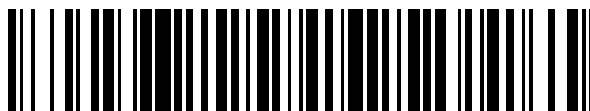


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 154**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2015** **PCT/EP2015/074271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016** **WO16062722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2015** **E 15784628 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 3209778**

54 Título: **Combinación**

30 Prioridad:

24.10.2014 US 201462068141 P

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

14.10.2019

73 Titular/es:

ASTRAZENECA AB (100.0%)
151 85 Södertälje, SE

72 Inventor/es:

WOESSNER, RICHARD;
MCCOON, PATRICIA ELIZABETH y
LYNE, PAUL DERMOT

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 727 154 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

Combinación

Listado de secuencias

La presente solicitud está siendo presentada junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico.

5 Campo

Como se divulga en el presente documento, se proporcionan aquí los métodos, compuestos y composiciones para el tratamiento del cáncer, por ejemplo el linfoma de células B, en un animal, mediante la administración de un agente capaz de inhibir la expresión de ARNm o proteína STAT3 y un agente inmunomodulador. En realizaciones particulares, el agente capaz de inhibir la expresión de ARNm o proteína STAT3 es selectivo para inhibir la expresión de ARNm o proteína STAT3. Como se divulga en el presente documento, la terapia de combinación implica la administración a un paciente que lo necesite, un compuesto antisentido dirigido a STAT3 y un agente (tal como un anticuerpo) capaz de inhibir la unión del ligando PD-L1 a su receptor. Tales métodos, compuestos y composiciones son útiles para tratar, prevenir o mejorar el linfoma de células B y otros cánceres que son susceptibles de responder con un inhibidor del punto de regulación inmunitario.

15 Antecedentes de la invención

El papel del sistema inmunitario, en particular la citotoxicidad mediada por células T, en el control de tumores es bien reconocido. Existe una creciente evidencia de que las células T controlan el crecimiento y la supervivencia del tumor en pacientes con cáncer, tanto en las etapas tempranas como tardías de la enfermedad. Sin embargo, las respuestas de células T específicas de tumores son difíciles de montar y mantener en pacientes con cáncer.

20 Las rutas de células T que reciben atención significativa a la señal de la fecha a través del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, CD152), ligando 1 de muerte programada (PD-L1, también conocido como B7-H1 o CD274) y OX40 (CD134; TNFRSF4) .

CTLA-4 se expresa en las células T activadas y sirve como un co-inhibidor para mantener las respuestas de las células T bajo control después de la activación de las células T mediadas por CD28. Se cree que CTLA-4 regula la amplitud de la activación temprana de las células T ingenuas y de memoria después del acoplamiento con TCR y es parte de una ruta inhibitoria central que afecta tanto a la inmunidad como a la autoinmunidad antitumoral. CTLA-4 se expresa exclusivamente en las células T, y la expresión de sus ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), se restringe en gran medida a las células que presentan antígenos, células T y otras células mediadoras inmunitarias. CTLA-4 pertenece a una clase de moléculas conocidas como proteínas reguladoras inmunes. Se ha informado que los anticuerpos anti-CTLA-4 antagonistas que bloquean la ruta de señalización de CTLA-4 mejoran la activación de las células T. Uno de tales anticuerpos, el ipilimumab, fue aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico. Otro anticuerpo anti-CTLA-4, el tremelimumab, se probó en ensayos de fase III para el tratamiento del melanoma avanzado, pero no aumentó significativamente la supervivencia general de los pacientes en comparación con el estándar de cuidado (temozolomida o dacarbazina) en ese momento.

PD-L1 y PD1 pertenecen a una clase de moléculas conocidas como proteínas reguladoras inmunes. Estas proteínas son pares de ligando-receptor unidos a la superficie celular que, en individuos sanos, amortiguan las respuestas inmunitarias para prevenir una reacción excesiva del sistema inmunitario. Las células cancerosas a menudo secuestran el mecanismo regulador inmunitario de PD-L1-PD1 normal mediante la sobreexpresión del ligando PD-L1, que se une a PD1 en las células T CD8 efectoras, evitando así que las células T desarrollen una respuesta inmune al tumor. PD-L1 se expresa en un amplio rango de cánceres con una alta frecuencia. La sobreexpresión del tumor PD-L1 se correlaciona con un pronóstico desfavorable en un número de cánceres (véase, por ejemplo, Hamid and Carvajal. Expert Opin. Biol. Ther. 13 (6): 847-861, 2013).

Los anticuerpos que bloquean la interacción entre PD-L1 y sus receptores pueden aliviar los efectos inmunosupresores dependientes de PD-L1 y mejorar la actividad citotóxica de las células T antitumorales in vitro. MEDI4736 (también conocido como durvalumab) es un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra PD-L1 humano que es capaz de bloquear la unión de PD-L1 a los receptores tanto de PD-1 como de CD80.

Se están probando los anticuerpos de bloqueo terapéutico anti-PD-L1 y anti-PD1 y han demostrado beneficios clínicos en un número de tumores, incluidos cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, etc.; pero solo una minoría de pacientes responde a estas terapias (por ejemplo, véase, Brahmer et al., New Engl. J. Med. 366(26):2455-2465, 2012; Harvey. Clinical Pharmacology & Therapeutics 96(2): 214-223, 2014). Esta falta de respuesta se ha atribuido a otros modos de inmunosupresión que anulan los efectos de PD1/PD-L1 y se están considerando las metodologías de combinación que implican inmunosupresión (Dolan et al., Cancer Control 21 (3) 231-237).

OX40 es un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) que se encuentra principalmente en las células T CD4+ y CD8+ activadas, las células T reguladoras (Treg) y las células asesinas naturales (NK). La señalización a través de OX40 en células T CD4+ y CD8+ activadas conduce a una producción mejorada de citoquinas, liberación de gránulos

y perforinas, y expansión de los grupos de células T de memoria y efectores. Además, la señalización OX40 en las células Treg inhibe la expansión de las Treg, detiene la inducción de las Treg y bloquea la función supresora de Treg.

El documento WO 2013/134467 A1 menciona la combinación de Ipilimumab (un anticuerpo monoclonal que se dirige a CTLA-4, que es un inhibidor del punto de regulación inmunitario) con un inhibidor de STAT3. Hossain, DM et al., Leukemia cell-targeted STAT3 silencing and TLR9 triggering generate systemic antitumor immunity, Blood, vol. 123, 2 January 2014, páginas 15-25 menciona que el ARNip CpG-Stat3 tiene actividad antitumoral. Peyser, ND and Grandis, JR, "Critical analysis of the potential for targeting STAT3 in human malignancy" Onco Targets Ther., 30 July 2013, páginas 999-1010, menciona que el AZD9150 tiene actividad antitumoral.

A pesar del potencial de los inmunomoduladores o los inhibidores del punto de regulación inmunitario para el tratamiento de cánceres, existe una necesidad en la técnica de mejorar las respuestas a estos agentes para tratar cánceres.

Resumen de la invención

Como se describe a continuación, la presente invención presenta un inmunomodulador, tal como un inhibidor del punto de regulación inmunitario, y un compuesto antisentido dirigido a STAT3 para uso en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, linfoma) en un sujeto que lo necesite. Los inmunomoduladores particulares incluyen un anticuerpo anti-PD-L1 (o un fragmento de unión a antígeno del mismo), un anticuerpo anti-PD1 (o un fragmento de unión a antígeno del mismo), un anticuerpo anti-CTLA-4 (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y un agonista OX40 (por ejemplo, una proteína de fusión del ligando OX40, o un anticuerpo agonista OX40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo). El sujeto puede ser cualquier mamífero. En una realización, el sujeto es un humano. También se proporcionan productos de combinación y kits, cada uno de los cuales comprende un inmunomodulador y un compuesto antisentido dirigido a STAT3, para uso en el tratamiento de uno o más tipos de cáncer. En realizaciones particulares, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 es un oligonucleótido antisentido monocatenario (ASO).

Los anticuerpos que se unen selectivamente a CTLA-4, PD-L1 o PD-1, o que inhiben la unión o activación de CTLA-4, PD-L1 o PD-1 son útiles en los métodos de la invención. Los anticuerpos que se unen y activan selectivamente OX40 son útiles en los métodos de la invención.

Los anticuerpos anti-PD-L1 son conocidos en la técnica. Ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen: MEDI4736 (durvalumab), MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714 y MDX-1105.

Los anticuerpos anti-PD-1 son conocidos en la técnica. Anticuerpos anti-PD-1 de ejemplo incluyen: nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab y MPDL3280A.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 son conocidos en la técnica. Los anticuerpos anti-CTLA-4 de ejemplo incluyen: tremelimumab e ipilimumab, también denominados MDX-010 (o BMS-734016).

Los agonistas de OX-40 son conocidos en la técnica. Los agonistas de OX-40 de ejemplo incluyen: OX40L FP.

AZD9150 es un oligonucleótido antisentido y un ejemplo de un compuesto antisentido dirigido a STAT3.

Como se divulga en el presente documento, la combinación implica el oligonucleótido antisentido AZD9150 y al menos un inmunomodulador seleccionado del grupo que consiste en: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714, MDX-1105, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, MPDL3280A, ipilimumab y OX40L FP.

En una realización, la combinación implica el anticuerpo anti-PD-L1 MEDI4736 y el oligonucleótido antisentido AZD9150.

En una realización, la combinación implica el oligonucleótido antisentido AZD9150, el anticuerpo anti-PD-L1 MEDI4736 (durvalumab) y el anticuerpo anti-CTLA-4 tremelimumab.

PD-L1 se ha implicado en ayudar a una variedad de cánceres a evadir la vigilancia inmunológica del cuerpo. Como tal, se predice que la presente invención será beneficiosa en el tratamiento de cualquier cáncer.

Ejemplos de los tipos de cáncer para los que se propone el tratamiento de combinación incluyen: cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, que incluye triple negativo, cáncer de ovario, que incluye cáncer seroso, pancreático, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de cabeza y cuello, incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), y linfoma, incluido el carcinoma difuso de células B grandes (DLBCL).

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991);

and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Se pueden usar técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico.

A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

5 "2'-desoxinucleósido" significa un nucleósido que comprende la unidad estructural de azúcar 2'-H furanosilo, como se encuentra de forma natural en los desoxirribonucleósidos (ADN). En ciertas realizaciones, un 2'-desoxinucleósido puede comprender una nucleobase modificada o puede comprender una nucleobase de ARN (por ejemplo, uracilo).

"Nucleósido sustituido en 2'" significa un nucleósido que comprende un sustituyente en la posición 2' diferente de H u OH. A menos que se indique otra cosa, un nucleósido sustituido en 2' no es un nucleósido bicclico.

10 "5'-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'. Una 5'-metilcitosina es una nucleobase modificada.

15 Como se usa en este documento, el término "Aproximadamente" se entiende dentro de un rango de tolerancia normal en la técnica, y generalmente significa dentro de $\pm 10\%$, tal como dentro de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, o 0.01% del valor establecido. Por ejemplo, si se establece que "los compuestos afectaron al menos aproximadamente el 70% de inhibición de STAT3", se implica que los niveles de STAT3 se inhiben dentro de un rango de 63% y 77%. Si se afirma que el compuesto se usa a aproximadamente 20 mg/kg, cubre el rango de 18-22 mg/kg inclusive. A menos que se indique otra cosa en el contexto, todos los valores numéricos proporcionados en este documento están modificados por el término aproximadamente.

20 "Administrado concomitantemente" se refiere a la coadministración de dos agentes de cualquier manera en que los efectos farmacológicos de ambos se manifiestan en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una única composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación o por la misma vía de administración. Los efectos de ambos agentes no necesitan manifestarse al mismo tiempo. Los efectos solo deben sobreponerse durante un período de tiempo y no tienen que ser coextensivos.

"Agente" se refiere a una sustancia, tal como un compuesto, un oligonucleótido antisentido o un anticuerpo (y similares) que es capaz de producir un efecto.

25 "Animal" se refiere a un animal humano o no humano, incluidos, pero no limitados a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluidos, pero no se limitan a, monos y chimpancés.

30 El término "anticuerpo", como se usa en esta divulgación, se refiere a una inmunoglobulina o un fragmento o un derivado de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno, independientemente de si se produce in vitro o in vivo. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, mono-específicos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, de cadena única, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados e injertados. A menos que se modifique otra cosa por el término "intacto", como en "anticuerpos intactos", para los fines de esta divulgación, el término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, y otros fragmentos de anticuerpos que retienen la función de unión a antígeno, es decir, la capacidad de unirse, por ejemplo, CTLA-4, PD-L1 específicamente. Típicamente, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno.

35 Por "anticuerpo anti-CTLA-4" se entiende un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido CTLA-4. Anticuerpos anti-CTLA-4 de ejemplo se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. Nos. 6,682,736; 7,109,003; 7,123,281; 7,411,057; 7,824,679; 8,143,379; 7,807,797; y 8,491,895 (Tremelimumab es 11.2.1, en el mismo). Tremelimumab (Patente U.S. No. 6.682.736) es un anticuerpo anti-CTLA-4 de ejemplo.

40 Secuencias de Tremelimumab:

V_L - SEQ ID NO: 13.

V_H - SEQ ID NO: 14.

V_H CDR1 - SEQ ID NO: 15; V_H CDR2 - SEQ ID NO: 16; V_H CDR3 - SEQ ID NO: 17.

V_L CDR1 - SEQ ID NO: 18; V_L CDR2 - SEQ ID NO: 19; V_L CDR3 - SEQ ID NO: 20.

45 Por "anticuerpo anti-PD-L1" se entiende un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido PD-L1. Anticuerpos anti-PD-L1 de ejemplo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2011/066389, US20130034559/US8779108 y US20140356353. MEDI4736 es un anticuerpo anti-PD-L1 de ejemplo. Las secuencias se proporcionan en la siguiente lista de secuencias (por ejemplo, SEQ ID NOs. 3-10). Otros anticuerpos anti-PD-L1 incluyen BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y MPDL3280A (Roche).

50 Los términos "dominio de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno" y "fragmento de unión" se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. En los casos en que un antígeno es grande, el dominio de unión a antígeno solo puede unirse a una parte del antígeno. Una parte de la molécula de antígeno que es responsable de las interacciones específicas

con el dominio de unión a antígeno se denomina "epítipo" o "determinante antigénico". Un dominio de unión a antígeno comprende típicamente una región variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo, sin embargo, no necesariamente tiene que comprender ambos. Por ejemplo, un llamado fragmento de anticuerpo F_d consiste solo en un dominio V_H , pero aún conserva alguna función de unión al antígeno del anticuerpo intacto.

Los fragmentos de unión de un anticuerpo se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y anticuerpos de cadena única. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. La digestión de anticuerpos con la enzima, la papaína, da como resultado dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, conocidos también como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión a antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de anticuerpos con la enzima, pepsina, da como resultado un fragmento $F(ab')_2$ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen unidos y comprenden sitios de unión de dos antígenos. El fragmento $F(ab')_2$ tiene la capacidad de entrecruzar el antígeno. "Fv" cuando se usa en este documento se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que retiene los sitios de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. "Fab" cuando se usa en este documento se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

El término "mAb" se refiere a anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos de la invención comprenden, sin limitación, anticuerpos nativos completos, anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; Fab, Fab', fragmentos de la región V de cadena única (scFv), polipéptidos de fusión y anticuerpos no convencionales.

"Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno. Ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos monocatenarios y bicatenarios, tales como oligonucleótidos antisentido, ARNsi, ARNsh, ARNsno, ARNm, meroduplex (mdARN) y repeticiones de satélite.

"Un compuesto antisentido dirigido a STAT3" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar hibridación con el ácido nucleico diana STAT3 a través de enlaces de hidrógeno

"Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleobases que permite la hibridación a una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico diana.

"Actividad antitumoral" significa cualquier actividad biológica que reduce o estabiliza la proliferación o supervivencia de una célula tumoral. En una realización, la actividad antitumoral es una respuesta inmune antitumoral.

"Azúcar bicíclico" significa un anillo de furosil modificados por la unión de dos átomos. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

Por "cáncer" se entiende una enfermedad o trastorno caracterizado por un exceso de proliferación o una reducción de la apoptosis. Los cánceres ilustrativos para los cuales se puede usar la invención incluyen, pero no se limitan a, leucemias (por ejemplo, Leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, DLBCL), macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcomas mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto de Bile, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

"Compuesto antisentido quimérico" significa un compuesto antisentido que tiene al menos dos regiones químicamente distintas.

"Coadministración" significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un individuo. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una única composición farmacéutica, o pueden estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos puede administrarse a través de la misma o diferentes vías de administración. La coadministración abarca la administración paralela o secuencial. En una realización, la coadministración se lleva a cabo para dar como resultado la exposición del paciente a ambos fármacos al mismo tiempo basándose en la farmacocinética de los fármacos.

"Nucleósido de etilo restringido" (también cEt nucleósido) significa un nucleósido que comprende una unidad estructural de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'.

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

- 5 Por "enfermedad" se entiende cualquier condición o trastorno que dañe, interfiera con o desregule la función normal de una célula, tejido u órgano. En una enfermedad tal como el cáncer (por ejemplo, el cáncer de pulmón), la función normal de un tejido u órgano celular se subvierte para permitir la evasión y/o escape inmune.

Por "polipéptido CTLA-4" se entiende un polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con el número de acceso de GenBank AAL07473.1 o un fragmento del mismo, que tiene actividad inhibidora de células T. La secuencia de AAL07473.1 se divulga en la SEQ ID NO: 21, aquí.

- 10 Por "molécula de ácido nucleico CTLA-4" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CTLA-4. Se proporciona un polinucleótido CTLA-4 de ejemplo en el número de acceso AAL07473 de GenBank.

"Diluyente" significa un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable. Por ejemplo, el diluyente en una composición inyectada puede ser un líquido, por ejemplo solución salina.

- 15 "Dosis" significa una cantidad específica de un agente farmacéutico proporcionado en una sola administración, o en un período de tiempo específico. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en uno, dos o más bolos, tabletas o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se puede acomodar fácilmente con una sola inyección, por lo tanto, se pueden usar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período de tiempo prolongado o de forma continua. Las dosis se pueden establecer como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

- 20 "Cantidad efectiva" significa la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para efectuar un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad efectiva puede variar entre individuos dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la condición médica del individuo y otros factores relevantes.

- 25 "Gapmero" significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de la RNasa H se coloca entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos de los nucleósidos o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna puede denominarse "brecha" y las regiones externas pueden denominarse "alas".

"Hibridación" significa la fusión de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana.

"Inhibidor del punto de regulación inmune" significa un agente que inhibe las rutas CTLA-4 o PD-1, los inhibidores particulares del punto de regulación incluyen anticuerpos que inhiben PD-1, PD-L1 o CTLA-4.

- 35 "Agente inmunomodulador" significa un agente que mejora una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta inmunitaria antitumoral). Los agentes inmunomoduladores de ejemplo de la invención incluyen anticuerpos, tales como un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-1 y fragmentos antigénicos de cualquiera de estos, y agonistas de OX-40, incluidas las proteínas, tales como la proteína de fusión del ligando OX40, o fragmentos de la misma. En una realización, el agente inmunomodulador es un inhibidor del punto de regulación inmune.

"Inhibir STAT3" significa reducir la expresión de ARNm de STAT3 y/o los niveles de proteína en presencia de un compuesto antisentido de STAT3, incluyendo un oligonucleótido antisentido de STAT3, en comparación con la expresión de los niveles de proteína y/o ARNm de STAT3 en ausencia de un compuesto antisentido de STAT3, tal como un oligonucleótido antisentido.

- 45 "Individuo" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.

"Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre los nucleósidos.

"Nucleósidos enlazados" significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

"Enlace internucleosídico modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio de un enlace internucleosídico de origen natural (es decir, una unión de internucleósido fosfodiéster).

- 50 "Nucleobase modificada" se refiere a cualquier nucleobase distinta de adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

"Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, una unidad estructural de azúcar modificado, un enlace internucleósido modificado o una nucleobase modificada. Un "nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, una unidad estructural de azúcar modificado o una nucleobase modificada.

- 5 "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende un enlace internucleósido modificado, un azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.

"Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural.

"Enlace internucleosídico de origen natural" significa un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

- 10 "Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye los ácidos ribonucleicos (ARN), los ácidos desoxirribonucleicos (ADN), los ácidos nucleicos monocatenarios, los ácidos nucleicos bicatenarios, los ácidos ribonucleicos de interferencia corta (ARNip) y los microARN (miARN).

"Nucleobase" significa una unidad estructural heterocíclica capaz de emparejarse con una base de otro ácido nucleico.

"Secuencia de nucleobase" significa el orden de las nucleobases contiguas independientemente de cualquier azúcar, enlace o modificación de nucleobase.

- 15 "Nucleósido" significa una nucleobase enlazada a un azúcar.

"Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo fosfato enlazado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.

"Compuesto oligomérico" u "oligómero" significa un polímero de subunidades monoméricas enlazadas que es capaz de hibridar con al menos una región de una molécula de ácido nucleico.

- 20 "Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos enlazados, cada uno de los cuales puede ser modificado o no modificado, independientemente uno del otro.

"Supervivencia general" significa el período de tiempo desde el inicio del tratamiento para una enfermedad, tal como el cáncer, en que los pacientes diagnosticados con la enfermedad aún están vivos. La cifra de supervivencia general se determina típicamente como un promedio de un ensayo clínico de tamaño apropiado.

- 25 "Polipéptido OX40" significa un polipéptido o fragmento del mismo que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad de aminoácidos con el N° de acceso NCBI NP_003318. OX40 es un miembro de la superfamilia de receptores TNFR que se expresa en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de mamíferos activados por antígeno. Véase, por ejemplo, Paterson et al., Mol Immunol 24, 1281-1290 (1987); Mallett et al., EMBO J 9, 1063-1068 (1990); y Calderhead et al., J Immunol 151, 5261-5271 (1993)). OX40 también se conoce como CD134, ACT-4 y ACT35. Las secuencias del receptor OX40 son conocidas en la técnica y se proporcionan, por ejemplo, en los números de acceso de GenBank: AAB33944 o CAE11757. Una secuencia de aminoácidos OX40 humana de ejemplo se divulga en la SEQ ID NO: 22, en este documento.
- 30

- 35 "Ligando OX40" significa un polipéptido o fragmento del mismo que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad de aminoácidos con el N° de acceso NCBI NP_003317 y que se une específicamente al receptor OX40. Véase, por ejemplo, Baum P.R., et al. EMBO J. 13: 3992-4001 (1994)). El término OX40L incluye el ligando OX40 completo, el ligando OX40 soluble y las proteínas de fusión que comprenden una porción funcionalmente activa del ligando OX40 unido covalentemente a una segunda unidad estructural, por ejemplo, un dominio de proteína. También se incluyen dentro de la definición de OX40L variantes que varían en la secuencia de aminoácidos de OX4L de origen natural pero que conservan la capacidad de unirse específicamente al receptor OX40. Además, dentro de la definición de OX40L se incluyen variantes que mejoran la actividad biológica de OX40. Las secuencias de ligandos OX40 son conocidas en la técnica y se proporcionan, por ejemplo, en los números de acceso de GenBank: NP_003318.
- 40

Una secuencia de aminoácidos del ligando OX40 humano de ejemplo se divulga en la SEQ ID NO: 23, en este documento.

- 45 "Agonista de OX40" significa un ligando OX40 que interactúa específicamente con y aumenta la actividad biológica del receptor OX40. Deseablemente, la actividad biológica se incrementa en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, o incluso el 100%. En ciertos aspectos, los agonistas de OX40 como se divulgan en el presente documento incluyen polipéptidos de unión a OX40, tales como anticuerpos anti-OX40 (por ejemplo, anticuerpos agonistas de OX40), ligandos de OX40, o fragmentos o derivados de estas moléculas.

- 50 "Anticuerpo OX40" significa un anticuerpo que se une específicamente a OX40. Los anticuerpos OX40 incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales que son específicos para OX40 y sus fragmentos de unión a antígeno. En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-OX40 como se describen en este documento son anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos, humanizados o completamente humanos. Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo OX40 es un agonista del receptor

OX40, tal como el anticuerpo monoclonal OX40 anti-humano de ratón (9B12) descrito por Weinberg et al., J Immunother 29, 575-585 (2006). Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo que se une específicamente a OX40, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al mismo epítipo OX40 que el mAb 9B12.

- 5 "Proteína de fusión del ligando OX40" significa una proteína que se une específicamente al receptor OX40 y aumenta la respuesta inmune. Como se divulga en el presente documento, la unión de una proteína de fusión del ligando OX40 al receptor OX40 potencia una respuesta inmune específica del antígeno tumoral al potenciar el reconocimiento de las células T. Las proteínas de fusión del ligando OX40 de ejemplo se describen en la Patente de Estados Unidos 7,959,925, titulada Trimeric OX40 Immunoglobulin Fusion Protein and Methods of Use." Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7,959,925, SEQ ID NO. 8. Esta secuencia se reproduce en este documento como SEQ ID NO: 24. Otras
- 10 proteínas de fusión del ligando OX40 se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6,312,700. Como se divulga en el presente documento, una proteína de fusión de ligando OX40 potencia la inmunidad de células T específica de tumores. Como se divulga en el presente documento, la proteína de fusión del ligando OX40 tiene una secuencia de aminoácidos divulgada en la SEQ ID NO: 32, 34 o 36 (tales variantes se denominan aquí como OX40L FP)
- 15 "Administración parenteral" significa administración a través de inyección (por ejemplo, inyección en bolo) o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular.
- 20 "Polipéptido PD-L1" significa un polipéptido o fragmento del mismo que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad de aminoácidos con el N° de acceso NCBI NP_001254635, y que tiene actividad de unión a PD-1 y CD80.
- "Molécula de ácido nucleico PD-L1" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido PD-L1. Se proporciona una secuencia de molécula de ácido nucleico PD-L1 de ejemplo en el número de acceso NCBI NM_001267706.
- 25 "PD-L1 positivo" significa, en el contexto de la inmunohistoquímica, las células en una muestra de cáncer exhiben tinción para PD-L1. El nivel de positividad que es biológicamente significativo puede variar, con base en el tipo de tumor y el estado inmunológico del entorno del tumor.
- "Péptido" significa una molécula formada al enlazar al menos dos aminoácidos mediante enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.
- 30 "Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administrar a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes farmacéuticos activos y una solución acuosa estéril. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica muestra actividad en el ensayo de captación libre en ciertas líneas celulares.
- "Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde el enlace fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno que no forman puentes con un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato (P = S) es un enlace internucleósido modificado.
- 35 "Porción" significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, enlazadas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.
- 40 "Prevenir" se refiere a retrasar o adelantarse a la aparición o el desarrollo de una enfermedad, trastorno o condición durante un período de tiempo desde minutos hasta indefinidamente. Prevenir también significa reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición.
- "Supervivencia libre de progresión" significa el tiempo durante y después del tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer, que un paciente vive con la enfermedad pero no empeora. La cifra de supervivencia libre de progresión generalmente se determina como un promedio de un ensayo clínico de tamaño apropiado.
- 45 Los rangos proporcionados en este documento se entienden como abreviados para todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subrango del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.
- Por "referencia" se entiende un estándar de comparación.
- Por "sensible" en el contexto de la terapia se entiende susceptible al tratamiento.
- 50 "Ácido nucleico del Transductor de señal y activador de la transcripción 3" o "ácido nucleico de STAT3" significa cualquier ácido nucleico que codifique STAT3. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de STAT3 incluye una secuencia de ADN que codifica STAT3, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica STAT3 (incluido el ADN genómico que comprende intrones y exones), y una secuencia de ARNm que codifica STAT3. "ARNm de STAT3" significa un ARNm que codifica una proteína STAT3.

"Oligonucleótido monocatenario" significa un oligonucleótido que no está hibridado con una cadena complementaria.

Por "se une específicamente" se entiende un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce y se une a una molécula (por ejemplo, un polipéptido), pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. Por ejemplo, dos moléculas que se unen específicamente forman un complejo que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada, a diferencia de la unión no específica que usualmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_A es mayor que 0^6 M^{-1} , o más preferiblemente mayor que 10^8 M^{-1} . Si es necesario, la unión no específica se puede reducir sin afectar sustancialmente la unión específica al variar las condiciones de unión. Las condiciones de unión apropiadas, tales como la concentración de anticuerpos, la concentración iónica de la solución, la temperatura, el tiempo permitido para la unión, la concentración de un agente bloqueador (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de la leche), etc., pueden ser optimizadas por un experto en la técnica utilizando las técnicas de rutina.

"Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad (emparejamiento entre nucleobases) entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhibe efectos mínimos o nulos en ácidos nucleicos no diana bajo condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo y tratamientos terapéuticos.

Por "sujeto" se entiende un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino.

"Direccionamiento" o "dirigido" significa dirigido a. Con respecto a un anticuerpo, se refiere a la capacidad de unirse a la proteína de referencia. Con respecto a un compuesto antisentido, se refiere a su capacidad para hibridar específicamente con un ácido nucleico diana e inducir un efecto deseado.

"Ácido nucleico diana", "ARN diana", "ARNm diana" y "transcripción de ARN diana" se refieren a un ácido nucleico capaz de ser direccionado por compuestos antisentido.

"Segmento objetivo" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que se direcciona un compuesto antisentido. "Sitio objetivo 5'" se refiere al nucleótido más 5' de un segmento objetivo. "Sitio objetivo 3'" se refiere al nucleótido más 3' de un segmento objetivo.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo.

"Trato", "tratar", "tratamiento" y similares, se refiere a la administración de una composición farmacéutica para reducir o mejorar una enfermedad, trastorno o condición y/o cualquier síntoma asociado con el mismo. Se apreciará que, aunque no está excluido, el tratamiento de un trastorno o condición no requiere que el trastorno, condición o síntomas asociados con él se eliminen por completo.

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto de nucleobases de origen natural, unidades estructurales de azúcar y enlaces internucleósidos. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β -D-desoxirribonucleósido).

A menos que se indique específicamente, o sea obvio en el contexto, como se usa en este documento, el término "o" se entiende que es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en este documento, los términos "un", "uno, una" y "el, la" se entienden como singular o plural.

En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares puede tener el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de EE. UU., y puede significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" también tiene el significado que se le atribuye en la Ley de Patentes de EE. UU. y el término está abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no se modifica por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.

Como se usa en este documento, los términos "determinar", "evaluar", "ensayar", "medir" y "detectar" se refieren a determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas, y como tal, el término "determinar" se usa indistintamente en este documento con "ensayar", "medir", y similares. Cuando se pretende una determinación cuantitativa, se utiliza la expresión "determinar una cantidad" de un analito y similares. Cuando se pretende una determinación cualitativa y/o cuantitativa, se utiliza la expresión "determinar un nivel" de un analito o "detectar" un analito.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren al material que está libre en diversos grados de los componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentran en su estado nativo. "Aislar" denota un grado de separación de la fuente original o el entorno. "Purificar" denota un grado de separación que es más alto que el aislamiento. Una proteína "purificada" o "biológicamente pura" está suficientemente libre de otros materiales, de tal manera que cualquier impureza no afecte materialmente las propiedades biológicas de la proteína o cause otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de esta invención está purificado si está

sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente mediante técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. El término "purificado" puede indicar que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Para una proteína que puede someterse a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glicosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

Descripción detallada de la invención

Como se describe a continuación, la presente invención presenta un agente inmunomodulador, tal como un anticuerpo anti-PD-L1 similar a MEDI4736, y un compuesto antisentido dirigido a STAT3, tal como AZD9150, para uso en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón, tal como como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC); cáncer de mama, incluido triple negativo; cáncer de ovario, incluyendo seroso; cáncer pancreático; cáncer colorrectal; linfoma, tal como el cáncer de pulmón difuso de células B grandes (DLBCL) o linfoma de Hodgkin; y cáncer de cabeza y cuello, tal como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un sujeto que lo necesite.

Anticuerpos Anti-PD-L1

Los anticuerpos que se unen e inhiben específicamente PD-L1 son útiles en la presente invención.

MEDI4736 es un anticuerpo anti-PD-L1 de ejemplo que es selectivo para un polipéptido PD-L1 y bloquea la unión de PD-L1 a los receptores PD-1 y CD80. MEDI4736 puede aliviar la supresión mediada por PD-L1 de la activación de células T humanas in vitro e inhibe el crecimiento de tumores en un modelo de xenoinjerto a través de un mecanismo dependiente de células T.

La información relativa a MEDI4736 (o fragmentos de la misma) para uso en los métodos proporcionados en este documento se puede encontrar en la patente de los Estados Unidos No. 8,779,108. El dominio de fragmento cristizable (Fc) de MEDI4736 contiene una mutación triple en el dominio constante de la cadena pesada de IgG1 que reduce la unión al componente del complemento C1q y los receptores Fcγ responsables de la mediación de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

El MEDI4736 y sus fragmentos de unión a antígeno para uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprenden una cadena pesada y una cadena ligera o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En un aspecto específico, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID NO: 4. En un aspecto específico, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que la región variable de cadena pesada comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat. secuencias de SEQ ID NOS: 5-7, y en las que la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat de SEQ ID NOS: 8-10. Los expertos en la técnica podrán identificar fácilmente las definiciones de CDR definidas por Chothia, definidas por Abm u otras conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto específico, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprenden las secuencias de CDR de cadena pesada variable y cadena ligera variable del anticuerpo 2.14H9OPT como se divulga en el documento WO 2011/066389 A1.

Existen numerosos anticuerpos anti-PDL-1 en la literatura publicada que podrían aparecer en la presente invención, incluidos los compuestos en desarrollo y/o en ensayos clínicos tales como: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714 y MDX-1105. Las especificaciones de patente que divulgan anticuerpos anti-PDL-1 que pueden ser útiles en la presente invención incluyen: WO2007/005874 (BMS/Medarex), WO01/14556 (Dana Farber), US2011/0271358 (Dana Farber), WO2010/036959 (Dana Farber), WO2010/077634 (Genentech), incluida la Patente de EE. UU. No. 8.217.149, US2012/0039906 (INSERM), WO2012/145493 (Amplimmune), Patente de EE.UU. No. 8.779.108 (MedImmune - para MEDI4726 y 2.7A4), US20140044738 (Ampimmune - para AMP-714) y WO2009/089149 (John's Hopkins University).

Anticuerpos anti-CTLA-4

Los anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 e inhiben la actividad de CTLA-4 son útiles para potenciar una respuesta inmune antitumoral. La información sobre el tremelimumab (o sus fragmentos de unión a antígeno) para su uso en los métodos que se proporcionan en este documento se puede encontrar en el documento US 6,682,736 (donde se menciona como 11.2.1). Tremelimumab (también conocido como CP-675,206, CP-675, CP-675206 y ticilimumab) es un anticuerpo monoclonal IgG₂ humano que es altamente selectivo para CTLA-4 y bloquea la unión de CTLA-4 a CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Se ha demostrado que da como resultado una activación inmunitaria in vitro y algunos pacientes tratados con tremelimumab han mostrado regresión tumoral.

Tremelimumab para uso en los métodos proporcionados en este documento comprende una cadena pesada y una cadena ligera o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En un aspecto específico, el tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas anteriormente en este documento y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada anteriormente en este documento. En un aspecto específico, el tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat mostradas en el presente documento anteriormente, y en las que la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat mostradas anteriormente en el presente documento. Los expertos en la técnica podrán identificar fácilmente las definiciones de CDR definidas por Chothia, definidas por Abm u otras conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto específico, el tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende las secuencias de CDR de cadena pesada variable y cadena ligera variable del anticuerpo 11.2.1 como se divulga en el documento US 6,682,736.

Otros anticuerpos anti-CTLA-4 se describen, por ejemplo, en el documento US 20070243184. En una realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es Ipilimumab, también denominado MDX-010; BMS-734016.

Agonistas de OX40

Los agonistas de OX40 interactúan con el receptor OX40 en las células T CD4⁺ durante, o poco después, el cebado por un antígeno que da como resultado una mayor respuesta de las células T CD4⁺ al antígeno. Un agonista de OX40 que interactúa con el receptor OX40 en células T CD4⁺ específicas de antígeno puede aumentar la proliferación de células T en comparación con la respuesta al antígeno solo. La respuesta elevada al antígeno puede mantenerse durante un período de tiempo sustancialmente más largo que en ausencia de un agonista de OX40. Por lo tanto, la estimulación a través de un agonista de OX40 mejora la respuesta inmune específica del antígeno al potenciar el reconocimiento de antígenos de las células T, por ejemplo, las células tumorales. Los agonistas de OX40 se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 6,312,700, 7,504,101, 7,622,444, y 7,959,925. Los métodos para usar tales agonistas en el tratamiento del cáncer se describen, por ejemplo, en los documentos WO/2013/119202 y WO/2013/130102.

Los agonistas de OX40 incluyen, pero no se limitan a, moléculas de unión a OX40, por ejemplo, polipéptidos de unión, por ejemplo, ligando OX40 ("OX40L") o un fragmento, variante o derivado de unión a OX40 del mismo, tal como dominios ligandos extracelulares solubles y proteínas de fusión OX40L, y anticuerpos anti-OX40 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos monoclonales humanizados), o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de los mismos. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-OX40 se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 5,821,332 y 6,156,878. Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo monoclonal anti-OX40 es 9B12, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, como se describe en Weinberg, A.D., et al. J Immunother 29, 575-585 (2006).

Como se divulga en el presente documento, el agonista de OX40 es un anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25) o

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRF
SGSGSRDYLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 26).

Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un anticuerpo VH y un anticuerpo VL, donde el VL comprende la secuencia de aminoácidos

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25) y la V_H comprende la secuencia de aminoácidos QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPS LKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 27).

Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo anti-OX40 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento de la misma y una cadena ligera de anticuerpo o fragmento de la misma, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos divulgada en la SEQ ID NO: 28. en el presente documento, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos divulgada en la SEQ ID NO: 29, en este documento.

Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo que se une específicamente a OX40, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al mismo epítope OX40 que el mAb 9B12.

Un ejemplo de anticuerpo OX40 humanizado se describe por Morris et al., Mol Immunol. Mayo 2007; 44 (12): 3112-3121, y tiene la secuencia divulgada en la SEQ ID NO: 30, aquí. 9B12 es un mAb anti-OX40 IgG1 murino dirigido contra el dominio extracelular de OX40 humano (CD134) (Weinberg, A.D., et al. J Immunother 29, 575-585 (2006)). Se seleccionó de un panel de anticuerpos monoclonales anti-OX40 debido a su capacidad para provocar una respuesta agonista para la señalización, estabilidad de OX40, y por su alto nivel de producción por el hibridoma. Para uso en aplicaciones clínicas, el 9B12 mAb se equilibra con solución salina regulada con fosfato, pH 7.0, y su concentración se ajusta a 5.0 mg/ml mediante diafiltración.

El "ligando OX40" ("OX40L") (también denominado de varias maneras miembro 4 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral, gp34, TAX, glucoproteína-1 activada transcripcionalmente y CD252) se encuentra principalmente en las células presentadoras de antígeno (APC), y puede inducirse en células B activadas, células dendríticas (DC), células de Langerhans, DC plasmocitoides y macrófagos (Croft, M., (2010) Ann Rev Immunol 28: 57-78). Otras células, incluidas las células T activadas, las células NK, los mastocitos, las células endoteliales y las células musculares lisas pueden expresar OX40L en respuesta a las citoquinas inflamatorias (Id.). OX40L se une específicamente al receptor OX40. La proteína humana se describe en la patente de Estados Unidos 6.156.878. El OX40L de ratón se describe en la patente de EE.UU. 5.457.035. OX40L se expresa en la superficie de las células e incluye un dominio de unión a receptor intracelular, transmembrana y extracelular. Una forma soluble funcionalmente activa de OX40L puede producirse eliminando los dominios intracelular y transmembrana como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5,457,035; 6,312,700; 6,156,878; 6,242,566; 6,528,055; 6,528,623; 7,098,184; y 7,125,670. Una forma funcionalmente activa de OX40L es una forma que conserva la capacidad de unirse específicamente a OX40, es decir, que posee un "dominio de unión al receptor" OX40. Un ejemplo son los aminoácidos 51 a 183 de OX40L humano. Los métodos para determinar la capacidad de una molécula de OX40L o un derivado para unirse específicamente a OX40 se describen a continuación. Los métodos de fabricación y uso de OX40L y sus derivados (como los derivados que incluyen un dominio de unión a OX40) se describen en las patentes de EE.UU. Números 6,156,878; 6,242,566; 6,528,055; 6,528,623; 7,098,184; y 7,125,670, que también describen proteínas que comprenden la forma soluble de OX40L unida a otros péptidos, tal como las regiones Fc de inmunoglobulina humana ("Ig"), que pueden producirse para facilitar la purificación del ligando OX40 de células cultivadas, o para mejorar la estabilidad de la molécula después de la administración in vivo a un mamífero (véase también las patentes de EE. UU. Nos. 5,457,035 y 7,959,925).

Como se usa en este documento, el término "OX40L" incluye el ligando OX40 completo, el ligando OX40 soluble y las porciones funcionalmente activas del ligando OX40. También se incluyen dentro de la definición de OX40L variantes de ligando OX40 que varían en la secuencia de aminoácidos de las moléculas de ligando OX40 naturales pero que conservan la capacidad de unirse específicamente a un receptor OX40. Tales variantes se describen en la Patente de EE.UU. N° 5,457,035; 6,156,878; 6,242,566; 6,528,055; 6,528,623; 7,098,184; y 7,125,670. Como se divulga en este documento, se utiliza un mutante de OX40L que ha perdido la capacidad de unirse específicamente a OX40, por ejemplo los aminoácidos 51 a 183, en el que la fenilalanina en la posición 180 del dominio de unión al receptor de OX40L humano se ha reemplazado con alanina (F180A).

Los agonistas de OX40 incluyen una proteína de fusión en la que uno o más dominios de OX40L están enlazados covalentemente a uno o más dominios de proteína adicionales. Las proteínas de fusión OX40L ejemplares que pueden usarse como agonistas de OX40 se describen en las patentes de EE.UU. N° 6,312,700. Como se divulga en el presente documento, un agonista de OX40 incluye un polipéptido de fusión OX40L que se autoensambla en una proteína de fusión OX40L multimérica (por ejemplo, trimérica o hexamérica). Tales proteínas de fusión se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 7,959,925. La proteína de fusión OX40L multimérica exhibe mayor eficacia para mejorar la respuesta inmune específica de antígeno en un sujeto, particularmente en un sujeto humano, debido a su capacidad para ensamblarse espontáneamente en trímeros y hexámeros altamente estables.

Como se describe en el presente documento, un agonista de OX40 capaz de ensamblarse en una forma multimérica incluye un polipéptido de fusión que comprende en una dirección N-terminal a C-terminal: un dominio de inmunoglobulina, en donde el dominio de inmunoglobulina incluye un dominio Fc, un dominio de trimerización, en donde el dominio de trimerización incluye un dominio de trimerización de bobina enrollada, y un dominio de unión al receptor, en donde el dominio de unión al receptor es un dominio de unión al receptor OX40, por ejemplo, un OX40L o un fragmento de unión a OX40, variante o derivado del mismo, donde el polipéptido de fusión puede autoensamblarse en una proteína de fusión trimérica. En un aspecto, un agonista de OX40 capaz de ensamblarse en una forma multimérica es capaz de unirse al receptor OX40 y estimular al menos una actividad mediada por OX40. En ciertos aspectos, el agonista OX40 incluye un dominio extracelular del ligando OX40.

El dominio de trimerización de un agonista de OX40 capaz de ensamblarse en una forma multimérica sirve para promover el autoensamblaje de moléculas de polipéptidos de fusión OX40L individuales en una proteína trimérica. Por lo tanto, un polipéptido de fusión OX40L con un dominio de trimerización se autoensambla en una proteína de fusión OX40L trimérica. En un aspecto, el dominio de trimerización es un dominio de cremallera de isoleucina u otra estructura polipeptídica coli enrollada. Los dominios de trimerización de bobina en espiral de ejemplo incluyen: TRAF2 (GENBANK® No. de registro Q12933, aminoácidos 299-348; Trombospondina 1 (No. de acceso PO7996, aminoácidos

291-314; Matrilina-4 (No. de acceso O95460, aminoácidos 594-618 ; CMP (matrilin-1) (No. de acceso NP-002370, aminoácidos 463-496; HSF1 (No. de acceso AAX42211, aminoácidos 165-191; y Cubilin (No. de acceso NP-001072, aminoácidos 104-138. En ciertos aspectos específicos, el dominio de trimerización incluye un dominio de trimerización TRAF2, un dominio de trimerización de Matrilin-4, o una combinación de los mismos.

- 5 OX40L FP es una proteína de fusión IgG4P del ligando OX40 humano que se une específicamente y desencadena la señalización por el receptor OX40 humano, un miembro de la superfamilia TNFR. OX40L FP puede tener el ácido nucleico divulgado en cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33 y 35 y la secuencia de aminoácidos codificada correspondiente descrita en la SEQ ID NO: 32, 34 y 36, respectivamente. OX40L FP también se describe en PCT/US2015/032598. OX40L FP se compone de tres dominios distintos: (1) dominios de unión a receptor extracelular (RBD) del ligando OX40 humano que forman homotrímeros y se unen al receptor OX40; (2) dominios de trimerización de cremallera de isoleucina derivados del factor 2 asociado a TNFR que estabilizan la estructura homotrimérica de los RBD del ligando OX40; y (3) dominios gamma (Fcγ) cristalizables del fragmento IgG4 humano que facilitan la agrupación de receptores de Fcγ de la proteína de fusión cuando se unen a los receptores OX40, y contienen una serina a la prolina en la posición 228 (según la numeración de la UE) en las regiones bisagra (IgG4P)) para promover la estabilidad de dos conjuntos de homotrímeros RBD ligando OX40. El dominio Fc de IgG4P se fusiona directamente con un dominio de trimerización de cremallera de isoleucina derivado de los residuos de aminoácidos 310-349 del factor 2 de necrosis tumoral humana (TRAF2). Fusionados con el extremo C del dominio TRAF2 están los residuos de aminoácidos 51-183 del dominio de unión extracelular del receptor (RBD) de OX40L humano (nombre del gen TNFSF4). El dominio TRAF2 estabiliza la estructura homotrimérica de OX40L RBD para permitir la unión y activación de OX40, mientras que el dominio IgG4P Fc confiere estabilidad sérica, dimerización de los trímeros de OX40L y facilita la agrupación de receptores Fcγ de la proteína de fusión hexamérica. Uno de tales OX40L FP tiene las secuencias divulgadas en las SEQ ID NO: 31 y 32. Una variante de OX40L FP posee una mutación de fenilalanina (F) a alanina (A) en el aminoácido correspondiente a la posición 180 en OX40L (SEQ ID NO: 33 y 34). Otra variante de OX40L FP tiene el dominio Fc de IgG4P reemplazado con un dominio Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO: 35 y 36). Como se divulga en el presente documento, el agonista de OX40 para uso en la presente invención es una de las variantes de OX40L FP.

- Como se divulga en el presente documento, el agonista de OX40 para uso en la presente invención se ha modificado para aumentar su vida media en suero. Por ejemplo, la vida media en suero de un agonista de OX40 se puede aumentar por conjugación con una molécula heteróloga, tal como la albúmina sérica, una región Fc de anticuerpo o PEG. Como se divulga en el presente documento, los agonistas de OX40 pueden conjugarse con otros agentes terapéuticos o toxinas para formar immunoconjugados y/o proteínas de fusión. Como se divulga en el presente documento, el agonista de OX40 puede formularse para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo.

Derivados

- 35 Los anticuerpos para su uso en la invención (por ejemplo, anti-CTLA-4, anti-PD-L1, anti-PD-1, anti-OX40) pueden incluir variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unirse específicamente a sus objetivos. Tales variantes pueden derivarse de la secuencia de estos anticuerpos por un experto en la técnica usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos se pueden hacer en las FR y/o en las CDR. Mientras que los cambios en las FR se diseñan generalmente para mejorar la estabilidad y la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR se diseñan generalmente para aumentar la afinidad del anticuerpo por su objetivo. Las variantes de los FR también incluyen los alotipos de inmunoglobulina que se producen de forma natural. Tales cambios que aumentan la afinidad se pueden determinar empíricamente mediante técnicas de rutina que implican alterar la CDR y probar el anticuerpo de afinidad para determinar su objetivo. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de una cualquiera de las CDR divulgadas. Se pueden hacer diversas alteraciones de acuerdo con los métodos descritos en Antibody Engineering, 2ª ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995. Estas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un residuo de aminoácido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, lo que produce un cambio "silencioso". Por ejemplo, los aminoácidos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

- Los derivados y análogos de los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante diversas técnicas bien conocidas en la técnica, incluidos los métodos recombinantes y sintéticos (Maniatis (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y Bodansky et al. (1995) The Practice of Peptide Synthesis, 2ª ed., Springer Verlag, Berlín, Alemania). Stemmer (Nature (1994) 370: 389-391) también divulga técnicas de combinación aleatorias o combinatorias, que describen la técnica en relación con un gen de la β-lactamasa, pero observa que la metodología puede usarse para la generación de anticuerpos.

- Uno puede generar regiones VH o VL novedosas que llevan una o más secuencias derivadas de las secuencias divulgadas en el presente documento utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados.

Una de tales técnicas, la PCR propensa a errores, se describe en Gram et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89: 3576-3580).

Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a CDR de genes VH o VL. Tales técnicas son divulgadas por Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1994) 91: 3809-3813) y Schier et al. (J. Mol. Biol. (1996) 263: 551-567).

- 5 De manera similar, una o más, o las tres CDR se pueden injertar en un repertorio de dominios VH o VL, que luego se analizan en busca de un fragmento de unión a antígeno específico para CTLA-4 o PD-L1.

Una porción de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos una de las CDR sustancialmente como se establece en el presente documento y, opcionalmente, las regiones de marco de intervención de los fragmentos scFv según se establece en el presente documento. La porción puede incluir al menos aproximadamente el 50% de FR1 y FR4 o ambos, siendo el 50% el 50% del C-terminal de FR1 y el 50% del N-terminal de FR4. Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que normalmente no están asociados con regiones de dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables a otras secuencias de proteínas que incluyen regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos), o marcadores proteicos como se describe con más detalle a continuación.

20 Un experto en la técnica reconocerá que los anticuerpos para uso en la invención pueden comprender fragmentos de unión a antígeno que contienen solo una única CDR de dominio VL o VH. Cualquiera de los dominios de unión específica de una sola cadena se puede usar para detectar dominios complementarios capaces de formar un fragmento de unión a antígeno específico de dos dominios capaz de, por ejemplo, unirse a CTLA-4 y PD-L1.

Los anticuerpos para su uso en la invención descrita en el presente documento pueden unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (albúmina, otro anticuerpo, etc.). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir mediante entrecruzamiento químico o mediante métodos recombinantes. Los anticuerpos también se pueden unir a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de EE.UU. Números 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; o 4,179,337. Los anticuerpos pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente a un polímero, por ejemplo, para aumentar su vida media circulante. Los polímeros de ejemplo y los métodos para unirlos también se muestran en las patentes de EE.UU. Nos. 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285, y 4,609,546.

30 Los anticuerpos también pueden alterarse para tener un patrón de glicosilación que difiere del patrón nativo. Por ejemplo, uno o más unidades estructurales de carbohidratos se pueden eliminar y/o uno o más sitios de glicosilación se pueden agregar al anticuerpo original. La adición de los sitios de glicosilación a los anticuerpos actualmente divulgados puede realizarse alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias de consenso del sitio de glicosilación conocidas en la técnica. Otro medio para aumentar el número de unidades estructurales de carbohidratos en los anticuerpos es mediante el acoplamiento químico o enzimático de los glucósidos a los residuos de aminoácidos del anticuerpo. Tales métodos se describen en el documento WO 87/05330, y en Aplin et al. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306. La eliminación de cualquier unidad estructural de carbohidrato de los anticuerpos se puede realizar química o enzimáticamente, por ejemplo, según lo descrito por Hakimuddin et al. (1987) Arco. Biochem. Biophys., 259: 52; y Edge et al. (1981) Anal. Biochem., 118: 131 y por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol., 138: 350. Los anticuerpos también se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Las etiquetas detectables incluyen radiomarcadores tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que también pueden unirse a anticuerpos usando química convencional. Los marcadores detectables también incluyen marcadores de enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina. Los marcadores detectables incluyen además unidades estructurales químicas, tales como biotina, que pueden detectarse mediante la unión a una unidad estructural detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada.

Los anticuerpos, en los que las secuencias de CDR difieren solo de manera sustancial de las que se exponen en el presente documento, están incluidos dentro del alcance de esta invención. Típicamente, un aminoácido está sustituido por un aminoácido relacionado que tiene características de carga, hidrófobas o estereoquímicas similares. Tales sustituciones estarían dentro de los conocimientos normales de un artesano. A diferencia de las CDR, se pueden hacer cambios más sustanciales en las FR sin afectar negativamente las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, pero no se limitan a, la humanización de un derivado no humano o la ingeniería de ciertos residuos estructurales que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase de la región constante, cambiando los residuos de aminoácidos que pueden alterar la función efectora, tal como la unión al receptor Fc, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5,624,821 y 5,648,260 y Lund et al. (1991) J. Immun. 147: 2657-2662 y Morgan et al. (1995) Immunology 86: 319-324, o cambiando las especies de las que se deriva la región constante.

Un experto en la técnica apreciará que las modificaciones descritas anteriormente no son del todo exhaustivas, y que muchas otras modificaciones serían obvias para un experto en la materia a la luz de las enseñanzas de la presente divulgación.

Compuestos antisentido STAT3, incluyendo oligonucleótidos antisentido

Los compuestos antisentido dirigidos a STAT3, que incluyen oligonucleótidos antisentido, que se unen específicamente a e inhiben la expresión de ARNm o proteína de STAT3 son útiles en la presente invención.

Los oligonucleótidos antisentido inhibidores de STAT3 son conocidos en la técnica.

- 5 Los documentos WO2000/061602 y WO2005/083124 (ambos Isis Pharmaceuticals Inc.) divulgan numerosos oligonucleótidos antisentido inhibidores de STAT3 que podrían caracterizarse en la presente invención.

El documento WO2012/135736 (Isis Pharmaceuticals Inc.) también divulga numerosos oligonucleótidos antisentido inhibidores de STAT3 que podrían caracterizarse en la presente invención. Los oligonucleótidos antisentido adecuados para uso en las realizaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las SEQ ID NO: 9-426, 430-442, 445-464, 471-498, 500-1034 y 1036-1512 descritas en el documento WO2012/135736. Uno de estos, identificado allí como ISIS 481464, es la molécula también conocida como AZD9150. Es una molécula gapmero con configuración 3'-10'-3', el segmento central de la brecha que comprende diez 2'-desoxinucleósidos, flanqueados en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden tres nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento del ala 5' y cada nucleósido en el segmento del ala 3' tiene una modificación de azúcar cET. Los enlaces internucleótidos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citosina en el gapmero son 5'-metilcitosinas. La secuencia completa de nucleobases de 16 mer de AZD9150/ISIS481464 es CTATTTGGATGTCAGC (divulgada en este documento como SEQ ID NO: 2). Los segmentos del ala están subrayados. AZD9150 es complementario de las nucleobases 3016-3031 en la secuencia STAT3 del No. de acceso GENBANK NM 139276.2, incorporado aquí como SEQ ID NO: 1.

- 20 El documento WO 2014/070868 (Isis Pharmaceuticals Inc.) divulga dosificaciones particulares de AZD9150 y métodos para tratar cánceres particulares con el mismo.

AZD9150 se está probando actualmente en ensayos clínicos de Fase I y ha mostrado respuestas clínicas en DLBCL y HCC en dosis toleradas.

- 25 Otros compuestos antisentido dirigidos a STAT3 se divulgan, por ejemplo, en el documento WO2008109494, que divulga moléculas de ácido ribonucleico meroduplex STAT3 (mdARNs), y US20100298409, que divulga moléculas de ARNsi STAT3.

Ciertas realizaciones.

- 30 En un aspecto, la invención proporciona un agente inmunomodulador, y un compuesto antisentido dirigido a STAT3, para uso en el tratamiento de un paciente que lo necesita. En una realización, los dos agentes se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

En un aspecto, la invención proporciona al menos un agente inmunomodulador, y un compuesto antisentido dirigido a STAT3, para uso en el tratamiento de un paciente que lo necesite. En una realización, los agentes se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

- 35 En un aspecto, la invención proporciona un agente inmunomodulador para uso en el tratamiento de un paciente que lo necesite, en el que dicho paciente también está siendo tratado con un compuesto antisentido dirigido a STAT3. En una realización, los agentes se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto antisentido dirigido a STAT3 para uso en el tratamiento de un paciente que lo necesite, en donde dicho paciente también está siendo tratado con un agente inmunomodulador. En una realización, los agentes se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

- 40 En un aspecto, la invención proporciona un agente inmunomodulador, para uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, paciente que también está siendo tratado con un compuesto antisentido dirigido a STAT3.

En un aspecto, la invención proporciona un agente inmunomodulador, para uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, en el que el agente inmunomodulador, se administra simultáneamente, por separado o secuencialmente con un compuesto antisentido dirigido a STAT3.

- 45 En un aspecto, la invención proporciona un compuesto antisentido dirigido a STAT3, para uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, paciente que también está siendo tratado con un agente inmunomodulador.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto antisentido dirigido a STAT3, para uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, en el que el compuesto antisentido dirigido a STAT3 se administra simultáneamente, por separado o secuencialmente con un agente inmunomodulador.

- 50 I [0157] En un aspecto, la invención proporciona: (i) un agente inmunomodulador; y (ii) un compuesto antisentido dirigido a STAT3; para uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, en el que cada uno de los agentes inmunomoduladores y el compuesto antisentido dirigido a STAT3 se administra de forma simultánea, por separado o secuencialmente al paciente.

En los diversos aspectos divulgados en este documento, cuando nos referimos al tratamiento de un paciente con un agente inmunomodulador, también abarca el tratamiento con más de un agente inmunomodulador.

En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento, el agente inmunomodulador es un inhibidor del punto de regulación inmunitario.

- 5 En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento, el agente inmunomodulador es: anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento, el agente inmunomodulador es: anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 10 En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento, el agente inmunomodulador es: anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como se divulga en el presente documento, el agente inmunomodulador es: un agonista de OX-40. Como se divulga en el presente documento, el agonista OX-40 se selecciona de: un anticuerpo agonista anti-OX40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un ligando OX40 o un fragmento o derivados del mismo, o una proteína de fusión del ligando OX40.

- 15 En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento, el agente inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714, MDX-1105, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, MPDL3280A, tremelimumab e ipilimumab.

En una realización de cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento, STAT3 es STAT3 humano, por lo tanto las combinaciones y similares, utilizan un compuesto antisentido dirigido a STAT3 humano.

- 20 Ciertos aspectos se relacionan con una combinación de un compuesto antisentido dirigido a STAT3 y uno o más agentes inmunomoduladores. Como se divulga en el presente documento, una combinación de este tipo de un compuesto antisentido dirigido a STAT3 y uno o más agentes inmunomoduladores comprende AZD9150 y uno o más agentes seleccionados entre: un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD1 y anticuerpo anti-CTLA-4 y un agonista OX-40. Como se divulga en el presente documento, tal combinación comprende AZD9150 como el compuesto

- 25 antisentido dirigido a STAT3 y uno o más agentes inmunomoduladores seleccionados del grupo que consiste en: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714, MDX-1105, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, MPDL3280A, tremelimumab, ipilimumab y OX40L FP.

En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos divulgados en el presente documento, pueden administrarse dos o más agentes inmunomoduladores en combinación con el compuesto antisentido dirigido a STAT3. Por ejemplo, el tratamiento de combinación puede involucrar un STAT3 ASO, un anticuerpo anti-PDL-1 y un anticuerpo anti-CTLA-4, tal como AZD9150, MEDI4736 y tremelimumab. Una alternativa sería involucrar un STAT3 ASO, un anticuerpo anti-PDL-1 y un agonista de OX40, tal como AZD9150, MEDI4736 y OX40L FP. Otra alternativa involucraría un STAT3 ASO, un anticuerpo anti-PDL-1 y un anticuerpo anti-CTLA-4, tal como AZD9150, MEDI4736 y tremelimumab.

- 30 En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos divulgados en el presente documento, el agente inmunomodulador es un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, seleccionado de: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714 y MDX-1105, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos.

- 35 En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos anteriores que implican un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4376, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos anteriores que implican un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, bloquea la unión de PD-L1 a los receptores PD-1 y CD80.

- 40 En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos anteriores, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 se administra al paciente antes del agente inmunomodulador. En realizaciones particulares, la duración entre la administración del compuesto antisentido dirigido a STAT3 y el agente inmunomodulador, es al menos: 10 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 5 días, 7 días 10 días o 14 días. En una realización particular, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 se administra primero al paciente y luego el agente inmunomodulador se administra más tarde en un momento diferente y en una visita diferente. Una visita diferente en este contexto puede significar que el proveedor de atención médica que suministra o administra el fármaco inmunomodulador al paciente lo hace en una visita diferente a la visita cuando se proporcionó/administró el compuesto antisentido dirigido a STAT3. Claramente, la ubicación de la visita no es importante. El paciente podría estar visitando al proveedor de atención médica o viceversa.
- 45
- 50

En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos anteriores, el agente inmunomodulador se administra al paciente antes que el compuesto antisentido dirigido a STAT3.

5 En realizaciones particulares, la duración entre la administración de: (i) el agente inmunomodulador; y, (ii) el compuesto antisentido dirigido a STAT3, es al menos: 10 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 5 días, 7 días 10 días o 14 días.

En cada uno de los diversos primeros o segundos usos médicos anteriores, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 puede ser un oligonucleótido antisentido.

En realizaciones particulares de cualquiera de los primeros o segundos usos médicos anteriores, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 puede ser AZD9150.

10 En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 no inhibe STAT1, STAT4 o STAT6.

15 En ciertas realizaciones, el paciente tiene cáncer. En una realización, el paciente tiene un cáncer seleccionado de: cáncer de cabeza y cuello (incluido el carcinoma de células escamosas (HNSCC)), linfoma (incluido el carcinoma difuso de células B grandes (DLBCL) o linfoma de Hodgkin), cáncer de mama (incluido triple negativo), cáncer de ovario (incluso seroso), cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)) y carcinoma hepatocelular (HCC).

En ciertas realizaciones, las células cancerosas expresan PD-L1.

En ciertas realizaciones, se identificó que el paciente que lo necesitaba tenía un cáncer que es PD-L1 positivo. En realizaciones particulares, al menos: 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más de las células en las células tumorales del paciente son positivas para PD-L1 cuando se evalúan utilizando inmunoquímica

20 En una realización, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes, carcinoma adenoescamoso y carcinoma sarcomatoide).

En una realización, el cáncer de cabeza y cuello es HNSCC.

En una realización, el linfoma es DLBCL.

25 En otro aspecto, la invención proporciona MEDI4736 o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, y AZD9150, para uso en el tratamiento del cáncer, en el que el MEDI4736 o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, y AZD9150 se administra a un paciente identificado como que tiene un cáncer. En una realización de este aspecto específico, el cáncer se selecciona de: HNSCC, DLBCL, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, NSCLC y HCC.

30 En otro aspecto, la invención proporciona MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150 para el tratamiento del cáncer, en donde entre aproximadamente 0.5-20 mg/kg/semana de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y entre aproximadamente 0.3-5 mg/kg/wk AZD9150 se administra a un paciente identificado con cáncer. En una realización particular, además de AZD9150 y MEDI4736, también se administra al paciente entre aproximadamente 1-10 mg/kg/semana de tremelimumab. En ciertas realizaciones, el peso corporal del sujeto se calcula como el peso corporal ideal utilizando la fórmula de Devine (Pai, MP y Paloucek, FP Ann. Pharmacol. 35 2000. 34: 1066-1069): para hombres (en kg) = $50 + 2.3 \text{ kg/pulgada sobre } 5 \text{ pies}$; para mujeres (en kg) = $45.5 + 2.3 \text{ kg/pulgadas sobre } 5 \text{ pies}$.

40 En ciertas realizaciones, debido a los efectos del tratamiento observados, el agente inmunomodulador y/o los compuestos antisentido dirigidos a STAT3 pueden administrarse a una dosis que es menor que el mismo agente cuando se usa como monoterapia. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 proporcionado en este documento se administra a un sujeto en el rango de aproximadamente 0.3 a 5 miligramos del compuesto antisentido por kilogramo de peso corporal del sujeto por semana (0.3-5 mg/kg/semana). Tales rangos de dosis son inesperadamente bajos para tratar el cáncer. En comparación, un estudio de Fase 1 de LY2275796, un oligonucleótido antisentido dirigido a un factor de iniciación eucariótico de proteína de unión al extremo 4E (eIF-4E), concluyó que la dosis máxima tolerable (MTD) y la dosis biológicamente efectiva (BED) de LY2275796 es de 1,000 mg bajo un régimen de dosis de carga y mantenimiento, pero incluso a una dosis de 1,000 mg, no se observó respuesta tumoral. (Hong D.S. et al., Clin Cancer Res. 2011 17 (20): 6582-91). En ciertas realizaciones, el agente inmunomodulador se 45 administra a un sujeto en el rango de aproximadamente 1 a 20 miligramos del compuesto de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del sujeto por semana (1-20 mg/kg/semana).

50 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores o cualquier aspecto de la invención delineada en el presente documento que implica un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714 y MDX-1105, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores o cualquier aspecto de la invención delineada en el presente documento que implica un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo

anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de: nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab y MPDL3280A.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores o cualquier aspecto de la invención delineado en el presente documento que implica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo CTLA-4 o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de: tremelimumab e ipilimumab.

En diversos aspectos de cualquiera de las divulgaciones anteriores o cualquier aspecto de la divulgación delineado en este documento que involucre a un agonista de OX40, el agonista de OX-40 es: OX40L FP.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores o cualquier aspecto de la invención delineado en el presente documento, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 es AZD9150.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de STAT3 con el que se pueden hibridar los compuestos antisentido es cualquiera de las secuencias expuestas en el número de acceso de GENBANK NM_139276.2 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1) o el complemento del número de acceso de GENBANK NT_010755. 14 truncado desde los nucleótidos 4185000 a 4264000 (referido como SEQ ID NO: 2 en el documento WO2012/135736). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido adecuado para su uso en el presente documento incluye, pero no se limita a, los SEQ ID NO: 9-426, 430-442, 445-464, 471-498, 500-1034 y 1036-1512 descritos en el documento WO2012/135736. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido para uso en la presente invención comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende una porción de al menos 12 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de las nucleobases 3008 a 3033 de la SEQ ID. NO: 1, y en la que la secuencia de nucleobases es complementaria a la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es AZD9150.

La información con respecto a AZD9150 (también conocida como ISIS 481464), para uso en los métodos proporcionados en este documento se puede encontrar en el documento WO2012/135736, tal como en el Ejemplo 1. AZD9150 es un oligonucleótido modificado monocatenario que comprende diez deoxinucleósidos enlazados (el segmento de brecha), un segmento de ala 5' que consta de 3 nucleósidos enlazados; y un segmento de ala 3' que consta de 3 nucleósidos enlazados. El segmento de la brecha se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3' y cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un nucleósido de etilo restringido. Cada enlace internucleósido del oligonucleótido es un enlace fosforotioato y cada citosina del oligonucleótido es una 5'-metilcitosina. La secuencia completa de nucleobases de 16 mer de AZD9150 es CTATTTGGATGTCAGC (divulgada en este documento como SEQ ID NO: 2), con segmentos de ala subrayados. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 es un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 2.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado dirigido a STAT3 consiste en un oligonucleótido modificado monocatenario.

En ciertas realizaciones, al menos un enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado dirigido a STAT3 es un enlace internucleósido modificado.

En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado que se dirige a STAT3 es un enlace internucleosídico fosforotioato.

En ciertas realizaciones, al menos un nucleósido del oligonucleótido modificado que se dirige a STAT3 comprende un azúcar modificado.

En ciertas realizaciones, al menos un azúcar modificado del oligonucleótido modificado dirigido a STAT3 es un azúcar bicíclico.

En ciertas realizaciones, el azúcar bicíclico del oligonucleótido modificado que se dirige a STAT3 comprende un puente 4'-CH₂-O-2' o un puente 4'-CH (CH₃)-O-2'.

En ciertas realizaciones, el azúcar modificado del oligonucleótido modificado dirigido a STAT3 comprende un grupo 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ o un grupo 2'-O-CH₃.

En ciertas realizaciones, al menos un nucleósido del oligonucleótido modificado dirigido a STAT3 comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, dicha nucleobase modificada es una 5'-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado dirigido a STAT3 comprende:

un ala 5' que consta de 1 a 5 nucleósidos unidos;

un ala 3' que consta de 1 a 5 nucleósidos unidos;

una brecha entre el ala 5' y el ala 3' que consta de 8 a 12 2'-desoxinucleósidos enlazados; y en donde al menos uno del ala 5' y el ala 3' comprende al menos un nucleósido bicíclico o un nucleósido sustituido en 2'.

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido.

- 5 Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID NO contenida en este documento y tal como se aplica a una molécula/compuesto antisentido es independiente de cualquier modificación en una unidad estructural de azúcar, un enlace internucleósido o una nucleobase. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a una unidad estructural de azúcar, un enlace internucleósido o una nucleobase.

Modificaciones

- 10 Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente una unidad estructural de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato enlazado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede enlazar a la unidad estructural 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura del oligonucleótido, se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como formadores de los enlaces internucleósidos del oligonucleótido.

- 15 Las modificaciones a los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleósidos, unidades estructurales de azúcar o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados son a menudo preferidos sobre las formas nativas debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad aumentada por la diana del ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas, o actividad inhibitoria incrementada.

- 20 Los nucleósidos modificados químicamente también pueden emplearse para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado para su ácido nucleico diana. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

Enlaces internucleosídicos modificados

- El enlace internucleosídico de origen natural del ARN y el ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, no naturales, a menudo se seleccionan sobre los compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos de origen natural, debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por los ácidos nucleicos diana y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas.

- 30 Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo, así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

- 35 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico STAT3 comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico fosforotioato.

Unidades estructurales de azúcar modificados

- Los compuestos antisentido proporcionados en este documento pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en los que el grupo azúcar se ha modificado. Tales nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir una mayor estabilidad de las nucleasas, una mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden una unidad estructural de anillo de ribofuranosa modificado químicamente. Ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluidos los grupos sustituyentes 5' y 2'); puente de los átomos del anillo no geminal para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o C(R1)(R2) (R = H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector); y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares modificados químicamente incluyen, nucleósido sustituido con 2'-F-5'-metilo (véase, solicitud internacional PCT WO 2008/101157 para otros nucleósidos sustituidos en 5', 2'-bis divulgados), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con una sustitución adicional en la posición 2' (véase, solicitud de patente U.S. publicada US2005/0130923), o, alternativamente, sustitución 5' de un BNA (véase, solicitud internacional PCT WO 2007/134181, en donde LNA está sustituido con por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

- 55 Ejemplos de nucleósidos que tienen unidades estructurales de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y Grupos sustituyentes 2'-O(CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, OCF₃,

$O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, y $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido.

Compuestos antisentido conjugados

- 5 Los compuestos antisentido pueden unirse covalentemente a una o más unidades estructurales o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen unidades estructurales de colesterol y unidades estructurales de lípidos. Los grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

Formulaciones

- 10 Los agentes inmunomoduladores y el compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas combinando el (los) compuesto (s) con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina regulada con fosfato (PBS). Ejemplos adecuados de vehículos incluyen solución salina fisiológica, polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, miristato de isopropilo, etc., pero no se limitan a ellos.

- 15 Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., A.R Gennaro edit., 1985.

- Las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente inmunomodulador y/o los compuestos antisentido abarcan cualesquiera sales, ésteres o sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptables que, al administrarse a un animal, incluido un humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo de los mismos.

- 20 En ciertas realizaciones, los dos agentes (agente inmunomodulador y el compuesto antisentido STAT3) se formulan por separado.

- De acuerdo con un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente inmunomodulador y un compuesto antisentido dirigido a STAT3 y uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

- Los agentes de la presente invención pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como soluciones, suspensiones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, por ejemplo soluciones en polietilenglicol acuoso. Ejemplos de portadores, diluyentes o vehículos aceitosos o no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo). Las composiciones también pueden contener otros agentes de formulación tales como agentes humectantes, emulsionantes o de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de la solución para la constitución antes de su uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos.

- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 MEDI4736 se formula a 50 mg/ml en histidina/histidina-HCl 26 mM, trehalosa dihidratada 275 mM, 0.02% (peso/volumen [p/v]) polisorbato 80, pH 6.0. El producto se puede suministrar como un polvo liofilizado de blanco a blanquecino en viales de vidrio transparente (por ejemplo, frasco de 10R), por ejemplo, cerrado con un tapón elastomérico y una tapa abatible. Cada vial contiene 200 mg (nominal) de producto activo. El MEDI4736 se reconstituye luego utilizando técnicas asépticas con 4.0 ml de agua estéril para inyección (WFI) para obtener una concentración final de 50 mg/ml. La solución reconstituida se diluye luego con solución salina al 0.9% (p/v) para infusión IV utilizando, por ejemplo, jeringas o bolsas.

Regímenes de tratamiento.

- 45 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el tratamiento se administra cada 1, 2, 3 o 4 semanas. En diversas realizaciones, al paciente se le administra primero una o una serie de dosis de carga del agente inmunomodulador (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1 MEDI4736). Esto podría implicar dosificar el agente varias veces en la etapa inicial del tratamiento (fase de carga), por ejemplo en los días 1, 3 y 5 de la semana 1.

- Los inventores han encontrado que tratar al paciente con el inhibidor de STAT3 primero seguido más tarde por el inmunomodulador produce mejores resultados anticancerosos. En diversas realizaciones, al paciente se le administra primero una o una serie de dosis de carga del compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 (por ejemplo, AZD9150). Esto podría implicar dosificar el agente varias veces en la etapa temprana del tratamiento, por ejemplo en los días 1, 3 y 5 de la semana 1.

- El propósito de una fase de dosis de carga es alcanzar un estado estable o un nivel eficaz de agente (medido en sangre) más rápidamente, antes de la fase de "mantenimiento" del tratamiento, por ejemplo una vez por semana.

El pretratamiento con el inhibidor selectivo de STAT3 también puede servir para proporcionar un aumento en las células CD45+ infiltrantes de tumores, y posiblemente también una disminución en los macrófagos infiltrantes de tumores, proporcionando un entorno tumoral que es más susceptible a un tratamiento efectivo con un agente inmunomodulador.

- 5 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores entre aproximadamente 1 mg/kg y 20 mg/kg, inclusive, de un agente inmunomodulador, y entre aproximadamente 1 mg/kg y 15 mg/kg, inclusive, de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 es administrado a un paciente.

- 10 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores que involucran MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, entre aproximadamente 2 mg/kg y 10 mg/kg, inclusive, de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y entre aproximadamente 1 mg/kg y 3 mg/kg, inclusive, se administra AZD9150. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores que involucran MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administran aproximadamente 1 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 1 mg/kg de AZD9150, se administran aproximadamente 1 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 2 mg/kg de AZD9150, se administran aproximadamente 1 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 3 mg/kg de AZD9150; se administra aproximadamente 1 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 10 mg/kg de AZD9150, se administra aproximadamente 3 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 1 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 3 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 3 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 3 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 10 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 10 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 1 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 10 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 2 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 10 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 3 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 10 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 10 mg/kg de AZD9150, se administran aproximadamente 15 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 1 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 15 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 2 mg/kg de AZD9150; se administran aproximadamente 15 mg/kg de MEDI4736 y aproximadamente 3 mg/kg de AZD9150 o aproximadamente 15 mg/kg de MEDI4736 y se administran aproximadamente 10 mg/kg de AZD9150. En ciertas realizaciones, el peso corporal del sujeto se calcula como el peso corporal ideal utilizando la fórmula Devine.

- 30 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el método da como resultado un aumento en la supervivencia general (por ejemplo, un aumento de semanas, meses o años) en comparación con la administración del agente inmunomodulador (por ejemplo, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o el AZD9150 solo. En particular, el aumento en la supervivencia es más de aproximadamente 4-6 semanas, 1-2 meses, 3-4 meses, 5-7 meses, 6-8 meses o 9-12 meses. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la administración del agente inmunomodulador (por ejemplo, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) se repite aproximadamente cada 4 semanas. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la administración de AZD9150 se repite aproximadamente cada 4 semanas. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la administración de AZD9150 se repite aproximadamente cada 12 semanas. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la administración de AZD9150 se administra aproximadamente cada 4 semanas durante siete administraciones y luego cada 12 semanas. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la administración del agente inmunomodulador (por ejemplo, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo), se realiza mediante infusión intravenosa. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la administración de AZD9150 es por infusión intravenosa. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, AZD9150 y MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, se administran simultáneamente o en diferentes momentos. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, AZD9150 y MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, se administran con veinticuatro, cuarenta y ocho o setenta y dos horas de diferencia, 1, 2 o 3 semanas de diferencia, o entre 1, 2, y 3 meses de diferencia.

- 50 También se contemplan combinaciones que involucran tres agentes. En realizaciones particulares de cualquiera de los aspectos divulgados en este documento, AZD9150, MEDI4736 y tremelimumab se usan en la combinación y/o tratamientos. La dosis particular para estos agentes incluye, AZD9150 a 2 mg/kg o 3 mg/kg, MEDI4736 a 5 mg/kg, 10 mg/kg o 20 mg/kg y tremelimumab a 1 mg/kg o 2 mg/kg.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

En ciertos aspectos, a un paciente con cáncer/tumor se le administra: (i) al menos un agente inmunomodulador; y, (ii) un compuesto antisentido dirigido a STAT3; en cantidades farmacéuticamente efectivas.

- 55 En ciertos aspectos, a un paciente con cáncer/tumor se le administra: (i) MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y, (ii) AZD9150; en cantidades farmacéuticamente efectivas. En una realización particular de este aspecto, al paciente también se le administra tremelimumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150 pueden administrarse solo una vez o con poca frecuencia mientras siguen brindando beneficios al paciente. En otros aspectos, al paciente se le administran dosis de seguimiento adicionales. Las dosis de seguimiento pueden administrarse en diversos intervalos de tiempo, según la

60

edad, el peso, la evaluación clínica, la carga tumoral y/u otros factores del paciente, incluido el criterio del médico que lo atiende.

Los intervalos entre las dosis del agente inmunomodulador (por ejemplo, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y/o tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo), y del compuesto antisentido dirigido a STAT3 (por ejemplo, AZD9150) pueden ser cada uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis semanas. Los intervalos entre dosis de MEDI4736, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150 pueden ser cada cuatro semanas durante seis ciclos y luego cada doce semanas. En ciertos aspectos, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra aproximadamente el doble de la frecuencia con AZD9150. En ciertos aspectos, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra aproximadamente seis veces más frecuentemente que AZD9150. En ciertos aspectos, AZD9150 se administra aproximadamente dos veces más frecuentemente que MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, AZD9150 se administra aproximadamente seis veces más frecuentemente que MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, al menos tres dosis, al menos cuatro dosis, al menos cinco dosis, al menos seis dosis, al menos siete dosis, al menos ocho dosis, al menos nueve dosis, al menos diez dosis o al menos quince dosis o más de cada agente se pueden administrar al paciente. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador (por ejemplo, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno), se administra durante un período de tratamiento de dos semanas, durante un período de tratamiento de cuatro semanas, durante un período de tratamiento de seis semanas, durante un período de tratamiento de ocho semanas, período de tratamiento de doce semanas, durante un período de tratamiento de veinticuatro semanas, o durante un período de tratamiento de un año o más. En algunas realizaciones, AZD9150 se administra durante un período de tratamiento de dos semanas, un período de tratamiento de cuatro semanas, un período de tratamiento de ocho semanas, un período de tratamiento de doce semanas, un período de tratamiento de veinticuatro semanas, o durante un período de tratamiento de un año o más.

La cantidad de (i) agente inmunomodulador y (ii) compuesto antisentido dirigido a STAT3 para ser administrado a un paciente individual puede depender de diversos parámetros, tales como la edad, el peso, la evaluación clínica, la carga tumoral y/u otros factores del paciente, incluidos el juicio del médico tratante. La cantidad de agente inmunomodulador (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo) y el compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 (por ejemplo, AZD9150) que se administrará al paciente se puede determinar a partir de ensayos clínicos exhaustivos de los agentes en la población de pacientes.

En ciertas realizaciones que implican el anticuerpo anti-PD-L1 MEDI4736, al paciente se le administra una o más dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 0.3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 15 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 20 mg/kg. En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se administran con al menos una semana de diferencia, tal como 1 qw, 2 qw, 3 qw, 4 qw, 8 qw y 12 qw. En ciertas realizaciones, el peso corporal del sujeto se calcula como el peso corporal ideal utilizando la fórmula Devine.

En ciertas realizaciones que implican el compuesto antisentido dirigido a STAT3 conocido como AZD9150, al paciente se le administra una o más dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 0.3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 15 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 20 mg/kg. En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de AZD9150 se administra al menos con una semana de diferencia. En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de AZD9150 se administra con 2 semanas de diferencia (2QW). En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de AZD9150 se administra con 3 semanas de diferencia (3QW). En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de AZD9150 se administra con 4 semanas de diferencia (4QW). En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de AZD9150 se administra con 8 semanas de diferencia (8QW). En ciertas realizaciones, cada una de las dosis de AZD9150 se administra con 12 semanas de diferencia (12QW).

En ciertas realizaciones que implican el anticuerpo anti-CTLA-4 tremelimumab o ipilimumab, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los dos, al paciente se le administra una o más dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administra una o más

dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg.

En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, las al menos dos dosis se administran con un intervalo de aproximadamente cuatro semanas. En algunas realizaciones, las al menos dos dosis se administran con un intervalo de aproximadamente doce semanas.

En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos tres dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos tres dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos tres dosis del anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, las al menos tres dosis se administran con un intervalo de aproximadamente cuatro semanas. En algunas realizaciones, las al menos tres dosis se administran con un intervalo de aproximadamente doce semanas.

En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 15 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la dosis es de aproximadamente 20 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de AZD9150 en donde la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de AZD9150, en donde la dosis es de aproximadamente 2 mg/kg. En ciertas realizaciones, al paciente se le administran al menos dos dosis de AZD9150 en las que la dosis es de aproximadamente 3 mg/kg. En ciertas realizaciones, el peso corporal del sujeto se calcula como el peso corporal ideal utilizando la fórmula Devine.

En algunas realizaciones, las al menos dos dosis se administran con un intervalo de aproximadamente cuatro semanas. En algunas realizaciones, las al menos dos dosis se administran con un intervalo de aproximadamente doce semanas. En ciertas realizaciones, la administración de los agentes, tales como MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o AZD9150, de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, se realiza a través de la administración parenteral. Por ejemplo, uno o ambos agentes pueden administrarse por infusión intravenosa o por inyección subcutánea. En algunas realizaciones, la administración es por infusión intravenosa.

El tratamiento efectivo con una combinación de un inmunomodulador (tal como el anticuerpo anti-CTLA-4, el anticuerpo anti-PD-L1, el anticuerpo anti-PD-1 y el agonista OX40) y un compuesto antisentido dirigido a STAT3 (tal como AZD9150) incluye, por ejemplo, reducir la tasa de progresión del cáncer, el retraso o la estabilización del tumor o el crecimiento metastásico, la contracción del tumor y/o la regresión del tumor, ya sea en el sitio de un tumor primario, o en una o más metástasis. En algunos aspectos, la reducción o el retraso del crecimiento del tumor puede ser estadísticamente significativo. Una reducción en el crecimiento del tumor se puede medir en comparación con el crecimiento del tumor del paciente al inicio del estudio, contra un crecimiento tumoral esperado, contra un crecimiento tumoral esperado basado en una gran población de pacientes, o contra el crecimiento tumoral de una población control. En otras realizaciones, los métodos de la invención aumentan la supervivencia.

Se puede evaluar la respuesta clínica a la administración de un inmunomodulador (tal como el anticuerpo anti-CTLA-4, el anticuerpo anti-PD-L1, el anticuerpo anti-PD-1 y el agonista OX40) y un compuesto antisentido dirigido a STAT3 (tal como AZD9150) utilizando técnicas de diagnóstico conocidas por los clínicos, entre las que se incluyen, pero no se limitan a, la exploración por imágenes de resonancia magnética (IRM), la generación de imágenes por radiografía x, barrido por tomografía computarizada (TC), la citometría de flujo o el análisis del clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), histología, patología general, y química sanguínea, incluidos, pero no se limitan a, los cambios detectables por ELISA, RIA y cromatografía.

Los métodos proporcionados en este documento pueden disminuir o retardar el crecimiento de tumores de cáncer. En algunos casos, la reducción o el retraso puede ser estadísticamente significativo. Una reducción en el crecimiento del tumor se puede medir en comparación con el crecimiento del tumor del paciente al inicio del estudio, contra un crecimiento tumoral esperado, contra un crecimiento tumoral esperado con base en una gran población de pacientes, o contra el crecimiento tumoral de una población control.

En ciertas realizaciones, la administración de la dosis de un compuesto antisentido dirigido a STAT3 y un agente inmunomodulador reduce el tamaño del tumor o el volumen del tumor en el sujeto. En ciertas realizaciones, la

administración de la dosis del compuesto antisentido y el agente inmunomodulador prolonga la supervivencia del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración de la dosis del compuesto antisentido dirigido a un STAT3 y el agente inmunomodulador trata el cáncer, tal como el linfoma de células B, en el sujeto. En ciertas realizaciones, el método es efectivo para tratar el cáncer y aceptablemente tolerable en un sujeto.

- 5 En ciertas realizaciones, la respuesta del tumor se mide utilizando los Criterios de respuesta relacionados con la inmunidad (irRc). En ciertas realizaciones, una respuesta tumoral se mide utilizando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST).

En ciertas realizaciones, una respuesta tumoral es detectable en la semana 7 o después, tal como en la semana 13, en la semana 25, en la semana 41, en la semana 52.

- 10 En ciertas realizaciones, un paciente logra el control de la enfermedad (DC). El control de la enfermedad puede ser una respuesta completa (CR), una respuesta parcial (PR) o una enfermedad estable (SD).

Una "respuesta completa" (CR) se refiere a la desaparición de todas las lesiones, ya sean medibles o no, y no a nuevas lesiones. La confirmación se puede obtener utilizando una evaluación repetida y consecutiva, no menos de cuatro semanas a partir de la fecha de la primera documentación. Nuevas lesiones no medibles impiden la CR.

- 15 Una "respuesta parcial" (PR) se refiere a una disminución en la carga tumoral $\geq 30\%$ en relación con la línea de base. La confirmación se puede obtener utilizando una evaluación de repetición consecutiva al menos 4 semanas a partir de la fecha de la primera documentación.

- 20 La "enfermedad estable" (SD) indica que no se puede establecer una disminución en la carga tumoral de menos del 30% en relación con la línea de base y no se puede establecer un aumento del 20% o mayor en comparación con el nadir.

En ciertas realizaciones, la administración del agente inmunomodulador y el compuesto antisentido dirigido a STAT3 puede aumentar la supervivencia libre de progresión (PFS).

En ciertas realizaciones, la administración del agente inmunomodulador y el compuesto antisentido dirigido a STAT3 puede aumentar la supervivencia global (OS).

- 25 En ciertas realizaciones, la administración de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150 puede aumentar la supervivencia libre de progresión (PFS).

En ciertas realizaciones, la administración de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150 puede aumentar la supervivencia global (OS).

- 30 En algunas realizaciones, el paciente ha recibido previamente tratamiento con al menos un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el paciente ha recibido previamente tratamiento con al menos dos agentes quimioterapéuticos. El agente quimioterapéutico puede ser, por ejemplo, y sin limitación, Vemurafenib, Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Cetuximab, Carboplatin, Bevacizumab y/o Pemetrexed.

- 35 En algunas realizaciones, el cáncer es refractario o resistente a al menos un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el cáncer es refractario o resistente a al menos dos agentes quimioterapéuticos. El cáncer puede ser refractario o resistente a uno o más de, por ejemplo, y sin limitación, Vemurafenib, Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Cetuximab, Carboplatin, Bevacizumab y/o Pemetrexed.

En algunas realizaciones, el paciente tiene un estado de rendimiento de Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (Oken MM, et al. Am. J. Clin. Oncol. 5: 649-55 (1982)) de 0, 1 o 2 antes de la administración de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150.

- 40 Como se proporciona en el presente documento, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, también puede disminuir los niveles de PD-L1 libres (solubles). La PD-L1 libre (soluble) se refiere a la PD-L1 que no está unida (por ejemplo, por MEDI4736). En algunas realizaciones, los niveles de sPD-L1 se reducen y/o son indetectables tras la administración de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150. En algunas realizaciones, la administración de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150 reduce la tasa de aumento de los niveles de PD-L1 libre (soluble) en comparación, por ejemplo, a la tasa de aumento de los niveles de PD-L1 libre (soluble) antes de las administraciones.

- 50 Tratamiento de un paciente con cáncer utilizando tanto (i) un agente inmunomodulador, tal como MEDI4736, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y, (ii) un compuesto antisentido dirigido a STAT3, tal como AZD9150, (es decir, co-terapia) como se proporciona en el presente documento puede dar como resultado un efecto aditivo y/o sinérgico. Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" se refiere a una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150) que es más efectiva que los efectos aditivos de las terapias individuales.

Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de un MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y AZD9150) puede permitir el uso de dosis más bajas de uno o más de los agentes terapéuticos y/o la administración menos frecuente de dichos agentes terapéuticos para un paciente con cáncer. La capacidad de utilizar dosificaciones más bajas de agentes terapéuticos y/o de administrar dichas terapias con menor frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de dichas terapias en el tratamiento de un cáncer. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado una mejor eficacia de los agentes terapéuticos en el manejo, tratamiento o mejora de un cáncer. El efecto sinérgico de una combinación de agentes terapéuticos puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual. El efecto sinérgico de una combinación de agentes terapéuticos también puede manifestarse como una reducción en la masa tumoral (o regresión del tumor). El efecto sinérgico de una combinación de agentes terapéuticos también puede manifestarse como una reducción sostenida en la tasa de crecimiento del tumor.

En la co-terapia, el agente inmunomodulador (tal como MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno), puede incluirse opcionalmente en la misma composición farmacéutica que el compuesto antisentido dirigido a STAT3 (tal como AZD9150), o puede incluirse en una composición farmacéutica separada. En este último caso, la composición farmacéutica que comprende el agente inmunomodulador es adecuada para la administración antes, simultáneamente o después de la administración de la composición farmacéutica que comprende el compuesto antisentido dirigido a STAT3. En ciertos casos, el agente inmunomodulador, se administra en tiempos de solapamiento como el compuesto antisentido dirigido a STAT3 en una composición separada.

20 Kits

En otro aspecto, la invención proporciona kits para tratar el cáncer que comprenden: (i) un compuesto antisentido dirigido a STAT3 (tal como AZD9150); y, (ii) un agente inmunomodulador (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo). En una realización, el kit incluye una composición terapéutica que comprende el agente inmunomodulador (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y el compuesto antisentido dirigido a STAT3 (tal como AZD9150), cada uno en formas de dosificación unitarias. Como se divulga en el presente documento, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 puede ser AZD9150 y/o el agente inmunomodulador, puede seleccionarse del grupo que consiste en: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714, MDX-1105, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, MPDL3280A, tremelimumab, ipilimumab y OX40L FP.

Cuando el agente inmunomodulador es un anticuerpo anti-PD-L1, se puede seleccionar de: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714 y MDX-1105, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una o más composiciones terapéuticas; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsos, bolsas, paquetes de blíster u otras formas de recipientes adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

Si se desea, el kit comprende además instrucciones para administrar el agente inmunomodulador (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo), y el compuesto antisentido dirigido a STAT3 (por ejemplo, AZD9150) a un sujeto que tiene un cáncer. En realizaciones particulares, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del (de los) agente (s) terapéutico (s); esquema de dosificación y administración para el tratamiento o la prevención del cáncer o sus síntomas; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información de sobredosificación; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente en el recipiente (cuando esté presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta por separado suministrada en o con el recipiente.

En otro aspecto, se proporciona un producto que contiene un compuesto antisentido dirigido a STAT3 y un agente inmunomodulador, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer.

En un producto de este tipo, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 es o puede ser AZD9150 y/o el agente inmunomodulador es o puede seleccionarse de: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714, MDX-1105, nivolumab, pembrolizumab, picholizumab, panzolizumab, panzolizumab, MPDL3280A, tremelimumab, ipilimumab y OX40L FP.

En otra realización, en tal producto, el compuesto antisentido dirigido a STAT3 es o puede ser AZD9150 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se puede o seleccionar de: MEDI4736, MPDL3280A, BMS936559, 2.7A4, AMP-714 y MDX-1105, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, inmunohistoquímica bioquímica e inmunología, que están bien dentro del ámbito de los expertos en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide

Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan et al., 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse al hacer y practicar la invención. Técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se discutirán en las secciones que siguen.

Los siguientes ejemplos y figuras se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar los diversos aspectos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores considerar como su invención.

10 Leyenda de la figura

Figura 1 Tumor que infiltra leucocitos en tumores CT-26 de ratones tratados con muSTAT3 ASO (% del total de células vivas, en relación con el control del vehículo).

Figura 2 Volúmenes de tumores CT-26 (media +/- SEM (2a) y ratones individuales (2b) y (2c)) después del tratamiento con STAT3 ASO de ratón como agente único y en combinación con un anticuerpo dirigido a PD-L1.

15 Figura 3 Volúmenes de tumores de CT-26 después del tratamiento con STAT3 ASO de ratón como agente único y en combinación con PD-L1 Ab, CTLA-4 Ab o proteína de fusión OX4-ligando.

Figura 4 Volúmenes de tumores CT-26 después del tratamiento con AZD9150, PD-L1 Ab, o control de isotipo Ab como agentes únicos, o una combinación de AZD9150 más PD-L1 Ab.

20 Figura 5 Linfocitos infiltrantes de tumores en tumores CT-26 de ratones tratados con un inhibidor selectivo de JAK1 (% del total de células vivas, en relación con el control del vehículo).

Figura 6 Volúmenes de tumores CT-26 después del tratamiento con AZ-JAK1, anti-PD-L1 Ab, o combinación de los dos tratamientos. Media $\pm$ SEM.

25 Figura 7 Niveles de ARNm de STAT3 en muestras de tumor y sangre de ratones portadores de tumores CT-26 después del tratamiento con STAT3 ASO, anti-PD-L1 Ab, o una combinación de los dos tratamientos. Media +/- SEM de 4 muestras de cada grupo de tratamiento.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Estudios preclínicos que muestran que la inhibición de STAT3 utilizando ASO en ratones refuerza el sistema inmunológico.

Oligos antisentido utilizados:

30 Ambos ASO utilizados son gapmeros 3-10-3 con química cET y enlaces fosforotioato, todas las bases son 2'-desoxinucleósidos. Las porciones de ala están subrayadas.

STAT3 ASO de ratón:	<u>GAAATTCATTCTT</u> <u>CCA</u> [SEQ ID NO: 11]
ASO de control:	<u>GGCTACTACGCCG</u> <u>TCA</u> (SEQ ID NO: 12)

35 Los oligos se pueden sintetizar de acuerdo con técnicas estándar, tal como la descrita en Seth et al., (J Med Chem. 52 (1): 10-13, 2009).

Se implantaron células de tumor de colon de ratón CT-26 (5×10^5 /ratón) subcutáneamente en ratones BALB/c hembra. Los ratones se asignaron al azar a grupos de 8 (con base en el peso corporal) y se trataron ya sea con vehículo PBS, oligonucleótido antisentido de control no dirigido (ASO) SEQ ID NO: 12] o STAT3 de ratón ASO dirigido (SEQ ID NO: 11) a 50 mg/kg. Todos los ASO se formularon en PBS y se dosificaron por vía subcutánea a 50 mg/kg, QD, en un
40 plazo de 5 días/2 días fuera de horario, comenzando 2 días después de la implantación del tumor. A los 12 y 26 días después del inicio de la dosificación, se seleccionaron 4 ratones de cada grupo y se recogieron los tumores y se procesaron para el análisis de citometría de flujo. Las células de los tumores recogidos en el día 12 (semana 2) se agruparon antes del análisis, debido al pequeño tamaño del tumor, mientras que los tumores recogidos en el día 26 (semana 4) se analizaron individualmente. Las células CD45+ se cuantificaron en las semanas 2 y 4. Los macrófagos
45 se cuantificaron en la semana 4. Las diversas células se identificaron y cuantificaron mediante inmunotinción y análisis de citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo BD FACS Canto II y el software FlowJo.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales en biología celular, inmunohistoquímica e inmunología, que están bien dentro del ámbito del experto en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tal como "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996) y "Current Protocols in Immunology" (Coligan et al., 1991).

- 5 El tratamiento con STAT3 ASO dio como resultado cambios en el infiltrado inmune del tumor, en relación con los ratones tratados con ASO vehículo y de control (Figura 1). Se observó un aumento en el infiltrado inmunitario total (leucocitos CD45+) en el grupo tratado con STAT3 ASO de ratón, en relación con el vehículo y los grupos tratados con ASO control, en las semanas 2 (149%) y 4 (353%). Los macrófagos (CD45+ F4/80+) fueron menores (65% de disminución) en los tumores en la semana 4.
- 10 La elevación en las células CD45+ que se infiltran en el tumor, junto con la disminución en los macrófagos que se infiltran en el tumor, indican una modulación inmune y una respuesta inmune antitumoral mejorada asociada con el tratamiento con STAT3 ASO.

Ejemplo 2. Pretratamiento vs. tratamiento concomitante con STAT3 ASO de ratón en combinación con el tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1 proporciona una actividad antitumoral mejorada.

- 15 Se implantaron células de tumor de colon de ratón CT-26 (5×10^5 /ratón) subcutáneamente en ratones BALB/c hembra. Los ratones se trataron ya sea con un vehículo PBS, STAT3 ASO de ratón (igual que el utilizado en el Ejemplo 1), un anticuerpo anti-PD-L1 (PD-L1 anti-ratón, clon 10F.9G2, isotipo IgG2b de rata, adquirido de BioXCell, West Lebanon, NH), un control de isotipo Ab (IgG2b de rata, producto LTF-2, adquirido de BioXCell, West Lebanon NH), o una combinación de STAT3 ASO de ratón + anticuerpo PD-L1. Los tratamientos con ASO comenzaron antes de la
- 20 asignación al azar en grupos de tratamiento (día 2 después del implante) o en el momento de la asignación al azar (día 9 después del implante). En el momento de la asignación al azar, el volumen del tumor en ratones que recibían tratamiento con ASO no era significativamente diferente al volumen del tumor en ratones que no habían recibido tratamiento con ASO. Había diez ratones en cada grupo de tratamiento. Los ASO se formularon en PBS y se administraron por vía subcutánea. Los Abs también se formularon en PBS y se administraron por vía intraperitoneal.
- 25 Durante el transcurso del experimento, la longitud y la anchura del tumor se midieron mediante calibrador, y el volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula volumen = (longitud x anchura²) * $\pi/6$.

Como se muestra en la Figura 2a, el tratamiento con el Ab de control no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor. El tratamiento con el STAT3 ASO de ratón y Ab anti-PD-L1 como agentes únicos tuvo un efecto modesto sobre el crecimiento del tumor. El tratamiento con la combinación STAT3 ASO + Ab anti-PD-L1 tuvo mayor actividad antitumoral que los tratamientos de agente único.

30 Cuando el tratamiento con STAT3 ASO comenzó antes del tratamiento con Ab anti-PD-L1 (el tratamiento con ASO comenzó el día 2 y el tratamiento con Ab comenzó el día 9), se observó una regresión del tumor en 6/10 ratones (60%), mientras que la regresión del tumor se observó en solo 1/10 ratones (10%) cuando ambos tratamientos comenzaron el día 9. La Figura 2a muestra la media $\pm$ SEM. La Figura 2b muestra animales individuales para combinación cuando se dosifican simultáneamente. La Figura 2c muestra animales individuales para combinación cuando se predosifican con ASO.

Estos resultados indican que comenzar el tratamiento con ASO STAT3 antes del tratamiento con inhibidores del punto de regulación proporciona una mayor actividad antitumoral. Por lo tanto, parece que es beneficioso permitir que los efectos inmunoestimulantes del tratamiento con STAT3 ASO ya estén en curso en el momento del tratamiento con inhibidores de punto de regulación.

Ejemplo 3. La adición del tratamiento con STAT3 ASO de ratón mejora la actividad antitumoral de los anticuerpos dirigidos a PD-L1 y CTLA-4, y una proteína de fusión del ligando OX40, en modelos de tumores singénicos de ratón

Inhibidores del punto de regulación o estimuladores inmunes utilizados:

45 CTLA-4 anti-ratón: Clon 9D9, isotipo IgG2b de ratón. Adquirido de BioXCell, West Lebanon, NH

PD-L1 anti-ratón: clon 10F.9G2, isotipo IgG2b de rata. Adquirido de BioXCell, West Lebanon, NH

La proteína de fusión del ligando OX40 del ratón (mIgG1FcmTF2mOX40L u OX40FP) se generó internamente. Las secuencias de ADN y aminoácidos se presentan como SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente.

50 La eficacia antitumoral de STAT3 ASO de ratón en combinación con anticuerpos dirigidos a PD-L1 o CTLA-4, o con una proteína de fusión de ligando OX40, se evaluó en tres modelos de tumores singénicos de ratón: CT-26 (colorrectal), 4T1 (mamaria) y A20 (linfoma). Los detalles de la implantación del tumor y los programas de tratamiento para cada modelo se encuentran en la tabla a continuación. El programa de dosificación de QDx5/wk para la STAT3 ASO (la misma ASO utilizada en el Ejemplo 1) fue de 5 días de tratamiento seguidos de 2 días sin tratamiento. El programa de dosificación de 2X/semana para los anticuerpos fue de 2 tratamientos/semana uniformemente espaciados a lo largo de la semana (por ejemplo, lunes y jueves, o martes y viernes, etc.). Los tratamientos con ASO comenzaron antes de la asignación al azar en grupos de tratamiento. En el momento de la asignación al azar, el

volumen del tumor en ratones que recibían tratamiento con ASO no era significativamente diferente al volumen del tumor en ratones que no habían recibido tratamiento con ASO. Había diez ratones en cada grupo de tratamiento.

	CT-26	4T1	A20
Implantación	0.5 millones de células, subcutáneamente en flanco derecho	0,4 millones de células en la almohadilla de grasa mamaria	1 millón de células, subcutáneamente en flanco derecho
Volumen tumoral en la asignación aleatoria	Media: 147 mm ³	Media: 123 mm ³	Media: 218 mm ³
	Rango: 58-248 mm ³	Rango: 70-182 mm ³	Rango: 122-277 mm ³
Programa de tratamiento con ASO	Comenzando 7 días antes del tratamiento con Ab o FP, QDx5/semana durante 4 semanas, se administró SC	Comenzando 5 días antes del tratamiento con Ab o FP, QDx7/semana durante 1 semana seguido de QDx5/semana durante 3 semanas, se administró SC	Comenzando 4 días antes del tratamiento con Ab o FP, QDx5/semana durante 3 semanas, se administró SC
Asignación aleatoria (días después del implante)	7	5	13
Programa de dosificación para los anticuerpos PD-L1 y CTLA-4 (comenzando un día después de la asignación aleatoria)	2X/semanas durante 3 semanas, se administró IP	2X/semanas durante 1 semana, se administró IP	2X/semanas durante 2 semanas, se administró IP
Programa de dosificación para la proteína de fusión OX40 (comenzando un día después de la asignación aleatoria)	2X/semanas durante 1 semana, se administró IP	2X/semanas durante 1 semana, se administró IP	2X/semanas durante 1 semana, se administró IP

5 El STAT3 ASO de ratón se formuló en PBS y se administró por vía subcutánea. Los Abs y FP también se formularon en PBS y se administraron por vía intraperitoneal. Durante el transcurso del experimento, la longitud y la anchura del tumor se midieron por calibrador, y el volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula volumen = (longitud x anchura²) * $\pi/6$.

10 Los resultados se muestran en la Figura 3. A las dosis y los programas administrados en este experimento, los Abs anti-PD-L1 y anti-CTLA-4, el ligando OX40 FP y la ASO dirigida a STAT3 de ratón tuvieron una actividad antitumoral de agente único débil a modesta. La adición del tratamiento con STAT3 ASO de ratón mejoró significativamente la actividad antitumoral del tratamiento con anticuerpos y FP en muchos casos. En ciertos casos el efecto apareció sinérgico. La adición de STAT3 ASO de ratón a Ab PD-L1 Ab, Ab CTLA-4 o FP de ligando OX40 condujo a una media de estasis tumoral o regresión en los modelos CT-26 y A20. En el modelo 4T1, la combinación de STAT3 ASO de ratón más anticuerpo CTLA-4 condujo a regresiones tumorales. Además, los tratamientos combinados condujeron a respuestas completas a largo plazo (sin tumor medible varias semanas después del final del tratamiento) en algunos ratones individuales, incluido el 30% (3/10) de ratones con la combinación de STAT3 ASO de ratón + Ab CTLA-4 en los modelos CT-26, 4T1 y A20; 20% (2/10) con la combinación PD-L1 en el modelo A20, y 50% (5/10) con la combinación OX40 en el modelo A20.

20 La actividad antitumoral mejorada del tratamiento combinado frente a los agentes individuales en estos modelos indica el potencial para el tratamiento con una molécula antisentido dirigida a STAT3 para mejorar la actividad del inhibidor del punto de regulación o los estimuladores inmunitarios utilizados, incluidos los agentes dirigidos a PD-L1, CTLA-4 y OX40, en múltiples tipos de tumores. La actividad de combinación es consistente con un mecanismo por el cual el tratamiento con STAT3 ASO da como resultado un aumento de los infiltrados inmunes antitumorales en el tumor (Ejemplo 1), que permite una mayor inhibición del crecimiento del tumor cuando se bloquean los puntos de regulación inmunitarios mediante el tratamiento con agentes terapéuticos dirigidos a la PD-L1. y CTLA-4, o cuando se usan estimuladores tales inmunes como los agonistas OX40.

Ejemplo 4. No se observó actividad antitumoral con un ASO de control y anticuerpos de control en ratones portadores de tumores CT-26

El experimento CT-26 en el Ejemplo 3 incluyó tratamiento con un ASO de control (AZD9150) y un anticuerpo de control de isotipo (IgG2b de rata, producto LTF-2, adquirido de BioXCell, West Lebanon NH) como controles negativos. La molécula de ASO dirigida a STAT3 humana AZD9150 puede usarse como control en modelos de tumores murinos, ya que no reacciona de forma cruzada con las secuencias de STAT3 de ratón. Como se muestra en la Figura 4, y en contraste con la actividad con la STAT3 ASO dirigida al ratón descrita en los Ejemplos 2 y 3, el tratamiento con la ASO de control no produjo un aumento de la actividad del anticuerpo anti-PD-L1. Estos resultados son consistentes con las actividades de los STAT3 ASO de ratón y anticuerpos anti-PD-L1 que se deben a las actividades específicas de estos agentes.

Ejemplo 5. La inhibición de STAT3 usando un inhibidor de JAK1 de molécula pequeña suprime el sistema inmunológico

Se implantaron células de tumor de colon de ratón CT-26 (5×10^5 /ratón) subcutáneamente en ratones BALB/c hembra. Diez días después del implante, los ratones se asignaron al azar en grupos de 4, con un volumen de tumor promedio de 122 mm^3 , y se trataron ya sea con un inhibidor de molécula pequeña selectiva JAK1 (AZ-3; Woessner et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 54: 931, 2013), o vehículo. AZ-3 se menciona aquí como AZ-JAK1. AZ-JAK1 se formuló en agua y se administró por vía oral a 100 mg/kg , BID, durante 11 días. En el día 11, los tumores se recogieron y se procesaron para el análisis de citometría de flujo. Los tumores de cada grupo se agruparon antes del análisis, para permitir la detección de poblaciones de células de bajo porcentaje mediante citometría de flujo. Se cuantificaron leucocitos CD45+, células T CD4+ y CD8+, células dendríticas CD11c+MHCII+ y células supresoras mieloides CD11b+Gr1+.

El tratamiento con el inhibidor selectivo de JAK1 dio lugar a una disminución de las células T, las células dendríticas y las células supresoras mieloides (Figura 5), lo que indica que el tratamiento fue ampliamente supresor inmunitario, en contraste con el tratamiento con STAT3 ASO (Figura 1). Los datos indican que la inhibición selectiva de STAT3 con un oligonucleótido antisentido dirigido a STAT3 puede mejorar la respuesta inmune antitumoral, mientras que la inhibición de JAK1, que inhibe la señalización a través de varios STAT, incluyendo STAT3 pero también STAT 1, 4 y 6, es ampliamente supresora.

Ejemplo 6. La inhibición de JAK1 antagoniza la actividad antitumoral del Abs anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 en ratones portadores de tumores CT-26 establecidos.

Se implantaron células de tumor de colon de ratón CT-26 (5×10^5 /ratón) subcutáneamente en ratones BALB/c hembra. El día 14 después de la implantación, los ratones se asignaron al azar en grupos de 10 (según el volumen del tumor) y se trataron ya sea con un vehículo PBS, una molécula pequeña selectiva de JAK1 (AZ-JAK1) a 100 mg/kg BID, anticuerpo anti-PD-L1 (clon 10F.9G2) a $2,5 \text{ mg/kg}$ dos veces por semana, anticuerpo anti-CTLA-4 (clon 9D9) a 1 mg/kg dos veces por semana, o combinaciones de AZ-JAK1+ Ab anti-PD-L1 o AZ-JAK1+ Ab anti-CTLA-4. AZ-JAK1 se formuló en agua y se administró por vía oral. Los anticuerpos se formularon en PBS y se administraron por vía intraperitoneal. El tamaño promedio del tumor al inicio del tratamiento fue de $\sim 140 \text{ mm}^3$. Durante el transcurso del experimento, la longitud y la anchura del tumor se midieron por calibrador, y el volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula $\text{volumen} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2) \times \pi/6$.

Los resultados se muestran en la Figura 6. El tratamiento con los anticuerpos anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 como agentes únicos dio como resultado la inhibición del crecimiento del tumor. El tratamiento con AZ-JAK1 produjo un aumento moderado en la tasa de crecimiento promedio del tumor en relación con el control del vehículo. La adición de AZ-JAK1 a Ab anti-PD-L1 o a Ab anti-CTLA-4 antagonizó la actividad antitumoral de los anticuerpos, lo que dio como resultado una tasa de crecimiento tumoral similar a la del agente único AZ-JAK1. Todos los tratamientos fueron bien tolerados, sin signos externos significativos a lo largo del tratamiento. El peso promedio de los ratones al final del tratamiento fue mayor que el peso al inicio del tratamiento en todos los grupos.

El aumento de la actividad anti-PD-L1 o anti-CTLA-4 mediante la adición de un STAT3 ASO (Figuras 2 y 3), vs. antagonismo de la actividad del anticuerpo mediante la adición del inhibidor JAK1 (Figura 6), indica un efecto diferencial que es dependiente del mecanismo de inhibición de STAT3 (reducción selectiva de la proteína STAT3 mediante el tratamiento con STAT3 ASO, vs. la inhibición de la señalización mediada por múltiples STAT, incluidas las STAT 1, 3, 4 y 6, mediante el tratamiento con inhibidor de JAK1).

La estimulación inmunitaria y la actividad antitumoral del tratamiento con STAT3 ASO (Figuras 1 - 3), vs. la supresión inmunitaria y el antagonismo de las actividades Ab anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 con AZ-JAK1 (Figuras 5 y 6), indican que la actividad de combinación de STAT3 ASO + Ab anti-PD-L1 es dependiente de una inhibición de STAT3 directa y selectiva, y no puede replicarse (y de hecho está antagonizada) por otras metodologías para la inhibición de la señalización de JAK/STAT, tal como inhibición de JAK1.

Ejemplo 7. Datos que muestran la eliminación de STAT3 en los tumores CT-26 y la sangre con el tratamiento con STAT3 ASO

Para confirmar la eliminación del ARNm de STAT3 por parte de la ASO dirigida a STAT3, los ratones portadores de tumores CT-26 subcutáneos se trataron con vehículo, la ASO STAT3 de ratón (la misma ASO utilizada en el Ejemplo 1; QD, 50 mg/kg durante 3,5 semanas), Ab anti-PD -L1 (PD-L1 anti-ratón: clon 10F.9G2, isotipo IgG2b de rata; 2X/semana, 2,5 mg/kg durante 3,5 semanas) o una combinación de STAT3 ASO más Ab antiPD-L1, y muestras de sangre y tumores extraídas al final del experimento y analizado el nivel de ARNm de STAT3. Se recogieron muestras de 4 ratones en cada grupo de tratamiento y se procesaron para el análisis de qRT-PCR. La sangre se recogió en el reactivo de Paxgene y el ARN se preparó de acuerdo con las instrucciones del kit (Qiagen, número de catálogo 762164). Los tumores se recolectaron en RNAlater (Qiagen) y se procesaron a RNA de acuerdo con las instrucciones del kit (Qiagen, número de catálogo 74104) para el análisis de qRT-PCR. El nivel de ARNm de STAT3 medido por qRT-PCR se normalizó a la cantidad de ARNm de GAPDH en cada muestra. Los conjuntos de cebadores/sondas se adquirieron de ABL: catálogo # 4331182 para STAT3 de ratón, catálogo # 4352339E para GAPDH de ratón.

La inactivación de ARNm STAT3 en la sangre y el tumor, después de tratamiento con STAT3 ASO fue de 53% y 70%, respectivamente (Figura 7). Los ratones con inactivación de ARNm STAT3 con Ab PD-L1 + STAT3 ASO no fueron significativamente diferentes que en los ratones tratados con STAT3 ASO solo.

Ejemplo 8. Cambios en la expresión génica en pacientes con DLBCL tratados con AZD9150

Las biopsias de tumores se recolectaron en un ensayo clínico de Fase I de pacientes con cáncer tratados con AZD9150 antes de comenzar el tratamiento y a las 4-6 semanas después de que comenzara el tratamiento. Los pacientes recibieron tres dosis de carga de 2 o 3 mg/kg de AZD9150 durante la primera semana en los días 1, 3 y 5, seguidos de las dosis semanales posteriores. Nueve de los conjuntos de biopsias fueron de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, dos de pacientes con linfoma folicular y una de un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Las biopsias se fijaron con formalina y se embebieron en parafina y se seccionaron. El ARN se aisló de seis secciones de cinco micrones de cada biopsia y se sometió a un análisis de perfiles de expresión génica de Nanostring utilizando el Conjunto de códigos de inmunología humana nCounter que representa 594 genes relacionados con el sistema inmunitario. Los datos sin procesar se calibraron de acuerdo con Veldman-Jones et al., (Cancer Research. 75: 2587, 2015) y se analizaron para detectar cambios en el tratamiento en comparación con las muestras de tratamiento previo de referencia. Se generó un mapa de calor que representa el agrupamiento no supervisado de los cambios de expresión génica más grandes y más relevantes estadísticamente en DLBCL. Entre los genes sobreexpresados por AZD9150 se encuentran cinco de los seis genes que comprenden una "firma de gen gamma interferón" que se relaciona con el beneficio clínico de pembrolizumab, un anticuerpo terapéutico dirigido a PD1 (Plimack et al, J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr 4502). Estos cinco genes de "firma de genes de interferón gamma" sobreexpresados por AZD9150 fueron: STAT1, IFN-gamma, CXCL9, CXCL10 e IDO. Estos datos indican una modulación inmune en el microentorno del tumor después del tratamiento con AZD9150 en pacientes, y sugieren que el tratamiento con AZD9150 puede hacer que los tumores de los pacientes respondan mejor a la terapia de eje PD(L)1.

Ejemplo 9. Ensayos prospectivos de combinación

Los ensayos clínicos de la combinación de MEDI4736 y AZD9150 se planifican en el carcinoma de células escamosas de la cabeza o cuello (SCCHN) y el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) para establecer dosis seguras para la combinación y probar las tasas de respuesta clínica superior versus cualquier terapia sola. Las indicaciones se seleccionaron con base en la demostración de respuestas clínicas en ensayos clínicos previos a la monoterapia MEDI4736 en SCCHN y al tratamiento con AZD9150 o anti-PD1 en DLBCL.

AZD9150 se formulará en solución salina y se administrará por infusión en los días 1, 3, 5 de tratamiento y semanalmente después. El MEDI4736 se formulará en solución salina y se administrará por infusión intravenosa una vez cada dos semanas, comenzando al mismo tiempo que la primera administración de AZD9150, o después de 1, 2 o más semanas de administración de AZD9150, para permitir la fase de dosis de carga de AZD9150.

Ejemplo 9a: Ensayo de carcinoma de células escamosas de cabeza o cuello (SCCHN)

Los sujetos en este estudio deben tener 18 años de edad o más y tener SCCHN confirmado histológicamente o citológicamente con al menos una lesión medible de acuerdo con los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST), guías v1.1.

Diseño del ensayo de SCCHN

El estudio es un estudio abierto de Fase 1/2 de la combinación de anticuerpo anti-PD-L1 (MEDI4736) y STAT3 ASO (AZD9150) vs. AZD9150 solo para establecer dosis, seguridad y eficacia superior de la combinación vs. la monoterapia utilizando los criterios RECIST. Fase 1a: para establecer la seguridad y las dosis de la Fase 1b, una pequeña cohorte de sujetos (por ejemplo, 6) recibirá combinaciones de hasta 3 mg/kg de AZD9150 (comenzando con 3 mg/kg y reduciendo si hay problemas de seguridad) y 3 o 10 mg/kg MEDI4736.

Fase 1b: Hasta cincuenta pacientes recibirán las dosis de AZD9150 + MEDI4736 establecidas en la Fase 1a y hasta cincuenta pacientes recibirán AZD9150 solo a la misma dosis que la utilizada en la combinación. La tasa de respuesta de monoterapia con MEDI4736 de un ensayo clínico previo de MEDI4736 en SCCHN se usará como otro comparador con la terapia de combinación.

Se obtendrán niveles de referencia de la expresión del tumor PDL-1 para que todos los sujetos se correspondan con las respuestas clínicas. Además, algunas poblaciones de leucocitos circulantes (por ejemplo, células supresoras derivadas de mieloides, MDSC) se controlarán mediante inmunofenotipificación para evaluar la correlación con la respuesta clínica.

- 5 El éxito se define como una tasa de respuesta superior o un beneficio de supervivencia para la combinación de AZD9150 y MEDI4736 versus cualquier fármaco en su dosis de monoterapia recomendada en toda la población de pacientes o un subconjunto definido por biomarcadores.

Ejemplo 9b: Ensayo de linfoma de células B grandes difuso (DLBCL)

- 10 Los sujetos en este estudio deben tener 18 años de edad o más y tener DLBCL con confirmación histológica o citológica con al menos una lesión medible de acuerdo con los criterios del Grupo de Trabajo Internacional (IWG). Los pacientes elegibles deben haber fallado el trasplante autólogo de células madre (ASCT) o haber tenido al menos dos regímenes de quimioterapia con múltiples agentes antes y no ser candidatos para el ASCT.

Diseño del ensayo de DLBCL

- 15 El estudio es un estudio abierto de Fase 1/2 de la combinación de anticuerpo anti-PD-L1 (MEDI4736) y AZD9150 vs. MEDI4736 solo para establecer las dosis, la seguridad y la eficacia superior de la combinación en comparación con la monoterapia utilizando los criterios de IWG.

Fase 1a: para establecer la seguridad y las dosis de la Fase 1b, una pequeña cohorte de sujetos (por ejemplo, 6) recibirá combinaciones de hasta 3 mg/kg de AZD9150 (comenzando con 3 mg/kg y reduciendo si hay problemas de seguridad) y 3 o 10 mg/kg MEDI4736.

- 20 Fase 1b: hasta cincuenta pacientes recibirán las dosis de AZD9150 + MEDI4736 establecidas en la Fase 1a y hasta cincuenta pacientes recibirán MEDI4736 solo a la misma dosis que la utilizada en la combinación. La tasa de respuesta de monoterapia con AZD9150 de un ensayo clínico anterior de AZD9150 en DLBCL se usará como otro comparador con la terapia de combinación.

- 25 Se obtendrán niveles de referencia de la expresión del tumor PDL-1 para que todos los sujetos se correspondan con las respuestas clínicas. Además, algunas poblaciones de leucocitos circulantes (por ejemplo, células supresoras derivadas de mieloides, MDSC) se controlarán mediante inmunofenotipificación para evaluar la correlación con la respuesta clínica.

- 30 El éxito se define como una tasa de respuesta superior o un beneficio de supervivencia para la combinación de AZD9150 y MEDI4736 versus cualquier fármaco en su dosis de monoterapia recomendada en toda la población de pacientes o un subconjunto definido por biomarcadores.

Listado de secuencias

<110> AstraZeneca AB

<120> COMBINACIÓN

- 35 <130> 200252-WO-PCT

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4978

- 40 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 727 154 T3

ggtttccgga gctgcggcgg cgcagactgg gagggggagc cgggggttcc gacgtcgcag	60
ccgaggggaa aagccccaac cggatcctgg acaggcacc cggcttggcg ctgtctctcc	120
ccctcggctc ggagaggccc ttcggcctga gggagcctcg ccgcccgccc ccggcacacg	180
cgcagccccg gcctctcggc ctctgccgga gaaacagttg ggaccctga ttttagcagg	240
atggcccaat ggaatcagct acagcagctt gacacacggg acctggagca gctccatcag	300
ctctacagtg acagcttccc aatggagctg cggcagtttc tggcccttg gattgagagt	360
caagattggg catatgcggc cagcaaagaa tcacatgcc ctttggtgtt tcataatctc	420
ctgggagaga ttgaccagca gtatagccgc ttcctgcaag agtcgaatgt tctctatcag	480
cacaatctac gaagaatcaa gcagtttctt cagagcaggt atcttgagaa gccaatggag	540
attgcccgga ttgtggcccg gtgcctgtgg gaagaatcac gccttctaca gactgcagcc	600
actgcggccc agcaaggggg ccaggccaac caccacacag cagccgtggg gacggagaag	660
cagcagatgc tggagcagca ccttcaggat gtccggaaga gagtgcagga tctagaacag	720
aaaatgaaag tggtagagaa tctccaggat gactttgatt tcaactataa aaccctcaag	780
agtcaaggag acatgcaaga tctgaatgga aacaaccagt cagtgaccag gcagaagatg	840
cagcagctgg aacagatgct cactgcgctg gaccagatgc ggagaagcat cgtgagtgag	900
ctggcggggc ttttgtcagc gatggagtac gtgcagaaaa ctctcacgga cgaggagctg	960
gctgactgga agaggcggca acagattgcc tgcattggag gcccgcccaa catctgccta	1020
gatcggctag aaaactggat aacgtcatta gcagaatctc aacttcagac ccgtcaacaa	1080
attaagaaac tggaggagtt gcagcaaaaa gtttcctaca aaggggaccc cattgtacag	1140
caccggccga tgctggagga gagaatcgtg gagctgttta gaaacttaat gaaaagtgcc	1200
tttgtggtgg agcggcagcc ctgcatgccc atgcatcctg accggcccct cgtcatcaag	1260
accggcgtcc agttcactac taaagtcagg ttgctggtca aattccctga gttgaattat	1320

ES 2 727 154 T3

cagcttaaaa	ttaaagtgtg	cattgacaaa	gactctgggg	acgttgacag	tctcagagga	1380
tcccggaaat	ttaacattct	gggcacaaac	acaaaagtga	tgaacatgga	agaatccaac	1440
aacggcagcc	tctctgcaga	attcaaacac	ttgaccctga	gggagcagag	atgtgggaat	1500
gggggcccag	ccaattgtga	tgcttccctg	attgtgactg	aggagctgca	cctgatcacc	1560
tttgagaccg	aggtgtatca	ccaaggcctc	aagattgacc	tagagaccca	ctccttgcca	1620
gttgtggtga	tctccaacat	ctgtcagatg	ccaaatgcct	gggcgtccat	cctgtggtac	1680
aacatgctga	ccaacaatcc	caagaatgta	aaacttttta	ccaagccccc	aattggaacc	1740
tgggatcaag	tgcccgaggt	cctgagctgg	cagttctcct	ccaccaccaa	gcgaggactg	1800
agcatcgagc	agctgactac	actggcagag	aaactcttgg	gacctggtgt	gaattattca	1860
gggtgtcaga	tcacatgggc	taaattttgc	aaagaaaaca	tggttggaac	gggcttctcc	1920
ttctgggtct	ggctggacaa	tatcattgac	cttgtgaaaa	agtacatcct	ggccctttgg	1980
aacgaagggt	acatcatggg	ctttatcagt	aaggagcggg	agcgggccat	cttgagcact	2040
aagcctccag	gcaccttctc	gctaagattc	agtgaagca	gcaaagaagg	aggcgtcact	2100
ttcacttggg	tggaagaagga	catcagcggg	aagaccaga	tccagtccgt	ggaaccatac	2160
acaaagcagc	agctgaacaa	catgtcattt	gctgaaatca	tcatgggcta	taagatcatg	2220
gatgtacca	atatcctggg	gtctccactg	gtctatctct	atcctgacat	tccaaggag	2280
gaggcattcg	gaaagtattg	tcggccagag	agccaggagc	atcctgaagc	tgaccaggt	2340
agcgtgccc	catacctgaa	gaccaagttt	atctgtgtga	caccaacgac	ctgcagcaat	2400
accattgacc	tgccgatgtc	ccccgcact	ttagattcat	tgatgcagtt	tggaataat	2460
ggtgaagggt	ctgaaccctc	agcaggaggg	cagtttgagt	ccctcacctt	tgacatggag	2520
ttgacctcgg	agtgcgctac	ctcccccatg	tgaggagctg	agaacggaag	ctgcagaaag	2580
atacgactga	ggcgctacc	tgcatctctg	cacctctcac	acagccaaac	cccagatcat	2640
ctgaaactac	taactttgtg	gttccagatt	ttttttaatc	tcctacttct	gctatctttg	2700
agcaatctgg	gcacttttaa	aaatagagaa	atgagtgaat	gtgggtgata	tgcttttata	2760
taaatgcaaa	taaggatgtg	ttctctgaga	cccatgatca	ggggatgtgg	cggggggtgg	2820
ctagaggggg	aaaaaggaaa	tgtcttgtgt	tgttttgttc	ccctgccctc	ctttctcagc	2880
agctttttgt	tattgttgtt	gttgttctta	gacaagtgcc	tcctggtgcc	tgccgcatcc	2940
ttctgcctgt	ttctgtaagc	aaatgccaca	ggccacctat	agctacatac	tcctggcatt	3000
gcacttttta	accttgctga	catccaaata	gaagatagga	ctatctaagc	cctaggtttc	3060
tttttaaatt	aagaaataat	aacaattaaa	gggcaaaaaa	cactgtatca	gcatagcctt	3120
tctgtattta	agaaacttaa	gcagccgggc	atggtggctc	acgcctgtaa	tcccagcact	3180
ttgggaggcc	gaggcggatc	ataaggtcag	gagatcaaga	ccatcctggc	taacacggtg	3240

ES 2 727 154 T3

```

aaaccccgtc tctactaaaa gtacaaaaaa ttagctgggt gtgggtgggtg gcgcctgtag 3300
tcccagctac tcgggaggct gaggcaggag aatcgcttga acctgagagg cggaggttgc 3360
agtgagccaa aattgcacca ctgcacactg cactccatcc tgggcgacag tctgagactc 3420
tgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa cttcagttaa cagcctcctt ggtgctttaa 3480
gcattcagct tccttcaggc tggtaattta tataatccct gaaacgggct tcaggtcaaa 3540
cccttaagac atctgaagct gcaacctggc ctttgggtgtt gaaataggaa ggtttaagga 3600
gaatctaagc attttagact tttttttata aatagactta ttttcctttg taatgtattg 3660
gccttttagt gagtaaggct gggcagaggg tgcttacaac cttgactccc tttctccctg 3720
gacttgatct gctgtttcag aggctagggt gtttctgtgg gtgccttatc agggctggga 3780
tacttctgat tctggcttcc ttcctgcccc accctcccg cccagctccc cctgatcctg 3840
ctagaggcat gtctccttgc gtgtctaaag gtccctcatc ctgtttgttt taggaatcct 3900
ggtctcagga cctcatggaa gaagaggggg agagagttac aggttggaca tgatgcacac 3960
tatggggccc cagcgacgtg tctggttgag ctcagggaat atggttctta gccagtttct 4020
tggtgatata cagtggcact tgtaatggcg tcttcattca gttcatgcag ggcaaaggct 4080
tactgataaa cttgagtctg ccctcgtagt aggggtgtata cctggcctcc ctctgaggct 4140
ggtgactcct ccctgctggg gcccacagg tgaggcagaa cagctagagg gcctccccgc 4200
ctgcccgcct tggtggcta gctcgctct cctgtgcgta tgggaacacc tagcacgtgc 4260
tggatgggct gcctctgact cagaggcatg gccggatttg gcaactcaaa accaccttgc 4320
ctcagctgat cagagtttct gtggaattct gtttgttaa tcaaattagc tgggtctctga 4380
attaaggggg agacgacctt ctctaagatg aacagggttc gcccagtc tctgcctgg 4440
agacagttga tgtgtcatgc agagctctta cttctccagc aacactcttc agtacataat 4500
aagcttaact gataaacaga atatttagaa aggtgagact tgggcttacc attgggttta 4560
aatcataggg acctagggcg aggggttcagg gcttctctgg agcagatatt gtcaagttca 4620
tggccttagg tagcatgtat ctggtcttaa ctctgattgt agcaaaagt ctgagaggag 4680
ctgagccctg tttggtgccc ttaaagaaca gggctctcag gccctgcccg cttcctgtcc 4740
actgccccct ccccatcccc agcccagccg agggaatccc gtgggttgct tacctaccta 4800
taagggtggt tataagctgc tgtcctggcc actgcattca aattccaatg tgtacttcat 4860
agtgtaaaaa tttatattat tgtgaggttt tttgtctttt tttttttttt ttttttttgg 4920
tatattgctg tatctacttt aacttccaga aataaacgtt atataggaac cgtaaaaa 4978

```

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético (AZD9150)

<400> 2

ctatttggat gtcagc 16

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> MEDI4736 VL; Secuencia 77 de PCT/US2010/058007

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 4

10 <211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> MEDI4736 VH; Secuencia 72 de PCT/US2010/058007

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

15 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 727 154 T3

35

40

45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> MEDI4736 V_H CDR1; Secuencia 73 de PCT/US2010/058007

<400> 5

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 6

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> MEDI4736 V_H CDR2; Secuencia 74 de PCT/US2010/058007

<400> 6

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 Gly

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <223> MEDI4736 V_H CDR3; Secuencia 75 de PCT/US2010/058007

<400> 7

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> MEDI4736 VL CDR1; Secuencia 78 de PCT/US2010/058007
 <400> 8
 Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 5 1 5 10
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <223> MEDI4736 VL CDR2; Secuencia 79 de PCT/US2010/058007
 <400> 9
 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> MEDI4736 VL CDR3; Secuencia 80 de PCT/US2010/058007
 <400> 10
 Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
 1 5
 20 <210> 11
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <223> Oligonucleótido sintético (STAT3 ASO de murina)
 25 <400> 11
 gaaattcatt ctcca 16
 <210> 12
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <223> Oligonucleótido sintético (ASO de control de murino)
 <400> 12
 ggctactacg ccgtca 16
 <210> 13
 35 <211> 139
 <212> PRT

ES 2 727 154 T3

<213> Homo sapiens

<223> Tremelimumab VL

<400> 13

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys
20 25 30

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
100 105 110

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
115 120 125

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135

5 <210> 14

<211> 167

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Tremelimumab VH

10 <400> 14

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

ES 2 727 154 T3

65		70		75		80
Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp	Pro Arg Gly Ala Thr Leu				
	85	90			95	
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val						
	100	105			110	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala						
	115	120			125	
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu						
	130	135			140	
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly						
145	150		155		160	
Ala Leu Thr Ser Gly Val His						
	165					

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Tremelimumab V_H CDR1

<400> 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 16

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Tremelimumab V_H CDR2

<400> 16

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <223> Tremelimumab V_H CDR3

<400> 17

Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 18

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Tremelimumab VL CDR1

5 <400> 18
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens
 <223> Tremelimumab VL CDR2
 <400> 19
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 20

15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Tremelimumab VL CDR3
 <400> 20
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

20 <210> 21
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <223> Polipéptido CTLA-4 - No. de Acceso GenBank AAL07473.1
 <400> 21
 Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 50 55 60
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 65 70 75 80

ES 2 727 154 T3

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 22

<211> 277

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Polipéptido OX40

<400> 22

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro

ES 2 727 154 T3

[illegible]

<210> 23

<211> 183

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Ligando OX40

<400> 23

ES 2 727 154 T3

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 24

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<223> Proteína de ligando OX40; corresponde a SEQ ID NO: 8 en la Patente U.S. 7,959,925

<400> 24

Leu Ala Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

ES 2 727 154 T3

Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		35					40					45			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	50					55					60				
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
65					70					75					80
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				85					90					95	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
			100					105					110		
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
		115					120					125			
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
	130					135					140				
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
145					150					155					160
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
				165					170					175	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
			180					185					190		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
		195					200					205			
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	210					215					220				
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Lys	Gln
225					230					235					240
Ile	Glu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Ile	Tyr	His	Ile	Glu
				245					250					255	
Asn	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu	Arg	Gly	His	Gly
			260					265					270		
Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Val	Ser	His	Arg	Tyr	Pro	Arg	Phe	Gln	Ser

ES 2 727 154 T3

275 280 285

Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu
290 295 300

Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val
305 310 315 320

Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe
325 330 335

Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro
340 345 350

Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala
355 360 365

Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn
370 375 380

Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile
385 390 395 400

His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
405 410

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> VL de anticuerpo anti-OX40 humanizado

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp

ES 2 727 154 T3

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
	<210> 26		
	<211> 107		
	<212> PRT		
5	<213> Homo sapiens		
	<223> VL de anticuerpo anti-OX40 humanizado		
	<400> 26		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
	20	25	30
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Arg Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp		
	85	90	95
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
	<210> 27		
10	<211> 121		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<223> VH de anticuerpo anti-OX40 humanizado		
	<400> 27		
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
	1	5	10
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly		
	20	25	30
	Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile		
	35	40	45
15	Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys		
	50	55	60

ES 2 727 154 T3

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Cadena pesada de anticuerpo anti-OX40 humanizado

<400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

ES 2 727 154 T3

145		150		155		160									
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	370					375					380				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395					400

ES 2 727 154 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Cadena ligera de anticuerpo anti-OX40 humanizado

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

ES 2 727 154 T3

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 30

<211> 412

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Anticuerpo anti-OX40 humanizado

<400> 30

Ala Pro Leu Ala Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

ES 2 727 154 T3

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Leu Leu Gly Gly Gly Ser Ile
225 230 235 240

Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His
245 250 255

Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly
260 265 270

His Gly Gly Gly Ser Asn Ser Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Phe
275 280 285

Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe
290 295 300

Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn
305 310 315 320

Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly
325 330 335

Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu
340 345 350

Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met
355 360 365

Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr
370 375 380

Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile
385 390 395 400

Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
405 410

<210> 31

<211> 1206

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<223> Secuencia de ADN de hulG4FcPTF20X40L (5\222 to 3\222 Marco de Lectura abierto)

ES 2 727 154 T3

<400> 31

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggacct	60
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag	120
gtgacctgcg tgggtggtga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt taattggtac	180
gtggacggcg tgaagtgc taacgccaa accaagccca gagaggagca gttcaacagc	240
acctacagag tgggtgtccgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	300
tacaagtgc aggtctccaa caagggcctg cctagcagca tcgagaagac catcagcaag	360
gccaagggcc agccacggga gcccaggtc tacaccctgc cacctagcca agaggagatg	420
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaaaggct tctatcccag cgatatcgcc	480
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtactcc agactgaccg tggacaagtc cagatggcag	600
gagggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag	660
aagtccctga gcctgagcct gggcaaggac caggataaga tcgaggctct gtccctccaag	720
gtgcagcagc tggaacggtc catcggcctg aaggacctgg ccatggctga cctggaacag	780
aaagtgtgg aaatggaagc ctccacacag gtgtcacaca gatacccccg gatccagtcc	840
attaagtgct agttcaccga gtacaagaaa gagaagggtt ttatcctgac ctcccagaaa	900
gaggacgaga tcatgaaggt gcagaacaac tccgtgatca tcaactgcga cgggttctac	960
ctgatctccc tgaagggcta cttcagccag gaagtgaaca tctccctgca ctaccagaag	1020
gacgaggaac ccctgttcca gctgaagaaa gtgcggagcg tgaactccct gatggtggcc	1080
tctctgacct acaaggacaa ggtgtacctg aacgtgacca ccgacaacac ctccctggac	1140
gacttccacg tgaacggcgg cgagctgatc ctgatccacc agaaccctgg cgagttctgc	1200
gtgctg	1206

<210> 32

<211> 402

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<223> Secuencia de aminoácidos de hulgG4FcPTF20X40L (Terminal N a C)

<400> 32

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

ES 2 727 154 T3

1		5				10				15					
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			20					25					30		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	50					55					60				
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
65					70					75					80
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				85					90					95	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser
			100					105					110		
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
		115					120					125			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
	130					135					140				
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
145					150					155					160
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				165					170					175	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu
			180					185						190	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
		195					200					205			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Asp	Gln	Asp	Lys	Ile	Glu	Ala	Leu	Ser	Ser	Lys
225					230					235					240
Val	Gln	Gln	Leu	Glu	Arg	Ser	Ile	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Ala	Met	Ala
				245					250					255	

ES 2 727 154 T3

Asp Leu Glu Gln Lys Val Leu Glu Met Glu Ala Ser Thr Gln Val Ser
260 265 270

His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr
275 280 285

Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile
290 295 300

Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr
305 310 315 320

Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu
325 330 335

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg
340 345 350

Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val
355 360 365

Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val
370 375 380

Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys
385 390 395 400

Val Leu

<210> 33

<211> 1206

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<223> Secuencia de ADN de hulG4FcPTF20X40L F180A (5\222 to 3\222 Marco de Lectura abierto)

<400> 33

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggacct	60
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag	120
gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt taattggtac	180
gtggacggcg tggaagtgca taacgccaag accaagccca gagaggagca gttcaacagc	240
acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	300
tacaagtgca aggtctccaa caagggcctg cctagcagca tcgagaagac catcagcaag	360
gccaagggcc agccacggga gcccaggtc tacaccctgc cacctagcca agaggagatg	420
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaaaggct tctatcccag cgatatcgcc	480

ES 2 727 154 T3

```

gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg      540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtactcc agactgaccg tggacaagtc cagatggcag      600
gagggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag      660
aagtccttga gcctgagcct gggcaaggac caggataaga tcgaggctct gtcctccaag      720
gtgcagcagc tggaacggtc catcggcctg aaggacctgg ccatggctga cctggaacag      780
aaagtgctgg aaatggaagc ctccacacag gtgtcacaca gatacccccg gatccagtcc      840
attaaggtgc agttcaccga gtacaagaaa gagaaggggct ttatcctgac ctcccagaaa      900
gaggacgaga tcatgaaggt gcagaacaac tccgtgatca tcaactgcga cgggttctac      960
ctgatctccc tgaagggcta cttcagccag gaagtgaaca tctccctgca ctaccagaag     1020
gacgaggaac ccctgttcca gctgaagaaa gtgcggagcg tgaactccct gatggtggcc     1080
tctctgacct acaaggacaa ggtgtacctg aacgtgacca ccgacaacac ctccctggac     1140
gacttcacag tgaacggcgg cgagctgatc ctgatccacc agaaccctgg cgaggcctgc     1200
gtgctg                                           1206

```

<210> 34

<211> 1206

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<223> Secuencia de aminoácidos de hulG4PFcTF20X40L F180A (Terminal N a C)

<400> 34

```

Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Gly Thr Ala Cys Gly Gly Cys Cys
1          5          10          15

```

```

Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Thr Gly
20          25          30

```

```

Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys
35          40          45

```

```

Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Gly Ala Cys Cys Thr Ala Gly Cys Gly
50          55          60

```

```

Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys
65          70          75          80

```

```

Cys Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys
85          90          95

```

```

Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala
100          105          110

```

ES 2 727 154 T3

Cys Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly
 115 120 125
 Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Gly
 130 135 140
 Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly
 145 150 155 160
 Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Gly
 165 170 175
 Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly
 180 185 190
 Gly Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Thr Ala Ala Cys Gly Cys Cys Ala
 195 200 205
 Ala Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala
 210 215 220
 Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Ala Cys Cys Thr Ala Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Thr Gly Thr
 245 250 255
 Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr
 260 265 270
 Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly
 275 280 285
 Ala Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala Cys Ala
 290 295 300
 Ala Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala
 305 310 315 320
 Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Ala Gly Cys
 325 330 335
 Ala Gly Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala
 340 345 350
 Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly
 355 360 365

ES 2 727 154 T3

Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Gly Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys
 385 390 395 400
 Cys Ala Cys Cys Thr Ala Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala
 405 410 415
 Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly
 420 425 430
 Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Thr Cys
 435 440 445
 Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala
 450 455 460
 Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala Thr Ala Thr Cys Gly Cys Cys
 465 470 475 480
 Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala
 485 490 495
 Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Ala
 500 505 510
 Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys
 515 520 525
 Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala
 530 535 540
 Gly Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Thr
 545 550 555 560
 Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly
 565 570 575
 Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Ala
 580 585 590
 Gly Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Cys Ala Ala
 595 600 605
 Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys

ES 2 727 154 T3

610		615		620
Gly Thr Gly Ala Thr	Gly Cys Ala Cys	Gly Ala Gly Gly Cys Cys Cys		
625	630	635		640
Thr Gly Cys Ala Cys	Ala Ala Cys Cys	Ala Cys Thr Ala Cys Ala Cys		
	645	650		655
Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr	Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys			
	660	665		670
Cys Thr Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly				
	675	680		685
Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Gly Ala Thr Cys Gly Ala				
	690	695		700
Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly				
	705	710		715
Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys				
	725	730		735
Gly Gly Thr Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala				
	740	745		750
Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly				
	755	760		765
Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly				
	770	775		780
Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Cys				
	785	790		795
Cys Thr Cys Cys Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Cys Ala				
	805	810		815
Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala				
	820	825		830
Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Cys Ala Thr Thr Ala Ala Gly Gly Thr				
	835	840		845
Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Gly Ala Gly Thr Ala Cys				
	850	855		860

ES 2 727 154 T3

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr
 865 870 875 880
 Thr Thr Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala
 885 890 895
 Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys
 900 905 910
 Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Ala
 915 920 925
 Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Ala
 930 935 940
 Cys Thr Gly Cys Gly Ala Cys Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Ala Cys
 945 950 955 960
 Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly
 965 970 975
 Gly Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala
 980 985 990
 Ala Gly Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly
 995 1000 1005
 Cys Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Cys
 1010 1015 1020
 Gly Ala Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys
 1025 1030 1035
 Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly
 1040 1045 1050
 Cys Gly Gly Ala Gly Cys Gly Thr Gly Ala Ala Cys Thr Cys Cys
 1055 1060 1065
 Cys Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Thr Cys Thr
 1070 1075 1080
 Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys
 1085 1090 1095
 Ala Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys
 1100 1105 1110

ES 2 727 154 T3

Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Gly Ala Cys Ala Ala Cys
1115 1120 1125

Ala Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Gly Ala Cys
1130 1135 1140

Thr Thr Cys Cys Ala Cys Gly Thr Gly Ala Ala Cys Gly Gly Cys
1145 1150 1155

Gly Gly Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Cys Thr Gly
1160 1165 1170

Ala Thr Cys Cys Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr
1175 1180 1185

Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Cys Gly Thr Gly
1190 1195 1200

Cys Thr Gly
1205

<210> 35

<211> 1200

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<223> Secuencia de ADN de hulG1TF20X40L (5'222 to 3'222 Marco de Lectura abierto)

<400> 35

gataagaccc acacctgtcc cccttgtcct gccctgaac tgctgggcgg accttccgtg	60
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc	120
tgctgtggtg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac	180
ggcgtggaag tgacaaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa ctccacctac	240
cgggtgtgtt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag	300
tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaaa agaccatctc caaggccaag	360
ggccagcccc ggaacccca ggtgtacaca ctgcccccta gccgggaaga gatgaccaag	420
aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa	480
tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc	540
gacggctcat tcttcctgta ctccaagctg acagtggaca agtcccgtg gcagcagggc	600
aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc	660
ctgtccctga gcccgggcaa ggaccaggat aagatcgagg ctctgtcctc caaggtgcag	720
cagctggaac ggtccatcgg cctgaaggac ctggccatgg ctgacctgga acagaaagtg	780
ctggaaatgg aagcctccac acaggtgtca cacagatacc cccggatcca gtccattaag	840

ES 2 727 154 T3

```

gtgcagttca ccgagtacaa gaaagagaag ggctttatcc tgacctccca gaaagaggac      900
gagatcatga aggtgcagaa caactccgtg atcatcaact gcgacggggt ctacctgac      960
tccctgaagg gctacttcag ccaggaagtg aacatctccc tgcactacca gaaggacgag     1020
gaacccctgt tccagctgaa gaaagtgcgg agcgtgaact ccctgatggt ggcctctctg     1080
acctacaagg acaaggtgta cctgaacgtg accaccgaca acacctccct ggacgacttc     1140
cacgtgaacg gcggcgagct gatcctgac caccagaacc ctggcgagtt ctgcgtgctg     1200

```

<210> 36

<211> 400

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<223> Secuencia de aminoácidos de hulg1FcTF2OX40L (Terminal N a C)

<400> 36

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1          5          10          15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20          25          30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35          40          45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50          55          60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65          70          75          80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85          90          95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100         105         110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115         120         125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130         135         140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145         150         155         160

```

ES 2 727 154 T3

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Asp Gln Asp Lys Ile Glu Ala Leu Ser Ser Lys Val Gln
225 230 235 240

Gln Leu Glu Arg Ser Ile Gly Leu Lys Asp Leu Ala Met Ala Asp Leu
245 250 255

Glu Gln Lys Val Leu Glu Met Glu Ala Ser Thr Gln Val Ser His Arg
260 265 270

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
275 280 285

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
290 295 300

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
305 310 315 320

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
325 330 335

Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
340 345 350

Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
355 360 365

Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
370 375 380

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
385 390 395 400

<210> 37

<211> 1248

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<223> Secuencia de ADN de constructo de ratón mlgG1mTF2mOX40L (5\222 to 3\222 Marco de Lectura abierto)

<400> 37

```

gtgcctagag attgaggctg caagccctgc atctgcaccg tgcccagaggt gtccagcgtg      60
ttcatcttcc caccacaagcc caaggacgtg ctgaccatca ccctgacccc caaagtgacc      120
tgcgtggtgg tggacatcag caaggacgac cccgaggtgc agttcagttg gttcgtggac      180
gacgtggaag tgcacaccgc ccagaccag cccagagagg aacagttcaa cagcaccttc      240
agaagcgtgt ccgagctgcc catcatgcac caggactggc tgaacggcaa agaattcaag      300
tgcagagtga acagcgccgc cttccctgcc cccatcgaga aaaccatcag caagaccaag      360
ggcagaccca agggcccccga ggtgtacacc atccccccac ccaaagaaca gatggccaag      420
gacaaggtgt ccctgacctg catgatcacc gatttcttcc cagaggacat caccgtggaa      480
tggcagtgga acggccagcc cgccgagaac tacaagaaca cccagcccat catggacacc      540
gacggcagct acttcgtgta cagcaagctg aacgtgcaga agtccaactg ggaggccggc      600
aacaccttca cctgtagcgt gctgcacgag ggcctgcaca accaccacac cgagaagtcc      660
ctgagccaca gcccgggcaa gcggctggac caggacaaga tcgaggccct gagcaacaag      720
gtgcagcagc tggaaaggctc tatcggcctg aaggacctgg ctatggccga cctggaacag      780
aaagtgtctg agctggaagt gtccaccagc agccccgcca aggaccctcc catccagaga      840
ctgagaggcg ccgtgaccag atgcgaggac ggccagctgt tcatcagcag ctacaagaac      900
gagtaccaga ccatggaagt gcagaacaac agcgtggtca tcaagtgcga cggcctgtac      960
atcatctacc tcaagggcag cttcttccag gaagtgaaga tcgacctgca cttcagagag     1020
gaccacaacc ccatcagcat ccccatgctg aacgacggca gacggatcgt gttcaccgtg     1080
gtggctagcc tggccttcaa ggacaaagtg tatctgaccg tgaacgcccc cgacaccctg     1140
tgcgagcatc tgcagatcaa cgacggcgag ctgatcgtgg tgcagctgac ccccggctac     1200
tgtgcccctg agggcagcta ccacagcacc gtgaaccagg tgcccctg      1248

```

<210> 38

<211> 416

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<223> Secuencia de aminoácidos de constructo de ratón mlgG1FcmTF2mOX40L (Terminal N a C)

<400> 38

```

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu
1              5              10             15

```

```

Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr

```

ES 2 727 154 T3

20					25					30					
Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys
		35					40					45			
Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe
65					70					75					80
Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro
				165					170					175	
Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val
			180					185					190		
Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu
		195					200					205			
His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gln	Asp	Lys	Ile	Glu	Ala	Leu	Ser	Asn	Lys
225					230					235					240
Val	Gln	Gln	Leu	Glu	Arg	Ser	Ile	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Ala	Met	Ala
				245					250					255	
Asp	Leu	Glu	Gln	Lys	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Ser	Thr	Ser	Ser	Pro
			260					265					270		

ES 2 727 154 T3

Ala Lys Asp Pro Pro Ile Gln Arg Leu Arg Gly Ala Val Thr Arg Cys
275 280 285

Glu Asp Gly Gln Leu Phe Ile Ser Ser Tyr Lys Asn Glu Tyr Gln Thr
290 295 300

Met Glu Val Gln Asn Asn Ser Val Val Ile Lys Cys Asp Gly Leu Tyr
305 310 315 320

Ile Ile Tyr Leu Lys Gly Ser Phe Phe Gln Glu Val Lys Ile Asp Leu
325 330 335

His Phe Arg Glu Asp His Asn Pro Ile Ser Ile Pro Met Leu Asn Asp
340 345 350

Gly Arg Arg Ile Val Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Ala Phe Lys Asp
355 360 365

Lys Val Tyr Leu Thr Val Asn Ala Pro Asp Thr Leu Cys Glu His Leu
370 375 380

Gln Ile Asn Asp Gly Glu Leu Ile Val Val Gln Leu Thr Pro Gly Tyr
385 390 395 400

Cys Ala Pro Glu Gly Ser Tyr His Ser Thr Val Asn Gln Val Pro Leu
405 410 415

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende un inhibidor del punto de regulación inmunitario y un oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. Una combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor del punto de regulación inmunitario se selecciona de: un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; un anticuerpo anti-PD1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y, un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 10 3. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el inhibidor del punto de regulación inmunitario se selecciona de: MEDI4736, MPDL3280A, 2.7A4, AMP-714, MDX-1105, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, BMS936559, MPDL3280A, tremelimumab e ipilimumab.
4. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el inhibidor del punto de regulación inmunitario es MEDI4736.
5. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 no inhibe STAT1, STAT4 o STAT6.
- 15 6. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 es AZD9150.
- 20 7. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el cáncer se selecciona de: cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de cabeza y cuello, incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y linfoma, incluido el carcinoma de células B grandes difuso (DLBCL).
8. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las células cancerosas expresan PD-L1.
9. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el cáncer es PD-L1 positivo.
- 25 10. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el inhibidor del punto de regulación inmunitario es MEDI4736 y el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 es AZD9150.
11. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que entre aproximadamente 1 mg/kg y 20 mg/kg de MEDI4736, y entre aproximadamente 1 mg/kg y 10 mg/kg de AZD9150 se administra a un paciente en necesidad del mismo.
- 30 12. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el tratamiento se administra cada semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas o cada 4 semanas.
13. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 se administra al paciente antes del inhibidor del punto de regulación inmunitario.
- 35 14. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 se administra al paciente al menos un día antes de que se administre el inhibidor del punto de regulación inmunitario al paciente.
- 40 15. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 es AZD9150 y el inhibidor del punto de regulación inmunitario es MEDI4736, y en la que AZD9150 y MEDI4736 se administran simultáneamente o en diferentes momentos.
- 45 16. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 15, que comprende administrar (i) dos inhibidores del punto de regulación inmunitario y (ii) un oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 a un paciente en necesidad del mismo; en donde los dos inhibidores del punto de regulación inmunitario son MEDI4736 y tremelimumab, y el oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 es AZD9150.
17. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor del punto de regulación inmunitario y un oligonucleótido antisentido monocatenario dirigido a STAT3 en asociación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento del cáncer.

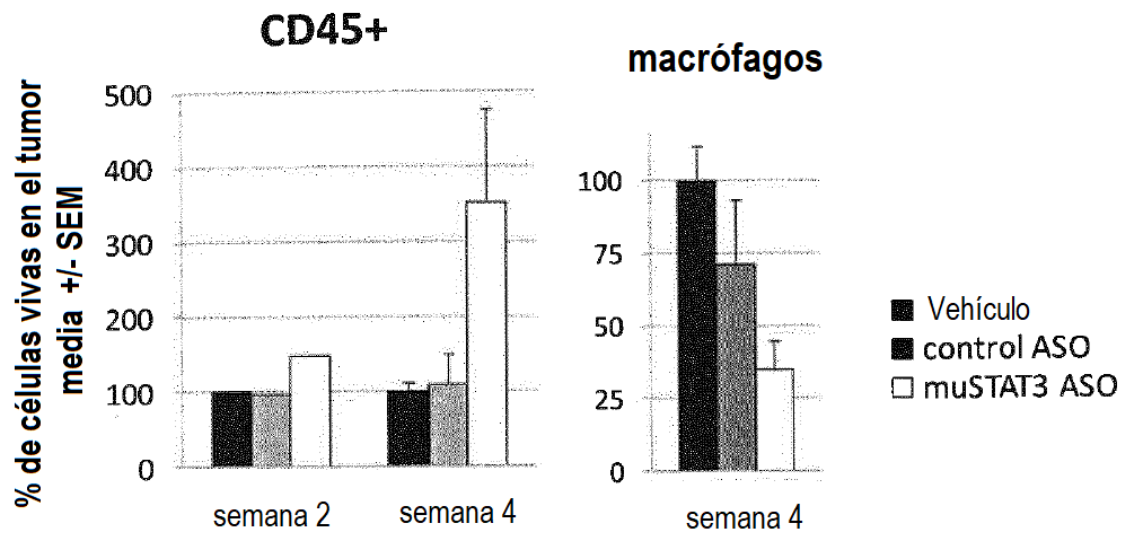


Figura 1

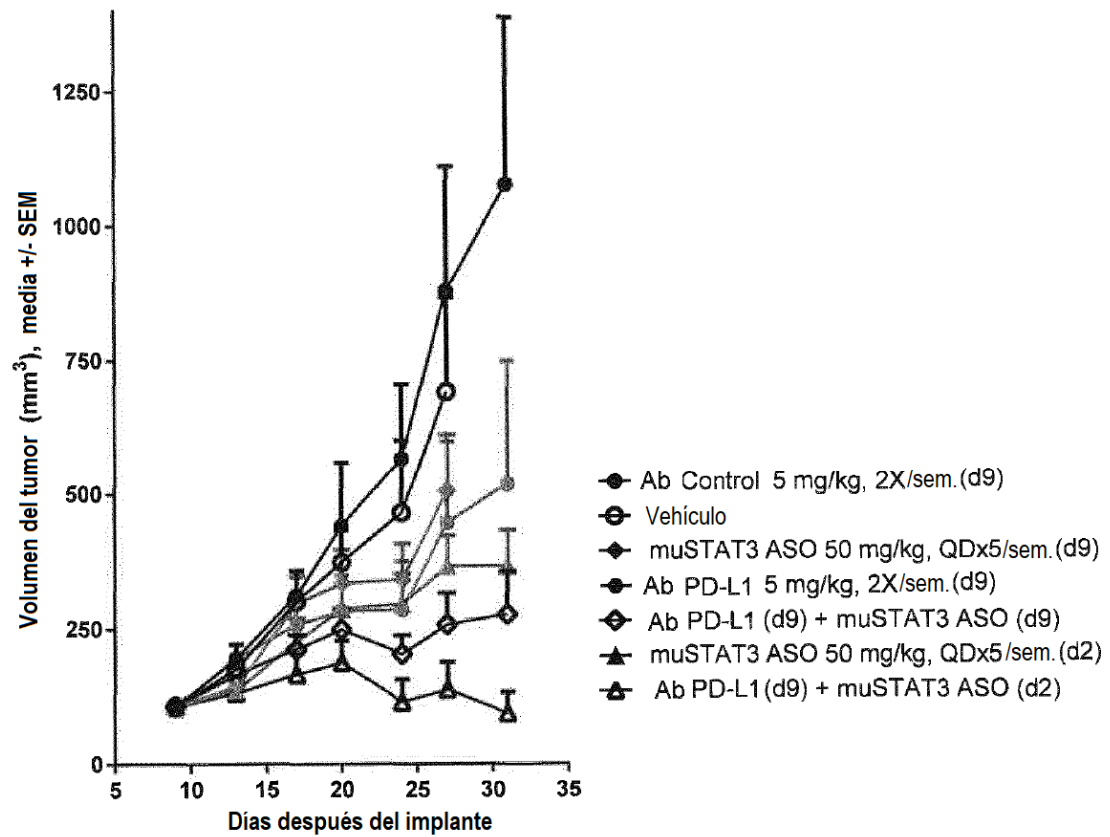


Figura 2a

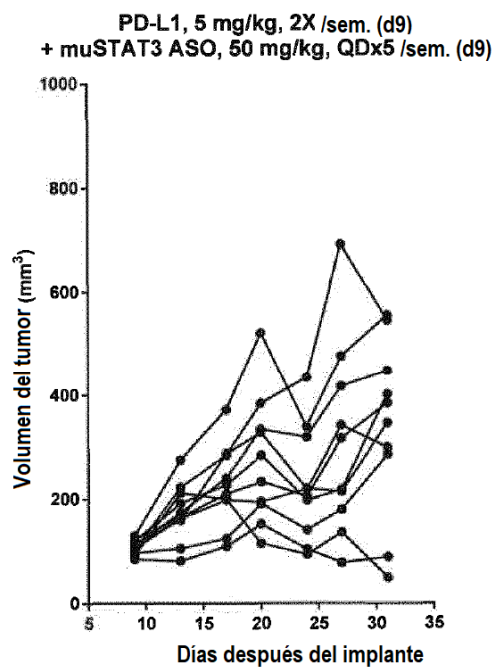


Figura 2b

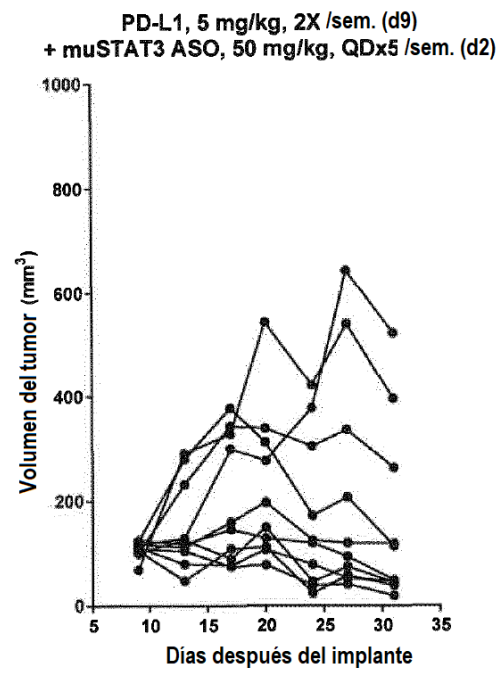
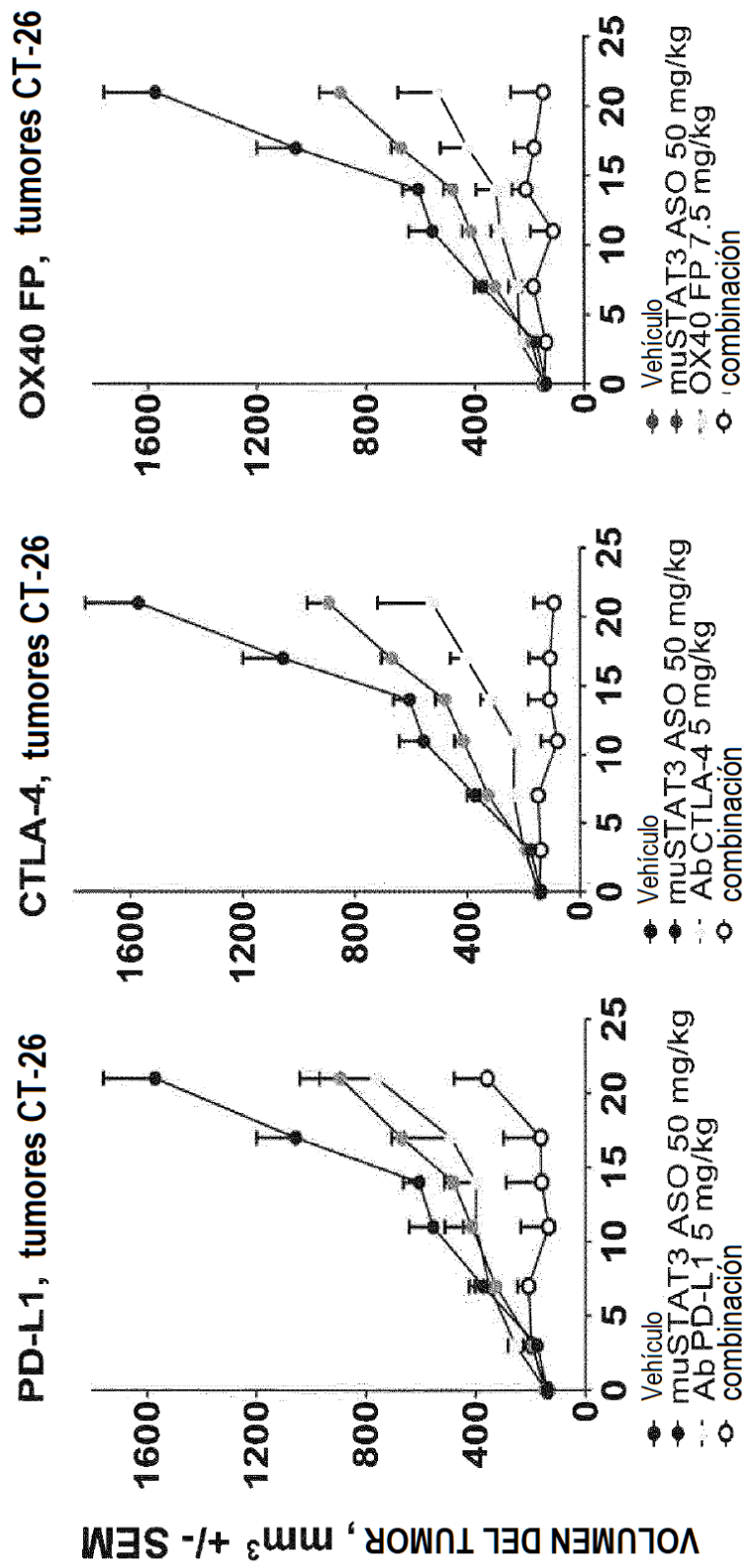
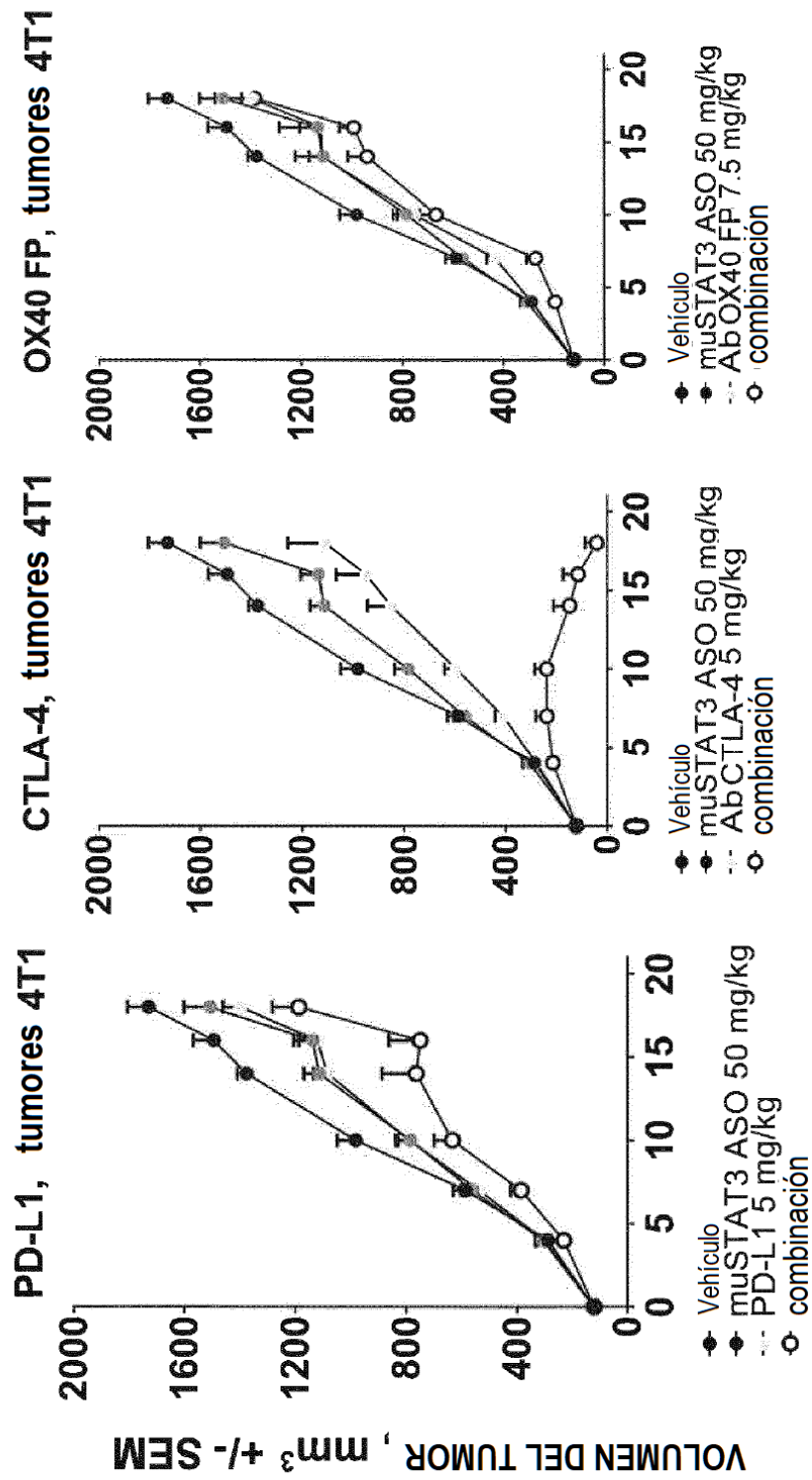


Figura 2c



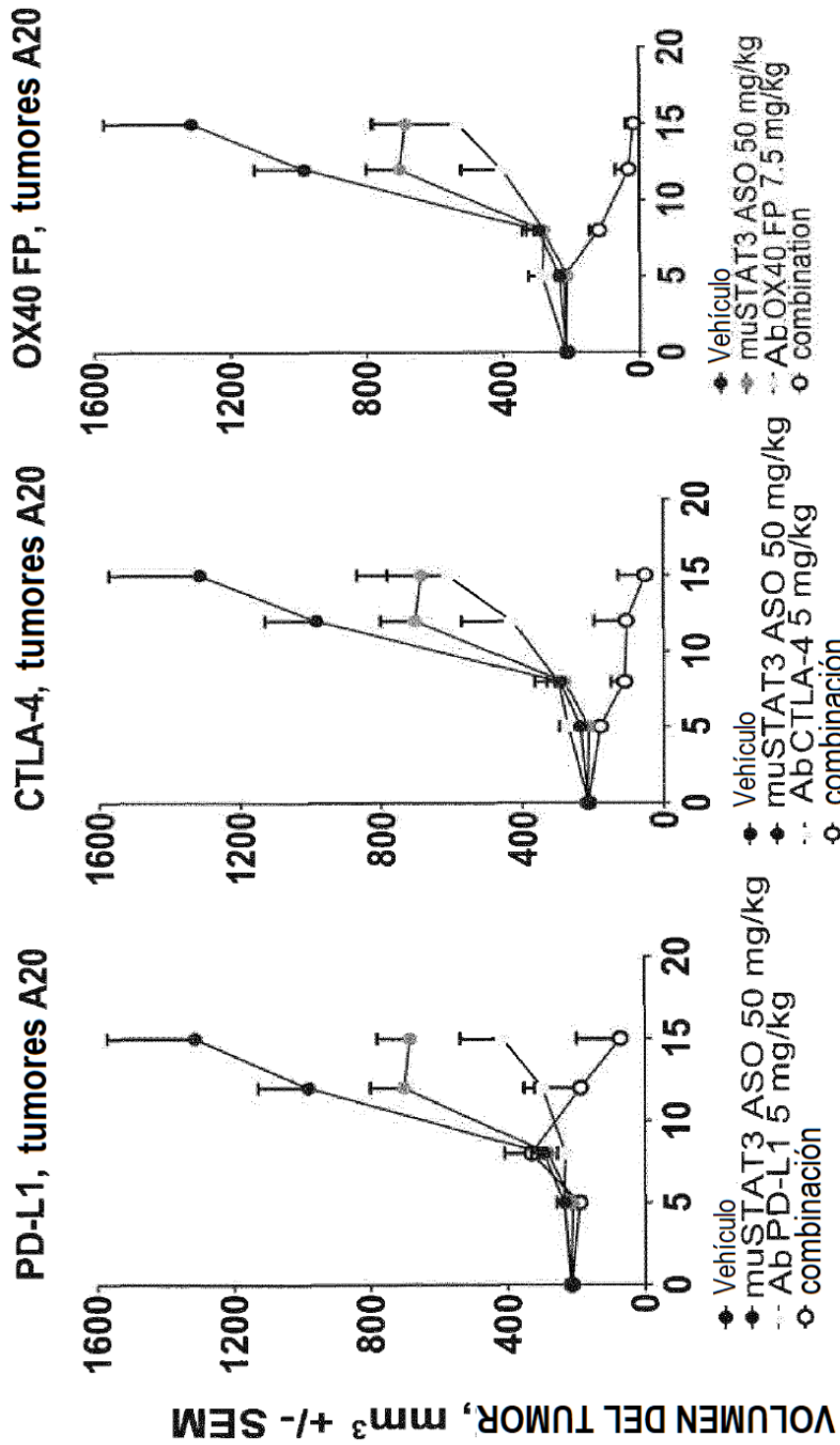
DÍAS DESPUÉS DE LA ASIGNACIÓN ALEATORIA

Figura 3a



DÍAS DESPUÉS DE LA ASIGNACIÓN ALEATORIA

Figura 3b



DÍAS DESPUÉS DE LA ASIGNACIÓN ALEATORIA

Figura 3c

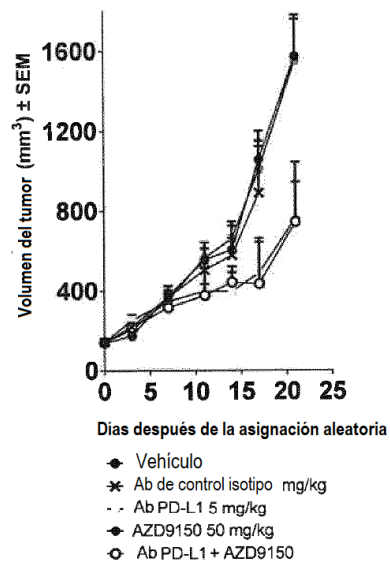


Figura 4

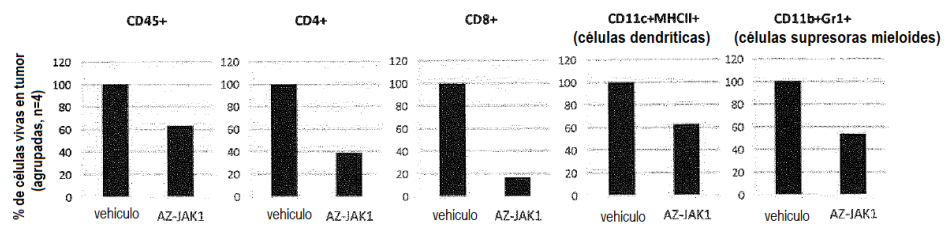


Figura 5

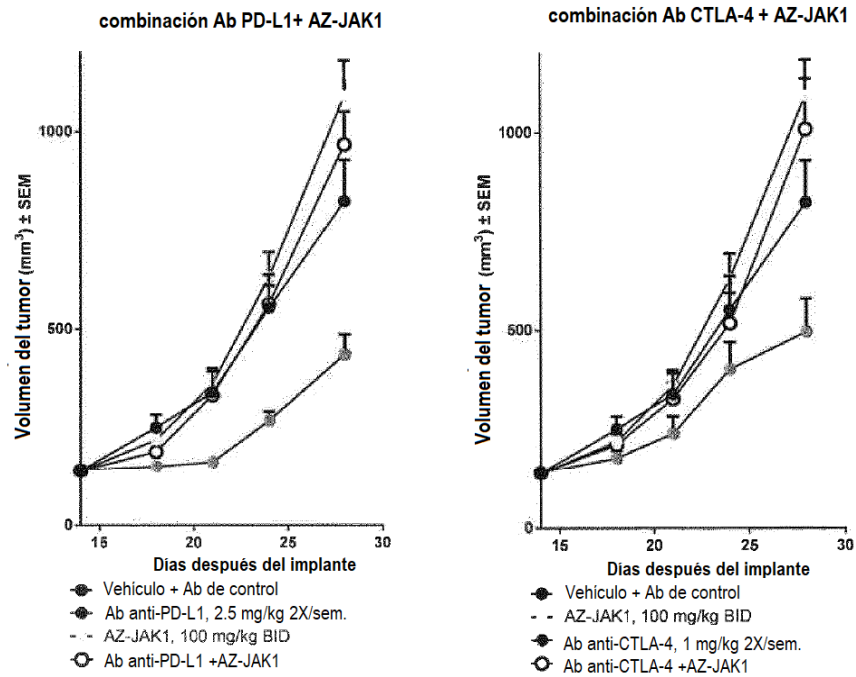


Figura 6

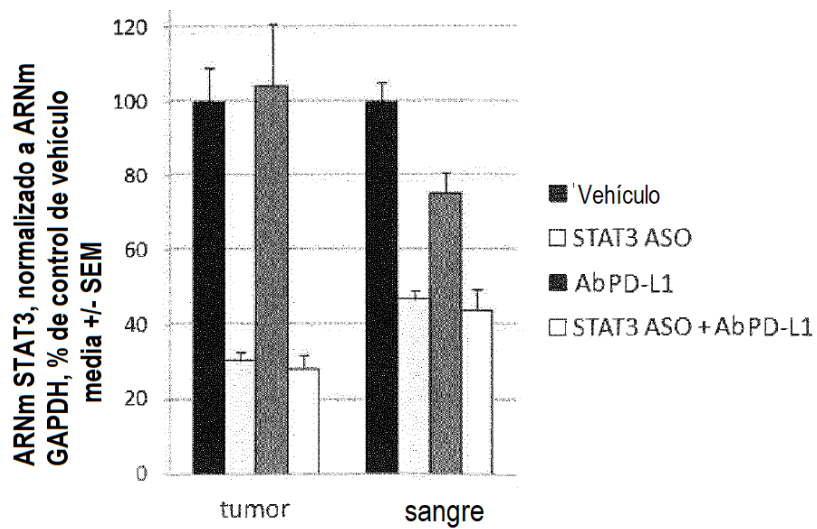


Figura 7