

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 958**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2011 PCT/EP2011/074099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12089736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2011 E 11805055 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2658566**

54 Título: **ARNip frente a Cbl-b combinado con citocinas e interferones en el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

28.12.2010 EP 10197146

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.07.2017

73 Titular/es:

**APEIRON BIOLOGICS AG (100.0%)
Campus-Vienna-Biocenter 5
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**LAMETSCHWANDTNER, GÜNTHER;
LOIBNER, HANS;
SCHUSTER, MANFRED;
HASLINGER, ISABELLA y
SEIDL, SANDRA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 622 958 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

ARNip frente a Cbl-b combinado con citocinas e interferones en el tratamiento de cáncer

5 La presente invención se refiere a procedimientos terapéuticos para la activación del sistema inmunitario innato, en particular de células NK.

10 Las células NK (células citotóxicas naturales) pertenecen a los linfocitos (subgrupo de los glóbulos blancos o leucocitos). Son capaces de reconocer y matar células anómalas, como células tumorales y células infectadas por virus. Las células NK no poseen receptores específicos de antígeno y pertenecen al sistema inmunitario innato. Las células NK reconocen entre otros el complejo MHC-I, que está presente en casi todas las células corporales sanas. Si una célula se infecta con virus o se transforma en una célula tumoral, entonces eventualmente puede perderse el complejo MHC-I en la superficie. Las células NK se desarrollan al igual que los otros linfocitos a partir de células linfáticas precursoras en la médula ósea y después circulan en el torrente sanguíneo.

15 Loeser y otros. (JEM (2007) doi:10.1084/iem.20061699) mostraron que Cbl-b es un regulador negativo, que es responsable de manera determinante para la "inmunorreactividad" de células T. Cbl-b suprime la activación de células T y es capaz de impedir una reacción autoinmunitaria. En ausencia de Cbl-b, sustancias administradas pero apenas inmunogénicas pueden conducir a la inducción de una respuesta inmunitaria fuerte. Además los ratones deficientes en Cbl-b (inactivación génica homocigótica) son viables y su sistema inmunitario es capaz de reconocer de manera eficaz tumores inducidos de manera autóloga y establecer contra esto una respuesta inmunitaria lítica basada sobre todo en células T CD8⁺. Sin embargo, la inactivación total descrita de la enzima condujo igualmente a una autoinmunidad elevada tras la inmunización con superantígenos.

20 Chiang y otros. (Journal of Clinical Investigation 117 (4) (2007): 1033-1034) escribieron que pueden usarse células T Cbl-b^{-/-} CD8⁺, para aumentar la reactividad anti-tumoral en ratones E.G7.

25 Kojo y otros. (PNAS 2009; 106(42): 17847-17851) describe un mecanismo influenciado por Cbl-b en una anergia desencadenada de manera artificial de células NKT.

30 El documento WO 2008/033403 A describe el aumento de la reactividad de células T CD8⁺ mediante la reducción de la actividad de Cbl-b. Se dan a conocer secuencias de ARN inhibitorias, en particular de ARNip, frente a Cbl-b.

35 El documento WO 2009/073905 A2 describe un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para el aumento de la reacción inmunitaria de células del sistema inmunitario, que se han puesto en contacto con un antígeno, que comprende la reducción o inhibición de la función Cbl-b de estas células, por lo que se aumenta la inmunorreactividad de las células frente al antígeno.

40 El documento WO 2010/119061 A1 se refiere a un procedimiento para la determinación intracelular de la expresión de Cbl-b.

Lametschwandtner y otros. (Journal of Immunotherapy 31 (9) (2008): 943) describen inmunoterapias que se basan en la supresión de Cbl-b en células T.

45 Wigginton y otros. (Expert Opinion on Biological Therapy 2002; 2(5): 513-524) describen la infiltración de tejido tumoral por células T CD8⁺ en el caso de la administración de IL-12 e IL-2.

50 Weiss y otros. (Expert Opinion on Biological Therapy, 2007; 7(11): 1705-1721) describen diferentes combinaciones de IL-12 con citocinas adicionales como principios activos frente a cáncer.

Lametschwandtner y otros. (J. of Immunotherapy 2010; 33(8): 899) describen que los efectos inmunopotenciadores de IL-7 sobre T células humanas tienen lugar debido a una activación de la ruta de señalización de STAT, y no debido a una represión de Cbl-b.

55 Stromnes y otros. (J. of Clinical Investigation 2010; 120(10): 3722-3734) muestran que la administración de células T Cbl-b^{-/-} CD8⁺ expandidas *ex vivo* en el caso de inmunoterapia adoptiva en ratones desencadena una reacción antitumoral *in vivo*.

60 Por tanto se conocía que células T, es decir, células del sistema inmunitario adaptativo, pueden activarse por medio de la inhibición de Cbl-b para fomentar una respuesta inmunitaria. Un fomento de este tipo de la respuesta inmunitaria es de interés terapéutico especialmente para enfermedades crónicas graves, en las que la actividad insuficiente del sistema inmunitario es causal para el desarrollo de la enfermedad. Tales enfermedades son por ejemplo enfermedades tumorales o infecciones crónicas. Sin embargo, precisamente respuestas inmunitarias eficaces en estas enfermedades requieren una interacción eficaz del sistema inmunitario adaptativo y del innato, en el que en particular para la activación de células NK todavía no están disponibles suficientes enfoques de

65 tratamiento de manera clínica.

Por tanto, un objetivo prioritario es encontrar nuevos procedimientos, que a través de la activación del sistema inmunitario innato, haciendo referencia especial a células NK, por consiguiente puedan conducir a una efectividad fuertemente mejorada de respuestas inmunitarias.

5 Según la invención este objetivo se alcanzó mediante la inhibición de Cbl-b en células NK.

La invención se define mediante las reivindicaciones independientes. Todos los aspectos y objetos que difieran se describen en este caso solo para fines explicativos, y afirmaciones de que estas son parte de la invención o similares, deben considerarse en el contexto de la solicitud tal como se ha entregado y no modifican el campo de protección de las reivindicaciones.

En un primer aspecto la invención se refiere a un inhibidor de Cbl-b seleccionado de ácidos nucleicos inhibidores, que reducen o inhiben la expresión de Cbl-b, en combinación con al menos una citocina o un interferón seleccionado de

- IL-2 y una o varias citocinas o interferones adicionales seleccionados de IL-12, IL-23, IFN-alfa e IFN-beta, o
- IFN-alfa y una o varias citocinas adicionales seleccionadas de IL-15 e IL-21, o
- IL-12 e IL-7, o
- IL-12 e IL-15,

25 para su uso en el tratamiento terapéutico de cáncer en un paciente que comprende la administración *in vivo* del inhibidor de Cbl-b a un paciente y/o la administración *ex vivo* de las citocinas y/o interferones a células NK del paciente, y que comprende la recirculación de células NK tratadas *ex vivo* al paciente.

30 “Administración de un inhibidor de Cbl-b” o “inhibición de Cbl-b” son términos, que en el presente documento, en particular en el caso de la descripción de formas de realización especiales, pueden usarse de manera intercambiable.

La combinación de inhibidor de Cbl-b según la invención puede usarse para inmunoterapias en un paciente, en particular para la activación del sistema inmunitario o del sistema inmunitario innato, especialmente mediada por células NK. En particular puede emplearse la divulgación para el tratamiento de cáncer, de una infección vírica, de una infección bacteriana, en particular de una infección crónica, especialmente de una infección crónica con bacterias intracelulares persistentes, o de una infección parasitaria, en particular de una micosis, en el paciente. La terapia puede ser una inmunoterapia de una enfermedad crónica, incluyendo infecciones crónicas. La infección puede afectar a uno o varios órganos, por ejemplo el hígado. Preferiblemente la infección es una infección vírica. Un ejemplo es hepatitis crónica, por ejemplo desencadenada por una infección vírica. Se prefiere especialmente el tratamiento de hepatitis B o hepatitis C. La activación de células NK según la invención por medio de la inhibición de Cbl-b es especialmente eficaz en el caso de enfermedades de este tipo. El paciente es preferiblemente un mamífero, especialmente un ser humano.

45 En particular en el caso de cáncer puede combinarse la activación de células NK según la invención con terapias convencionales. Muchas terapias frente a tumores, como por ejemplo radioterapia, quimioterapia o extracción tumoral operativa, están establecidas desde hace años y se perfeccionan y mejoran constantemente. Las terapias nuevas comprenden inmunoterapias y terapias, que seleccionan como diana marcadores específicos de células tumorales, en particular usando anticuerpos monoclonales. Precisamente el efecto de los últimos depende también esencialmente de la actividad de las células NK, que reconocen los anticuerpos unidos a células tumorales a través de determinantes de anticuerpos generales y posteriormente matan la célula tumoral. Por tanto, mediante la activación del sistema inmunitario innato a través del efecto de las células NK, se pone a disposición una estrategia adicional, que puede complementar y completar los enfoques hasta el momento para fomentar lo más ampliamente posible las reacciones inmunitarias, especialmente para combatir células cancerosas. En particular, terapias que tienen una influencia citotóxica directa sobre las células tumorales, por ejemplo quimioterapias o radioterapias, inducen la expresión de moléculas de la clase MHC y otros receptores inmunoactivadores, por ejemplo ligandos de NKG2D. Estas modificaciones celulares se reconocen por células del sistema inmunitario innato, en particular células NK, y conducen a su activación, que mediante la sinergia con la activación de células NK según la invención pueden lograr un efecto terapéutico esencialmente mayor.

60 Según esto la carcinomatosis que va a tratarse según la invención se selecciona preferiblemente de carcinomatosis del aparato reproductor, en particular cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata o cáncer de mama; carcinomatosis del aparato digestivo, en particular cáncer de estómago, cáncer de intestino, carcinoma rectal, cáncer de páncreas, cáncer de esófago y cáncer de hígado; cáncer de riñón, cáncer de piel, en particular melanomas, carcinomas de células basales y carcinomas del epitelio escamoso; neuroblastomas y glioblastomas, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, sarcomas, carcinoma de cabeza/cuello, carcinomas del epitelio escamoso,

linfomas y leucemias (usándose en el presente documento las expresiones “cáncer”, “tumor”, “carcinoma”, etc. siempre de manera sinónima y se refieren a enfermedades malignas).

El gen Cbl-b así como sus productos génicos se han descrito detalladamente en el estado de la técnica (UniGene Id. Hs.3144 y Hs.381921). Las secuencias de Cbl-b están publicadas por ejemplo en la base de datos de GenBank con el n.º de registro NM_008279 y NP_009112. Los anticuerpos anti-Cbl-b, ARNip e inhibidores antisentido están disponibles comercialmente. Determinados ARNip adecuados para la reducción o inhibición de la expresión de Cbl-b y por consiguiente también de la función Cbl-b se dan a conocer por ejemplo en el documento US 2007/0054355 con nucleótidos de ARN/ADN mixtos y una longitud de aproximadamente 20 bases.

Los inhibidores de Cbl-b son suficientemente conocidos en el estado de la técnica. Cualquier inhibidor de Cbl-b puede emplearse según la presente invención. El inhibidor de Cbl-b se selecciona de ácidos nucleicos inhibidores, en particular oligonucleótidos antisentido, en particular ARN antisentido, ARNip (ARN de interferencia pequeño) o ARNhp (ARN en horquilla pequeño). Los inhibidores de ácido nucleico pueden usarse como tal o en forma de vectores, que codifican y expresan la inhibición. Inhibidores de Cbl-b adecuados son por ejemplo antagonistas, aptámeros o intrámeros, preferiblemente se emplea ARNip de Cbl-b. La tecnología de ARNip para atenuar la expresión génica específica ya se ha descrito para Cbl-b. Los inhibidores de Cbl-b en el sentido de la presente invención son sustancias, que reducen o inhiben la expresión y/o la función de Cbl-b y pueden determinarse, tal como se conoce en el estado de la técnica (Loeser y otros. (JEM (2007) doi:10.1084/jem.20061699; Chiang y otros. (Journal of Clinical Investigation 117 (4) (2007): 1033-1034); Lametschwandner y otros. (Journal of Immunotherapy 31 (9) (2008): 943); Paolini y otros. (J Immunol. 15 de febrero de 2011;186(4):2138-47), o tal como se describe en los presentes ejemplos.

El documento US 2007/0087988 se refiere a un procedimiento para la regulación de HPK1, cuya expresión puede aumentarse mediante el aumento de la expresión de Cbl-b y viceversa (por ejemplo mediante inhibición por ARNip de Cbl-b).

Preferiblemente se reduce o inhibe la función Cbl-b mediante la reducción o inhibición de la expresión de Cbl-b. Los términos reducción o inhibición se refieren a la disminución de la función (o de la expresión) de Cbl-b en comparación con la función natural sin cambios, hasta la inhibición completa de la función. Preferiblemente se reduce la función (o expresión) en al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95%.

La reducción o inhibición de la función de Cbl-b tiene lugar en formas de realización preferidas de manera transitoria. Es decir la función se reduce solo temporalmente tal como se indica anteriormente y puede volver a recuperarse tras esto, por ejemplo mediante consumo o degradación de inhibidores, como por ejemplo ARNip de Cbl-b, o mediante neoformación o de células no alteradas por Cbl-b *in vivo*. A este respecto la reducción transitoria de Cbl-b en células inmunitarias también puede tener lugar de manera repetitiva, por ejemplo hasta lograr un éxito terapéutico.

Preferiblemente se reduce o inhibe la expresión de Cbl-b mediante el uso de ARN antisentido o ARNip de Cbl-b. Para esto se emplean secuencias cortas de ADN y/o de ARN complementarias a una parte de la secuencia de ARNm (Cbl-b) diana, de modo que estas por consiguiente se hibriden e inactiven. La longitud de estas secuencias es preferiblemente de al menos 15, 18, 20, 22, 25, 28, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 o 200 bases hasta la completa secuencia diana, preferiblemente hasta 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 500 o 300 bases. Preferiblemente se emplean las secuencias de SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y/u 8.

Igualmente puede reducirse o inhibirse la función de Cbl-b mediante un gran número de componentes adicionales conocidos, como por ejemplo mediante el uso de antagonistas, inhibidores, en particular aptámeros o intrámeros de Cbl-b. Cualquier antagonista o inhibidor, que suprime el efecto o la función de Cbl-b puede usarse según la invención para aumentar la inmunorreactividad de las células NK. Para la inhibición de Cbl-b también pueden usarse sustancias, que o bien inhiben específicamente la actividad enzimática de ligasa E3 o bien inhiben la asociación intracelular de Cbl-b con sus componentes de interacción o bien inhiben la expresión de Cbl-b. Preferiblemente se emplean antagonistas o inhibidores para la producción de un agente farmacéutico para el aumento según la invención de la inmunorreactividad de las células NK. Se posibilitan tratamientos de enfermedades con un sistema inmunitario suprimido o ineficaz, en particular cáncer o infecciones crónicas.

Se observó, que la inhibición de Cbl-b junto con otras sustancias estimulantes de células NK (activadores de células NK) causa un efecto sinérgico, que va más allá de los efectos esperados de los efectos aditivos de la inhibición de Cbl-b y activación de células NK. Por tanto, la administración del inhibidor de Cbl-b o la inhibición de Cbl-b tiene lugar preferiblemente junto con una sustancia estimulante de células NK adicional (activador de células NK). A continuación se emplean los términos “sustancia estimulante de células NK”, “sustancia activadora de células NK”, y “activador de células NK” de manera sinónima. Una sustancia estimulante de células NK de este tipo es una sustancia distinta del inhibidor de Cbl-b según la invención. Una sustancia estimulante de células NK es una sustancia, que en uno o varios ensayos *in vitro* adecuados causa una activación o estimulación de células NK. Preferiblemente, la sustancia estimulante de células NK causa la producción de IFN-gamma, y/o TNF-alfa, y/o la expresión en superficie de CD107a, por las células NK, independientemente de una inhibición de Cbl-b. Una producción de IFN-gamma, y/o TNF-alfa, y/o la expresión en superficie de CD107a de este tipo, puede medirse con

los métodos conocidos en el estado de la técnica (Fauriat Blood. 18 de marzo de 2010;115(11):2167-76; Dons'koi y otros., J Immunol Methods. 30 de septiembre de 2011;372(1-2):187-95.), o tal como se describe en los ejemplos de la presente invención. Igualmente puede someterse a prueba el efecto de las sustancias estimulantes de células NK mediante la determinación directa de la citotoxicidad o "actividad citocida" de las células NK (tal como se describe en el ejemplo 4, métodos correspondientes adicionales se conocen en el estado de la técnica (Beano y otros., J Transl Med. 16 de Mayo de 2008;6:25; Claus y otros., J Immunol Methods. 28 de febrero de 2009;341(1-2):154-64; Fujisaki y otros., Cancer Res. 1 de mayo de 2009;69(9):4010-7; Cho y otros., Clin Cancer Res. 1 de agosto de 2010;16(15):3901-9), es decir se determina la citotoxicidad de las células NK o PBMC frente a determinadas células objetivo o diana (en el ejemplo 4 células tumorales SKBR3), por ejemplo mediante la medición de la liberación de la enzima LDH del citosol de la célula tumoral como medida para la lisis celular. En el caso de una medición *in vitro* correspondiente preferiblemente se activan o estimulan las células NK, para poder medir un efecto de la inhibición de Cbl-b, por ejemplo mediante el contacto con células tumorales (por ejemplo K562), y/o mediante una sustancia estimulante de células NK (por ejemplo una o varias citocinas, como por ejemplo IL-2 y/o IL-12), y/o un anticuerpo (por ejemplo trastuzumab (Herceptin[®])).

Se da a conocer la administración conjunta del inhibidor de Cbl-b con un activador de células NK, seleccionado en particular de una citocina estimulante de células inmunitarias, por ejemplo de una citocina de las citocinas con cadena gamma comunes, en particular IL-2, IL-15, IL-21; citocinas que estimulan células del sistema inmunitario tanto adaptativo así como innato, en particular IL-12, IL-23, IL-27; citocinas de células efectoras como IL-1, IL-17, IL-18; un interferón, en particular interferón-alfa; o un estimulante de interferones; un anticuerpo, en particular un anticuerpo, que reconoce moléculas de la superficie de células tumorales, y/o un anticuerpo cuya región constante en el receptor de Fc correspondiente puede unirse a células NK; o un ligando de receptor de TLR o PAMP, en particular agonistas, preferiblemente de TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-7, TLR-8 o TLR-9, así como combinaciones de los activadores de células NK mencionados anteriormente. Con los términos "conjuntamente" o "junto con" o "en combinación con" o "combinado con" en relación con la administración de las sustancias dadas a conocer, se define la administración de al menos un inhibidor de Cbl-b y al menos un activador de células NK en un paciente, que puede tener lugar en forma de una (contiene al menos un inhibidor de Cbl-b y al menos un activador de células NK) o varias composiciones farmacéuticas distintas (conteniendo la una al menos un inhibidor de Cbl-b, la otra al menos un activador de células NK, y opcionalmente composiciones farmacéuticas adicionales). Si la administración tiene lugar por medio de varias composiciones farmacéuticas distintas, puede tener lugar la administración conjunta al mismo tiempo o con un desfase temporal. Se prefiere en particular la administración del inhibidor de Cbl-b junto con al menos un activador de células NK, en particular IL-2, IL-15, IL-12, IL-23, interferón, un estimulante de interferones, imiquimod y otros agonistas de TLR7/8, como por ejemplo resiquimod, nucleótidos ssPolyU, loxoribina, gardiquimod, CL075, CL097, CL264, 3M002; oligonucleótidos poli(I:C), oligonucleótidos CpG, ligandos de CD205 o ligandos de CD206, así como combinaciones de los mismos. Combinaciones preferidas de activadores de células NK, que pueden combinarse con la administración del inhibidor de Cbl-b, comprenden por ejemplo una citocina de las citocinas con cadena gamma comunes con uno de los otros activadores de células NK anteriores; o una citocina del sistema inmunitario adaptativo así como innato con uno de los otros activadores de células NK anteriores. Combinaciones según la invención son tales con una citocina de las citocinas con cadena gamma comunes y una citocina del sistema inmunitario adaptativo así como innato, concretamente que se administra el inhibidor de Cbl-b en combinación con IL-2 y uno adicional seleccionado de IL-12, IL-23, IFN-alfa e IFN-beta; en combinación con IFN-alfa y uno adicional de IL-15 e IL-21; en combinación con IL-12 e IL-7 o en combinación con IL-12 e IL-15.

Una citocina de las citocinas con cadena gamma comunes se selecciona de la familia de citocinas, que comparten la denominada cadena gamma de receptor de citocinas común o "*common cytokine-receptor gamma-chain*" (γ_c o CD132) en sus complejos de receptores, y está compuesta de diferentes miembros con una estructura similar con cuatro haces de hélices alfa. Esta familia comprende por ejemplo interleucina (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 y "linfopoyetina derivada de estroma tímico" (TSLP). Una citocina estimulante de células inmunitarias, una citocina del sistema inmunitario adaptativo así como del innato, una citocina de células efectoras, o un estimulante de interferones se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17a, IL-17f, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-lambda, TNF-alfa, y TNF-beta.

Una forma de realización especialmente preferida de la invención consiste en la administración de un inhibidor de Cbl-b junto con IL-2, opcionalmente con uno o varios activadores de células NK adicionales, en particular IL-12, IL-23, IFN-alfa y/o IFN-beta. Una forma de realización especialmente preferida adicional de la invención consiste en la administración de un inhibidor de Cbl-b junto con IFN-alfa, opcionalmente con uno o varios activadores de células NK adicionales, en particular IL-15 y/o IL-21. Una forma de realización especialmente preferida adicional de la invención consiste en la administración de un inhibidor de Cbl-b junto con IL-12, opcionalmente con uno o varios activadores de células NK adicionales, en particular IL-15 y/o IL-7.

Preferiblemente las sustancias estimulantes de células NK empleadas causan en células NK una producción de IFN-gamma y/o una producción de TNF-alfa, y/o una expresión en superficie de CD107a aumentada, y/o una citotoxicidad aumentada sobre células objetivo o diana. IFN-alfa, IL-12 o IL-23 causan por ejemplo especialmente fuertes respuestas a IFN-gamma en células NK. Sorprendentemente se observó que la activación de células NK

mediante la inhibición de Cbl-b con sustancias estimulantes de células NK que causan una producción de IFN-gamma generaba efectos sinérgicos especialmente fuertes, que va mucho más allá de los efectos esperados de las sustancias individuales.

5 Igualmente puede administrarse el inhibidor de Cbl-b junto con un anticuerpo por ejemplo frente a determinantes de células tumorales, opcionalmente combinado con uno o varios de los activadores inmunitarios enumerados anteriormente o una o varias de las sustancias estimulantes de células NK mencionadas anteriormente. La inhibición de Cbl-b en células NK así como la administración del activador de células NK adicional o del anticuerpo dirigido contra células tumorales puede tener lugar *in vivo* por ejemplo mediante la administración directa al paciente.

10 Preferiblemente el inhibidor de Cbl-b está unido a un ligando de una molécula de reconocimiento de células NK, por ejemplo de una molécula de la superficie de células NK. Un ligando de este tipo puede ser por ejemplo una proteína u otra biomolécula que se produce de manera natural o un derivado funcional de la misma, que puede unir células NK. En particular un ligando de este tipo puede ser un anticuerpo frente a una molécula de reconocimiento de células NK. Según la invención, preferiblemente se activan específicamente las células NK mediante la inhibición de Cbl-b, por ejemplo mediante el acoplamiento a un ligando de una molécula de reconocimiento de células NK de este tipo, *in vivo*. La activación "específica" de células NK debe entenderse como un efecto aumentado sobre las células NK en comparación con inespecíficas, por ejemplo administraciones de inhibidor de Cbl-b no controlado o no acoplado, que también pueden desarrollar efectos en otras células. En particular debe entenderse la activación "específica" de células NK como un efecto sobre en particular células NK en comparación con la administración de un inhibidor de Cbl-b solo (sin la administración conjunta con un activador de células NK), o en comparación con la administración de un inhibidor de Cbl-b, que no está unido a un ligando de una molécula de reconocimiento de células NK. Una administración inespecífica tiene lugar por ejemplo mediante una administración simple del inhibidor sin una administración adicional de estimulantes de células NK o modificaciones específicas de células NK del inhibidor mediante acoplamiento a una molécula de reconocimiento de células NK. Mediante la activación específica de células NK puede controlarse de manera dirigida la respuesta inmunitaria transmitida por células NK (sistema inmunitario innato) según la invención, con efectos secundarios menores o no deseados, por ejemplo mediante el sistema inmunitario adaptativo.

30 Por el término "anticuerpos" se entienden todos los anticuerpos que se producen de manera natural, como anticuerpos IgG, IgD, IgA, IgE, IgM, así como sus derivados funcionales, que comprenden por ejemplo fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios (scAb o scFv), o un fragmento de un dominio variable de anticuerpo, y que unen específicamente un antígeno, en este caso en particular una molécula de reconocimiento de células NK, o el receptor de Fc correspondiente a células NK o están dirigidas contra las mismas. Los anticuerpos según la invención presentan preferiblemente una región constante, en particular un dominio Fc, que puede unirse al receptor de Fc correspondiente a células NK. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos, que deben administrarse tal como se ha descrito anteriormente en una terapia en combinación con el inhibidor de Cbl-b según la invención, están dirigidos contra un epítipo de un agente patógeno, o un epítipo tumoral, y presentan preferiblemente un dominio Fc.

40 A las moléculas de reconocimiento de células NK preferidas pertenecen en particular aquellas que o bien solo aparecen específicamente en células NK o bien que se expresan de manera especialmente frecuente en células NK y dado el caso adicionalmente incluso en células inmunitarias adicionales cuya actividad puede aumentarse según lo deseado mediante la inhibición de Cbl-b por ejemplo CD2, CD8a, CD16, CD25, CD27, CD56, CD71, CD158, CD159, CD160, CD161, CD205, CD206, CD205, CD314, CD335, CD336, CD337. De esta manera puede acercarse el inhibidor de Cbl-b específicamente o bien a células NK o bien a células NK y subtipos relevantes adicionales de células inmunitarias en un paciente y absorberse por las células. Por consiguiente puede causarse que el inhibidor de Cbl-b solo sea terapéuticamente eficaz específicamente en las células objetivo deseadas.

50 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Cbl-b seleccionado de ácidos nucleicos inhibidores, que reducen o inhiben la expresión de Cbl-b, y

- IL-2 y una o varias citocinas o interferones adicionales seleccionados de IL-12, IL-23, IFN-alfa e IFN-beta, o

- 55 • IFN-alfa y una o varias citocinas adicionales seleccionadas de IL-15 e IL-21, o

- IL-12 e IL-7, o

- IL-12 e IL-15,

60 para su uso en el tratamiento terapéutico de cáncer en un paciente.

En una forma de realización preferida adicional, la composición comprende IL-2 e IL-12, o IL-2 e IFN-beta, o IL-2 e IL-23, o IL-12 e IL-7, o IL-12 e IL-15, o IFN-alfa e IL-2, o IFN-alfa e IL-15, o IFN-alfa e IL-21.

65 Preferiblemente la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente adecuado

para la administración intracelular en un paciente, en particular vehículos como formulaciones de liposomas o microsomas, que se prefieren en particular para la administración de ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender sales farmacéuticamente adecuadas, adicionalmente tampones, componentes de tonicidad o portadores farmacéuticamente adecuados. En particular los ácidos nucleicos inhibitorios, como ácidos nucleicos antisentido, ARNip, ARNhp, pueden preverse en sistemas de vectores terapéuticos adecuados. Las sustancias portadoras farmacéuticas sirven para conferir una mejor tolerancia de la composición y permiten una mejor solubilidad así como mejor biodisponibilidad de las sustancias activas. Ejemplos de esto son emulgentes, agentes espesantes, componentes redox, almidón, disoluciones alcohólicas, polietilenglicol o lípidos. La elección de un portador farmacéutico adecuado depende fuertemente del tipo de administración. Para administraciones orales pueden usarse portadores líquidos o sólidos, para inyecciones son ventajosas composiciones finales líquidas.

Preferiblemente el medicamento que va a emplearse según la invención comprende sustancias tamponantes o sustancias tónicas. Por medio de tampones puede ajustarse el valor de pH del medicamento a condiciones fisiológicas y posteriormente pueden disminuirse o tamponarse oscilaciones de pH. Un ejemplo para esto es un tampón fosfato. Las sustancias tónicas sirven para ajustar la osmolaridad y pueden comprender sustancias iónicas, como por ejemplo sales inorgánicas, como NaCl, o también sustancias no tónicas, como por ejemplo glicerina o hidratos de carbono.

Preferiblemente la composición que va a emplearse según la invención se prepara de manera adecuada para la administración sistémica, tópica, oral o intranasal. Estas formas de administración del medicamento de la presente invención permiten una absorción rápida y simple. Para la administración oral pueden tomarse por ejemplo medicamentos sólidos o líquidos directamente o disueltos o diluidos.

El medicamento que va a emplearse según la invención se prepara preferiblemente de manera adecuada para la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o subcutánea. Para esto son adecuadas por ejemplo inyecciones o transfusiones. Las administraciones directamente en el torrente sanguíneo tienen la ventaja de que los principios activos del medicamento se reparten por todo el cuerpo y alcanzan rápidamente los tejidos diana. Adicionalmente están previstas administraciones tópicas. En particular una administración directamente en o cerca del punto, en el que debe desencadenarse o potenciarse una respuesta inmunitaria, por ejemplo el lugar de una infección o de un tumor, tiene la ventaja de que la activación de células NK tiene lugar de manera prioritaria en el punto de destino.

Aparte de la administración *in vivo* también son posibles tratamientos *ex vivo* de células NK. Para esto se aíslan células NK de un paciente, se tratan y activan *ex vivo* según la invención y a continuación se recirculan de nuevo al paciente. Un procedimiento *ex vivo* de este tipo para el tratamiento de células del sistema inmunitario se describe por ejemplo en el documento WO 2009/073905, y puede usarse aplicándolo a células NK según la invención. Preferiblemente tiene lugar la variante *ex vivo* del procedimiento según la invención en combinación con los activadores de células NK adicionales mencionados anteriormente como citocinas estimulantes de células inmunitarias, en particular IL-2 y/o IL-12, un interferón o estimulante de interferones, un anticuerpo, o un ligando de receptor de TLR o PAMP, preferiblemente de TLR-2, TLR-7 o TLR-8, así como combinaciones de los mismos. Es posible, que o bien la inhibición de Cbl-b o bien los activadores de células NK adicionales se administren *ex vivo* a las células NK y la activación adicional tiene lugar *in vivo*, por ejemplo inhibición de Cbl-b *ex vivo* y administración *in vivo* del activador de células NK adicional, o al revés. Preferiblemente pueden realizarse ambas etapas, inhibición de Cbl-b y activación de células NK adicional, *ex vivo*. Las células NK aisladas y activadas pueden administrarse de manera dirigida en el punto de destino. Las células NK pueden aislarse *ex vivo*. Para la activación específica de células NK pueden enriquecerse *ex vivo* células NK en un aislado celular, por ejemplo PBMC, o aislarse del mismo.

El tratamiento *ex vivo* de las células NK también puede comprender una expansión, preferiblemente tal como se describe en el documento US 7.435.596 B2 o WO 2006/52534 A2. Para esto pueden ponerse en contacto por ejemplo células NK con células activadoras de células NK, que expresan el complejo MHC-I solo de manera reducida y expresan IL-15 unido a la membrana. Alternativa o adicionalmente pueden ponerse en contacto células NK con IL-15 o un anticuerpo frente al receptor de IL-15 y un ligando de CD137 o un anticuerpo frente a CD137. Esta expansión se realiza opcionalmente en combinación con los activadores de células NK adicionales mencionados como citocinas estimulantes de células inmunitarias.

La presente invención se representa adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse obligatoriamente a los mismos.

Figuras:

Figura 1: PBMC o fracciones celulares aisladas del mismo se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b y entonces se estimularon con IL-2 e IL-12 y se midió la producción de IFN-gamma tras 24 h.

Figura 2: PBMC o fracciones celulares aisladas del mismo se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, se estimularon por medio de coincubación con la línea celular tumoral K562 y se midió la producción de IFN-gamma tras 24 h.

Figura 3: Células NK aisladas se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, y estimularon por medio de K562 o IL-2 e IL-12 y se midió la producción de TNF-alfa tras 24 h.

5 Figura 4: PBMC se inhibieron con ARNip de Cbl-b, y se incubaron durante 4 h con la línea celular tumoral SKBR3 y tal como se indica adicionalmente con la adición de Herceptin o citocina. Entonces se determinó la citotoxicidad basándose en la enzima LDH celular liberada, que se midió por medio de ensayos enzimáticos.

10 Figura 5: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad frente a la estimulación por IFN-alfa: las células NK se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, y se estimularon por medio de IFN-alfa y se midió la producción de IFN-gamma tras 24 h.

15 Figura 6: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad frente a combinaciones de interleucinas e IFN-alfa: las células NK se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, y se estimularon por medio de IL-2, IL-7, IL-15 o IL-21 o bien solo o bien junto con IL-12, IL-23 o IFN-alfa y se midió la producción de TNF-alfa tras 24 h.

20 Figura 7: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad frente a combinaciones de IL-12 con diferentes citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas común: las células NK se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, y se estimularon por medio de IL-2, IL-7 o IL-15 o bien solo o bien junto con IL-12 y se midió la producción de IFN-gamma tras 24 h.

25 Figura 8: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad no sólo frente a combinaciones de IL-2 con IL-12, IL-23 e IFN-alfa o IFN-beta: las células NK se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, y se estimularon por medio de IL-23, IFN-alfa o IFN-beta o bien solo o bien en presencia de IL-2 y se midió la producción de IFN-gamma tras 24 h.

30 Figura 9: La reactividad aumentada de células NK tras el silenciamiento de Cbl-b frente a estimulación de citocinas conduce a un aumento del marcador de activación CD69 sobre la superficie celular: las células NK se inhibieron por medio de ARNip de Cbl-b, y se estimularon por medio de IL-2 y o bien IFN-alfa o bien IL-12 y se determinó la expresión de CD69 tras 48 h.

Ejemplo 1: Secuencias

Las siguientes secuencias de ARNip se emplearon para la inhibición de Cbl-b:

- 35 A. Secuencia sentido:
 GUACUGGUCCGUUAGCAAUUU (SEQ ID n.º 1)
- 40 Secuencia antisentido:
 5'-PUUUGCUAACGGACCAGUACUU (SEQ ID n.º 2)
- B. Secuencia sentido:
 45 GGUCGAAUUUUGGGUUAUUUU (SEQ ID n.º 3)
- Secuencia antisentido:
 50 5'-PUAAUACCCAAAUUCGACCUU (SEQ ID n.º 4)

Ejemplo 2: Inhibición de Cbl-b en células NK

55 Por medio de tubitos CPT (Vacutainer) se le extrajo sangre completa a un donante y de esta se separó PBMC mediante centrifugación. A partir de PBMC se aislaron células NK (incluyendo la fracción CD8⁺ CD3⁻) y después las células T CD8 y CD4 por medio de selección magnética. Por medio de FACS se verificó que la pureza de las poblaciones celulares correspondientes era de al menos el 90%. Se transfectaron tanto las PBMC así como las fracciones celulares aisladas de las mismas con ARNip de Cbl-b usando un aparato de transfección de Amaxa y se estimularon con IL-2 (50 ng/ml) e IL-12 (10 ng/ml) humanas recombinantes durante la noche en medio Xvivo15 (figura 1). La secreción de IFN-gamma de las células tratadas de este modo se midió entonces por medio de ELISA. El resultado muestra claramente que la producción de IFN-gamma fuertemente aumentada de PBMC inhibidas por Cbl-b tras la estimulación por IL-2 e IL-12 puede asignarse inequívocamente a la reacción de las células NK.

Ejemplo 3: Inhibición de Cbl-b en células NK y coestimulación

65 Una posibilidad de coestimular células NK es a través de líneas celulares tumorales, cuya expresión aberrante de

marcadores en superficie ya no puede mantener el equilibrio correspondiente entre receptores de NK inhibitorios y activadores y que por consiguiente causan una activación de las células NK, por ejemplo la línea celular tumoral K562. Se aislaron PBMC así como las células CD8 y NK tal como se ha descrito anteriormente y se transfectaron con ARNip de Cbl-b. Se incubaron entonces 1×10^5 de estas células transfectadas o bien solas (sin estimular) o bien con en cada caso 6×10^4 células tumorales K562 en medio Xvivo durante la noche y se determinó la secreción de IFN-gamma del mismo modo que anteriormente. La incubación de PBMC inhibidas por Cbl-b con esta línea celular tumoral condujo igualmente de nuevo a una fuerte producción de IFN-gamma y a su vez pudo atribuirse la producción de IFN-gamma claramente al aporte de las células NK (figura 2). Ambos métodos de estimulación también condujeron a un aumento de la producción de TNF-alfa de células NK tras la inhibición de Cbl-b (figura 3).

Ejemplo 4: Citotoxicidad tumoral mediante la inhibición de Cbl-b en células NK

Una de las funciones principales de las células NK en el contexto de la aparición de tumores es la destrucción directa de células tumorales. Por tanto se sometió a prueba si las PBMC inhibidas por Cbl-b son más capaces de destruir células tumorales. Como línea celular objetivo o diana se empleó a este respecto la línea de carcinoma de mama SKBR3 positiva para Her2, dado que en este contexto también puede someterse a prueba el anticuerpo frente a Her2 empleado en la terapia antitumoral (trastuzumab o Herceptin). Se volvieron a aislar PBMC tal como se ha descrito anteriormente y se transfectaron con ARNip de Cbl-b y se incubaron o bien solas o bien con 4×10^4 células SKBR3 en medio Xvivo durante 4 h. Adicionalmente en las condiciones especificadas con Herceptin se añadieron $10 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos Herceptin así como en las condiciones especificadas con IL-2 e IL-12 se estimularon tal como se ha descrito anteriormente. La citotoxicidad de las PBMC sobre las células tumorales SKBR3 se determinó entonces mediante la medición colorimétrica de la liberación de la enzima LDH del citosol de la célula tumoral. Se determinó y se restó la liberación espontánea de esta enzima de las PBMC o las células tumorales, tal como se recomienda por el fabricante del kit de medición de colorimetría (Biovision), a partir de las condiciones de control individuales correspondientes. A este respecto se mostró que la lisis celular mediante las células inmunitarias inhibidas por Cbl-b era principalmente mayor que mediante las células tratadas con ARNip de control, en la que en particular la estimulación simultánea con IL-2 e IL-12 conducía a un aumento significativo de la lisis de células tumorales (figura 4).

Estos resultados *in vitro* mostraron por tanto, que es posible la inhibición simultánea de Cbl-b en células del sistema inmunitario adaptativo y del innato *ex vivo* en PBMC humanas sin separar, y adicionalmente conducen a la conclusión de que la inhibición de Cbl-b en células NK crea una base racional para la combinación de la inhibición de Cbl-b con terapias frente a tumores como la administración de IL-2 recombinante o anticuerpos terapéuticos dirigidos contra antígenos tumorales.

Ejemplo 5: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad frente a la estimulación por IFN-alfa

Se aislaron las células NK obtenidas en PBMC como en el ejemplo 2 y se silenciaron por medio de ARNip. Las secuencias de ARNip dirigidas contra Cbl-b empleadas a este respecto eran:

ARNip de Cbl-b 1:

5' - CUCUAUUUGCGGAAUUA - 3' (SEQ ID n.º 5)

3' - AAUUCGCAAAAUAGAGC - 5' (SEQ ID n.º 6)

ARNip de Cbl-b 2:

5' - GUGAGAAUGAGUACUUUAAA - 3' (SEQ ID n.º 7)

3' - ACACUCUUACUCAUAAGAUU - 5' (SEQ ID n.º 8)

A continuación de esto se estimularon las células o bien sin citocina o bien con IFN-alfa durante la noche (5 o 50 ng/ml tal como se indica en la figura 5) y se midió entonces la secreción de IFN-gamma de las células tratadas de este modo por medio de ELISA. El resultado muestra claramente que la inhibición de Cbl-b en células NK conduce a una producción de IFN-gamma fuertemente aumentada (figura 5). La producción de IFN-gamma de células T y NK en el hígado se ha definido como uno de los factores causales de la eficacia de la terapia con IFN-alfa en el tratamiento de infecciones de hepatitis crónicas. Por consiguiente existe un fundamento para una terapia de combinación de silenciamiento de Cbl-b con terapia sistémica con IFN-alfa, en particular en los casos en los que la terapia convencional con IFN-alfa solo no basta para la curación completa.

El hígado es principalmente un órgano diana ideal para terapias con ARNip, dado que puede modificarse bien la expresión génica en el hígado mediante la administración sistémica de ARNip. En el caso figurativo por tanto es posible tanto una inhibición de Cbl-b en células NK mediante una administración sistémica directa de ARNip específico de Cbl-b así como una terapia celular mediante la transferencia de células NK silenciadas *ex vivo*, dado

que hay que partir de la base de que estas migran tras la refusión intravenosa de manera suficiente a la zona del hígado enfermo.

Ejemplo 6: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad frente a combinaciones de IL-2 con IFN-alfa o IL-12/IL-23.

Dado que en los ejemplos 2 y 5 pudo mostrarse que la inhibición de Cbl-b en células NK conducía a una capacidad de estimulación aumentada mediante IFN-alfa o IL-2 e IL-12, se realizó un análisis esquematizado de la capacidad de estimulación de células NK con Cbl-b silenciado. IL-2 es un miembro de la denominada familia “*common cytokine receptor gamma-chain*”. Miembros adicionales de esta familia son entre otros IL-7, IL-15 e IL-21. IL-23 a su vez es, en distintos aspectos, estructural y funcionalmente similar a IL-12, y de ese modo se produce como IFN-alfa e IL-12 por células dendríticas activadas, que de esta manera entre otros también desempeñan un papel esencial en la activación de células NK. Por tanto en este experimento se estimularon las células NK con las citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 o bien solas o bien junto con IL-12, IL-23 o IFN-alfa. En comparación también se añadieron las citocinas DC IL-12, IL-23 e IFN-alfa sin citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas. Además se aislaron las células NK obtenidas en PBMC como en el ejemplo 5 y se silenciaron por medio de ARNip (con ARNip de Cbl-b 2) y se compararon directamente las células NK tratadas con control o con Cbl-b silenciado entre sí. Las células NK se estimularon con las citocinas durante la noche tal como se indica (todas las citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas 50 ng/ml, las citocinas DC IL-12, IL-23 e IFN-alfa 10 ng/ml). Como lectura se eligió TNF-alfa (determinación mediante ELISA), dado que TNF-alfa es una citocina clave en reacciones inmunitarias y su producción no es tan dependiente de IL-12 como IFN-gamma. Los resultados en la figura 6 muestran que la inhibición de Cbl-b de células NK conduce a una activación esencialmente mayor y por consiguiente una mayor producción de TNF-alfa. Especialmente fuerte era la producción de TNF-alfa, cuando se coestimularon las células NK con Cbl-b silenciado con combinaciones de IL-2 y una citocina DC como IL-12, IL-23 e IFN-alfa. Sin embargo se mostró que también otras citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas, especialmente IL-15 en presencia de IFN-alfa, conducían a una reacción esencialmente mayor de células NK con Cbl-b silenciado. Dado que la producción de citocinas DC como IL-12, IL-23 e IFN-alfa *in vivo* se estimula sobre todo mediante componentes de patógenos que actúan como ligandos de TLR, existe por tanto un fundamento terapéutico de emplear la inhibición de Cbl-b de células NK o bien en la situación de infecciones crónicas o bien emplearla en la terapia de enfermedades tumorales con ligandos de TLR artificiales (por ejemplo ligandos de TLR7/8 como imiquimod o ligandos de TLR9 como CpG). El estímulo adicional mediante citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas IL-2 o IL-15 *in vivo* se puede transmitir a este respecto por ejemplo mediante inmunización con vacunas anti-tumorales, que conducen a una producción de IL-2 e IL-15 mediante células T específicas de antígeno activadas, o mediante la administración terapéutica directa al paciente.

Ejemplo 7: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad frente a combinaciones de IL-12 con diferentes citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas común.

Dado que en el ejemplo 6 se pudo mostrar que la inhibición de Cbl-b en células NK puede conducir a una capacidad de estimulación aumentada mediante diferentes citocinas con cadena gamma de receptor de citocinas, especialmente cuando se usan en combinación con citocinas que habitualmente producen DC, se sometió a prueba si aparte de IL-2 también IL-7 o IL-15 junto con IL-12, el factor clave para la inducción de IFN-gamma, podían conducir a una producción aumentada de esta citocina. Además se aislaron las células NK obtenidas en PBMC como en el ejemplo 5 y 6, se silenciaron y se estimularon con las citocinas IL-2 (50 ng/ml), IL-7 e IL-15 (en cada caso 20 ng/ml) o bien solas o bien en presencia de IL-12 (10 ng/ml) durante la noche tal como se indica. La producción de IFN-gamma se determinó por medio de ELISA. Los resultados en la figura 7 muestran que las células NK con Cbl-b silenciado son capaces de presentar una reacción esencialmente más fuerte en forma de producción de IFN-gamma en las 3 citocinas sometidas a prueba con cadena gamma de receptor de citocinas en presencia de IL-12. Igualmente se mostró que solo las células NK con Cbl-b silenciado eran capaces de presentar una producción medible de IFN-gamma debido solo a estimulación con IL-2. IL-2 se ha autorizado para la terapia de determinadas enfermedades tumorales malignas, pero solo muestra en una pequeña proporción de los pacientes un efecto suficiente. La inhibición de Cbl-b en células NK es según esto una estrategia potencial de mejorar la eficacia de IL-2 en la terapia antitumoral. Adicionalmente las células NK con Cbl-b silenciado son capaces de reaccionar de manera esencialmente más fuerte a la presencia de IL12 e IL-7 o IL-15.

Ejemplo 8: El silenciamiento de Cbl-b en células NK aumenta la reactividad no sólo frente a combinaciones de IL-2 con IL-12, IL-23 e IFN-alfa sino también con IFN-beta.

Dado que en el ejemplo 6 se mostró que la inhibición de Cbl-b en células NK conducía a una capacidad de estimulación aumentada mediante IL-2 e IFN-alfa, también se sometió a prueba si IFN-beta era capaz de provocar un efecto del mismo tipo. Además se aislaron las células NK obtenidas en PBMC como en el ejemplo 6, se silenciaron y se estimularon con las citocinas IL-23, IFN-alfa o IFN-beta y o bien solas o bien en presencia de IL-2 (50 ng/ml) durante la noche tal como se indica. La producción de IFN-gamma se determinó por medio de ELISA. Los resultados en la figura 8 muestran que las células NK con Cbl-b silenciado son capaces de presentar una reacción esencialmente más fuerte en forma de producción de IFN-gamma en las 3 citocinas sometidas a prueba en presencia de IL-2.

Ejemplo 9: La reactividad aumentada de células NK tras el silenciamiento de Cbl-b frente a estimulación de citocinas conduce a un aumento del marcador de activación CD69 sobre la superficie celular

5 Dado que en los ejemplos se ha mostrado anteriormente que células NK con Cbl-b silenciado reaccionan mediante una producción de citocina aumentada, se evaluó como un parámetro adicional la expresión del marcador de activación CD69 sobre la superficie celular por medio de FACS. Además se aislaron las células NK obtenidas en PBMC como en el ejemplo 6, se silenciaron y se estimularon con las citocinas IL-2 y o bien IFN-alfa o bien IL-12. Tras 2 días se recogieron las células y se evaluó la expresión en superficie de CD69 por medio de FACS en un citómetro FC500. Como prueba de la especificidad de la tinción se contratiñeron las células por medio de CD56-PE-Cy5 y CD3-FITC y se tiñeron con CD69-PE o un control de isotipo correspondiente (los anticuerpos se aplicaron de manera habitual según la especificación de trabajo recomendada del fabricante Beckman-Coulter). La figura 9A muestra como ejemplo la expresión de CD69 aumentada de células NK con Cbl-b silenciado en comparación con las tratadas con control, habiéndose tratado ambas con IFN-alfa e IL-2 en el histograma de superposición. La figura 9B resume la valoración cuantitativa de la expresión de CD69 para la estimulación con IL-2 y o bien IFN-alfa o bien IL-12. A este respecto se muestra coincidiendo con los datos de los ejemplos anteriores, que células NK con Cbl-b silenciado son hiperreactivas frente a la estimulación con estas citocinas, y esta reactividad aumentada se manifiesta directamente de manera celular en la regulación por incremento potenciada del marcador de activación CD69.

20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> APEIRON BIOLOGICS AG

25 <120> Procedimiento para la activación de células NK

<130> r60068

<150> EP10197146.3

30 <151> 2010-12-28

<160> 8

<170> BiSSAP 1.0

35

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<222> 1..21

<223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencia artificial"

45

<400> 1

guacuggucc guuagcaau u 21

<210> 2

50

<211> 21

<212> ARN

<213> secuencia artificial

<220>

55

<221> fuente

<222> 1..21

<223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencia artificial"

<400> 2

60

uuugcuaacg gaccaguacu u 21

<210> 3

65

<211> 21

<212> ARN

<213> secuencia artificial

ES 2 622 958 T3

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencia artificial"
 5
 <400> 3
 ggucgaauuu uggguauuu u 21
 <210> 4
 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencia artificial"
 <400> 4
 20 uaaauaccaa aauucgaccu u 21
 <210> 5
 <211> 17
 <212> ARN
 25 <213> secuencias artificiales
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..17
 30 <223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencias artificiales"
 <400> 5
 cucuauuugc ggaauua 17
 35 <210> 6
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> secuencias artificiales
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencias artificiales"
 45 <400> 6
 cgagauaaaa cgccuuaa 18
 <210> 7
 <211> 20
 50 <212> ARN
 <213> secuencias artificiales
 <220>
 <221> fuente
 55 <222> 1..20
 <223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencias artificiales"
 <400> 7
 60 gugagaauga guacuuuaa 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> secuencias artificiales
 65 <220>

ES 2 622 958 T3

<221> fuente

<222> 1..20

<223> /tipo_mol="ARN" /nota="ARNip" /organismo="secuencias artificiales"

5

<400> 8

uuagaauacu caucucaca

20

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de Cbl-b seleccionado de ácidos nucleicos inhibidores, que reducen o inhiben la expresión de Cbl-b, en combinación con al menos una citocina o un interferón seleccionado de
- 5
- IL-2 y una o varias citocinas o interferones adicionales seleccionados de IL-12, IL-23, IFN-alfa e IFN-beta, o
 - IFN-alfa y una o varias citocinas adicionales seleccionadas de IL-15 e IL-21, o
- 10
- IL-12 e IL-7, o
 - IL-12 e IL-15,
- 15
- para su uso en el tratamiento terapéutico de cáncer en un paciente, que comprende la administración *in vivo* del inhibidor de Cbl-b a un paciente y/o la administración *ex vivo* del inhibidor de Cbl-b a células NK del paciente, por lo que se inmunoactivan las células NK, y que comprende la administración *in vivo* de las citocinas y/o interferones a un paciente y/o la administración *ex vivo* de las citocinas y/o interferones a células NK del paciente, y que comprende la recirculación de células NK tratadas *ex vivo* al paciente.
- 20
2. Combinación de inhibidor de Cbl-b para su uso, según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el inhibidor de Cbl-b se selecciona de oligonucleótidos antisentido, ARNip o ARNhp.
3. Combinación de inhibidor de Cbl-b para su uso, según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** el inhibidor de Cbl-b se administra en combinación con IL-2 e IL-12, IL-2 e IFN-beta, IL-2 e IL-23, o IL-2 e IFN-alfa.
- 25
4. Combinación de inhibidor de Cbl-b para su uso, según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** el inhibidor de Cbl-b se administra en combinación con IL-12 y una o varias citocinas adicionales seleccionadas de IL-2, IL-15 e IL-7.
- 30
5. Combinación de inhibidor de Cbl-b para su uso, según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** el paciente se selecciona de un mamífero o un ser humano.
6. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Cbl-b seleccionado de ácidos nucleicos inhibidores, que reducen o inhiben la expresión de Cbl-b, y
- 35
- IL-2 y una o varias citocinas o interferones adicionales seleccionados de IL-12, IL-23, IFN-alfa e IFN-beta, o
 - IFN-alfa y una o varias citocinas adicionales seleccionadas de IL-15 e IL-21, o
- 40
- IL-12 e IL-7, o
 - IL-12 e IL-15,
- 45
- para su uso en el tratamiento terapéutico de cáncer en un paciente.
7. Composición, según la reivindicación 6, **caracterizada por que** el inhibidor de Cbl seleccionado de oligonucleótidos antisentido, es ARNip o ARNhp.
8. Composición, según la reivindicación 6 o 7, que comprende IL-2 e IL-12, o IL-2 e IFN-beta, o IL-2 e IL-23, o IL-12 e IL-7, o IL-12 e IL-15, o IFN-alfa e IL-2, o IFN-alfa e IL-15, o IFN-alfa e IL-21.
- 50
9. Composición, según una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Composición, según la reivindicación 9, **caracterizada por que** el portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración intracelular en un paciente.
- 55
11. Composición, según la reivindicación 9 o 10, **caracterizada por que** el portador farmacéuticamente aceptable es una formulación de liposomas o microsomas.

Fig. 1

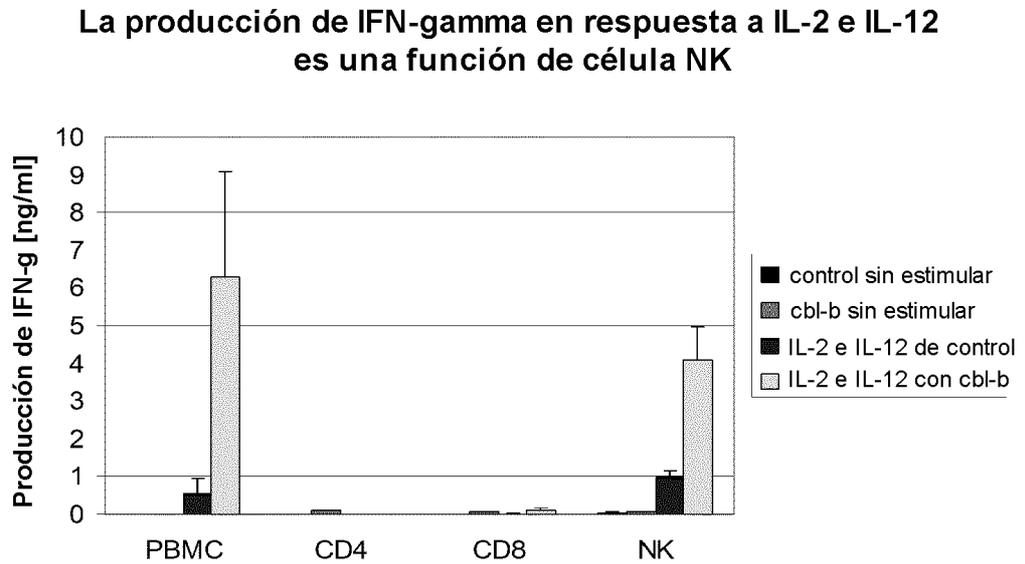


Fig. 2

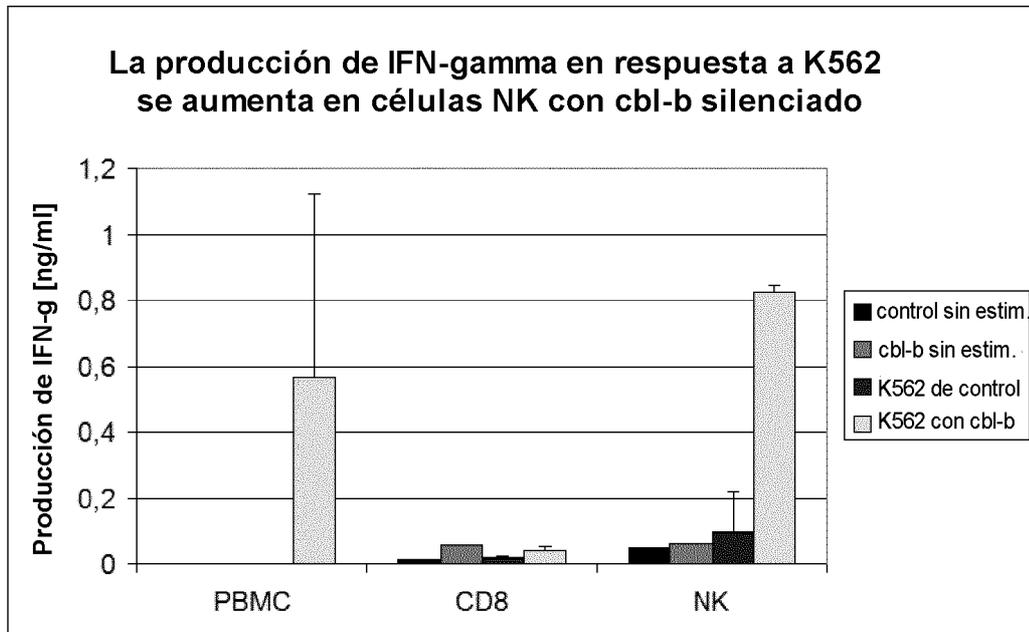


Fig. 3

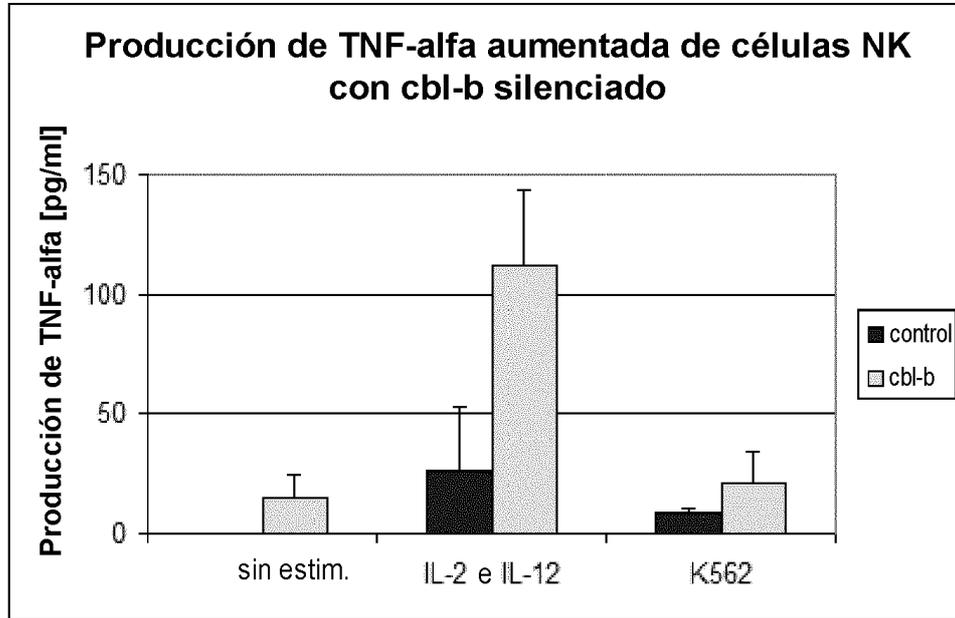


Fig. 4

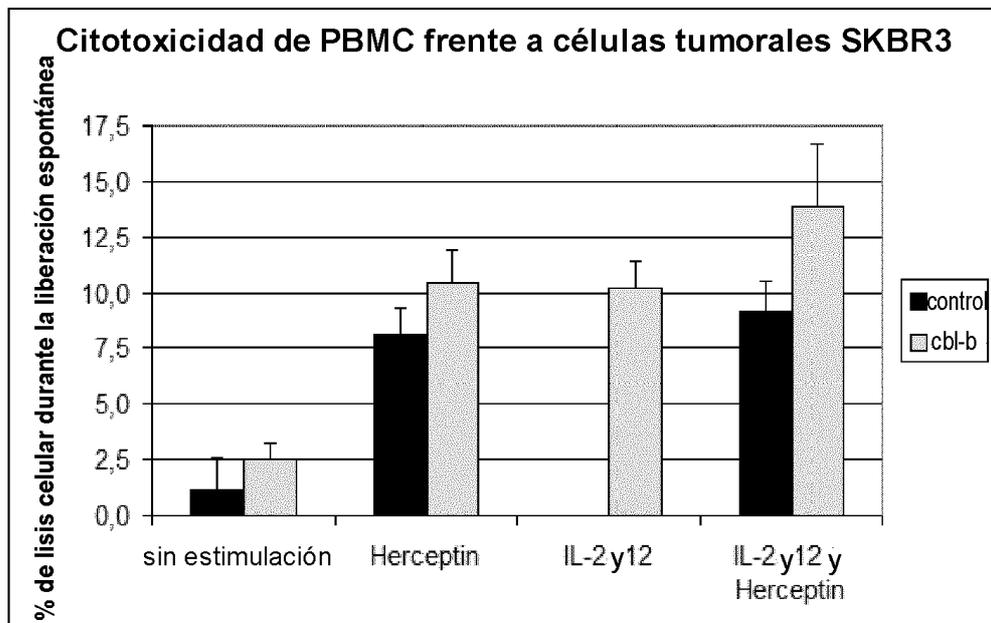


Fig. 5:

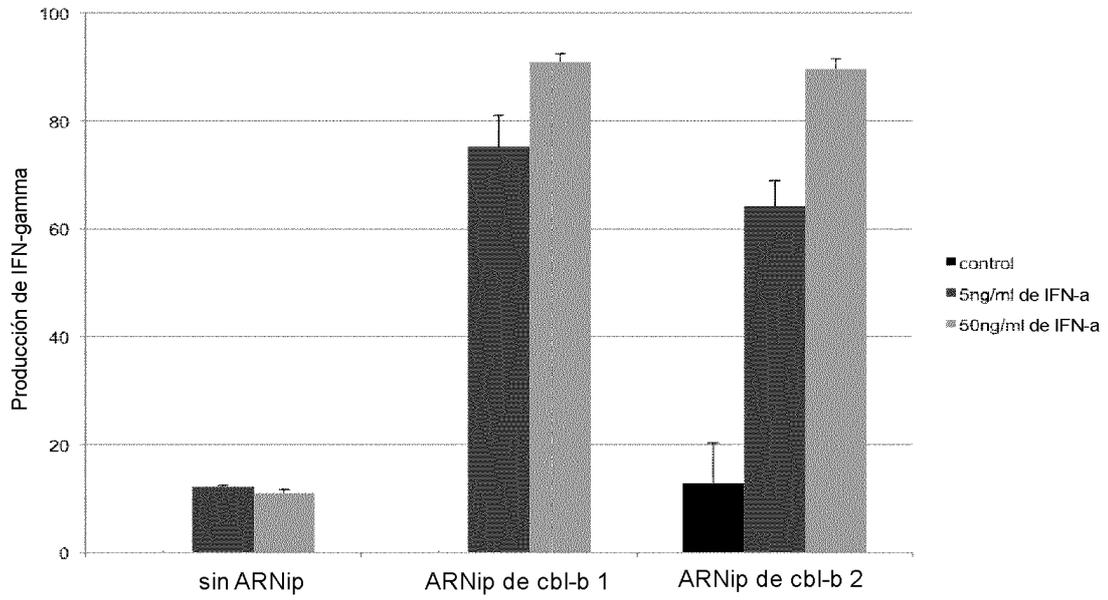


Fig. 6:

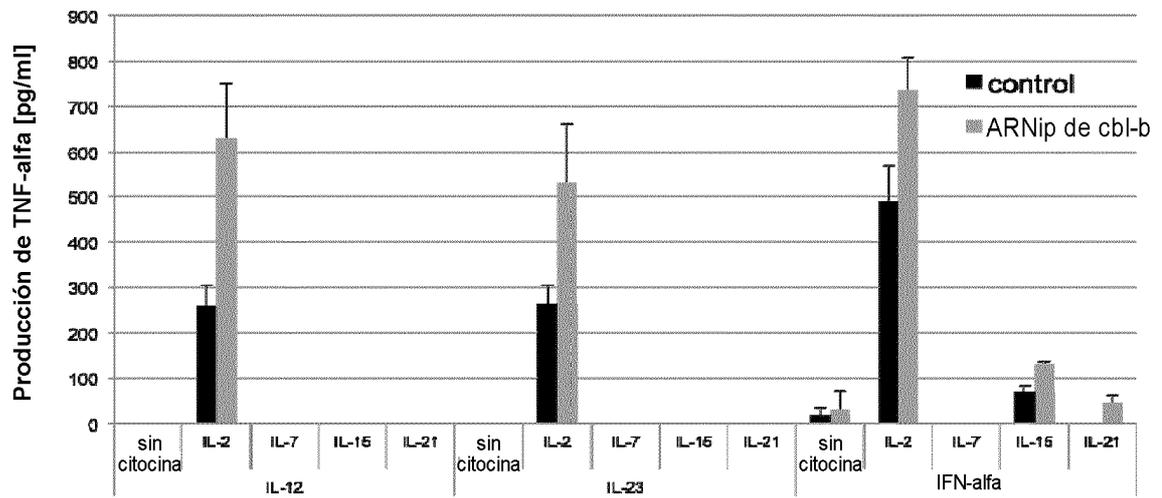


Fig. 7:

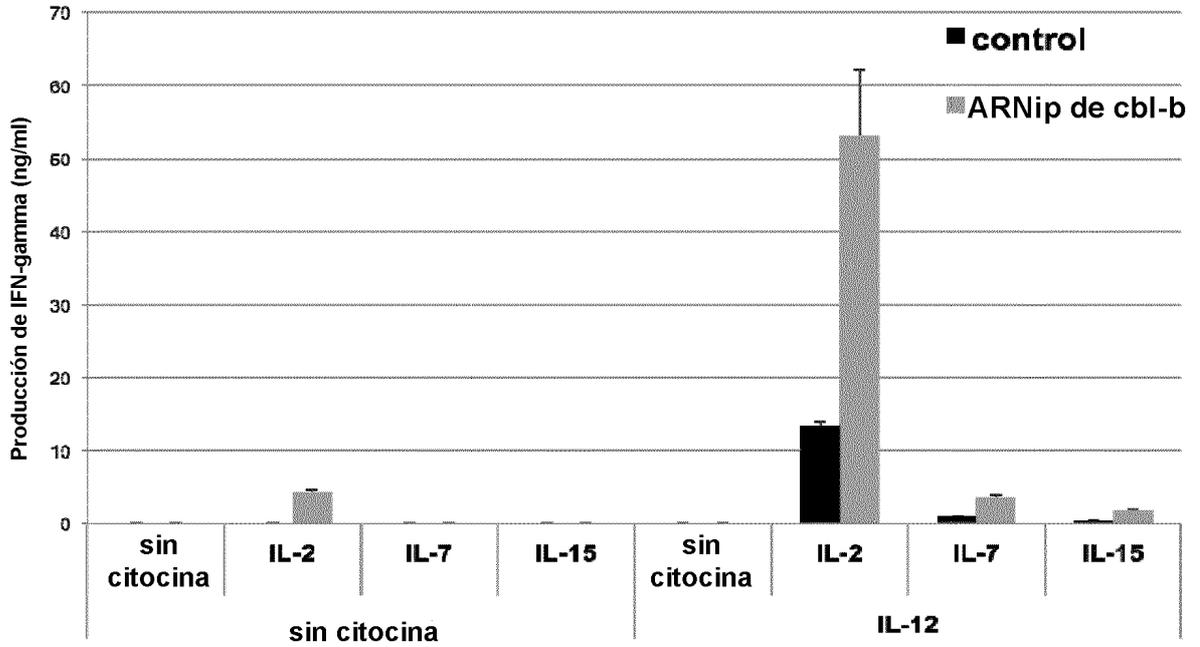


Fig. 8:

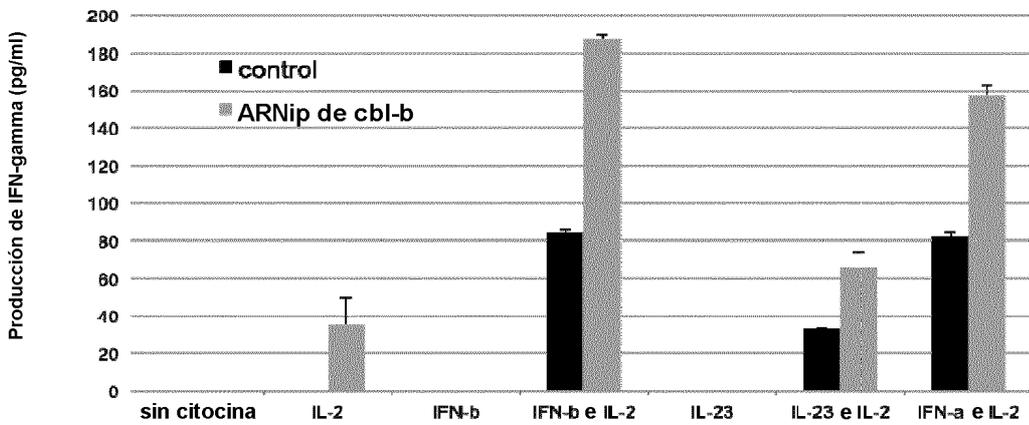


Fig. 9:

