder del factor  $\alpha$  de levadura (cuyo uso se describe, p. ej., en los documentos US 4.546.082, EP 16201, EP 123294, EP 123544 y EP 163529). Alternativamente, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir un péptido líder que no se encuentra en la naturaleza. Los péptidos líder sintéticos se pueden construir, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 89/02463 o WO 92/11378.

**[0082]** Para usar en hongos filamentosos, el péptido señal se puede obtener de forma conveniente de un gen que codifica una amilasa o glucoamilasa de la *Aspergillus sp.*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa de *Humicola lanuginosa*. El péptido señal se obtiene preferiblemente de un gen que codifica la TAKA-amilasa de *A. oryzae*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. niger*, la amilasa estable en ácido de *A. niger*, o glucoamilasa de *A. niger*.

**[0083]** Para usar en células de insecto, el péptido señal se puede obtener de forma conveniente de un gen de insecto (consultar el documento WO 90/05783), tal como el péptido señal del precursor de la hormona adipocinética del lepidóptero *Manduca sexta* (consultar el documento US 5.023.328).

**[0084]** Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican la presente proteína, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son conocidos para los expertos en la materia (consultar por ejemplo, Sambrook y col., citado antes).

### Células Huésped

**[0085]** La célula huésped en la que la construcción de ADN o el vector recombinante de la invención se introduce puede ser cualquier célula que sea capaz de producir la presente proteína e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores.

**[0086]** Los ejemplos de células huésped bacterianas que, al cultivarlas, son capaces de producir la proteína de la invención son bacterias Gram positivas tales como cepas de bacilos tales como cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. megatherium* o *B. thuringiensis*, o cepas de *Streptomyces*, tales como *S. lividans* o *S. murinus*, o bacterias Gram negativas tales como *Echerichia coli*. La transformación de las bacterias se puede realizar mediante transformación por protoplastos o usando células competentes de una forma conocida (consultar Sambrook y col., véase antes).

**[0087]** Cuando se expresa la proteína en bacterias tales como *E. coli*, la proteína puede ser retenida en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles (conocidos como cuerpos de inclusión), o puede ser dirigida al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células son lisadas y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan, después de lo cual la proteína se vuelve a plegar por dilución del agente desnaturalizante. En el último caso, la proteína se puede recuperar del espacio periplásmico por alteración de las células, por ejemplo por tratamiento con ultrasonidos o choque osmótico, para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína.

**[0088]** Los ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares (ATCC CRL 1650), BHK (ATCC CRL 1632, ATCC CCL 10), CHL (ATCC CCL39) o CHO (ATCC CCL 61). Los procedimientos de transfección de células de mamíferos y la expresión de secuencias de ADN introducidas en las células, se describen, p. ej., en Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601 - 621; Southern y Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327 - 341; Loyter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422 - 426; Wigler y col., *Cell* 14 (1978), 725; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell*

*Genetics* 7 (1981), 603, Graham y van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; y Neumann y col., *EMBO J.* 1 (1982), 841 - 845.

5 [0089] Los ejemplos de células de levaduras adecuadas incluyen células de *Saccharomyces* spp. o *Schizosaccharomyces* spp., en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Se describen procedimientos para transformar células de levaduras con ADN heterólogo y producir proteínas heterólogas a partir de las mismas, p. ej., en los documentos US 4.599.311, US 4.931.373, US 4.870.008, 5.037.743 y US 4.845.075, los cuales se incorporan todos en el presente documento por referencia. Las células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado mediante un marcador seleccionable, normalmente resistencia a fármaco o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo leucina. Un vector preferido para usar en levaduras es el vector POT1 descrito en el documento US 4.931.373. La secuencia de ADN que codifica la proteína de la invención puede estar precedida por una secuencia señal y opcionalmente una secuencia líder, p. ej. como se ha descrito antes. Ejemplos adicionales de células de levadura adecuadas son las cepas de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *Hansenula*, p. ej. *H. polymorpha*, o *Pichia*, p. ej. *P. pastoris* (consultar Gleeson y col., *J. Gen. Microbiol.* 132, 1986, pág. 3459-3465; documento US 4.882.279).

20 [0090] Los ejemplos de otras células fúngicas son células de hongos filamentosos, p. ej., *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp., *Fusarium* spp. o *Trichoderma* spp., en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. niger*. El uso de *Aspergillus* spp. para la expresión de proteínas se describe, p. ej., en los documentos EP 272277 y EP 230023. La transformación de *F. oxysporum* se puede llevar a cabo, por ejemplo, como describen Malardier y col., 1989, *Gene* 78: 147-156.

25 [0091] Cuando se usa un hongo filamentoso como célula huésped, se puede transformar con la construcción de ADN de la invención, de forma conveniente integrando la construcción de ADN en el cromosoma del huésped para obtener una célula huésped recombinante. En general, se considera que esta integración es una ventaja puesto que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga estable en la célula. La integración de las construcciones de ADN en el cromosoma del huésped se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales, p. ej., por recombinación homóloga o heteróloga.

30 [0092] La transformación de células de insecto y producción de proteínas heterólogas en las mismas se puede llevar a cabo como se describe en los documentos US 4.745.051; US 4.879.236; US 5.155.037; 5.162.222; EP 397.485, todos los cuales incorporan en el presente documento por referencia. La línea celular de insecto usada como huésped puede ser adecuadamente una línea celular de *Lepidoptera*, tal como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (véase el documento US 5.077.214). Las condiciones de cultivo pueden ser adecuadamente como se describen, por ejemplo, en los documentos WO 89/01029 o WO 89/01028, o cualquiera de las referencias mencionadas antes.

[0093] La célula huésped transformada o transfectada descrita antes, después se cultiva en un medio nutriente adecuado en condiciones que permitan la expresión de la proteína presente, después de lo cual la proteína resultante se recupera del cultivo.

40 [0094] El medio usado para cultivar células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de células huésped, tal como un medio mínimo o complejo que contiene complementos adecuados. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con recetas publicadas (p. ej., en los catálogos de la American Type Culture Collection). La proteína producida por las células después se puede recuperar del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del líquido sobrenadante o filtrado mediante una sal, p. ej. sulfato amónico, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de proteína en cuestión.

50 [0095] Los péptidos de la presente invención se pueden usar para producir anticuerpos que se unen específicamente a los péptidos de la presente invención. En el presente contexto "anticuerpos" incluye anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de los mismos de unión al antígeno, tales como fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab, incluyendo anticuerpos transformados por ingeniería genética y anticuerpos humanizados. Se dice que los anticuerpos son específicos si se unen a un péptido de la presente invención con una K<sub>a</sub> mayor o igual que 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>. Se describen procedimientos para preparar anticuerpos, p. ej., en Hurrell J.G.R. (Ed.) Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982 y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, New York, 1989.

- 5 **[0096]** La IL-21 se ha implicado en el tratamiento de enfermedades víricas, tales como virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, virus respiratorio sincitial, virus de Epstein-Barr, virus influenza, citomegalovirus, herpesvirus y síndrome respiratorio agudo severo; enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica o enfermedades alérgicas en la piel; enfermedades parasitarias, tales como infección helmíntica, enfermedades autoinmunes, tales como rechazo de aloinjerto y diabetes; y cáncer.
- 10 **[0097]** En el presente contexto “cáncer” se refiere a cualquier trastorno neoplásico, incluyendo trastornos celulares tales como sarcoma, carcinoma, melanoma, leucemia, linfoma, cánceres en el pecho, corazón y cuello, ovarios, vejiga, pulmón, faringe, laringe, esófago, estómago, intestino delgado, hígado, páncreas, colon, tracto reproductor femenino, tracto reproductor masculino, próstata, riñones y sistema nervioso central. En particular, “cáncer” se pretende que indique trastornos neoplásicos metastásicos y no metastásicos, tales como melanoma maligno, cánceres de piel de no melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de la cabeza y cuello, cáncer del sistema endocrino, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer del tracto gastrointestinal superior, cáncer colorrectal, cáncer de hígado y conductos biliares, cáncer pancreático, cáncer prostático, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer cervicouterino, cáncer endometrial, sarcomas de huesos y tejido blando, cáncer del sistema nervioso central, linfoma, leucemia y cáncer de origen primario desconocido.
- 15 **[0098]** En aspectos más específicos de la invención, debe entenderse que las expresiones “trastornos neoplásicos”, “cáncer” o “crecimiento tumoral” se refieren a todas las formas de crecimiento celular neoplásico, incluyendo tanto tumores quísticos como sólidos, tumores de hueso y tejido blando, incluyendo tanto tumores benignos como malignos, incluyendo tumores en el tejido anal, conducto biliar, vejiga, células sanguíneas, hueso, hueso (secundario), intestino (colon y recto), cerebro, cerebro (secundario), pecho, pecho (secundario), carcinoma, cuello uterino, cánceres en niños, ojos, garganta (esófago), cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi, riñón, laringe, leucemia (linfoblástica aguda), leucemia (mieloide aguda), leucemia (linfocítica crónica), leucemia (mieloide crónica), leucemia (otras), hígado, hígado (secundario), pulmón, pulmón (secundario), nódulos linfáticos (secundario), linfoma (Hodgkin), linfoma (no Hodgkin), melanoma, mesotelioma, mieloma, ovario, páncreas, pene, próstata, piel, sarcomas tejido blando, estómago, testículos, tiroides, tumor primario desconocido, vagina, vulva, matriz (útero).
- 20 **[0099]** Los tumores de tejido blando incluyen monosomía de schwannoma benigna, tumor desmoide, lipoblastoma, lipoma, leiomioma uterino, sarcoma de células claras, dermatofibrosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, liposarcoma mixoide, liposarcoma bien diferenciado, rdbomiosarcoma alveolar y sarcoma sinovial.
- 25 **[0100]** El tumor óseo específico incluye fibroma no osificante, quiste óseo unicameral, encondroma, quiste óseo aneurismático, osteoblastoma, condroblastoma, condromixofibroma, fibroma osificante y adamantinoma, tumor de células gigantes, displasia fibrosa, sarcoma de Ewing, granuloma eosinófilo, osteosarcoma, condroma, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, y carcinoma metastásico.
- 30 **[0101]** Las leucemias se refieren a cánceres de los leucocitos que son producidos por la médula ósea. Estas incluyen, pero sin limitar, los cuatro tipos principales de leucemia: linfoblástica aguda (LLA), mieloblástica aguda (LMA), linfocítica crónica (LLC) y mieloide crónica (LMC).
- 35 **[0102]** La memoria descriptiva describe procedimientos para tratar infecciones víricas, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y cáncer como se ha listado antes, comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de un péptido de la presente invención a un paciente que lo necesite.
- 40 **[0103]** La memoria descriptiva describe el uso de un péptido de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones víricas, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes y cáncer como se ha listado antes.
- 45 **[0104]** Se sabe en la técnica que los regímenes de tratamiento del cáncer a menudo incluyen más de un medicamento o modalidad de tratamiento. Por lo tanto, en una realización la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer, comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de un péptido de la presente invención en combinación con cantidades eficaces de uno o más de los siguientes de I a IV.
- 50 I. Agentes que inducen la muerte de células tumorales o muerte de células infectadas por virus
- 55 a) quimioterapia convencional

- b) terapia por radiación
- c) anticuerpos monoclonales
- d) control del ciclo celular/reguladores de apoptosis
- e) factor de crecimiento y moduladores de transducción de señales
- 5 f) inhibidores de vascularización tumoral (inhibidores de angiogénesis, fármacos anti-angiogénicos)
- g) virus dirigidos (el uso de un virus recombinante para destruir células tumorales)
- h) agentes antivíricos
- i) agentes hormonales
- 10 II. Agentes que potencian la respuesta inmunitaria contra células tumorales o células infectadas por virus
- j) activadores del sistema inmunitario
- k) inhibidores del sistema inmunitario (p. ej., agentes que inhiben señales inmunitarias que reducen la respuesta inmunitaria), incluyendo agentes antianérgicos
- 15 l) vacunas terapéuticas
- III. Agentes que interfieren con el crecimiento tumoral, metástasis o propagación de células infectadas por virus
- m) integrinas, moduladores de moléculas de adhesión celular
- n) antimetastásicos
- 20 o) moduladores de células endoteliales
- IV. Vacunación interna
- V. Antagonistas de factor tisular y otros factores que influyen en la cascada de coagulación
- p) anti-factor Xa, inhibidores del anti-factor IIa, agentes antifibronogénicos
- 25 q) pentasacáridos etc.
- VI. Agentes inmunosupresores/inmunomoduladores
- r) agentes que influyen en la dirección de linfocitos T, p. ej., FTY-720
- s) inhibidores de calcineurina
- t) inhibidores de TOR
- 30 **[0105]** A continuación se proporcionan una descripción más detallada de algunas combinaciones de fármacos posibles
- I: Agentes que inducen la muerte de células tumorales o la muerte de células infectadas por virus
- a) agentes quimioterapéuticos convencionales
- 35 **[0106]** La presente memoria descriptiva describe la terapia de combinación que se lleva a cabo administrando un péptido de la presente invención y agentes quimioterapéuticos convencionales. Los agentes quimioterapéuticos tienen diferentes modos de acción tales como influyendo en el
- a) nivel de ADN
- b) nivel de ARN
- 40 **[0107]** Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos convencionales para el nivel de ADN o el nivel de ARN son antimetabolitos (tales como azatioprina, citarabina, fosfato de

- fludarabina, fludarabina, gemcitabina, citarabina, cladribina, capecitabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, metotrexato, 5-fluorouracilo e hidroxurea) agentes alquilantes (tales como melfalán, busulfán, cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, dacarbazina, procarbazona, clorambucilo, tiotepá, lomustina, temozolamida) agentes antimitóticos (tales como vinorelbina, vincristina, vinblastina, docetaxel, paclitaxel), inhibidores de la topoisomerasa (tales como doxorubicina, amsacrina, irinotecán, daunorubicina, epirubicina, mitomicina, mitoxantrona, idarubicina, tenipósido, etopósido, topotecán), antibióticos (tales como actinomicina y bleomicina), asparaginasa, o las antraciclinas o los taxanos.
- 5
- [0108]** La terapia de combinación se puede llevar a cabo administrando un péptido de la presente invención y dacarbazina (DTIC).
- 10
- b) Radioterapia:
- [0109]** Algunos tumores se pueden tratar con radiación o radiofármacos. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se va a tratar. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia con radiación de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se llama braquiterapia (BT). Los átomos radiactivos típicos que se han usado incluyen radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yoduro-123, yoduro-131 e indio-111.
- 15
- [0110]** La terapia con radiación es un tratamiento estándar para controlar los tumores que no pueden ser operados o inoperables y/o la metástasis tumoral. Se han visto mejores resultados cuando la terapia de radiación se ha combinado con otras terapias.
- 20
- [0111]** Un péptido de la presente invención se puede administrar en combinación con terapia con radiación.
- c) Anticuerpos monoclonales (monoclonales; MAb)
- [0112]** Los MAb se han desarrollado para el tratamiento de la leucemia y linfomas así como para tumores sólidos, y este principio tiene cada vez más interés. Estos anticuerpos funcionan inhibiendo las funciones que son vitales para la supervivencia de las células tumorales, suministrando una carga tóxica, interrumpiendo sucesos de señalización claves, o induciendo citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dirigida por complemento (CDC) contra las células tumorales. La muerte de las células tumorales después puede conducir a la liberación de antígenos tumorales que “vacunan” el sistema inmunitario y lo estimulan para producir una respuesta secundaria que entonces se dirige a la célula tumoral (es decir, “vacunación interna” como se describe a continuación). Los oncogenes y antígenos específicos de tumores expresados en exceso son dianas clave para muchos mAb que se están desarrollando.
- 25
- [0113]** Los antígenos tumorales se describen por ejemplo en Stauss H., Kawakami Y. y Parmiani G.: Tumor antigens recognized by T cells and antibodies. Taylor and Frances (2003). La memoria descriptiva describe anticuerpos producidos contra estas dianas. La memoria descriptiva describe anticuerpos producidos contra antígenos víricos.
- 30
- [0114]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con anticuerpos tales como Rituximab, Alerntuzumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Gemtuzumab-ozogamicin (Myelotarg®, Wyeth) Cetuximab (Erbix™), Bevacizumab, Hu-Max-CD20, HuMax-EGFr, Zamyly y Pertuzumab.
- 35
- [0115]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con Rituximab.
- [0116]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con Cetuximab o con Bevacizumab o con Bevacizumab y Cetuximab o con Bevacizumab y Pantitumumab o con Bevacizumab y Pantitumumab.
- 40
- [0117]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con un anticuerpo contra el factor tisular, receptores similares a Ig citolíticos (KIR), laminina-5, EGF-R, VEGF-R, PDGF-R, HER-2/neu, o un anticuerpo contra un antígeno tumoral tal como PSA, PSCA, CEA, CA 125, KSA, etc.
- 45
- [0118]** Un péptido de la presente invención se puede administrar junto con un anticuerpo terapéutico, tal como los mencionados antes, y combinado además con compuestos potenciadores de la ADCC, p. ej., anticuerpos dirigidos contra KIR bloqueadores, agonistas de NKG2D, antagonistas de NKG2A, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 o IL-21.
- 50
- [0119]** Un péptido de la presente invención se puede administrar como una combinación con anticuerpos dirigidos contra antígenos víricos.

## d) Control del ciclo celular/reguladores de la apoptosis

**[0120]** Una serie de reguladores están implicados en el mantenimiento del ciclo celular normal. Los compuestos que se dirigen a reguladores tales como (i) cdc-25 (con NSC 663284 como un ejemplo no limitante (Pu y col. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 46877)), (ii) quinasas dependientes de ciclina que estimulan en exceso el ciclo celular (con los siguientes ejemplos no limitantes: flavopiridol (L868275, HMR1275; Aventis), 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01, KW-2401; Kyowa Hakko Kogyo) y roscovitina (R-roscovitina, CYC202; Cyclacel) - revisado por Fischer y Gianella-Borradori (2003) *Exp. Op. invest. Drugs* 12, 955-970), y (iii) telomerasa, la enzima que ayuda a las células de cáncer a reconstruir sus telómeros, están dentro de la presente invención, tal como los siguientes ejemplos no limitantes BIBR1532 (Damm y col. (2001) *EMBO J.* 20, 6958-6968) y SOT-095 (Tauchl y col. (2003) *Oncogene* 22, 5338-5347). Además, los fármacos que interfieren con las rutas apoptóticas están dentro de la presente invención, tal como los siguientes ejemplos no limitantes: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando de apoptosis 2 (Apo-2L), anticuerpos que activan los receptores TRAIL, IFN- $\alpha$  y Bcl-2 de sentido contrario (véase Igney y Krammer (2002) *Nature Rev. Cancer* 2, 277-288; Makin y Dive (2003) *Trends Mol. Med.* 9, 2519; Smyth y col. (2003) *Immunity* 18, 1-6; Panaretakis y col. (2003) *Oncogene* 22, 4543-4556 y referencias citadas en los mismos. Un péptido de la presente invención se puede combinar con uno o más reguladores del ciclo celular y/o agentes inductores de apoptosis tales como

**[0121]** compuestos seleccionados del grupo que consiste en cdc-25, NSC 663284, flavopiridol, 7-hidroxiestaurosporina, roscovitina, BIBR1532 SOT-095, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando de apoptosis 2 (Apo-2L), anticuerpos que activan los receptores de TRAIL, IFN- $\alpha$  y Bcl-2 de sentido contrario.

## e) Inhibidores de factores de crecimiento

**[0122]** Se ha desarrollado una serie de mAb contra factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, los miembros de la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGF-R) son activados de forma anómala en muchos tumores epiteliales, lo cual se correlaciona a menudo con un desarrollo clínico más agresivo. Los anticuerpos dirigidos contra el dominio de unión al ligando extracelular de estos receptores y las moléculas de bajo peso molecular que inhiben sus dominios de tirosina quinasa están en la última etapa del desarrollo clínico o aprobados para el tratamiento del cáncer como agentes solos o combinados con otros fármacos para el cáncer. Los ejemplos no limitantes son herceptina (anticuerpo monoclonal), cetuximab (anticuerpo monoclonal), tarceva (inhibidor de bajo peso molecular) e iressa (inhibidor de bajo peso molecular). Además, el ligando puede ser neutralizado antes de la unión al receptor.

**[0123]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con inhibidores de factores de crecimiento como los inhibidores de factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende herceptina (anticuerpo monoclonal), cetuximab (anticuerpo monoclonal), tarceva (inhibidor de bajo peso molecular) e iressa (inhibidor de bajo peso molecular).

**[0124]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con herceptina.

## f) Inhibidores de la vascularización tumoral (fármacos antiangiogénicos y agentes antimetastásicos)

**[0125]** El crecimiento tumoral depende del suficiente suministro de sangre y por lo tanto del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Esta característica general de los tumores sólidos parece atractiva desde un punto de vista terapéutico, es decir se espera un menor crecimiento tumoral y una regresión del tumor cuando se trata a los pacientes con cáncer con fármacos antiangiogénicos. Actualmente, hay más de 60 fármacos antiangiogénicos en ensayos clínicos, incluyendo la endostatina y anglostatina naturales (revisado en Marx (2003) *Science* 301, 452-454). Pero también los fármacos quimioterapéuticos anteriores, otros medicamentos y la terapia con radiación tienen efectos antiangiogénicos. Un tipo de realizaciones de la presente invención es la terapia de combinación de IL-21, análogos o derivados de la misma y uno o más agentes antiangiogénicos, tales como los siguientes ejemplos no limitantes, endostatina, anglostatina, anticuerpos que bloquean factores que inician la angiogénesis (p. ej., anti-VEGF-Avastin), compuestos de bajo peso molecular que inhiben la angiogénesis inhibiendo elementos claves en las rutas de transducción de señales relevantes.

**[0126]** El ataque a la vasculatura del tumor y la matriz extracelular han atraído una concienciación creciente. Hasta ahora se han desarrollado los siguientes principios: bloqueo de la célula endotelial, administración de anglostatina y endostatina, dirección de VEGF y matriz extracelular.

**[0127]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con un fármaco antiangiogénico tal como el fármaco antiangiogénico seleccionado del grupo que comprende: avastina, neovastat, talidomida, PTK787, ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD547.632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3, SU11248.

5 g) Dirección de virus

**[0128]** La dirección del virus usa un virus recombinante, normalmente de replicación incompetente, para destruir un tumor directamente. En la práctica, se produce al menos un ciclo de replicación antes de que el virus esté incapacitado. Por lo tanto, el tumor es lisado, lo cual conduce a menudo a la inmunización sistémica con protección resultante. Este procedimiento se ha refinado más usando modificación genética para potenciar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se ha usado la inserción genética de un gen de GM-CSF humano en un vector de virus herpes simplex de tipo 2 para mejorar la eficacia de la vacuna. La terapia de combinación se puede llevar a cabo administrando IL-21, un análogo o un derivado del mismo y virus dirigido.

i) Agentes hormonales

**[0129]** Los agentes hormonales se conocen principalmente en el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas tales como el cáncer de ovario, cáncer de mama y cáncer de próstata, tal como la terapia antiandrógenos y antiestrógenos. Las hormonas y antihormonas son compuestos tales como el fosfato de estramustina, fosfato de poliestradiol, estradiol, anastrozol, exemestano, letrozol, tamoxifeno, acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona, octreotido, acetato de ciproterona, bicaltumida, flutamida, tritorelina, leuprorelina, buserelina o goserelina.

**[0130]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con terapia hormonal.

II. Agentes que potencian la respuesta inmunitaria contra células tumorales o células infectadas por virus

j) Activadores del sistema inmunitario

**[0131]** La siguiente lista de componentes o agentes que se pueden usar junto con un péptido de la presente invención en terapia de combinación del cáncer y de infecciones víricas por potenciación de la eficacia del sistema inmunitario, no se pretende de ninguna forma que limite el alcance de la invención:

Adyuvantes:

**[0132]** La inmunoterapia consta de la modalidad específica y la no específica. Como ejemplos de inmunoterapia no específica son los adyuvantes que actúan principalmente como catalizadores para el inicio de una respuesta inmunitaria. Los ejemplos no limitantes de dichos adyuvantes vacunas son QS21, GM-CSF y oligodesoxinucleótidos CpG, lipopolisacárido y ácido poliinosínico:policitidílico.

**[0133]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con uno o más adyuvantes tales como adyuvantes seleccionados del grupo que comprende: QS21, GM-CSF y oligodesoxinucleótidos CpG, lipopolisacárido y ácido poliinosínico:policitidílico, a-galactosilceramida o análogos los mismos, dihidrocloruro de histamina o hidróxido de aluminio.

Citoquinas:

**[0134]** Los ejemplos no limitantes de citoquinas son IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, PEG-IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, GM-CSF, ligando Flt3 o factor de citoblastos.

**[0135]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con una o más citoquinas.

**[0136]** Una IL-21 se puede combinar con uno o más compuestos seleccionados del grupo que comprende IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, PEG-IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, GMCSF, ligando Flt3 o factor de citoblastos, o un análogo o derivado de cualquiera de estos.

**[0137]** Los compuestos se pueden seleccionar del grupo que comprende: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , PEG-IL-2, IL-18, IL-23, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29.

**[0138]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con uno de los siguientes: IL-2, PEG-IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\alpha$ .

- [0139]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con IL-12. Un péptido de la presente invención se puede combinar con IFN- $\alpha$ .
- [0140]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con PEG-IL-2.
- 5 **[0141]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con más de uno de los siguientes: IL-2, PEG-IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\alpha$  o al menos uno de los siguientes: IL-2, PEG-IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\alpha$  y un componente activo adicional o al menos uno de los siguientes: IL-2, PEG-IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\alpha$  y una citoquina adicional de la lista anterior. Un péptido de la presente invención se puede combinar con IFN- $\alpha$  y GM-CSF o con IFN- $\alpha$  y timopentina.
- 10 **[0142]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con IFN- $\gamma$  o con TiL autólogo e IFN- $\alpha$  o con IFN- $\alpha$  e IL-12 o con cis-platino e IFN- $\alpha$  o cis-platino, tamoxifeno e IFN- $\alpha$  o con cis-platino, DTIC, tamoxifeno e IFN- $\alpha$  o con cis-platino, DTIC, tamoxifeno y GM-CSF o con cis-platino, carmustina, DTIC e IFN- $\alpha$  o con cis-platino, carmustina, DTIC, tamoxifeno e IFN- $\alpha$  o con cis-platino, carmustina, DTIC, carboplatino, tamoxifeno e IFN- $\alpha$  o con cis-platino, DTIC, vinblastina, tamoxifeno e IFN- $\alpha$  o con cis-platino, vinblastina, temozolomida e IFN- $\alpha$ .
- 15 **[0143]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con cis-platino, carmustina, DTIC, vindesina, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- [0144]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con cis-platino, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- 20 **[0145]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con cis-platino, vinblastina, DTIC e IFN- $\alpha$ .
- [0146]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con DTIC e IFN- $\alpha$ .
- [0147]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con DTIC, GM-CSF e IFN- $\alpha$ .
- [0148]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con DTIC, timosina- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ .
- 25 **[0149]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con vinblastina e IFN- $\alpha$ .
- [0150]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con 5-fluorouracilo e IFN- $\alpha$ .
- [0151]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con fotemustina e IFN- $\alpha$ .
- [0152]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino e IFN- $\alpha$ .
- 30 **[0153]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- [0154]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, DTIC, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- [0155]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, DTIC, tamoxifeno e GM-CSF.
- 35 **[0156]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, carmustina, DTIC e IFN- $\alpha$ .
- [0157]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, carmustina, DTIC, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- 40 **[0158]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, carmustina, DTIC, carboplatino, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- [0159]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, DTIC, vinblastina, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- [0160]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, vinblastina, temozolomida e IFN- $\alpha$ .
- 45 **[0161]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, carmustina, DTIC, vindesina, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .

- [0162]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, tamoxifeno e IFN- $\alpha$ .
- [0163]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, vinblastina, DTIC e IFN- $\alpha$ .
- 5 **[0164]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con 5-fluorouracilo o un análogo del mismo activo por vía oral.
- [0165]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino y 5-fluorouracilo o un análogo de los mismos activos por vía oral.
- 10 **[0166]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con oxaliplatino, leucovorina y 5-fluorouracilo o un análogo de los mismos activos por vía oral.
- [0167]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con irinotecán.
- [0168]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con irinotecán y oxaliplatino.
- [0169]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con irinotecán y cetuximab.
- [0170]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con irinotecán y bevacizumab.
- 15 **[0171]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con irinotecán y cetuximab y bevacizumab.
- [0172]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con DTIC y análogos de células LAK.
- [0173]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con gemcitabina e IFN- $\alpha$ .
- 20 **[0174]** Cualquiera de las combinaciones anteriores se puede combinar más con IL-2.  
Inmunoterapia celular
- [0175]** Los ejemplos de inmunoterapia celular (o inmunoterapia adoptiva) incluyen la reinfusión de linfocitos T que infiltran tumores expandidos ex vivo o linfocitos T genéticamente modificados.
- 25 **[0176]** La terapia de combinación es combinar la administración de un péptido de la presente invención y la inmunoterapia celular.
- [0177]** La inmunoterapia celular puede incluir aislar de los pacientes células que pueden estimular o ejercer una respuesta anticancerígena, propagarlas hasta un gran número y reintroducirlas en el mismo o en otro paciente. Éstas pueden ser linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que reconocen antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores. Éstas pueden ser linfocitos B que expresan anticuerpos específicos para antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores. Éstas pueden ser células NK que pueden matar las células tumorales. En un aspecto preferido, éstas pueden ser células dendríticas (DC) que se cultivan ex vivo con un agente de propagación de DC (p. ej., GM-CSF o Flt3-L), se cargan con antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores y se vuelven a infundir en el paciente que lo necesite. La terapia de combinación es la administración que combina un péptido de la presente invención e inmunoterapia celular o terapia adoptiva.
- 30 **[0178]** La terapia celular adoptiva comprende linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que reconocen antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores.
- 35 **[0179]** La terapia celular adoptiva comprende linfocitos B que expresan anticuerpos específicos para antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores.
- 40 **[0180]** La terapia celular adoptiva comprende células NK que puede matar las células tumorales.
- [0181]** La terapia celular adoptiva comprende células dendríticas (DC).
- 45 **[0182]** Las células dendríticas se pueden cultivar in vivo con un agente de propagación de DC (p. ej., GM-CSF o Flt3-L), cargar con antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores y reintroducirlas in vivo.
- k) Agentes que bloquean la señalización inhibitoria en el sistema inmunitario

**[0183]** Las respuestas inmunitarias, incluyendo las respuestas antitumorales y antivíricas, son reguladas mediante un equilibrio de receptores estimuladores e inhibidores de la ruta de señalización en células del sistema inmunitario. Un desplazamiento hacia abundantes receptores activadores de la ruta de señalización puede conducir a respuestas inmunitarias más eficaces, mientras que los receptores inhibidores de la ruta de señalización pueden conducir a respuestas menos productivas, o incluso pueden dificultar la inmunidad. Con el fin de potenciar las respuestas antitumorales o antivíricas, es útil bloquear de forma terapéutica los receptores inhibidores de la ruta de señalización, con el fin de desplazar el equilibrio hacia la activación. Por lo tanto, los agentes que bloquean los receptores inhibidores, o inhibidores de las rutas de señalización, son agentes preferidos para el tratamiento de combinación junto con un péptido de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes que bloquean los receptores inhibidores son mAb específicos para CTLA-4 (anti-CTLA-4), mAb específicos para KIR (anti-KIR), mAb específicos para LIR (anti-LIR), mAb específicos para CD94 (anti-CD94), o mAb específicos para NKG2A (anti-NKG2A).

**[0184]** Los agentes antialérgicos son compuestos pequeños, proteínas, glicoproteínas o anticuerpos que pueden romper la tolerancia a los antígenos tumorales y cancerígenos.

**[0185]** Aunque la presencia de linfocitos que infiltran tumores (TIL) se correlaciona con un mejor resultado clínico, en una serie de diferentes formas de cáncer existe claramente la necesidad de mejorar la actividad de estos TIL debido a la anergia o tolerancia a los antígenos tumorales. El estado anérgico en un número sustancial de casos se puede contrarrestar mediante anticuerpos monoclonales que previenen la tolerancia o anergia inducida por CTLA-4. Se ha mostrado que bloqueo de CTLA-4 en modelos animales y en pacientes de cáncer humanos, mejora la eficacia de la terapia para el cáncer, sugiriendo que el bloqueo de CTLA-4 se puede usar para romper la tolerancia al cáncer y a los antígenos tumorales. Un ejemplo no limitante de un anticuerpo monoclonal que se puede usar para inducir la actividad de los TIL es MDX-010 (Phan y col. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 8372). La terapia de combinación se puede llevar a cabo administrando un péptido de la presente invención y uno o más agentes que rompen la tolerancia al cáncer, antígenos tumorales o víricos. Un péptido de la presente invención se puede combinar con MDX-010.

**[0186]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con anticuerpos contra CTLA-4.

**[0187]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con anticuerpos contra KIR.

**[0188]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con anticuerpos contra CD94.

**[0189]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con anticuerpos contra NKG2A.

**[0190]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con anticuerpos contra un receptor inhibidor expresado en una célula NK, un linfocito T o una célula NKT.

**[0191]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con un antagonista de un receptor inhibidor.

**[0192]** Un péptido de la presente invención se puede combinar con un antagonista de una proteína de señalización implicada en la transmisión de señales inhibitorias.

#### I) Vacunas terapéuticas

**[0193]** El desarrollo de casi todos los cánceres humanos implica alteraciones genéticas, y éstas pueden conducir a la expresión de moléculas alteradas en células tumorales y al exceso de expresión de moléculas normales, respectivamente. En principio, estos cambios deberían conducir a una respuesta inmunitaria del huésped (vigilancia inmunitaria). Obviamente, esta activación teórica del sistema inmunitario sólo conduce a la regresión espontánea del tumor en muy pocos casos excepcionales. Esto puede deberse, entre otros factores, a la falta de "señales de peligro", un fenómeno que ha atraído un interés creciente.

**[0194]** Se han identificado antígenos específicos de tumores, y la vacunación con dichos antígenos puede estimular el sistema inmunitario para erradicar el tumor. Los antígenos específicos de tumores (TSA) son un grupo relativamente pequeño de antígenos ilustrados por los antígenos del cáncer de testículo. Estos genes son silenciosos en el tejido normal pero son expresados por células cancerígenas. Son marcadores muy específicos de la enfermedad e incluyen el MAGE (gen de antígeno de melanoma) encontrado en melanomas.

**[0195]** Los antígenos asociados a tumores (TAA) normalmente son antígenos de diferenciación expresados por células normales pero expresados en exceso masivamente en el tejido cancerígeno. Las dianas que inicialmente se pensó que eran específicas para un cáncer particular realmente son

bastante comunes en muchos tumores, tales como los antígenos gangliósidos y mucinas. Los antígenos de diferenciación clásicos incluyen MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T) y gp 100, ambos de melanoma, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA) y gp75.

5 **[0196]** Antígenos mutacionales: las mutaciones puntuales son comunes en muchos cánceres y a menudo se producen en una localización similar, tal como la mutación común de los oncogenes P53 o ras. Se ha descrito la inducción in vitro de respuestas de linfocitos T citotóxicos humanos (CTL) contra péptidos de p53 mutante y natural. En un modelo de ratón, células dendríticas tratadas con pulsos de p53 mutante fueron capaces de inducir CTL específicos de p53 e inhibir el crecimiento de tumores establecidos.

10 **[0197]** Antígenos víricos: algunos virus son oncogénicos y los productos génicos codificados por estos virus pueden provocar respuestas inmunitarias y por lo tanto sirven como antígenos cancerígenos. Un ejemplo son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se ha mostrado que inducen respuestas de linfocitos T citotóxicos in vitro.

15 **[0198]** Los antígenos específicos de tumores, antígenos asociados a tumores y/o antígenos mutacionales y antígenos víricos se pueden usar como péptidos, antígenos de un solo agente purificados recombinantes, combinaciones de antígenos purificados recombinantes y/o antígenos purificados o grupos de antígenos aislados de células cancerígenas o células tumorales, como una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral. Igualmente, se pueden usar péptidos, antígenos de un solo agente purificados recombinantes, combinaciones de antígenos recombinantes y/o antígenos purificados o grupos de antígenos aislados de células infectadas por virus en una vacuna para provocar una respuesta contra células infectadas por virus. Las vacunas terapéuticas también pueden estar en forma de lisatos o extractos de células tumorales autólogas, o lisatos o extractos de líneas celulares tumorales alogénicas. Las vacunas terapéuticas también pueden estar en forma de una vacuna de ADN para provocar la respuesta inmunitaria contra células de cáncer e infectadas por virus. Dicha vacuna de ADN puede consistir en un vector de expresión que codifica el antígeno sólo o que codifica el antígeno junto con una citoquina (p. ej., GM-CSF, IL-2, IL-12 o IL-21) que puede potenciar la respuesta inmunitaria contra las células cancerígenas e infectadas por virus. Dicha vacuna de ADN también puede consistir en un virus modificado (p. ej., virus de la viruela aviar, virus de la variolovacuna o adenovirus) que contiene una secuencia de ADN que codifica el antígeno sólo o codifica el antígeno junto con una citoquina. Las vacunas terapéuticas también pueden estar en forma de anticuerpos antiidiotípicos para provocar la respuesta inmunitaria contra células cancerígenas e infectadas por virus. Las vacunas terapéuticas también pueden estar en forma de células dendríticas autólogas cargadas con dichos antígenos o péptidos derivados de los mismos junto con un agente modificador de DC, tal como citoquinas, agonistas de receptores de tipo toll (TLR), oligodesoxinucleótidos CpG, GM-CSF, o proteínas de choque térmico.

35

**[0199]** Dicha provocación mediada por la vacuna de una respuesta antitumoral o una respuesta contra células infectadas por virus se puede potenciar mediante la administración de adyuvantes, citoquinas, agonistas del receptor de tipo toll (TLR), oligodesoxinucleótidos CpG, células dendríticas, GM-CSF, o proteínas de choque térmico. En una realización de la invención, la terapia de combinación se lleva a cabo administrando un péptido de la presente invención con una o más vacunas terapéuticas con o sin adyuvantes, citoquinas, agonistas del receptor de tipo toll (TLR), oligodesoxinucleótidos CpG, células dendríticas, GM-CSF, o proteínas de choque térmico.

40

#### n) Antimetastásicos

45 **[0200]** Las células de cáncer metastásicas penetran en la matriz extracelular (ECM) y la membrana basal de los vasos sanguíneos para metastatizar un órgano diana (sitio ectópico). La ECM consta de proteínas insertadas en un complejo de hidratos de carbono (peptidoglicanos sulfato de heparán), y las proteasas que rodean el tumor son activas en esta alteración del tejido del huésped. Los agentes antimetastásicos antagonizan el efecto de dichas proteasas (p. ej., inhibidores de metaloproteasas) (Coussens y col. *Science* 2002; 295:2387-2392). La terapia de combinación puede ser un péptido de la presente invención y uno o más agentes antimetastásicos, tales como inhibidores de metaloproteasas.

50

#### IV: Vacunación interna

55 **[0201]** La “vacunación interna” y la “terapia de vacunación interna” se refieren a la muerte celular inducida por fármacos o radiación de células tumorales, que conduce a la producción de una respuesta inmunitaria dirigida contra (i) dichas células tumorales como un conjunto o (ii) partes de dichas células tumorales que incluyen (a) proteínas secretadas, glicoproteínas u otros productos, (b) proteínas asociadas a membrana o glicoproteínas u otros componentes asociados con o insertados en las membranas, y (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. La respuesta

inmunitaria puede ser humoral (es decir, mediada por anticuerpo-complemento) o mediada por células incluyendo, pero sin limitar, el desarrollo de linfocitos T citotóxicos que reconocen dichas células tumorales o partes de las mismas. La vacunación interna tiene muchas similitudes con otros procedimientos de vacunación e implica muchos o todos los mismos componentes celulares del sistema hematopoyético e inmunitario, con la ventaja de que los inmunógenos o componentes antigénicos son endógenos y por lo tanto representativos del repertorio antigénico de dichas células tumorales. Por lo tanto, la vacunación interna se puede considerar vacunación personalizada, que se provoca mediante el uso de procedimientos generales para el tratamiento del cáncer que conducen a la muerte de las células tumorales. Además de la radioterapia, los ejemplos no limitantes de fármacos y agentes que se pueden usar para inducir dicha muerte de células tumorales y vacunación interna son agentes quimioterapéuticos convencionales, inhibidores del ciclo celular, fármacos antiangiogénicos, anticuerpos monoclonales, agentes inductores de apoptosis e inhibidores de la transducción de señales.

**[0202]** La “terapia de combinación del péptido de la presente invención y vacunación interna” se refiere a la terapia de combinación en la que se administra un péptido de la presente invención a los pacientes con cáncer que se tratan con vacunación interna. Un péptido de la presente invención se puede administrar antes, simultáneamente o después de llevar a cabo la vacunación interna.

**[0203]** Se puede incluir un péptido de la presente invención en una terapia de vacunación interna.

**[0204]** La terapia génica incluye la transferencia de material genético a una célula para alterar de forma transitoria o permanente el fenotipo celular. Se investigan diferentes procedimientos para suministrar citoquinas, antígenos tumorales y moléculas estimuladoras adicionales. En el contexto de esta invención, un péptido de la presente invención puede ser el agente suministrado o coadministrado. Un péptido de la presente invención se puede administrar como un polinucleótido tal como el polinucleótido descrito en el documento WO 00/53761.

#### VI: Agentes inmunosupresores/inmunomoduladores

r) Agentes que influyen en la dirección de linfocitos T, p. ej., FTY-720

s) Inhibidores de calcineurina

**[0205]** Los inhibidores de calcineurina tales como valspodar, PSC 833, son activos previniendo el desarrollo de resistencia a agentes citotóxicos debido a los efectos inhibidores en MDR-1 y glicoproteína P.

t) Inhibidores de TOR

**[0206]** Los inhibidores de TOR actúan bloqueando la serina-treonina quinasa de mamíferos TOR (mTOR). Los compuestos tales como sirolimus, everolimus y rapamicina son agentes antiproliferativos. Están implicados en las cascadas de señalización corriente abajo y por lo tanto son importantes en el tratamiento de todos los tipos de tumores (p. ej., propiedades antiangiogénicas).

**[0207]** Las modalidades de tratamiento del cáncer mencionadas antes se pueden combinar con el SEQ ID No: 2 de la misma forma que se ha ilustrado para un péptido de la presente invención. La memoria descriptiva describe composiciones farmacéuticas como se discute a continuación, que comprenden un péptido con SEQ ID No: 2 y una o más modalidades de tratamiento del cáncer como se ha descrito antes.

#### Composiciones Farmacéuticas

**[0208]** Una formulación farmacéutica puede comprender un péptido de la presente invención que está presente en una concentración de  $10^{-15}$  mg/ml a 200 mg/ml, tal como  $10^{-10}$  mg/ml - 5 mg/ml, y en la que dicha formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. Opcionalmente, dicha formulación puede comprender uno o más agentes para el cáncer adicionales como se ha descrito antes. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. La formulación farmacéutica puede ser una formulación acuosa, es decir una formulación que comprende agua. Dicha formulación normalmente es una disolución o una suspensión. La formulación farmacéutica puede ser una disolución acuosa. La expresión “formulación acuosa” se define como una formulación que comprende al menos 50% en p/p de agua. Igualmente, la expresión “disolución acuosa” se define como una disolución que comprende al menos 50% en p/p de agua, y la expresión “suspensión acuosa” se define como una suspensión que comprende al menos 50% en p/p de agua.

- [0209]** La formulación farmacéutica puede ser una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de usarla.
- [0210]** La formulación farmacéutica puede ser una formulación seca (p. ej., liofilizada o secada por atomización) lista para usar sin ninguna disolución previa.
- 5 **[0211]** La formulación farmacéutica puede comprender una disolución acuosa de un péptido de la presente invención y un tampón, en la que dicha proteína OGP está presente en una concentración de 0,1-100 mg/ml y en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.
- 10 **[0212]** El pH de la formulación se puede seleccionar de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.
- 15 **[0213]** El tampón se puede seleccionar del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato disódico, fosfato sódico, y tris(hiroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos.
- 20 **[0214]** La formulación puede comprender además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante se puede seleccionar del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato sódico, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de benzetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml o en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 25 **[0215]** La formulación puede comprender además un agente isotónico. El agente isotónico se puede seleccionar del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas de los mismos. Se puede usar cualquier azúcar como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trealosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. El aditivo de azúcar puede ser sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. El aditivo de alcohol de azúcar puede ser manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados antes se pueden usar individualmente o en combinación. No hay un límite fijado a la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizantes logrados usando los procedimientos de la invención. La concentración del azúcar o alcohol de azúcar puede ser entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. El agente isotónico puede estar presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml o en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml o en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml o en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 30 **[0216]** La formulación puede comprender además un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 35 **[0217]** La formulación comprende además un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 40 **[0218]** La formulación comprende además un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 45 **[0219]** La formulación comprende además un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 50 **[0220]** La formulación comprende además un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.
- 55 **[0221]** La formulación comprende además un agente quelante. El agente quelante se puede seleccionar de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml o en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

**[0218]** Las composiciones de la invención pueden ser composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente presenta formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregado" se entiende una interacción física entre moléculas de polipéptido que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o agregados grandes visibles que precipitan de la disolución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición farmacéutica líquida o formulación que una vez preparada no se administra inmediatamente a un sujeto. Sino que después de la preparación se envasa para el almacenamiento en una forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para reconstituir más tarde en una forma líquida u otra forma adecuada para administrar a un sujeto. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca por liofilización (véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), se seca por atomización (véase Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5ª ed.; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), pág. 491-676; Broadhead y col. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; y Mumenthaler y col. (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), o se seca al aire (Carpenter and Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede producir otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene el polipéptido usando un sistema de infusión.

**[0219]** Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además una cantidad de un aminoácido base suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "aminoácido base" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en la que cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, pueden estar presentes todos los aminoácidos en su forma de base libre, pueden estar todos presentes en su forma de sales, o algunos pueden estar presentes en su forma de base libre mientras que otros están presentes en su forma de sal. Los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones pueden ser aquellos que llevan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o mezclas de los mismos) de un aminoácido particular (p. ej. glicina, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o su forma de sal. Se puede usar el estereoisómero L. las composiciones también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido natural que produce el efecto deseado de disminución de formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina, y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L-cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones en su forma de base libre o su forma de sal. Los aminoácidos o análogos de aminoácidos se pueden usar en una concentración que sea suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína.

**[0220]** Se pueden añadir metionina (u otros aminoácido sulfúricos o análogos de aminoácidos) para inhibir la oxidación de los restos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un resto de metionina susceptible de dicha oxidación. Por "inhibe" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina da como resultado una mayor retención del polipéptido en su forma molecular adecuada. Se puede usar cualquier estereoisómero de la metionina (L, D o mezclas de los mismos) o combinaciones de los mismos. La cantidad que hay que añadir debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los restos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene como máximo de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. En general, esto se puede lograr añadiendo metionina de modo que la relación de metionina añadida a restos de metionina esté en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

**[0221]** La formulación puede comprender además un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. El estabilizante se puede seleccionar de compuestos. El estabilizante se puede seleccionar de polietilenglicol (p. ej. PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de los mismos (p.

ej. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (p. ej. cloruro sódico).

**[0222]** Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que además potencian la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo de las mismas. Los agentes estabilizantes de interés particular incluyen, pero sin limitar, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido frente a la oxidación de la metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido frente a la agregación asociada a la liofilización o cizalladura mecánica.

**[0223]** La formulación puede comprender además un tensioactivo. El tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicérodios poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso y sorbitán, polímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno (p. ej. poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácido graso y sorbitán polioxietilénicos, polioxietileno y derivados de polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, p. ej. Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados polioxietilénicos de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (p. ej. fosfatidil-serina, fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-inositol, difosfatidil-glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (p. ej. ácido dipalmitoil-fosfatídico) y lisofosfolípidos (p. ej. palmitoil-lisofosfatidil-L-serina y ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato y etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados de alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxi (éter de alquilo), derivados de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, p. ej. derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los de carga positiva DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (p. ej. cefalinas), gliceroalcolípidos (p. ej. galactopiranosido), esfingoglicolípidos (p. ej. ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolectina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (p. ej. tauro-dihidrofusidato sódico etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (p. ej. ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N<sup>α</sup>-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N<sup>α</sup>-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido ácido o neutro, derivado N<sup>α</sup>-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato sódico, registro CAS n° [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS n° [128-49-4]), docusato potásico, registro CAS n° [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), caprilato sódico, ácido cólico o derivados de los mismos, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato sódico, desoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalente aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos de ion híbrido (p. ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (p. ej. dodecil-β-D-glucopiranosido), poloxaminas (p. ej. Tetronic), que son copolímeros de bloques tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina o mezclas de los mismos.

**[0224]** El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> edición, 2000.

**[0225]** Pueden estar presentes otros ingredientes en las formulaciones farmacéuticas peptídicas. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina de suero humana, gelatina o proteínas) y un ion híbrido (p. ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad general de la formulación farmacéutica.

**[0226]** Las composiciones farmacéuticas que contienen un péptido se pueden administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y de la mucosa, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

**[0227]** La administración de las composiciones farmacéuticas puede ser a través de diferentes vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de bronquiolos y alveolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la

conjuntiva, uretal, y parenteral en pacientes que necesiten dicho tratamiento.

- 5 **[0228]** Las composiciones se pueden administrar en varias formas de dosificación, por ejemplo, como disoluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, bálsamos, pastas, parches, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizadores, polvos, aerosoles, inhaladores, colirios, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, disolución en inyección, disoluciones transformadas in situ, por ejemplo gelificación in situ, sedimentación in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, disolución en infusión e implantes.
- 10 **[0229]** Las composiciones pueden estar además combinadas, o unidas, por ejemplo por interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, a un vehículo de fármacos, sistema de suministro de fármacos y sistema de suministro de fármacos avanzado con el fin de potenciar más la estabilidad del péptido de la presente invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir la cronoterapia bien conocida para el experto en la materia, y aumentar la observancia del paciente, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de vehículos, sistemas de suministro de fármacos y sistemas de suministro de fármacos avanzados incluyen, pero sin limitar, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y copolímeros de bloques de los mismos, polietilenglicoles, proteínas portadores, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas de copolímeros de bloques bien conocidos para el experto en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de las mismas, bien conocidas para el experto en la materia del comportamiento de fases en sistemas lípidos-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsiones, 15 automicroemulsiones, ciclodextrinas y derivados de las mismas y dendrímeros.
- 20 **[0230]** Las composiciones pueden ser útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y disoluciones para la administración pulmonar de un péptido de la presente invención, usando por ejemplo un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y nebulizador, siendo todos dispositivos bien conocidos para los expertos en la materia.
- 30 **[0231]** Las composiciones pueden ser útiles específicamente en la formulación de sistemas de suministro de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero sin limitar, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación parenteral controlada y liberación sostenida (conduciendo ambos sistemas a una reducción grande del número de veces de administración) bien conocidos por los expertos en la materia. Incluso son más preferidos los sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Los ejemplos de sistemas de liberación controlada y composiciones útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.
- 35 **[0232]** Los procedimientos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones incluyen, pero sin limitar, la cristalización, condensación, cristalización conjunta, precipitación, precipitación conjunta, emulsión, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del disolvente para producir microesferas, extrusión y procedimientos de fluidos supercríticos. Se hace referencia general a [Handbook of Pharmaceutical Controlled Release](#) (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) y [Drug and the Pharmaceutical Sciences](#) vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).
- 40 **[0233]** La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o inyección intravenosa mediante una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo bolígrafo. Alternativamente, la administración parenteral se puede llevar a cabo mediante una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una disolución o suspensión para administrar el péptido de la presente invención en forma de un pulverizador nasal o pulmonar. Como otra opción más, las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido de la presente invención también se pueden adaptar para administración transdérmica, p. ej. mediante inyección sin aguja o con un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, p. ej. bucal.
- 45 **[0234]** La expresión “formulación estabilizada” se refiere a una formulación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química.
- 50 **[0235]** El término “estabilidad física” de la formulación de proteína como se usa en el presente documento, se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas

y/o a la interacción con interfases y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies e interfases hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteína se evalúa mediante inspección visual y/o medición de la turbidez después de exponer la formulación cargada en envases adecuados (p. ej. cartuchos o viales) a tensiones mecánicas/físicas (p. ej. agitación) a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se lleva a cabo con una luz enfocada fuerte con un fondo negro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una clasificación de la puntuación visual del grado de turbidez, por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una formulación que no presenta turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que presenta turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas cuando presenta turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación se puede evaluar mediante mediciones de turbidez sencillas conocidas para el experto en la materia. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas también se puede evaluar usando un agente o sonda espectroscópicas del estado conformacional de la proteína. La sonda preferiblemente es una molécula pequeña que se une con preferencia a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura de proteína es la tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente y se ha usado ampliamente para detectar fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizás también otras configuraciones de proteínas, la tioflavina T produce un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de fibrilla de proteína. La tioflavina T no unida no es esencialmente fluorescente a las longitudes de onda.

**[0236]** Se pueden usar otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura de la proteína de los estados nativos a los no nativos. Por ejemplo, las sondas de “parche hidrófobo” que se unen con preferencia a los parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados en la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos cuando la proteína empieza a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes hidrófobos aromáticos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos de metal cobalto y aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, y valina, o similares.

**[0237]** La expresión “estabilidad química” de la formulación de proteínas como se usa en el presente documento se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con menos potencia biológica potencial y/o propiedades inmunógenas aumentadas potenciales comparado con la estructura de la proteína nativa. Se pueden formar diferentes productos de degradación química dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y del entorno al que se expone la proteína. Lo más probable es que la eliminación de la degradación química no pueda evitarse completamente y a menudo se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación de proteína, como conoce bien el experto en la materia. La mayoría de las proteínas tienen tendencia a la desamidación, un procedimiento en el que el grupo amida de la cadena lateral en los restos glutaminilo o asparaginilo es hidrolizado para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de peso molecular alto en los que dos o más moléculas de proteína están unidas covalentemente entre sí por transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de dímeros, oligómeros y productos de degradación de polímeros unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahem. T.J. y Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). La oxidación (por ejemplo de los restos de metionina) se pueden mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteínas se puede evaluar midiendo la cantidad de productos de degradación química en diferentes puntos de tiempo después de exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de los productos de degradación a menudo se puede acelerar por ejemplo aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación, dependiendo del tamaño molecular y/o carga, usando diferentes técnicas cromatográficas (p. ej. SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

**[0238]** Por lo tanto, como se ha señalado antes, una “formulación estabilizada” se refiere a una formulación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de acuerdo con las condiciones de almacenamiento y uso recomendadas) hasta llegar a la fecha de caducidad.

**[0239]** La formulación farmacéutica que comprende el péptido de la presente invención puede ser estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

**[0240]** La formulación farmacéutica que comprende el péptido de la presente invención puede

ser estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

**[0241]** La formulación farmacéutica que comprende el péptido de la presente invención puede ser estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 2 años de almacenamiento.

5 **[0242]** La formulación farmacéutica de la invención que comprende el péptido de la presente invención puede ser estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de 2 años de almacenamiento.

### Ejemplos

#### Ensayo de actividad de variantes de IL-21

10 **[0243]** Se analizaron proteínas hIL-21 naturales y mutantes usando un ensayo de actividad celular usando un sistema indicador de luciferasa regulado por stat.

15 **[0244]** El ensayo usa la línea celular murina Baf3, que se ha transfectado de forma estable para expresar la IL-21 R humana y una construcción indicadora de luciferasa unida a Stat. Las células Baf3 expresan de forma endógena la "cadena común" C gamma que constituye un componente esencial del complejo receptor de IL-21 de señalización. La línea celular indicadora Baf3/hIL-21 R se dejó sin nutrientes en medio exento de IL-3 durante 6 horas antes de la estimulación. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de dosis-respuesta usando estimulación de las células durante 24 horas.

20 **[0245]** La figura 1 representa un análisis de proteínas expresadas de forma transitoria en células HEK293 FS (Stengaard-Pedersen y col. *N. Engl. J. Med.* (2003) 349: 554; Invitrogen). Las proteínas se analizaron en la forma de los líquidos sobrenadantes brutos recogidos 48 horas después de la transfección.

**[0246]** La figura 2 representa un análisis de proteínas hIL-21 naturales y mutantes analizadas como proteínas purificadas. Chim-IL21 es la IL-21 sub[K77 - T92] (SEQ ID No. 7). Aquí, se prepararon construcciones para la expresión en *E. coli* y se purificaron por replegado de proteínas presentes en cuerpos de inclusión.

#### 25 Ensayo alternativo de actividad de variantes de IL-21

**[0247]** Se analizaron los ADNc que codifican las variantes de IL-21 por expresión transitoria seguido de análisis de la actividad en un sistema indicador regulado por stat.

30 **[0248]** Los ADNc se transfectan en células HEK293 FreeStile (Stengaard-Pedersen y col., *N. Engl. J. Med.* (2003) 349: 554; Invitrogen). Se recogen los líquidos sobrenadantes del medio exento de suero a las 48 horas después de transfección y se analizan en un bioensayo celular. El ensayo usa la línea celular murina Baf3 transfectada de forma estable para expresar la IL-21R humana y una construcción indicadora de luciferasa unida a Stat. Las células Baf3 expresan de forma endógena el componente yc del complejo receptor de IL-21 activo. La línea celular indicadora Baf3/hIL-21R se dejó sin nutrientes en medio exento de IL-3 durante 18 horas antes de la estimulación. Se lleva a cabo un análisis de dosis-respuesta usando el líquido sobrenadante bruto de los transfectantes HEK293-FS. La duración de la estimulación es de 4 horas.

#### Procedimientos Farmacológicos

**[0249]** Se usa el siguiente procedimiento in vitro para investigar la potenciación de la ADCC.

40 **[0250]** Las células diana que expresan el antígeno diana se incuban con el anticuerpo contra el antígeno diana y células mononucleares de sangre periférica, células NK, neutrófilos, macrófagos, monocitos o DC como células efectoras. Las células efectoras se pueden incubar previamente durante 1 a 10 días con IL-21, o se puede añadir IL-21 al cultivo que contiene tanto células efectoras como diana. Se pueden incluir otros compuestos que pueden potenciar la ADCC en el cultivo o en el cultivo de preincubación. La eficacia de la ADCC se medirá como la liberación específica de <sup>51</sup>Cr de las células diana o como la actividad de LDH como se ha descrito previamente (Golay y col., *Haematologica* 88:1002-1012, 2003 o Liu y col., *Cancer Immun.* 2:13, 2002 o Watanabe y col., *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207, 1999).

50 **[0251]** Determinación de la ADCC usando un ensayo basado en citometría de flujo como se ha descrito previamente (Flieger y col., *J. Immunother.* 23:480-486, 2000, o Flieger y col., *J. Immunol. Methods* 180:1-13, 1995, o Flieger y col., *Hybridoma* 18:63-68, 1999).

**[0252]** Determinación de la ADCP por ensayo de fluorescencia de dos colores como describen Watanabe y col., *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207, 1999, o Akewanlop y col., *Cancer Res.*

61:4061-4065, 2001.

**[0253]** A continuación se resume un procedimiento in vivo para determinar la potenciación de la ADCC:

5 Se inyectan células leucémicas o células transformadas por vía i.v., i.p. o s.c. en animales singénicos, seguido de tratamiento con el anticuerpo terapéutico que reconoce un antígeno expresado por las células leucémicas o células transformadas, con o sin terapia de IL-21. Los criterios de valoración son la carga tumoral y la supervivencia. La implicación de la ADCC se puede confirmar mediante el uso de anticuerpos que bloquean Fc $\gamma$ RI o mediante el uso de ratones deficientes en Fc $\gamma$ RI.

1.0 **[0254]** Se ha descrito previamente un procedimiento in vivo para investigar la potenciación de la ADCC contra células diana de origen humano, en Zhang y col., *Blood* 102:284-288, 2003, o Flavell y col. *Cancer Res.* 58:5787-5794, 1998. De acuerdo con estos modelos, se inyectan células de leucemia humanas o células transformadas por vía i.v., i.p. o s.c. en ratones SCID seguido de tratamiento con el anticuerpo terapéutico que reconoce un antígeno expresado por las células de leucemia o células transformadas, con o sin terapia con IL-21.

1.5 **[0255]** Las líneas celulares tumorales, p. ej. células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) o células de melanoma B16-F10 o células de carcinoma de células renales o células de carcinoma de mama 4T1 se implantan por vía s.c. en ratones singénicos. Cuando los tumores se hacen palpables, los ratones se tratan con IL-21 en combinación con otros agentes anticancerígenos como se describe en esta solicitud. La metodología está descrita en Palumbo y col., *Cancer Res.* 62:6966-6972 (2002); Bove y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 1001-1005 (2002); Wigginton y col., *J. Immunol.* 169:4467-4474 (2002).

2.0

**[0256]** Las líneas celulares tumorales, p. ej. células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) o células de melanoma B16-F10 se implantan por vía s.c. en ratones singénicos. El tumor primario se saca después de 1-4 semanas, y los ratones se tratan con IL-21 en combinación con otros agentes anticancerígenos como se describe en esta solicitud. La metodología se describe en Palumbo y col., *Cancer Res.* 62:6966-6972 (2002).

2.5

**[0257]** Las líneas celulares tumorales, p. ej. células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) o células de melanoma B16-F10 o células de carcinoma de células renales se inyectan por vía i.v. en ratones singénicos y los ratones se tratan con IL-21 en combinación con otros agentes anticancerígenos descritos en esta solicitud. La metodología está descrita en Amirkhosravi y col., *Thromb. Haemost.* 87: 930-936 (2002); Hosaka y col., *Cancer Lett.* 161:231-240 (2000); Maini y col., *In vivo* 17:119-123 (2003).

3.0

**[0258]** Se inyectan células de carcinoma de células renales por vía intrarrenal en un riñón en ratones singénicos. El tumor primario se saca después de 1-4 semanas, y los ratones se tratan con IL-21 en combinación con otros agentes anticancerígenos como se describe en esta solicitud. La metodología se describe en Murphy y col., *J. Immunol.* 170:2727-2733 (2003).

3.5

#### Lista de Secuencias

##### **[0259]**

- <110> Novo Nordisk A/S
- 4.0 <120> Variantes de IL-21
- <130> XXX
- <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 4.5 <211> 162
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 357 550 T3

```

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
1           5           10           15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
20           25           30

Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
35           40           45

Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
50           55           60

Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
65           70           75           80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
85           90           95

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
100          105          110

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
115          120          125

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
130          135          140

Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
145          150          155          160

Asp Ser

```

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 2

# ES 2 357 550 T3

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu  
 20 25 30  
 Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser  
 35 40 45  
 Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu  
 50 55 60  
 Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys  
 85 90 95  
 Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys  
 100 105 110  
 Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His  
 115 120 125  
 Gly Ser Glu Asp Ser  
 130

<210> 3

<211> 129

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 3

ES 2 357 550 T3

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile  
 1 5 10 15

Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu  
 20 25 30

Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser  
 35 40 45

Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu  
 50 55 60

Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser  
 65 70 75 80

Thr Asn Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu  
 85 90 95

Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln  
 100 105 110

Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp  
 115 120 125

Ser

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 4

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile  
 1 5 10 15

Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu  
 20 25 30

Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser

ES 2 357 550 T3

35 40 45

Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu  
50 55 60

Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser  
65 70 75 80

Thr Asn His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys  
85 90 95

Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met  
100 105 110

Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser  
115 120 125

<210> 5

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 5

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile  
1 5 10 15

Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu  
20 25 30

Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser  
35 40 45

Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu  
50 55 60

Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser  
65 70 75 80

Thr Asn Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro  
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His  
100 105 110

Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser  
115 120 125

10

<210> 6

<211> 126

<212> PRT

ES 2 357 550 T3

<213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 6

```

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile
1          5          10
Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu
          20          25          30
Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser
          35          40          45
Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu
          50          55          60
Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser
65          70          75
Thr His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro
          85          90          95
Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile
          100          105          110
His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
          115          120          125

```

5

<210> 7

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 7

ES 2 357 550 T3

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu  
 20 25 30  
 Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser  
 35 40 45  
 Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu  
 50 55 60  
 Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Asn Leu Trp Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys  
 85 90 95  
 Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met  
 100 105 110  
 Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser  
 115 120 125

<210> 8

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 8

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu  
 20 25 30  
 Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser  
 35 40 45  
 Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu  
 50 55 60  
 Arg Ile Ile Asn Val Ser Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys  
 85 90 95  
 Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met  
 100 105 110  
 Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser  
 115 120 125

10

<210> 9

ES 2 357 550 T3

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> variante de IL-21

<400> 9

```

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile
 1                               5 10 15
Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu
      20 25 30
Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser
      35 40 45
Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu
 50 55 60
Arg Ile Ile Asn Val Ser Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly
65 70 75 80
Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys
      85 90 95
Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met
      100 105 110
Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
      115 120 125

```

<210> 10

<211> 126

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 10

# ES 2 357 550 T3

```

Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile
1           5           10           15

Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu
          20           25           30

Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser
          35           40           45

Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu
          50           55           60

Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Asn Leu Trp Gly
65           70           75           80

Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro
          85           90           95

Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile
          100          105          110

His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
          115          120          125

```

<210> 11

<211> 134

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> variante de IL-21

<400> 11

```

Met Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp
1           5           10           15

Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe

```



**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 3.
2. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 4.
3. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 5.
- 5 4. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 6.
5. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 7.
6. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 8.
7. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 9.
8. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 10.
- 10 9. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, con una Met N-terminal adicional.
10. El uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
11. Un uso según la reivindicación 10, en el que el cáncer se selecciona de trastornos neoplásicos metastásicos y no metastásicos, tales como melanoma maligno, cánceres de piel de no melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de la cabeza y cuello, cáncer del sistema endocrino, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer del tracto gastrointestinal superior, cáncer colorrectal, cáncer de hígado y conductos biliares, cáncer pancreático, cáncer prostático, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer cervicouterino, cáncer endometrial, sarcomas de huesos y tejido blando, cáncer del sistema nervioso central, linfoma, leucemia y cáncer de origen primario desconocido.
- 15 12. Un uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer es melanoma maligno.
13. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para usar en el tratamiento del cáncer.
14. Una construcción de ácido nucleico que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 25 15. Un vector que comprende la construcción de ácido nucleico según la reivindicación 14.
16. Un huésped que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 14, o el vector de la reivindicación 15.

FIGURA 1/2

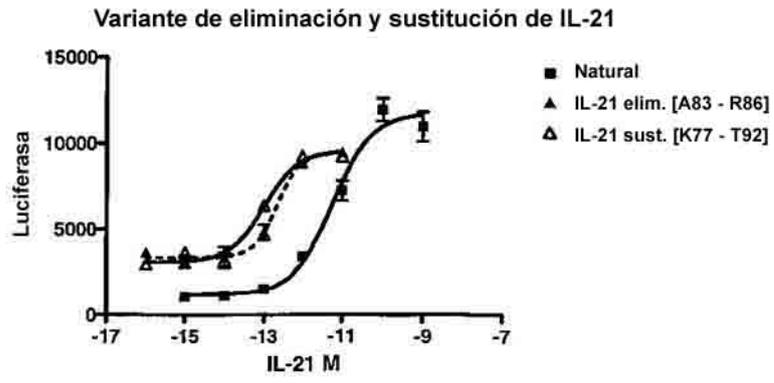


FIGURA 2/2

