

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 358**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2012 PCT/US2012/024009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012 E 12868058 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2812022**

54 Título: **Método de supervisión del tratamiento del cáncer con agonistas de OX40**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2020

73 Titular/es:

**PROVIDENCE HEALTH & SERVICES - OREGON
(100.0%)
1801 Lind Avenue Southwest No. 9016
Renton, WA 98057-9016, US**

72 Inventor/es:

**CURTI, BRENDAN;
KOVACSOVICS-BANKOWSKI, MAGDALENA;
WALKER, ED;
WALKER, JOSH y
WEINBERG, ANDY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 740 358 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

Método de supervisión del tratamiento del cáncer con agonistas de OX40

5 **Antecedentes**

10 Está bien documentado que los linfocitos T periféricos de pacientes con cáncer metastásico presentan defectos funcionales, incluyendo una capacidad disminuida para proliferar (Campoli, M., *et al.* Cancer Treat Res 123, 61-88 (2005); Gattinoni, L., *et al.* Nat Rev Immunol 6, 383-393 (2006); Rodriguez, P.C. y Ochoa, A.C. Immunol Rev 222, 180-191 (2008)). Esta pérdida de función de linfocitos T es probablemente un factor importante en la incapacidad de un hospedador para montar una respuesta inmunitaria eficaz a su propio tumor. Están presentes en pacientes con cáncer linfocitos T reactivos a tumor, pero son terapéuticamente ineficaces como se demuestra por el crecimiento tumoral dentro de estos hospedadores (Hiraoka, N. Int J Clin Oncol 15, 544-551 (2010)). Sin embargo, estos mismos linfocitos T se recuperan funcionalmente si se eliminan del microambiente tumoral supresor, se expanden a grandes cantidades *in vitro* y se transfieren de nuevo a los hospedadores portadores de tumores. Esta forma de inmunoterapia adoptiva ha sido particularmente eficaz, lo que ha conducido a respuestas clínicas duraderas en pacientes con melanoma (Gattinoni, L., *et al.* Nat Rev Immunol 6, 383-393 (2006)). Por tanto, existe la necesidad de restaurar la función de linfocitos T reactivos a tumores disfuncionales en la investigación de inmunoterapia del cáncer.

20 Se ha mostrado que los anticuerpos que se dirigen a determinadas proteínas de superficie de linfocitos T restauran/potencian la función de linfocitos T reactivos a tumor *in vivo* en hospedadores portadores de tumores anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-4-1BB y anti-OX40 (Melero, I., *et al.* Nat Rev Cancer 7, 95-106 (2007); Fong, L. y Small, E. J. J Clin Oncol 26, 5275-5283 (2008); Peggs, K. S., *et al.* J Exp Med 206, 1717-1725 (2009); Curran, M. A., *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 107, 4275-4280 (2010); Brahmer, J. R., *et al.* J Clin Oncol 28, 3167-3175 (2010)). Estos anticuerpos, solos o en combinación, se están investigando para determinar si pueden restaurar la función de linfocitos T en pacientes con cáncer. Podrían ser más prácticos que la terapia de linfocitos T adoptiva debido a su facilidad de administración y su valor potencial para pacientes con muchos tipos diferentes de tumores malignos.

30 OX40 es un miembro de la familia de receptores de TNF que se expresa principalmente en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados (Paterson, D. J., *et al.* Mol Immunol 24, 1281-1290 (1987); Mallett, S., *et al.* EMBO J 9, 1063-1068 (1990); Calderhead, D. M., *et al.* J Immunol 151, 5261-5271 (1993)). Los modelos preclínicos de cáncer han mostrado que los agonistas de OX40 tienen potente actividad antitumoral contra múltiples tipos tumorales, que depende de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Kjaergaard, J., *et al.* Cancer Res 60, 5514-5521 (2000); Weinberg, A. D., *et al.* J Immunol 164, 2160-2169 (2000); Gough, M. J., *et al.* Cancer Res 68, 5206-5215 (2008); Piconese, S., Valzasina, B. y Colombo, M. P. J Exp Med 205, 825-839 (2008)). Los modelos de inmunización han mostrado que los agonistas de OX40 potenciaron la proliferación de linfocitos T, producción de citocinas efectoras, citotoxicidad y disminución de muerte celular inducida por activación y aumento de la generación de linfocitos T de memoria en sistemas modelo no humanos (Gramaglia, I., *et al.* J Immunol 165, 3043-3050. (2000); Maxwell, J. R., *et al.* J Immunol 164, 107-112 (2000); Lee, S. W., *et al.* J Immunol 177, 4464-4472 (2006); Ruby, C. E. y Weinberg, A. D. Cancer Immunol Immunother 58, 1941-1947 (2009)). Weinberg *et al.* (Immunological Reviews 244, pág. 218-231 (2011)) divulgan un ensayo clínico usando un agonista de OX40 y muestran una supervisión inmunitaria, por lo que se detecta un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8⁺ medida por la expresión de Ki-67. No se muestra ninguna diferenciación entre pacientes que responden y que no responden. Sigue existiendo la necesidad de desarrollar métodos para estimular el sistema inmunitario de pacientes humanos con cáncer y determinar si el tratamiento de potenciación inmunitaria es eficaz.

45 **Breve resumen**

Aspectos de la invención proporcionan un método para supervisar si un paciente con cáncer a quien se le ha administrado una dosis de un agonista de OX40 responderá al tratamiento con el agonista de OX40, como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En determinada divulgación en el presente documento, se proporcionan métodos para tratar el cáncer.

55 En determinada divulgación en el presente documento, el método para tratar el cáncer incluye administrar a un paciente que necesite tratamiento una cantidad eficaz de un agonista de OX40, en donde la administración aumenta el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos sobre un nivel basal correspondiente, y puede estimular la actividad de linfocitos T contra células cancerosas en el paciente.

60 En determinada divulgación en el presente documento, el método para tratar el cáncer incluye: (a) administrar a un paciente que necesite tratamiento una cantidad efectiva de un agonista de OX40; y (b) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, obtenido en uno o más puntos temporales después de la administración; en donde la administración puede estimular la actividad de linfocitos T contra las células cancerosas en el paciente; y en donde un aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos en comparación con un nivel basal correspondiente es pronóstico de tratamiento eficaz.

65 En determinada divulgación en el presente documento, el método para tratar el cáncer incluye: (a) administrar a un paciente que necesite tratamiento una cantidad efectiva de un agonista de OX40; (b) obtener linfocitos T del paciente

5 en uno o más puntos temporales después de la administración; y (c) someter los linfocitos T para la detección del nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos y la comparación con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67; en donde la administración puede estimular la actividad de linfocitos T contra las células cancerosas en el paciente; y en donde un aumento en la expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos sobre el valor inicial después de la administración es pronóstico de un tratamiento eficaz.

10 En determinada divulgación en el presente documento, el método para tratar el cáncer incluye: (a) administrar a un paciente que necesite tratamiento una cantidad efectiva de un agonista de OX40; (b) obtener linfocitos T del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración; (c) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos y comparación con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67; y (d) comparar el nivel de expresión de Ki-67 con un nivel basal correspondiente; en donde la administración puede estimular la actividad de linfocitos T contra las células cancerosas en el paciente; y en donde un aumento en la expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos sobre el valor inicial después de la administración es pronóstico de un tratamiento eficaz.

En determinada divulgación en el presente documento, esta divulgación proporciona métodos para supervisar si un paciente con cáncer responderá al tratamiento con el agonista de OX40.

20 Determinada divulgación en el presente documento proporciona un método para supervisar si un paciente con cáncer a quien se le ha administrado un agonista de OX40 responderá al tratamiento con el agonista de OX40 incluye: (a) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, obtenido del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración del agonista de OX40; y (b) comparar el nivel de expresión de Ki-67 obtenido en (a) con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67, en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o subpoblación de los mismos obtenido después de la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento con un agonista de OX40.

30 En determinada divulgación en el presente documento, el método para supervisar si un paciente con cáncer responderá al tratamiento con el agonista de OX40 incluye: (a) administrar a un paciente con cáncer una cantidad eficaz de un agonista de OX40; (b) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, obtenido del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración del agonista de OX40; y (c) comparar el nivel de expresión de Ki-67 obtenido en (b) con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67, en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o subpoblación de los mismos obtenido después de la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento con un agonista de OX40.

40 En determinada divulgación en el presente documento, el método para supervisar si un paciente con cáncer responderá al tratamiento con el agonista de OX40 incluye: (a) instruir a un profesional sanitario para que administre una cantidad eficaz de un agonista de OX40 a un paciente con cáncer que lo necesite; (b) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, obtenido del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración del agonista de OX40; y (c) comparar el nivel de expresión de Ki-67 obtenido en (b) con un nivel basal correspondiente de Ki-67, en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o subpoblación de los mismos obtenido después de la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento con un agonista de OX40.

50 En determinada divulgación en el presente documento, el método para supervisar si un paciente con cáncer responderá al tratamiento con el agonista de OX40 incluye: (a) administrar a un paciente con cáncer una cantidad eficaz de un agonista de OX40; (b) obtener linfocitos T del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración; y (c) someter los linfocitos T para la detección del nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos y la comparación con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67; en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o subpoblación de los mismos obtenido después de la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento con un agonista de OX40.

55 En determinada divulgación del tratamiento o métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67 se establece promediando el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T o la misma subpoblación de los mismos, obtenido de una población de donantes, por ejemplo, donantes sanos normales o donantes que son pacientes con cáncer.

60 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67 es el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T o la misma subpoblación de los mismos obtenida del paciente antes de la administración del agonista de OX40.

65 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T puede ser linfocitos T efectores.

- 5 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T puede ser linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻. En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻, el aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻ puede detectarse en un punto temporal de menos de aproximadamente una semana desde la administración de agonistas de OX40.
- 10 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T puede ser linfocitos T CD8⁺. En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, el aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD8⁺ se detecta por primera vez en un punto temporal de al menos aproximadamente una semana desde la administración del agonista de OX40. En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, la administración de un agonista de OX40 aumenta adicionalmente la proporción de linfocitos T que expresan CD38, expresión de HLA-DR o tanto CD38 como HLA-DR.
- 15 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, no se detecta un aumento en la expresión de Ki-67 en linfocitos T FoxP3⁺ CD4⁺.
- 20 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el aumento en la expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o subpoblación de los mismos, puede ser al menos aproximadamente 0,5 veces o al menos aproximadamente dos veces en relación con el nivel basal correspondiente.
- 25 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, se detecta un aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en una subpoblación de linfocitos T que responden a un antígeno específico de tumor.
- 30 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, se detecta un aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T de memoria.
- 35 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une específicamente a OX40.
- 40 En determinada divulgación en el presente documento, la molécula de unión incluye un anticuerpo que se une específicamente a OX40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En determinada divulgación en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)₂, un fragmento Fv monocatenario o un anticuerpo monocatenario. En determinada divulgación 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 de OX40 que el mAb 9B12.
- 45 En determinada divulgación en el presente documento, la molécula de unión incluye un ligando OX40 o un fragmento de unión a OX40 del mismo.
- 50 En determinada divulgación en el presente documento, la molécula de unión incluye además un polipéptido heterólogo fusionado con la misma. En determinada divulgación en el presente documento, la molécula de unión se conjuga con un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un virus, un lípido, un modificador de la respuesta biológica, un agente farmacéutico o PEG.
- 55 En determinada divulgación en el presente documento, la molécula de unión 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 superhélice; y un dominio de unión a receptor, en donde el dominio de unión a receptor es un dominio de unión a receptor OX40 y en donde el polipéptido de fusión se autoensambla en una proteína de fusión trimérica. En determinada divulgación en el presente documento, este polipéptido de fusión es capaz de unirse al receptor OX40 y estimular al menos una actividad mediada por OX40. En determinada divulgación en el presente documento, el dominio de unión a receptor OX40 de este polipéptido de fusión incluye un dominio extracelular de ligando de OX40 (OX40L). En determinada divulgación en el presente documento, el dominio de trimerización de esta proteína de fusión incluye un dominio de trimerización de TRAF2, un dominio de trimerización de Matrilina-4 o una combinación de los mismos.
- 60 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el cáncer es un tumor sólido o una metástasis del mismo. En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento el cáncer es, por ejemplo, melanoma, cáncer gastrointestinal, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de pulmón o cualquier combinación de los mismos. En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento donde el cáncer se ha metastatizado, una metástasis puede situarse en un ganglio linfático, pulmón, hígado, hueso o cualquier
- 65

combinación de los mismos.

En determinada divulgación de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, el tratamiento incluye además administrar al paciente al menos un tratamiento adicional contra el cáncer. El tratamiento adicional
5 contra el cáncer puede ser, por ejemplo, cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia antineoplásica dirigida, terapia hormonal o cualquier combinación de los mismos.

En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el agonista de OX40 se administra como una dosis única. En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el agonista de OX40 se administra en al menos dos dosis.
10 En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el agonista de OX40 se administra mediante infusión IV.

En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T puede detectarse mediante citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para determinar la expresión de los marcadores CD3, CD95 y CD4. En determinada divulgación en el presente documento las PBMC que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD4 pueden analizarse adicionalmente mediante citometría de flujo para determinar la expresión del marcador FoxP3. En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para expresión de los marcadores CD3, CD95 y CD8. En determinada divulgación en el presente documento las PBMC que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD8 pueden analizarse adicionalmente mediante citometría de flujo para determinar la expresión del marcador CD28. En determinada divulgación en el presente documento las PBMC que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD8 pueden analizarse adicionalmente mediante citometría de flujo para determinar la expresión del marcador CD38, el marcador HLA-DR o los marcadores CD38 y HLA-DR.
15
20
25

En determinada divulgación de los métodos de tratamiento o supervisión proporcionados en el presente documento el paciente es un paciente humano.

En determinada divulgación de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento el tratamiento da como resultado una regresión de al menos un tumor o metástasis en el paciente. En determinada divulgación de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, el tratamiento da como resultado un aumento retardado o nulo del crecimiento tumoral o metastásico en el paciente. En determinada divulgación de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento el tratamiento da como resultado estabilización de la enfermedad en el paciente.
30
35

Breve descripción de los dibujos/figuras

FIG. 1: Recuentos totales de linfocitos periféricos después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12. Se analizó el recuento absoluto de linfocitos en todos los pacientes. Los resultados se presentan como valores medios para cada cohorte.
40

FIG. 2: Farmacocinética del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12 en pacientes. Los pacientes fueron infundidos con mAb anti-OX40 los días 1, 3 y 5. Se tomaron muestras de sangre antes (pre), y 2, 6 y 24 horas después de la dosis del día 1 y antes (D5-pre), 2 y 6 horas después de la dosis del día 5. La última muestra se obtuvo el día 8. Cada punto representa el valor medio para los diez pacientes en ese punto temporal. La concentración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12 se determinó mediante ELISA como se describe en los Ejemplos.
45

FIG. 3: Respuestas clínicas, **(a)** Diagrama de cascada de la mejor respuesta tumoral para pacientes con al menos una exploración de seguimiento expresada como porcentaje de cambio desde el valor inicial utilizando los criterios de Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST). Las barras están numeradas según las cohortes de pacientes incluidos en el estudio, cohorte 1 (0,1 mg/kg), cohorte 2 (0,4 mg/kg) y cohorte 3 (2 mg/kg). Los pacientes 10, 18 y 23 no tuvieron exploraciones de seguimiento debido a la progresión clínica y son EP (que padecen enfermedad progresiva), **(b-c)** Regresión de un nódulo pulmonar en un paciente (cohorte 1 con melanoma metastásico y progresión de otros nódulos). La imagen en el panel b se obtuvo antes de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12. La captura de imágenes en el panel c se obtuvo 5 meses después de la administración. **(d-e)** Reducción del volumen de un ganglio linfático en un paciente con melanoma tratado en la cohorte 3. **(f-m)** Regresión de una metástasis pulmonar en un paciente con carcinoma renal incluido en la cohorte 1. Las exploraciones de TC se tomaron antes y 2 meses después de la infusión del Ab monoclonal anti-OX40. Se muestran cuatro secciones en serie antes de (f, h, j, l) y después (g, i, k, m) tratamiento anti-OX40 para reafirmar que la lesión ha remitido completamente.
50
55

FIG. 4: aumento en el título de anticuerpos **(a)** antitetánicos y **(c)** anti-KHL medido mediante ELISA los días 15 y 43 (15 días después de la vacunación), como se explica en el Ejemplo 3. El aumento en el título de anticuerpos se comparó con muestras obtenidas antes de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12, **(b)** La proliferación de linfocitos T específicos para el tétanos se midió el día 43 para la rama A y el día 15 para la rama B, respectivamente 15 días después de la vacunación. * p<0,05, ** p<0,001.
60

FIG. 5: Cambios en la expresión de Ki-67 dentro de los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ examinados a lo largo del tiempo después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12. Las PBMC recogidas
65

en diferentes puntos temporales de dos pacientes después de la infusión de anti-OX40 y un donante normal después de la inmunización contra el tétanos se analizaron utilizando un panel de citometría de flujo multicolor descrito en el Ejemplo 4. **(a)** Células seleccionadas según CD3⁺, CD95⁺, CD4⁺ analizadas para determinar FoxP3 y Ki-67. **(b)** Células seleccionadas según linfocitos T CD3⁺ CD95⁺, CD8⁺ analizadas para determinar CD28 y Ki-67.

FIG. 6: Se analizó el factor de aumento promedio en la expresión de Ki-67 para pacientes en cada una de las tres cohortes y el grupo de control. El factor de aumento se calculó utilizando los porcentajes de Ki-67 el día 0 (valor inicial) y dividiéndolo por el porcentaje de células Ki-67⁺ en diversos días después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-OX40. **(a)** Factor de aumento de Ki-67 para linfocitos T CD4⁺ Foxp3^{neg}, **(b)** Linfocitos T CD4⁺ Foxp3^{pos}, **(c)** Linfocitos T CD8⁺ y **(d)** linfocitos NK CD3⁻. Se realizaron análisis estadísticos como se describe en el Ejemplo 4. * p=0,001, ** p=0,013, *** p=0,004, **** p=0,007.

FIG. 7: Expresión de Ki-67 por linfocitos T de memoria CD4⁺ y CD8⁺ de mono después de la administración de inmunoglobulina anti-OX40 o de ratón. Como en las FIG. 5 y 6, el factor de aumento de la expresión de Ki-67 se calculó en linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺. Se inmunizaron cuatro monos por grupo con tétanos y recibieron inmunoglobulina anti-OX40 o de ratón a 1 mg/kg i.v. **(a)** Células seleccionadas según linfocitos T CD3⁺, CD95⁺ CD4⁺, **(b)** células seleccionadas según CD3⁺ CD95⁺ CD8⁺ y evaluadas para determinar el factor de aumento en Ki-67.

FIG. 8: Los pacientes tratados con anticuerpos monoclonales anti-OX40 se estratificaron en dos grupos basándose en la progresión de enfermedad ("pacientes con progresión"), n=10 o regresión/estabilización de enfermedad ("pacientes sin progresión"), n=19. El aumento del factor promedio en la expresión de Ki-67 de PBMC se determinó para pacientes con progresión frente a pacientes sin progresión en las siguientes cuatro subpoblaciones celulares diferentes: **(a)** linfocitos T CD3⁺, CD95⁺, CD4⁺ Foxp3^{neg}, **(b)** linfocitos T CD3⁺, CD95⁺, CD8⁺, **(c)** linfocitos T CD3⁺, CD95⁺, CD4⁺ Foxp3^{pos} y **(d)** linfocitos NK CD3⁻. Se realizó una evaluación estadística para evaluar la importancia para cada grupo como se detalla en el Ejemplo 4. * p=0,021, ** p=0,003, *** p=0,001, **** p=0,01.

FIG. 9: La administración de anti-OX40 aumenta la expresión de HLA-DR y CD38 en linfocitos T CD8⁺ cíclicos. **(a)** PBL seleccionado según linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ y analizado para Ki-67 de un paciente en la segunda cohorte en diferentes puntos temporales después de la administración de anti-OX40 (columna izquierda). La columna de la derecha representa células seleccionadas según CD3⁺ CD8⁺ Ki-67⁺ (células en ciclo) y evaluadas para determinar la expresión de los marcadores de activación HLA-DR y CD38 en diferentes momentos después de la administración de anti-OX40. **(b)** Comparación del porcentaje medio de CD3⁺ CD8⁺ en ciclo que coexpresan linfocitos T HLA-DR y CD38 en 11 pacientes tratados con OX40 seleccionados al azar de las tres cohortes (círculos negros) y 9 donantes normales (triángulos negros).

FIG. 10: La infusión anti-OX40 aumenta la respuesta inmunitaria específica de tumor, **(a-b)** PBMC de dos pacientes con melanoma, antes y después de terapia con anticuerpos monoclonales anti-OX40, se cocultivaron con líneas celulares de melanoma autólogas o con HLA no coincidentes y se midió el IFN- γ en el sobrenadante mediante ELISA. Las respuestas de la gripe, que actuaron como un control positivo, no fueron significativamente diferentes en las muestras antes y después. Los anticuerpos específicos antitumorales se midieron mediante transferencia de Western **(c)** se utilizó suero de un paciente con melanoma para explorar lisados de una línea celular de melanoma (femex) o una línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293) en diferentes puntos temporales después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-OX40.

Descripción detallada

I. Definiciones

Debe observarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un agonista de OX40" representa uno o más agonistas de OX40. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Asimismo, "y/o" cuando se usa en el presente documento debe tomarse como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin la otra. Por tanto, se pretende que la expresión "y/o" como se utiliza en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento incluya "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Análogamente, se pretende que la expresión "y/o" como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C" abarque cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que se refiere la presente divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2^a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente divulgación.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican en su formulario aceptado por el Système International de Unités (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique otra cosa, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo. Los

encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la divulgación, que se pueden tener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente en referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

5 Se entiende que siempre que se describan realizaciones en el presente documento con la expresión "que comprende", se proporcionan también realizaciones por lo demás análogas descritas en términos de "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en".

10 Las expresiones "OX40" y "receptor OX40" se utilizan indistintamente en el presente documento. El receptor también se denomina CD134, ACT-4 y ACT35. OX40 es un miembro de la superfamilia de receptores TNFR y se expresa en la superficie de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de mamíferos activados por antígeno (Paterson, D. J., *et al.* Mol Immunol 24, 1281-1290 (1987); Mallett, S., *et al.* EMBO J 9, 1063-1068 (1990); Calderhead, D. M., *et al.* J Immunol 151, 5261-5271 (1993)).

15 Como se utiliza en el presente documento, la expresión ligando de OX40 ("OX40L"), también denominado de diversas formas gp34, ACT-4-L y CD252, es una proteína que interacciona específicamente con el receptor OX40 (Baum PR, *et al.* EMBO J. 13: 3992-4001(1994)). El término OX40L incluye el ligando de OX40 completo, ligando de OX40 soluble y proteínas de fusión que comprenden una porción funcionalmente activa del ligando de OX40 unido covalentemente a un segundo resto, por ejemplo, un dominio proteico. 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 potencian la actividad biológica de OX40.

20 Como se utiliza en el presente documento, un "agonista", por ejemplo, un agonista de OX40 es una molécula que potencia la actividad biológica de su diana, por ejemplo, OX40. En una divulgación determinada en el presente documento bloquear los agonistas de OX40, que comprenden, por ejemplo, anticuerpos anti-OX40 o composiciones de ligandos de OX40, potencia sustancialmente la actividad biológica de OX40. Convenientemente, la actividad biológica se potencia en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 100 %. Los agonistas de OX40 como se desvelan en el presente documento incluyen moléculas de unión a OX40, por ejemplo, polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos anti-OX40, OX40L o fragmentos o derivados de estas moléculas.

25 Una "molécula de unión" o "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a la diana, por ejemplo, receptor OX40. En alguna divulgación en el presente documento, una molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En otra divulgación, una molécula de unión incluye al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de referencia. En otra divulgación, una molécula de unión incluye al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de una o más moléculas de anticuerpos de referencia.

30 El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, hidrato de carbono, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenario (ScFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una parte de determinación de antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de los mismos (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basadas en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras subunitarias diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

35 Una "molécula de unión a OX40" como se describe aquí es un agente que se une sustancialmente solamente a OX40 presente en la superficie de linfocitos T de mamíferos, tales como linfocitos T CD4⁺ activados. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de unión a OX40" incluye anticuerpos anti-OX40 y OX40L.

40 La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Se sabe en la técnica que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

65 Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región

variable de la cadena pesada de anticuerpo, sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera constan de cuatro regiones marco conservadas (FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen en proximidad estrecha por las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) J. Molec. Biol. 273: 927-948)). Además, en ocasiones se utilizan combinaciones de estos dos enfoques en la técnica para determinar las CDR.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos implicada en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epitopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Asimismo, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos producidos de cualquiera de varias formas, incluyendo, pero sin limitación, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina procede de dos o más especies. Normalmente, la región variable de cadenas tanto pesadas como ligeras corresponde a la región variable de anticuerpos procedentes de una especie de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad funcional deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos procedentes de otro (habitualmente humano) para evitar inducir una respuesta inmunitaria en esa especie.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo procedente de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina), que ha sido diseñado para contener secuencias no humanas (por ejemplo, murinas) mínimas. Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que se reemplazan restos de la región determinante de complementariedad (CDR) por restos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, 1986, Nature, 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332: 323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, Science, 239: 1534-1536). En algunos casos, se reemplazan los restos de región marco conservada (FW) de Fv de una inmunoglobulina humana por los restos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Un anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales, ya sea en la región marco conservada de Fv y/o dentro de los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FW son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Se describen ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.225.539 o 5.639.641.

Como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N.º 5.939.598 de Kucherlapati *et al.* Los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos que comprenden al menos el dominio variable de una cadena pesada o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera, donde el (los) dominio(s) variable(s) tienen la secuencia de aminoácidos del (de los) dominio(s) variable(s) de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, variantes (incluyendo derivados). Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo humano, incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican sustituciones de menos de 50 aminoácidos, sustituciones de menos de 40 aminoácidos, sustituciones de menos de 30 aminoácidos, sustituciones de menos de 25 aminoácidos, sustituciones de menos de 20 aminoácidos, sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos con respecto a la región VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, región VL, VLCDR1, VLCDR2

o VLCDR3.

La expresión "anticuerpos anti-OX40" y equivalentes gramaticales abarca anticuerpos monoclonales y policlonales que son específicos para OX40, es decir, que se unen sustancialmente solo a OX40, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En determinada divulgación en el presente documento, los anticuerpos anti-OX40 como se describen en el presente documento son anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos, humanizados o completamente humanos.

Términos tales como "tratando" o "tratamiento" o "tratar" o "aliviando" o "aliviar" se refieren tanto a (1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, reducen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado como (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de una afección o trastorno patológico específico. Por tanto, los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno; los propensos a tener el trastorno; y en los que se debe prevenir el trastorno. En determinada divulgación en el presente documento, un sujeto se "trata" con éxito para el cáncer según los métodos descritos en el presente documento si el paciente muestra, por ejemplo, remisión total, parcial o transitoria de un determinado tipo de cáncer.

Un sujeto se "trata" con éxito según los métodos descritos en el presente documento si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en la cantidad o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; o retraso o inversión del crecimiento tumoral, inhibición, por ejemplo, supresión, prevención, retraso, reducción del volumen o inversión de metástasis, por ejemplo, de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo, por ejemplo, la propagación de cáncer en tejidos blandos y hueso; inhibición de, por ejemplo, supresión de, retraso de, prevención de, reducción del volumen de, inversión de o una ausencia de metástasis tumorales; inhibición de, por ejemplo, supresión de, retraso de, prevención de, reducción del volumen de, inversión de o una ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad; mejora de la calidad de vida; o alguna combinación de efectos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retardo o ralentización de la progresión de enfermedad, alivio o paliación de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno, así como los propensos a tener la afección o trastorno o en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero sin limitación, melanoma, cáncer gastrointestinal, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y cáncer de pulmón.

Los términos "metástasis", "metastásico", y otros equivalentes gramaticales, como se usan en el presente documento, se refieren a células cancerosas que se propagan o transfieren desde el sitio de origen (por ejemplo, un tumor primario) a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva ubicación. Una célula "metastásica" o "en metástasis" es una que pierde contactos adhesivos con células adyacentes y migra a través del torrente sanguíneo o la linfa desde el sitio primario de enfermedad para invadir estructuras corporales adyacentes. Los términos también se refieren al proceso de metástasis, que incluye, pero sin limitación, desprendimiento de células cancerosas de un tumor primario, intravasación de las células tumorales a la circulación, su supervivencia y migración a un sitio distante, inserción y extravasación a un nuevo sitio a partir de la circulación y microcolonización en el sitio distante, y crecimiento y desarrollo de tumores en el sitio distante. En determinada divulgación en el presente documento, aparecen metástasis en sitios que incluyen, pero sin limitación, ganglios linfáticos, pulmón, hígado y hueso.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero", se entiende cualquier tema, particularmente un sujeto mamífero, para quien se desea diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico, deportivos o de compañía tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, osos y así sucesivamente.

Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término "polipéptido" abarque un "polipéptido" singular, así como múltiples "polipéptidos", y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término utilizado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o indistintamente con, cualquiera de estos términos. También se pretende que el término "polipéptido" se refiera a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede proceder de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

- 5 Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede retirarse de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el fin de la presente divulgación, como también los polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o parcial o sustancialmente purificado por cualquier técnica adecuada.
- 10 También se incluyen como polipéptidos fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" en referencia, por ejemplo, a polipéptidos agonistas de OX40 incluyen cualquier polipéptido que conserve al menos algunas de las propiedades de unión del agonista de OX40 correspondiente. Los fragmentos de polipéptidos incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de supresión, además de fragmentos de anticuerpos específicos analizados en otra parte del presente documento. Como se usa en el presente documento, un "derivado", por ejemplo, de un polipéptido agonista de OX40 se refiere a un polipéptido objeto que tiene uno o más restos derivatizados químicamente mediante reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales.
- 15 Las expresiones "célula T" y "linfocito T" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a la población de linfocitos que portan un complejo receptor de linfocitos T (incluyendo el marcador CD3 específico de linfocitos T) en la superficie celular. Aunque los linfocitos T actúan muy en general en la inmunidad mediada por células, se pueden dividir en una multitud de subpoblaciones basadas no solo en sus funciones particulares, sino también en la expresión diferencial de determinados antígenos superficiales e intracelulares, que pueden actuar como "marcadores" para subpoblaciones de linfocitos T particulares. Como ejemplo general no limitante, los linfocitos T auxiliares expresan el antígeno de superficie CD4, donde los linfocitos T citotóxicos expresan CD8. Las subpoblaciones en estos grupos y el solapamiento entre estos grupos pueden identificarse mediante otros marcadores de superficie celular, incluyendo, pero sin limitación, CD95, CD25, FoxP3, CD28, CCR7, CD127, CD38, HLA-DR y Ki-67. Las subpoblaciones de linfocitos T se pueden identificar y/o aislar de una población mixta de células sanguíneas mediante el uso de anticuerpos marcados, por ejemplo, a través de citometría de flujo o clasificación de células activadas por fluorescencia, descrito en más detalle en los ejemplos siguientes. Por ejemplo, puede identificarse que los linfocitos T auxiliares expresan CD3 y CD4, pero no FoxP3. Otras subpoblaciones solapantes y no solapantes de linfocitos T incluyen linfocitos T de memoria, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T reguladores (Treg), linfocitos T activados y linfocitos T citolíticos naturales (NKT).
- 20 "Ki-67" (también conocido como MK167) es un marcador de antígeno nuclear expresado en células en proliferación pero no en células en reposo. Aunque no es específico para los linfocitos T, la detección de Ki-67 en combinación con marcadores específicos de linfocitos T puede usarse para analizar el nivel de proliferación dentro de los linfocitos T de un sujeto o una subpoblación de los mismos.
- 25 Como se utiliza en el presente documento, un aumento en la expresión de Ki-67 dentro de los linfocitos T de un sujeto o una subpoblación de los mismos puede medirse en comparación con un "nivel basal correspondiente". Normalmente, una pequeña fracción determinada de los linfocitos T de un individuo experimentará proliferación. Por ejemplo, en sangre humana normal, aproximadamente 1,5 % de los linfocitos CD3⁺ (es decir, linfocitos T maduros) son Ki-67⁺ (Cordone, I., *et al.* J. Clin. Pathol 45: 201-205 (1992)). Por tanto, el "nivel basal correspondiente" para linfocitos T Ki-67⁺ puede ser aproximadamente 1,5 % de los linfocitos T totales. De manera similar, un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente el nivel basal correspondiente para cualquier subpoblación de linfocitos T de linfocitos de sangre periférica (PBL) de sujetos humanos normales. Por ejemplo, de acuerdo con esta descripción, los PBL de un panel de voluntarios humanos sanos puede evaluarse para determinar el número promedio de linfocitos T auxiliares, es decir, células CD3⁺ CD4⁺ FoxP3⁻, que son positivos para Ki-67, para determinar el "nivel basal correspondiente" para la población de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ FoxP3⁻.
- 30 En determinada divulgación en el presente documento, el "nivel basal correspondiente" de la expresión de Ki-67 se mide en una población de pacientes que padecen una enfermedad. Por ejemplo, para medir un aumento en la expresión de Ki-67 en un paciente con cáncer en respuesta a un tratamiento, por ejemplo, administración de un agonista de OX40, el "nivel basal correspondiente" de la expresión de Ki-67 en linfocitos T o una subpoblación de los mismos puede determinarse midiendo el nivel de expresión de Ki-67 promedio en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos de una población de pacientes que padecen el mismo cáncer o uno similar, que no han recibido un agonista de OX40.
- 35 En otra divulgación más del presente documento, para medir un aumento en la expresión de Ki-67 en un paciente con cáncer en respuesta a un tratamiento, por ejemplo, administración de un agonista de OX40, el "nivel basal correspondiente" de la expresión de Ki-67 en linfocitos T o una subpoblación de los mismos puede determinarse obteniendo PBL del paciente antes del tratamiento y determinando el nivel de expresión real de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o subpoblación de los mismos, estableciendo de este modo el "nivel basal correspondiente" real del paciente.

II. Agonistas de OX40

Los agonistas de OX40 interactúan con el receptor OX40 en linfocitos T CD4⁺ durante, o poco después, de cebado con un antígeno que da como resultado una mayor respuesta de los linfocitos T CD4⁺ al antígeno. En el contexto de la presente divulgación, el término "agonista" se refiere a moléculas que se unen y estimulan al menos una actividad mediada por el receptor OX40. Por ejemplo, un agonista de OX40 que interactúa con el receptor OX40 en linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno puede aumentar la proliferación de linfocitos T en comparación con la respuesta al antígeno solo. La respuesta elevada al antígeno puede mantenerse durante un periodo de tiempo sustancialmente más largo que en ausencia de un agonista de OX40. Por tanto, la estimulación a través de un agonista de OX40 potencia la respuesta inmunitaria específica de antígeno reforzando el reconocimiento de antígenos por linfocitos T, por ejemplo, células tumorales. Se describen agonistas de OX40, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 6.312.700, 7.504.101, 7.622.444 y 7.959.925.

Los agonistas de OX40 incluyen, pero sin limitación, moléculas de unión a OX40, por ejemplo, polipéptidos de unión, por ejemplo, ligando de OX40 ("OX40L") o un fragmento de unión a OX40, variante o derivado de los mismos, tales como dominios de ligandos extracelulares solubles y proteínas de fusión de 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 y se describen en los documentos WO 95/12673 y WO/95/21915. En determinada divulgación en el presente documento, el anticuerpo monoclonal anti-OX40 es 9B12, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de los mismos, como se describe en Weinberg, A. D., *et al.* J Immunother 29, 575-585 (2006).

En alguna divulgación en el presente documento, un agonista de OX40 incluye una proteína de fusión en la que uno o más dominios de OX40L están unidos covalentemente a uno o más dominios proteicos adicionales. Las proteínas de fusión de OX40L a modo de ejemplo que pueden usarse como agonistas de OX40 se describen en la patente de los Estados Unidos N.º 6.312.700.

En alguna divulgación en el presente documento, un agonista de OX40 incluye un polipéptido de fusión de OX40L que se autoensambla en una proteína de fusión de OX40L multimérica (por ejemplo, trimérica o hexamérica). Dichas proteínas de fusión se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N.º 7.959.925. La proteína de fusión de OX40L multimérica presenta mayor eficacia para potenciar la respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, particularmente un sujeto humano, debido a su capacidad para ensamblarse espontáneamente en trímeros y hexámeros altamente estables.

En determinada divulgación 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 superhélice y un dominio de unión a receptor, en donde el dominio de unión a receptor es un dominio de unión al receptor OX40, por ejemplo, un OX40L o un fragmento de unión a OX40, variante o derivado de los mismos, donde el polipéptido de fusión puede autoensamblarse en una proteína de fusión trimérica. En alguna divulgación en el presente documento, 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 determinada divulgación en el presente documento, el agonista de OX40 incluye un dominio extracelular del ligando de 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 de OX40L individuales en una proteína trimérica. Por tanto, un polipéptido de fusión de OX40L con un dominio de trimerización se autoensambla en una proteína de fusión de OX40L trimérica. En alguna divulgación en el presente documento, el dominio de trimerización es un dominio de cremallera de isoleucina u otra estructura polipeptídica de superhélice. Los dominios de trimerización de superhélice ilustrativos incluyen: TRAF2 (N.º de referencia de GENBANK® Q12933, aminoácidos 299-348; Trombospondina 1 (N.º de referencia PO7996, aminoácidos 291-314; Matrilina-4 (N.º de referencia O95460, aminoácidos 594-618; CMP (matrilina-1) (N.º de referencia NP-002370, aminoácidos 463-496; HSF1 (N.º de referencia AAX42211, aminoácidos 165-191; y Cubilina (N.º de referencia NP-001072, aminoácidos 104-138. En determinada divulgación específica en el presente documento, el dominio de trimerización incluye un dominio de trimerización de TRAF2, un dominio de trimerización de Matrilina-4 o una combinación de los mismos.

Además, puede ser conveniente modificar un agonista de OX40 para aumentar su semivida en suero. Por ejemplo, la semivida en suero de un agonista de OX40 se puede aumentar mediante conjugación con una molécula heteróloga, tal como albúmina sérica, una región Fc de anticuerpo o PEG. En determinada divulgación en el presente documento, los agonistas de OX40 pueden conjugarse con otros agentes terapéuticos o toxinas para formar inmunoconjugados y/o proteínas de fusión. En determinada divulgación en el presente documento, un agonista de OX40 se puede conjugar con un agente seleccionado del grupo que incluye un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un virus, un lípido, un modificador de respuesta biológica o un agente farmacéutico. Se describen toxinas y agentes quimioterapéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed. (Mack Publishing Co. 1995) y en Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co.

1985). Los expertos en la materia conocen otras toxinas y/o agentes quimioterapéuticos adecuados.

En determinada divulgación en el presente documento, un agonista de OX40 se puede formular para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. En determinada divulgación en el presente documento, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, no tóxico, estéril tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos de tratamiento desvelados en el presente documento, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980).

10 III. Métodos para tratar el cáncer

Se describen en el presente documento métodos para tratar el cáncer, que comprenden la administración de un agonista de OX40, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos para el cáncer. La administración de un agonista de OX40 da como resultado una respuesta potenciada de linfocitos T a antígenos en diversas células cancerosas, debido a que la activación de OX40, aunque actúa en concierto con la estimulación antigénica de linfocitos T, no es específica de antígeno o célula en sí misma.

Alguna divulgación en el presente documento describe un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que necesite tratamiento una cantidad eficaz de un agonista de OX40. La administración puede estimular la proliferación de determinadas subpoblaciones de linfocitos T. El marcador Ki-67 está estrictamente asociado con células en proliferación. En consecuencia, la proliferación de linfocitos T se puede medir como un aumento en la expresión del marcador Ki-67 en los linfocitos T del paciente o una subpoblación de los mismos. Según este método, una administración eficaz de un agonista de OX40 aumenta el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos sobre un nivel basal correspondiente, y puede estimular la actividad de linfocitos T contra células cancerosas en el paciente.

La divulgación también proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que necesite tratamiento una cantidad eficaz de un agonista de OX40 como se ha observado anteriormente; y detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, donde los linfocitos T se obtienen en uno o más puntos temporales después de la administración, por ejemplo, mediante una extracción de sangre, enriquecimiento para PBMC y detección de los niveles de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos a través de citometría de flujo. Un aumento en el nivel de expresión de Ki-67 se determina en relación con el nivel basal correspondiente como se describe en otra parte del presente documento. Según la presente divulgación, la administración de un agonista de OX40 puede estimular la actividad de linfocitos T contra las células cancerosas en el paciente. Asimismo, un aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos en comparación con un nivel basal correspondiente puede ser pronóstico de tratamiento eficaz.

Como se observa en los Ejemplos posteriores, a pacientes humanos que padecían estadios avanzados de diversos diferentes cánceres de tumores sólidos se les administró un agonista de OX40, a saber, un anticuerpo monoclonal anti-OX40, y algunos de los pacientes mostraron resultados favorables en respuesta al tratamiento, por ejemplo, diversos niveles de regresión tumoral, reducción del volumen o una detención en el avance de la enfermedad. Se descubrió que un aumento en la expresión de Ki-67 en los linfocitos T generales de los pacientes, o en determinadas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, se correlacionó con un resultado favorable, por ejemplo, reducción del volumen o regresión del tumor, o una reducción en la progresión de la enfermedad. Según la presente divulgación, un proveedor de atención sanitaria puede supervisar la expresión de Ki-67 en los linfocitos T de un paciente o una subpoblación de los mismos y en ausencia de un aumento significativo en la expresión de Ki-67, ajustar la dosis de agonista de OX40 o alterar la terapia recetada de otra manera o interrumpir el tratamiento con un agonista de OX40.

En determinada divulgación específica en el presente documento, se proporciona un método para tratar el cáncer en el que un proveedor de atención primaria administra una cantidad eficaz de un agonista de OX40 a un paciente que necesite tratamiento, por ejemplo, un médico u otro proveedor de atención sanitaria o un hospital, y el proveedor de atención primaria obtiene después linfocitos T del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración, por ejemplo, mediante la extracción de sangre, que pueden después ser procesados por el proveedor de atención sanitaria o un laboratorio clínico para aislar leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC). En determinada divulgación en el presente documento, un agonista de OX40 es autoadministrado por el paciente como parte de un kit de atención domiciliaria. Dicho kit de atención domiciliaria puede, en algunos casos, permitir además que el paciente obtenga una muestra de sangre. El proveedor de atención sanitaria o el paciente pueden entonces enviar las muestras a un laboratorio, por ejemplo, un laboratorio clínico independiente, para la detección del nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos y la comparación con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67, por métodos descritos en otra parte en el presente documento, y los resultados se transmitirían al proveedor de atención sanitaria. Como se ha descrito anteriormente, la administración de un agonista de OX40 puede estimular la actividad de linfocitos T contra las células cancerosas en el paciente. Asimismo, un aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos en comparación con un nivel basal correspondiente, como se ha descrito anteriormente, puede ser pronóstico de tratamiento eficaz.

- 5 En determinada divulgación en el presente documento, la administración de un agonista de OX40, la obtención de linfocitos T en uno o más periodos de tiempo después de la administración, la detección del nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos, la comparación con el nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67 y la determinación de si se ha producido un aumento en la expresión de Ki-67 sobre un valor inicial correspondiente, pueden ser realizados por una sola entidad, por ejemplo, un hospital o consultorio médico con un laboratorio clínico interno.
- 10 Cualquier aumento en la expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos puede ser pronóstico de tratamiento eficaz. En determinada divulgación en el presente documento, un pronóstico favorable puede correlacionarse con un aumento del nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T o una subpoblación de los mismos en al menos aproximadamente 0,5 veces, al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente cuatro veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces o incluso al menos aproximadamente 10 veces o más sobre el nivel basal correspondiente.
- 15 En determinada divulgación de los métodos descritos anteriormente, los niveles de expresión de Ki-67 en la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ del paciente (linfocitos Treg) no aumentan.
- 20 Pueden obtenerse linfocitos T o una subpoblación de los mismos del paciente con cáncer en diversos puntos temporales después de la administración del agonista de OX40, pueden obtenerse muestras varias veces al día durante uno o más días, una vez al día durante uno o más días, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada semana, cada dos semanas y así sucesivamente, durante un periodo de tiempo después de la administración que varía de un día hasta varios meses o incluso un año.
- 25 Un experto habitual en la materia puede determinar una cantidad eficaz de un agonista de OX40 para administrar mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, en determinada divulgación en el presente documento una dosis eficaz de un agonista de OX40, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-OX40, es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,4 mg/kg o 2 mg/kg de mAb anti-OX40. El agonista de OX40 se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples, por ejemplo, al menos dos, tres, 30 cuatro, cinco, seis o más dosis, separadas en diversos intervalos de tiempo determinados por el médico tratante, por ejemplo, una o más dosis al día, una o más dosis cada tres días, una o más dosis cada cinco días, una o más dosis cada semana y así sucesivamente. El tratamiento puede continuar o puede variar basándose en la supervisión de eficacia (véase posteriormente) durante un periodo de tiempo para proporcionar el mayor beneficio al paciente que se trata.
- 35 La respuesta clínica a la administración de un agonista de OX40 también puede evaluarse utilizando técnicas de exploración, tales como la exploración de captura de imágenes por resonancia magnética (IRM), captura de imágenes radiográficas, barrido por tomografía computarizada (TC), análisis de citometría de flujo o clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), histología, anatomía patológica macroscópica y química de la sangre, incluyendo 40 pero sin limitación cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografía y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a terapia con un agonista de OX40 puede experimentar el efecto beneficioso de una mejoría en los síntomas asociados con la enfermedad.
- 45 La administración del agonista de OX40 puede ser mediante cualquier vía utilizable, según lo determinado por la naturaleza de la formulación y las necesidades del paciente. En determinada divulgación en el presente documento, el agonista de OX40 se administra mediante infusión IV.
- 50 Dado que la estimulación inmunitaria con agonistas de OX40 no es específica de antígeno, pueden tratarse diversos cánceres mediante los métodos proporcionados en el presente documento, por ejemplo, en determinada divulgación en el presente documento, el cáncer es un tumor sólido o una metástasis del mismo. Los tipos de cánceres incluyen, pero sin limitación, melanoma, cáncer gastrointestinal, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de pulmón o cualquier combinación de los mismos. El sitio de metástasis no es limitante y puede incluir, por ejemplo, metástasis en el ganglio linfático, pulmón, hígado, hueso o cualquier combinación de los mismos.
- 55 Los métodos de tratamiento del cáncer descritos en el presente documento también pueden incluir otros tratamientos contra el cáncer convencionales o no convencionales además de la administración de un agonista de OX40. A modo de ejemplo no limitante, la administración de un agonista de OX40 se puede combinar con cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia antineoplásica dirigida, terapia hormonal o cualquier combinación de los mismos. La terapia adicional contra el cáncer se puede administrar antes de, durante o después de la administración de un 60 agonista de OX40. Por tanto, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un agonista de OX40 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, radioterapia, otra terapia de anticuerpos contra el cáncer, terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas o terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia, los métodos descritos en el presente documento abarcan la administración conjunta, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, con administración simultánea o 65 consecutiva en cualquier orden.

En determinados métodos de tratamiento del cáncer como se describe en el presente documento, el paciente es un paciente humano. El tratamiento eficaz con un agonista de OX40 como se describe en el presente documento puede incluir cualquier situación favorable, por ejemplo, reducción de la tasa de progresión del cáncer, retraso o ausencia del aumento del crecimiento tumoral o metastásico, estabilización de la enfermedad, reducción del volumen tumoral o regresión tumoral, ya sea en el sitio de un tumor primario o en una o más metástasis.

En determinada divulgación en el presente documento de los métodos de tratamiento del cáncer proporcionados en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T efectores. En determinada divulgación en el presente documento de los métodos de tratamiento del cáncer proporcionados en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T de memoria. En determinada divulgación en el presente documento de los métodos de tratamiento del cáncer proporcionados en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T incluye los linfocitos T que responden a un antígeno específico de tumor. Como entenderá fácilmente un experto habitual en la materia, el nivel de expresión de Ki-67 sobre el valor inicial en diversas subpoblaciones diferentes de linfocitos T puede medirse mediante la determinación de la expresión de Ki-67 en combinación con otros antígenos marcadores de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD28, CD95, CD38 y HLA-DR.

En otra divulgación en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻. Según este aspecto, el aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻ se detecta por primera vez en un punto temporal de menos de aproximadamente una semana desde la administración de agonista de OX40, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o seis días después de la administración de agonista de OX40.

En otra divulgación en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺. Según la presente divulgación, el aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD8⁺ se detecta por primera vez en un punto temporal de al menos aproximadamente una semana desde la administración de agonista de OX40, por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, días o dos semanas o más después de la administración de agonista de OX40.

En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, la administración de un agonista de OX40 aumenta adicionalmente los niveles de expresión de CD38, expresión de HLA-DR o expresión tanto de CD38 como de HLA-DR. En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, la administración de un agonista de OX40 puede aumentar la expresión de Ki-67 en poblaciones tanto positivas para CD28 como negativas para CD28 en el periodo de tiempo de hasta aproximadamente 15 días, por ejemplo, aproximadamente 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días o 18 días, pero posteriormente después de la administración del agonista de OX40, por ejemplo, aproximadamente 28 días, por ejemplo, aproximadamente 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, o más; Los niveles de expresión de Ki-67 pueden aumentarse principalmente en la subpoblación CD28⁺ de linfocitos T CD8⁺.

En determinada divulgación en el presente documento, la administración de un agonista de OX40 también puede aumentar la expresión de Ki-67 en linfocitos no T, por ejemplo, células CD3⁻ tales como linfocitos NK, según la presente divulgación, por ejemplo, la expresión de Ki-67 aumenta con respecto al valor inicial en células CD3⁻ CD56⁺.

IV. Métodos para supervisar la respuesta de un paciente al tratamiento

La presente divulgación proporciona además un método para supervisar si un paciente con cáncer a quien se le ha administrado un agonista de OX40 responderá al tratamiento con el agonista de OX40. Diversos agonistas de OX40 se describen en otra parte en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, ligandos de OX40 o fragmentos de unión a OX40, variantes o derivados de los mismos, y anticuerpos anti-OX40 o fragmentos de unión a OX40, variantes o derivados de los mismos.

En alguna divulgación, el método incluye: (a) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, de muestras obtenidas del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración del agonista de OX40; y (b) comparar el nivel de expresión de Ki-67 con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67, en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o subpoblación de los mismos obtenido después de la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento con un agonista de OX40 o indica que el paciente responderá al tratamiento con un agonista de OX40. Se describen métodos para detectar la expresión de Ki-67 en los linfocitos T de un paciente en otra parte en el presente documento, como también métodos para establecer niveles basales de la expresión de Ki-67. Análogamente, los métodos de tratamiento que implican la administración de un agonista de OX40 se describen en otra parte en el presente documento.

Una divulgación similar proporciona un método para supervisar si un paciente con cáncer responderá al tratamiento con el agonista de OX40, que comprende: (a) administrar a un paciente con cáncer una cantidad eficaz de un agonista de OX40; (b) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente, o una subpoblación de los mismos, obtenido del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración del agonista de OX40; y (c) comparar el nivel de expresión de Ki-67 con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67, en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o subpoblación de los mismos obtenido después de la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento

con un agonista de OX40. Los métodos para administrar un agonista de OX40 como se describe en otra parte en el presente documento incluyen, por ejemplo, infusión IV de una o más dosis o el agonista de OX40.

5 En determinada divulgación en el presente documento, los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento son realizados por un laboratorio, por ejemplo, un laboratorio clínico independiente u otro establecimiento que realice ensayos de supervisión. Según la presente divulgación, el laboratorio puede instruir a un profesional sanitario, por ejemplo, un médico tratante u otro personal de hospital, o el consultorio de un médico, o el paciente usando un kit de atención domiciliaria, para administrar una cantidad eficaz de un agonista de OX40 a un paciente de cáncer que lo necesite, y llevan a cabo las etapas de detección y comparación como se ha destacado anteriormente para determinar si el paciente que está siendo tratado responderá al tratamiento, es decir, donde los linfocitos T del paciente o una subpoblación de los mismos presentan un aumento en la expresión de Ki-67 sobre el valor inicial.

15 En otra divulgación determinada en el presente documento, los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento son realizados por un proveedor de atención sanitaria, por ejemplo, un hospital o consultorio médico. Según la presente divulgación, el proveedor de atención sanitaria puede administrar una cantidad efectiva de un agonista de OX40 a un paciente que necesite tratamiento y obtener muestras de linfocitos T del paciente en uno o más intervalos de tiempo después del tratamiento, por ejemplo, extrayendo muestras de sangre y procesando las muestras para enriquecerlas con respecto a PBMC. El proveedor de atención sanitaria puede enviar los linfocitos T a una instalación establecida para medir los niveles de expresión de Ki-67, por ejemplo, un laboratorio en la oficina, un laboratorio que es parte del mismo hospital o un laboratorio clínico independiente, para la detección del nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos y la comparación con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67, que puede llevar a cabo las etapas de detección y comparación como se ha destacado anteriormente para determinar si el paciente que está siendo tratado responderá al tratamiento, es decir, donde los linfocitos T del paciente o una subpoblación de los mismos presentan un aumento en la expresión de Ki-67 sobre el valor inicial.

30 Según los métodos de supervisión descritos en el presente documento, un resultado en el que el aumento de los niveles de expresión de Ki-67 en los linfocitos T del paciente o subpoblación de los mismos indica que es probable que el paciente responda al tratamiento. Si no se observa ningún aumento en la expresión de Ki-67, se puede llegar a una conclusión de que es probable que el paciente no responda al tratamiento y el tratamiento puede ajustarse o interrumpirse según lo puede determinar el profesional sanitario tratante. La cantidad de aumento sobre el valor inicial puede usarse como medida del nivel de respuesta y, en determinada divulgación en el presente documento, la dosificación, frecuencia de dosificación o vía de dosificación al paciente se puede ajustar para aumentar la eficacia del tratamiento. El momento de las dosificaciones, las cantidades de dosificaciones y los métodos de administración se describen en otra parte en el presente documento.

40 Según los métodos de supervisión descritos en el presente documento, cualquier aumento en la expresión de Ki-67 en los linfocitos T o una subpoblación de los mismos del paciente puede indicar que el paciente responde al tratamiento. En determinada divulgación en el presente documento, una respuesta favorable al tratamiento puede correlacionarse con un aumento del nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T o una subpoblación de los mismos en al menos aproximadamente 0,5 veces, al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente cuatro veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces o incluso al menos aproximadamente 10 veces o más sobre el nivel basal correspondiente.

45 En determinada divulgación de los métodos de supervisión descritos anteriormente, los niveles de expresión de Ki-67 en la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ del paciente (linfocitos Treg) no son indicativos de una respuesta al tratamiento.

50 Según los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, Pueden obtenerse linfocitos T o una subpoblación de los mismos del paciente con cáncer en diversos puntos temporales después de la administración del agonista de OX40, pueden obtenerse muestras varias veces al día durante uno o más días, una vez al día durante uno o más días, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada semana, cada dos semanas y así sucesivamente, durante un periodo de tiempo después de la administración que varía de un día hasta varios meses o incluso un año.

55 Un experto habitual en la materia puede determinar una cantidad eficaz de un agonista de OX40 para administrar mediante métodos bien conocidos. Se proporcionan ejemplos de dosis eficaces en otra parte en el presente documento, por ejemplo, en los Ejemplos posteriores. Según los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, la dosificación continua para administrar a un paciente se puede ajustar basándose en el grado de aumento en la expresión de Ki-67 observado en los linfocitos T del paciente después de una o más administraciones anteriores de un agonista de OX40. Basándose en los resultados de supervisión, se pueden administrar dosis adicionales del agonista de OX40 como, por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dosis, separadas en diversos intervalos de tiempo determinados por el médico tratante basándose total o parcialmente en los resultados de los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento. Basándose en la supervisión, el tratamiento puede continuar o puede modificarse para proporcionar el mayor beneficio al paciente que está siendo tratado.

La administración del agonista de OX40 puede ser mediante cualquier vía utilizable, según lo determinado por la naturaleza de la formulación y las necesidades del paciente. En determinada divulgación en el presente documento, el agonista de OX40 se administra mediante infusión IV.

5 Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para supervisar la eficacia del tratamiento con agonista de OX40 de diversos cánceres, por ejemplo, en determinada divulgación en el presente documento, el cáncer puede ser un tumor sólido o una metástasis del mismo. Los tipos de cánceres incluyen, pero sin limitación, melanoma, cáncer gastrointestinal, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de pulmón o cualquier combinación de los mismos. El sitio de metástasis no es limitante y puede incluir, por ejemplo, metástasis en el ganglio linfático, pulmón, hígado, hueso o cualquier combinación de los mismos.

15 En determinada divulgación en el presente documento de los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel de expresión de Ki-67 sobre el valor inicial se mide en la subpoblación de linfocitos T efectores. En determinada divulgación en el presente documento de los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel de expresión de Ki-67 sobre el valor inicial se mide en la subpoblación de linfocitos T de memoria. En determinada divulgación en el presente documento de los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel de expresión de Ki-67 sobre el valor inicial se mide en la subpoblación de linfocitos T que responden a un antígeno específico del tumor. Como entenderá fácilmente un experto habitual en la materia, el nivel de expresión de Ki-67 sobre el valor inicial en diversas subpoblaciones diferentes de linfocitos T puede medirse mediante la determinación de la expresión de Ki-67 en combinación con otros antígenos marcadores de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, CD3, CD4, CD8, FoxP3, CD28, CD95, CD38 y HLA-DR. Dichas determinaciones se pueden lograr mediante el uso de anticuerpos específicos para marcadores de linfocitos T, por ejemplo, anticuerpos marcados tales como anticuerpos marcados con fluorescencia, en un ensayo tal como citometría de flujo.

25 En otra divulgación en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T para supervisar puede ser linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻ o linfocitos T CD4⁺ CD95⁺ Foxp3⁻. Según la presente divulgación, el aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻ se detecta por primera vez en un punto temporal de menos de aproximadamente una semana desde la administración de agonista de OX40, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o seis días después de la administración de agonista de OX40.

30 En otra divulgación en el presente documento, la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺. Según la presente divulgación, el aumento en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD8⁺ se detecta normalmente por primera vez en un punto temporal de al menos aproximadamente una semana desde la administración de agonista de OX40, por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, días o dos semanas o más después de la administración de agonista de OX40.

35 En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, la administración de un agonista de OX40 aumenta adicionalmente los niveles de expresión de CD38, expresión de HLA-DR o expresión tanto de CD38 como de HLA-DR. En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, un aumento en la expresión de Ki-67 se puede supervisar o detectar en linfocitos T tanto CD28⁺ como CD28⁻ CD8⁺ aproximadamente a los 15 días, por ejemplo, aproximadamente 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días o 18 días. En determinada divulgación en el presente documento donde la subpoblación de linfocitos T es linfocitos T CD8⁺, un aumento en la expresión de Ki-67 puede supervisarse o detectarse principalmente en linfocitos T CD28⁺ CD8⁺ durante un periodo de tiempo más largo, por ejemplo, hasta aproximadamente 28 días, por ejemplo, aproximadamente 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días o más.

50 En determinada divulgación en el presente documento, un aumento en los niveles de expresión de Ki-67 también puede supervisarse en linfocitos no T, por ejemplo, células CD3⁻ tales como linfocitos NK, por ejemplo, células CD3⁻ CD56⁺.

55 Según los métodos de supervisión proporcionados en el presente documento, el nivel de expresión de Ki-67 en linfocitos T puede detectarse mediante citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas del paciente con cáncer que está siendo tratado con un agonista de OX40. En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para determinar la expresión aumentada de Ki-67 en células que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD4. En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para determinar la expresión aumentada de Ki-67 en células que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD4, y también el marcador FoxP3. En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para determinar la expresión aumentada de Ki-67 en células que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD8. En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para determinar la expresión aumentada de Ki-67 en células que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD8, y también el marcador CD28. En determinada divulgación en el presente documento, las PBMC se pueden analizar mediante citometría de flujo para determinar la expresión aumentada de Ki-67 en células que expresan los marcadores CD3, CD95 y CD8, y también el marcador HLA-DR, el marcador CD38 o los marcadores CD38 y HLA-DR.

65 La práctica de la divulgación empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular,

cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Patente de los Estados Unidos N.º 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; el tratado, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Se exponen principios generales de la ingeniería de anticuerpos en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Se exponen principios generales de la ingeniería de proteínas en Rickwood *et al.*, eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Se exponen principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Además, los métodos convencionales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente se siguen generalmente como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8ª ed; Appleton y Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

Los trabajos de referencia convencionales que exponen principios generales de inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Ámsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) *Kuby Immunology* (4ª ed.; H. Freeman & Co.); Roitt *et al.* (2001) *Immunology* (6ª ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5ª ed.; División de Ciencias de la Salud de Elsevier); Kontermann y Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración y no como limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Protocolo de ensayo clínico

Este ejemplo describe un ensayo clínico de aumento de dosis de fase 1 en el que los pacientes con cáncer avanzado se trataron con un anticuerpo monoclonal anti-OX40 murino (mAb). Se incluyeron pacientes con neoplasias malignas sólidas metastásicas (por ejemplo, cáncer de próstata, renal, melanoma, gastrointestinal, de ovario y de pulmón) refractarias a la terapia convencional en un ensayo clínico de aumento de dosis de fase 1 utilizando el mAb agonista murino anti-OX40 humano 9B12 (véase posteriormente). Los individuos, de al menos 18 años de edad, con cáncer metastásico medible o evaluable no curable con cirugía convencional, quimioterapia o radiación fueron elegibles para el ensayo. Otros criterios de elegibilidad incluyen el estado de rendimiento del Grupo de Oncología Cooperativa del Este (ECOG) 0-2 (véase: Oken, M. M., *et al.*, *Am J Clin Oncol* 5:649-655, (1982), función hematológica, renal, cardíaca y hepática adecuadas, y la capacidad de comprender y firmar un documento de consentimiento informado por escrito. Los principales criterios de exclusión fueron la presencia de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) antes del tratamiento, enfermedad autoinmunitaria clínicamente significativa, infección por VIH, seropositividad para la hepatitis B o C o alergia al tétanos o mariscos.

(a) Pacientes y protocolo

Los datos demográficos de las patentes se presentan en la Tabla 1. La terapia previa para los pacientes incluidos incluyó cirugía, radiación, quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia. Todos los pacientes tenían estado de rendimiento ECOG 0 o 1. La mediana del número de tratamientos previos contra el cáncer fue de 2 (intervalo 0 - 8) y todos tuvieron progresión de su cáncer en el momento de su inclusión.

Todos los pacientes recibieron infusión intravenosa de mAb anti-OX40 los días 1, 3 y 5 de un solo ciclo. Los pacientes se incluyeron secuencialmente en las cohortes 1-3. Los pacientes recibieron 0,1 mg/kg de mAb anti-OX40, 0,4 mg/kg

y 2 mg/kg en las cohortes 1, 2 y 3 respectivamente. Los pacientes se incluyeron aleatoriamente para recibir dos secuencias diferentes de inyecciones de antígenos indicadores. La rama A recibió KLH el día 1 y vacuna contra el tétanos el día 29, mientras que los pacientes de la rama B recibieron vacuna contra el tétanos el día 1 y KLH el día 29. Se recogieron muestras de sangre periférica como una leucoféresis los días 0 y 57 o extracciones de sangre regulares los días 5, 8, 15, 29, 36 y 43. Además, a 10 donantes normales se les proporcionó una vacuna contra el toxoide tetánico el día 1 y se tomaron muestras de sangre en los mismos puntos temporales que los pacientes del ensayo. El ensayo clínico se realizó únicamente en el Providence Portland Medical Center, Portland, OR, y fue aprobado por la junta de revisión institucional del hospital. Todos los pacientes y donantes normales dieron su consentimiento informado por escrito.

(b) *Recogida, preparación y crioconservación de muestras de sangre*

Se recogió sangre completa en tubos Vacutainer que contenían heparina sódica (BD Vacutainer). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Las células recuperadas de la interfaz se lavaron dos veces en RPMI (Lonza) y se congelaron en DMSO al 10 %. Se realizó leucoféresis realizada los días 0 y 57 según los procedimientos convencionales de la Cruz Roja Americana.

(c) *mAb anti-OX40 (9B12)*

9B12 es una IgG1 murina, mAb anti-OX40 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 inducir una respuesta agonista para la señalización de OX40, estabilidad y por su alto nivel de producción por el hibridoma. El anticuerpo 9B12 se produjo en condiciones de buenas prácticas de fabricación en un biorreactor de fibra hueca y se purificó mediante cromatografía de proteína A. El mAb 9B12 se equilibró con solución salina tamponada con fosfato, pH 7.0, y su concentración se ajustó a 5.0 mg/ml por diafiltración, tras lo cual se dividió en alícuotas en viales que contenían 3,3 ml cada uno.

(d) *Toxicidad, farmacocinética y evaluación de HAMA*

Veintiocho de los 30 pacientes recibieron las tres dosis planificadas de anti-OX40 al nivel de dosis asignado. La Tabla 2 resume las toxicidades relacionadas con anti-OX40. No hubo ninguna correlación entre el tipo o la gravedad de la toxicidad con la dosis. Linfopenia, fatiga, erupciones y síntomas de tipo gripal con fiebre y escalofríos fueron las toxicidades más comunes; habitualmente comenzaron después de la tercera dosis de anti-OX40 y generalmente se resolvieron en un periodo de 72 horas desde la última dosis. Dos pacientes tuvieron erupciones episódicas y síntomas de gripe durante hasta 3 meses después de anti-OX40 que finalmente se resolvió sin esteroides ni medicamentos inmunosupresores. Las erupciones fueron en general irregulares, eritematosas y no se desescamaron ni ampollaron.

La mayoría de la toxicidad fue de grado 1 o 2 con la excepción de linfopenia donde se observaron acontecimientos de grado 3 y 4. La linfopenia fue transitoria (FIG. 1), con un nadir medio que no bajó de 0,7 células $\times 10^6$ ml en las cohortes 1 y 2 el día 8 y se resolvió el día 15 en la cohorte 1 y el día 28 en la cohorte 2. Los pacientes en la cohorte 3 no desarrollaron linfopenia. No hubo ninguna secuela adversa por linfopenia. Siete pacientes desarrollaron esplenomegalia asintomática por ultrasonido, que se evaluó porque el 40 % de los primates no humanos en el estudio de toxicología anti-OX40 desarrollaron esplenomegalia (Weinberg, A. D., *et al.* J Immunother 29, 575-585 (2006)). En general, el anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12 fue bien tolerado y no se alcanzó la dosis máxima tolerada (DMT). Dos pacientes murieron en un periodo de cuatro semanas después de recibir el anticuerpo monoclonal anti-OX40, uno de cáncer de pulmón metastásico progresivo y otro de insuficiencia cardíaca congestiva, que fue afección preexistente antecedente.

Los niveles de anti-OX40 se determinaron en muestras de suero obtenidas de pacientes por ELISA según el siguiente método. Se absorbió anticuerpo Fc gamma de cabra anti-IgG humana, (Jackson Labs), 2 μ g/ml, durante una noche a 4 °C sobre la superficie de placas de 96 pocillos (Fisher). El anticuerpo de captura no unido se retiró por lavado y se añadió una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino al 1 % (Fisher) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió ligando de CD134:Fc humano (Alexis), a 100 μ l/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12 (véase anteriormente) se preparó a 200 ng/ml en suero humano normal al 1 % y se añadió a la placa como patrón de control positivo. Se añadieron después muestras de suero humano a una dilución inicial de 1/100, y las muestras tanto de patrón como de ensayo se diluyeron en serie 2x a lo largo de las filas. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió IgG anti-ratón de oveja unida a peroxidasa, anticuerpo completo, diluido 1:10.000 (GE, Amersham Biosciences) durante 1 hora. Finalmente, se añadió solución de sustrato TMB (kit de sustrato Pierce TMB) y se dejó incubar durante 10 minutos en la oscuridad. Inmediatamente después, se añadió una solución de parada (solución de H₂SO₄ 2 M). Se realizaron mediciones de espectrofotometría a 450 nm (Microplaca Modulus, Turner Biosystems).

Hubo un aumento dependiente de la dosis en los niveles máximos de anti-OX40 en suero como se muestra en la FIG. 2. Los niveles de anti-OX40 aumentaron después de la primera y la tercera dosis (el suero no se evaluó después de la segunda dosis) y a continuación disminuyeron. Los niveles máximos de anti-OX40 se observaron 2 horas después

de la tercera dosis (día 5) y se observó un aumento de más de 25 veces en los niveles máximos de anti-OX40 comparando las dosis menores con las mayores. El anticuerpo monoclonal anti-OX40 de ratón se detectó en la superficie de las PBMC cuando se examinó directamente *ex vivo* mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo específico anti-ratón. Entre el 9,9 y el 26,9 % de los linfocitos T CD4 y del 0,6 al 7,8 % de los linfocitos T CD8 fueron positivos usando esta técnica (datos no mostrados). Estos porcentajes fueron similares a lo que se había señalado previamente en la sangre periférica de seres humanos utilizando un anticuerpo específico de OX40 (Ma, B. Y., *et al.* Blood 106, 2002-2010 (2005)). Todos los pacientes evaluados, excepto uno, tuvieron niveles séricos elevados de HAMA el día 28 (datos no mostrados). No hubo ningún aumento de la toxicidad o títulos de HAMA a medida que aumentó la dosis.

Ejemplo 2: Respuesta del tumor al tratamiento

La FIG. 3a muestra un gráfico en cascada para la mejor respuesta según los criterios de Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) después del tratamiento anti-OX40. Ningún paciente logró una respuesta parcial según los criterios RECIST (> 30 % de reducción del volumen tumoral total). Sin embargo, al menos un nódulo tumoral remitió en 12 pacientes y no se observó ningún cambio en la medición de lesiones diana en 6 individuos. Los tipos de tumores que mostraron estabilidad o regresión fueron melanoma, renal, escamoso de la uretra, de próstata y colangiocarcinoma. El intervalo más largo de estabilidad duró 470 días en un paciente con cáncer renal, que no recibió ninguna otra terapia durante ese tiempo. Algunas personas mostraron una disminución de la enfermedad el día 29, pero progresión el día 57. Las FIG. 3b-m muestran ejemplos de regresión tumoral en tres pacientes separados después del tratamiento anti-OX40, algunos de los cuales midieron más de 2 cm de diámetro. Se observaron respuestas mixtas (por ejemplo: regresión simultánea de al menos un depósito de tumor y progresión en otros sitios) en dos pacientes con melanoma y dos pacientes con cáncer renal.

La dosis máxima tolerada (DMT) no se alcanzó después de un ciclo de terapia con los niveles de dosis ensayados. La mayoría de los pacientes habían fracasado en todas las terapias convencionales anteriores y tenían enfermedad progresiva antes de recibir anti-OX40. Hubo pruebas de reducción del volumen tumoral en 12/30 pacientes después de un ciclo de tratamiento. Esto incluyó lesiones metastásicas establecidas que tenían más de 2 cm de diámetro, que remitió completamente (FIG. 3). Se espera que ciclos adicionales de un agonista de OX40 conduzcan a aumento de la activación inmunológica y mayor regresión tumoral.

Ejemplo 3: Respuestas de anticuerpos y linfocitos T a antígenos indicadores

Los pacientes en los tres niveles de dosis se asignaron aleatoriamente a dos grupos; los pacientes de la rama A recibieron hemocianina de lapa californiana (KLH) el día 1 después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12, seguido de una vacuna contra el tétanos el día 29, y la rama B recibió tétanos el día 1 y KLH el día 29. Los pacientes probablemente no se habrían expuesto previamente al antígeno KLH, pero el tétanos sería un antígeno de "recuerdo". Los títulos de anticuerpos se evaluaron mediante ELISA según el siguiente método. El fragmento de toxina C del tétanos recombinante, (Roche), a 2 µg/ml, se absorbió durante una noche a 4 °C sobre la superficie de placas de 96 pocillos (Fisher). El antígeno no unido se retiró por lavado y se añadió una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino al 5 % (Fisher). Después se añadieron diluciones de suero del paciente y de donante normal a una dilución inicial de 1/50 y se realizaron diluciones en serie 3x a lo largo de las filas. Después de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió IgG antihumana de cabra conjugada con peroxidasa, diluida 1: 100.000 (Jackson Immuno Research Lab) durante 1 hora. Finalmente, se añadió solución de sustrato TMB (TMB SureBlue, KPL Inc) y se dejó incubar durante 10 minutos en la oscuridad, seguido de una solución de parada (ácido O-fosfórico al 85 %, Fisher). Se realizaron mediciones de espectrofotometría a 450 nm (espectrofotómetro Wallac Victor2, Perkin Elmer).

Se absorbió KLH (Biosyn Corp), a 10 µg/ml, durante una noche a 4 °C sobre la superficie de placas maxisorb de fondo plano de 96 pocillos. Se utilizó el mismo protocolo empleado en el ELISA contra el tétanos, excepto que se añadieron muestras de suero humano a una dilución inicial de 1/25, seguido de diluciones en serie 2x a lo largo de las filas.

Para todas las pruebas estadísticas de respuestas de anticuerpos séricos a KLH y tétanos, se estableció un valor de densidad óptica (DO) de corte que determinaría la dilución a la que los sueros se considerarían negativos (dilución de punto final). Se utilizó una curva de mejor ajuste generada por un modelo de degradación de 1 fase para determinar los valores de DO para la meseta inferior para cada placa de ELISA. La media para todas las mesetas en la placa + 4 desviaciones típicas se usó como la DO de corte. La dilución a la que cada curva intersectó el corte es la dilución de punto final (título) para esa curva. Las dos ramas de las tres cohortes se compararon usando un análisis de Mann-Whitney (prueba de suma de rangos de Wilcoxon) de dos colas para determinar si el factor de cambio medio aumentó significativamente desde el valor inicial entre las dos ramas.

Los niveles de anticuerpos para KLH y tétanos se evaluaron 15 días después de la inmunización (máximo de la respuesta de anticuerpos), que fue el día 15 o 43 para la rama A y la rama B, respectivamente, después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12. Los títulos de anticuerpos antitéticos se calcularon tanto antes como después de la administración de anti-OX40 y se calcularon los factores de aumento para todos los pacientes. Se descubrió un factor de aumento significativo en pacientes que fueron inmunizados con tétanos el mismo

día que la administración de anti-OX40 (rama B) en comparación con los pacientes inmunizados 28 días después (rama A) ($p = 0,0158$) (FIG. 4a).

5 La proliferación de linfocitos T en respuesta al toxoide tetánico se examinó mediante el siguiente método. Se descongelaron PBMC criopreservadas de los puntos temporales indicados para cada paciente y se incubaron 1×10^5 PBMC por pocillo (placa de 96 pocillos) por triplicado en X-VIVO15 (Lonza) que contenía suero humano normal agrupado al 5 %. Las células se estimularon con un cóctel de anticuerpos coestimulante, anti-CD28/anti-CD49d (BD Biosciences), a $0,5 \mu\text{g/ml}$ y con antígeno de toxoide tetánico (EMD Calbiochem) a $1 \mu\text{g/ml}$ durante 4 días. El día 4, las células se marcaron con 4 uCi/ml de $[^3\text{H}]$ Timidina (MP Biomedicals) durante 18 h antes de que se recogieran en
10 almohadillas de filtro y se contaran en un contador de centelleo Wallac Trilux Microbeta. Se utilizó una prueba de t de dos colas para muestras no relacionadas para determinar si la incorporación media de timidina aumentó significativamente al comparar los niveles de pretratamiento con el día 43 para la rama A o el día 15 para la rama B.

15 La proliferación de linfocitos T específicos del tétanos a partir de PBMC obtenidas antes y 15 después de la inmunización también se evaluó como anteriormente y, de forma similar a la respuesta de anticuerpos, hubo un aumento significativo en la proliferación en las muestras después de anti-OX40 asociadas con la rama B, pero no en la rama A (FIG. 4b). Los niveles de anticuerpos para KLH también se evaluaron de manera similar al tétanos. Los pacientes que recibieron anti-OX40 el mismo día en que fueron inmunizados con KLH (rama A) tuvieron un factor de aumento significativo en títulos de anticuerpos de KLH en comparación con los pacientes que recibieron KLH 28 días
20 después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-OX40 (rama B) (FIG. 4c, $p = 0,007$).

En resumen, el tratamiento anti-OX40 aumentó significativamente los títulos de anticuerpos y las respuestas de recuerdo de linfocitos T a la inmunización contra el tétanos (FIG. 4a-b). Actualmente hay varios ensayos clínicos que inmunizan a pacientes con cáncer con antígenos tumorales y esta observación aumenta la justificación para usar anti-OX40 para aumentar las respuestas de linfocitos T y B al Ag de inmunización en estudios clínicos futuros.
25

Ejemplo 4: Perfilado y proliferación de linfocitos T

30 Para determinar los efectos del anti-OX40 en linfocitos T periféricos, se desarrolló un ensayo de citometría de flujo de 10 colores utilizando anticuerpos marcados que reconocían las siguientes proteínas de superficie e intracelulares: CD3, CD4, CD8, CD95, CD25, FoxP3, CD28, CCR7, CD127 y Ki-67. La citometría de flujo se llevó a cabo mediante el siguiente método. Se obtuvieron PBMC de pacientes en momentos específicos como se indica en el Ejemplo 1 y las muestras criopreservadas se usaron para estudios de citometría de flujo. Los anticuerpos marcados con fluorocromo para CD3 (SK7), CD4 (SK3), CD8 (RPA-T8), CD95 (DX2), HLA-DR (L243), CCR7 (3D12) y Ki-67 (B56) se adquirieron de BD Pharmingen, CD127 (eBioRDR5) y Foxp3 (236A/E7) de eBioscience, CD28 (CD28.2) de Beckman Coulter, CD25 (4E3) de Miltenyi Biotech y CD38 (HIT2), CD8 (3B5) y estreptavidina AF-700 de Invitrogen. La tinción intracelular se realizó utilizando el kit Fix/Perm de eBioscience según las instrucciones del fabricante. Para evitar la interferencia de HAMA con tinción, las células se preincubaron con el anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12. Se realizó detección de la unión de anti-OX40 en PBMC nuevas utilizando una IgG anti-ratón y una IgG anti-rata
40 marcada con FITC (Invitrogen). Las células teñidas se analizaron en un LSRII o el FACS Aria (BD Biosciences). Se realizó análisis de datos utilizando el software Winlist (Verity Software House) o FACSDiva (Becton Dickinson). Se llevó a cabo análisis estadístico de la expresión de Ki-67 de la siguiente manera. Para cada población celular, las diferencias medias entre las cohortes de tratamiento en los días 8 y 15 del estudio se compararon usando análisis de varianza de una vía (ANOVA) en el factor de cambio \log_{10} desde el valor inicial. La transformación de \log_{10} se realizó para satisfacer los supuestos del modelo estadístico. Las comparaciones entre cohortes no se ajustaron para comparaciones múltiples debido a la naturaleza exploratoria de los análisis. Las diferencias medias en el factor cambio entre pacientes que responden y pacientes que no responden (véase Ejemplo 5 posterior) en cada día de estudio se analizaron utilizando ANOVA de una vía. Se realizaron análisis utilizando JMP versión 9 (SAS Institute).

50 Se examinó la expresión de Ki-67, un marcador presente solo dentro de las células en proliferación, ya que se sabe que los agonistas de OX40 aumentan la proliferación de linfocitos T. Los cambios fenotípicos en linfocitos T CD4^+ y CD8^+ de dos pacientes representativos (de las cohortes 1 y 2) después de la administración de anti-OX40 y de un individuo normal inmunizado con tétanos se analizaron directamente *ex vivo* en varios puntos temporales después de la administración de anticuerpos (FIG. 5a-b). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se seleccionaron según CD3, CD95 y CD4, marcadores que se ha señalado que identifican linfocitos T de memoria/expuestas a Ag (Pitcher, C. J., *et al.* J Immunol 168, 29-43 (2002)), y se analizaron adicionalmente para determinar FoxP3 (Tregs) y Ki-67 (FIG. 5a). También se seleccionaron PBMC de los mismos pacientes según CD3, CD95 y CD8 y se analizaron para determinar CD28 y Ki-67 (FIG. 5b). En el valor inicial, el porcentaje de linfocitos T en proliferación/ Ki-67^+ CD4^+ y CD8^+ proliferación varió entre 0,5 y 6,0 % en pacientes y controles normales (FIG. 5 y datos no mostrados). El porcentaje de linfocitos T Ki-67^+ CD4^+ comenzó a aumentar pronto (día 8) y los linfocitos T Ki-67^+ CD8^+ posteriormente (día 15) después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 (resumido en la FIG. 6); el porcentaje de células en proliferación en ambas poblaciones habitualmente volvió a los porcentajes de administración de mAb pre-anti-OX40 el día 57. Normalmente, los linfocitos T CD8^+ en proliferación se observaron en las poblaciones tanto positivas como negativas para CD28 el día 15; sin embargo, la mayoría de los linfocitos T CD8^+ en proliferación el día 29 fueron CD28^+ . El tratamiento anti-OX40 también aumentó la proliferación de células CD3^+ CD56^+ (muy probablemente linfocitos NK, FIG. 6d). No se detectaron cambios significativos en el porcentaje de PBL Ki-67^+ entre
65

los donantes normales que se inmunizaron con toxoide tetánico para cualquiera de estas poblaciones en cualquier punto temporal (FIG. 6).

5 El factor de aumento medio de linfocitos Ki-67+ entre subpoblaciones de PBL se resume en la FIG. 6 para las tres cohortes y los controles. Hubo un aumento significativo en los linfocitos Ki-67+ (en proliferación) en pacientes tratados con anticuerpos anti-OX40 en comparación con el grupo de control. Se observaron cambios significativos para linfocitos T CD4⁺/FoxP3^{neg} (FIG. 6a), linfocitos T CD8⁺ (FIG. 6c) y linfocitos CD3⁺/NK (FIG. 6d). La proliferación de los Treg CD4⁺ FoxP3^{pos} no se vio afectada en pacientes tratados con anti-OX40 a cualquier dosis o en el grupo de control (FIG. 6b). El día 15, la proliferación de células CD4⁺ FoxP3^{neg} mostró un aumento estadísticamente significativo en las cohortes 1 y 2 en comparación con el grupo de control ($p < 0,02$). El aumento de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ FoxP3^{neg} en pacientes dentro de la tercera cohorte alcanzó su máximo el día 8 y disminuyó a continuación, lo que fue un patrón de expresión diferente al de las dos primeras cohortes. El aumento en la proliferación de linfocitos T CD8⁺ alcanzó su máximo el día 15 para las tres cohortes; sin embargo, solo se observó un aumento significativo en la proliferación en la segunda cohorte en comparación con el grupo de control ($p = 0,001$). Se observó un aumento sostenido de linfocitos T Ki-67+ CD8⁺ solo en pacientes de la segunda cohorte (hasta el día 29). El aumento promedio en la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ en la cohorte 3 fue bastante menor que el observado en la cohorte 2, a pesar del hecho de que los pacientes recibieron una dosis cinco veces mayor del anticuerpo monoclonal anti-OX40. El aumento en la expresión de Ki-67 dentro de las células CD3⁺/CD56⁺ fue estadísticamente significativo en todas las cohortes en comparación con los donantes normales y alcanzó su máximo 15 días después del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-OX40. En general, el mayor factor de aumento promedio en el porcentaje de células en ciclo para las tres poblaciones de células (células CD4⁺/FoxP3^{neg}, CD8⁺ y NK) se observó en la cohorte 2 (FIG. 6).

25 Se observó un aumento significativo en la proliferación de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ que comenzó siete días después de la infusión inicial y duró al menos 15 días y en algunas ocasiones hasta un mes. Se ensayaron tres dosis de anticuerpo monoclonal anti-OX40 y hubo algunos efectos inmunológicos relacionados con la dosis. Hubo un aumento dependiente de la dosis en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ cuando la dosis aumentó de 0,1 a 0,4 mg/kg. Sin embargo, a la dosis más alta (2 mg/kg), se observó un patrón cinético diferente de la proliferación de linfocitos T CD4⁺, así como un aumento reducido en la proliferación de linfocitos T CD8⁺. El anti-OX40 no pareció aumentar la proliferación de linfocitos Treg (CD4⁺/FoxP3^{pos}) a ninguna dosis, lo que sugiere que los agonistas de OX40 condujeron preferentemente a la proliferación de linfocitos T efectores en pacientes con cáncer. Este patrón de respuesta inmunológica podría ser beneficioso para pacientes con cáncer, porque se sabe que los linfocitos Treg amortiguan la inmunidad a células tumorales (Colombo, M. P. y Piconese, S. *Nat Rev Cancer* 7, 880-887 (2007)). La expresión de Ki-67 por linfocitos T también se ha evaluado recientemente en pacientes con cáncer de próstata tratados con anti-CTLA-4 (Kavanagh, B., *et al.* *Blood* 112, 1175-1183 (2008)). El anti-CTLA-4 aumentó la proliferación de linfocitos T CD4⁺ tanto FoxP3^{pos} como FoxP3^{neg} de una manera dependiente de la dosis (misma referencia). No hubo ninguna evaluación de la proliferación de linfocitos T CD8⁺ o ninguna correlación de aumentos de Ki-67 con respuestas clínicas en esta publicación.

40 Dado que todos los pacientes montaron una respuesta HAMA al anticuerpo monoclonal anti-OX40 murino, existía la posibilidad de que el aumento en las células Ki-67+ pudiera atribuirse a una respuesta inmunitaria específica anti-ratón o inmunización contra el tétanos en lugar de potenciar el repertorio de linfocitos T endógenos. Dado que esto no podría ensayarse directamente en seres humanos, se realizó un estudio en primates no humanos para determinar si la infusión de una proteína IgG de ratón de control en combinación con una vacuna contra el tétanos induciría un aumento similar en la expresión de Ki-67+ por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ como se observó en el ensayo clínico (véase FIG. 6). Se utilizaron los siguientes métodos. Ocho macacos rhesus hembra (*Macaca mulatta*) nacidos y criados en el Centro Nacional de Investigación de Primates de Oregón (ONPRC) se dividieron en dos grupos (4 monos/grupo). Al grupo 1 se le administró el anticuerpo monoclonal anti-OX40 9B12 y al grupo 2 se le administró un IgG1 de ratón de control (MOPC-21), ambos a 1,0 mg/kg mediante infusión intravenosa los días 1, 3 y 5. Todos los monos recibieron también una vacuna contra el toxoide tetánico el día 1 antes de la infusión de mA. Se obtuvieron muestras de sangre los días 1, 7, 14, 21, 28 y 35 y las PBMC se analizaron utilizando un panel de análisis de flujo multiparamétrico como se ha descrito anteriormente.

55 Las PBMC se analizaron mediante citometría de flujo con un panel similar al descrito anteriormente para PBL humanos. El anticuerpo anti-OX40 humano de ratón aumentó la expresión de Ki-67 de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ a lo largo del tiempo (FIG. 7). No se observaron aumentos significativos en la expresión de Ki-67 en linfocitos CD4⁺ o CD8⁺ aislados de monos que habían recibido tétanos e IgG de ratón. Estos datos muestran que el aumento de la expresión de Ki-67 fue inducido por la interacción específica de OX40 y no por una respuesta inmunitaria *de novo* inducida por una proteína de ratón extraña o inmunización contra el tétanos.

60 **Ejemplo 5: Correlación de la proliferación de linfocitos T y progresión retardada del cáncer**

65 Se detalla un resumen de la respuesta clínica para pacientes en este ensayo de fase I en la FIG. 3A. Se detectaron tres patrones de respuesta clínica después de un ciclo de tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-OX40: 1) prueba de reducción inicial del volumen tumoral, 2) ausencia de cambios en la carga tumoral durante los dos meses de evaluación y 3) progresión/crecimiento tumoral. En un análisis post-hoc, los pacientes se agruparon en dos categorías: 1) pacientes que tuvieron una disminución inicial en su masa tumoral o estabilización de su enfermedad

(grupo "sin progresión", (n=19)) y 2) pacientes cuyos tumores progresaron (grupo "con progresión" (n=10)). Usando citometría de flujo como se ha descrito en el Ejemplo 4, la expresión de Ki-67 se comparó después del tratamiento anti-OX40 entre los grupos con progresión y sin progresión. El factor de aumento de linfocitos T Ki-67+ entre la población CD4⁺/FoxP3^{neg} en el grupo sin progresión el día 8 después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-OX40 fue significativamente mayor en comparación con el aumento entre el grupo con progresión, 2,7 veces frente a 1,6 veces con $p < 0,05$ (FIG. 8a). El aumento de la expresión de Ki-67 entre los linfocitos T CD8⁺ en el grupo sin progresión también fue significativamente mayor los días 5, 8 y 15 en comparación con el grupo con progresión ($p \leq 0,01$) (FIG. 8b). No se observaron diferencias significativas cuando se evaluó la expresión de Ki-67 en linfocitos T CD4⁺ Foxp3^{pos} o linfocitos CD3⁻ en grupos con progresión y sin progresión (FIG. 8c-d). Estos resultados sugieren que la respuesta proliferativa dentro de la subpoblación efectora de CD4 seguida de la proliferación de linfocitos T CD8⁺ se correlaciona con una progresión retardada del cáncer en pacientes tratados con anticuerpo monoclonal anti-OX40.

Ejemplo 6: La administración de anti-OX40 induce cambios cualitativos en linfocitos T CD8⁺ en ciclo

El efecto del anti-OX40 sobre el fenotipo de activación de linfocitos T CD8⁺ en ciclo se examinó evaluando la coexpresión de CD38 y HLA-DR, que es un rasgo característico de linfocitos T CD8⁺ humanos específicos de virus, en proliferación después de la vacunación (Miller, J. D., *et al.* Immunity 28, 710-722 (2008)). Se analizó la expresión de CD38 y HLA-DR en linfocitos T CD8⁺/Ki-67+ en diferentes momentos después de la administración de anti-OX40, utilizando los métodos de citometría de flujo descritos en el Ejemplo 4. La FIG. 9a muestra un paciente individual en el que el 1,3 % de los linfocitos T CD8⁺ eran Ki-67+ y el 64,2 % de ellos coexpresaban CD38 y HLA-DR antes del tratamiento. El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ positivos para Ki-67 aumentó a 16,3 y 20,3% los días 15 y 29 respectivamente y el día 29 más del 95 % de las células en ciclo fueron muy positivas tanto para CD38 como para HLA-DR (FIG. 9a). Hubo incluso un mayor porcentaje de células que expresaban ambos marcadores de activación en los linfocitos T CD8⁺ en ciclo dos meses después de la infusión de anti-OX40, incluso aunque el porcentaje de células CD8⁺/Ki-67+ había vuelto a los niveles basales. El porcentaje medio de linfocitos T CD38⁺/HLA-DR⁺/Ki-67+ CD8⁺ en once pacientes tratados con anti-OX40 (pacientes analizados de las tres cohortes) se comparó con nueve donantes normales inmunizados con tétanos (FIG. 9b). Los días 29 y 57, hubo un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en proliferación HLA-DR⁺/CD38⁺ en comparación con los controles, lo que sugiere que la interacción de OX40 no solo aumentó la proliferación de linfocitos T CD8⁺, sino que también aumentó su fenotipo de activación.

El aumento en el fenotipo de linfocitos T CD8⁺ activados muestra que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-OX40 puede aumentar la potencia inmunológica de estas células. Como se muestra en el Ejemplo 7 a continuación y la FIG. 10, los linfocitos T en proliferación específicos de tumores (Ki-67+) aumentaron después del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-OX40.

Ejemplo 7: Respuestas inmunitarias específicas de tumor

El anti-OX40 provocó la activación inmunitaria según se evaluó mediante el aumento de las respuestas a un neoantígeno (KLH), un antígeno de recuerdo (tétanos) y proliferación de linfocitos T de sangre periférica con fenotipos efector y de memoria (Ejemplo 3). Además, se midieron las respuestas inmunitarias específicas de tumor después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-OX40 mediante el siguiente método. La reactividad específica de tumor antes y después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-OX40 se evaluó en PBMC de 3 pacientes con melanoma para los cuales se disponía de líneas de células tumorales autólogas y con HLA no coincidentes. Se cocultivaron células de melanoma autólogas o con HLA coincidentes con PBMC del producto de la aféresis obtenido antes o 57 días después del tratamiento, a una relación de PBMC:tumor de 8:1 durante cinco días. Se recogieron sobrenadantes y la secreción de IFN- γ se cuantificó utilizando un kit de ELISA de IFN- γ (BD Biosciences). Se comparó la secreción de INF γ a partir de sobrenadantes que contienen PBMC antes del tratamiento o después del tratamiento cocultivados con línea celular autóloga, con HLA no coincidente, o gripe, utilizando una prueba t de una cola para muestras no relacionadas para determinar si el cambio fue significativo.

Se descubrieron aumentos significativos en IFN- γ en las PBMC/sobrenadantes de tumores después del tratamiento anti-OX40 en 2 de cada 3 pacientes (FIG. 10a-b). Los niveles de IFN- γ aumentaron en respuesta a células tumorales autólogas en dos pacientes, pero no en respuesta a líneas tumorales con HLA no coincidentes, y estos aumentos fueron inducidos principalmente por linfocitos T CD8 (datos no mostrados). En estas muestras no hubo diferencias significativas en la producción de IFN- γ inducida por gripe por PBMC recogidas antes o después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-OX40.

Se ha mostrado previamente que el anticuerpo monoclonal anti-OX40 potencia la producción de anticuerpos (Evans, DE *et al.*, J. Immunol 167: 6804-6801 (2001)). En consecuencia, la presencia de anticuerpos específicos de tumores se midió antes y después del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-OX40. Se usó suero de un paciente con melanoma para explorar lisados de proteínas de una línea celular de melanoma (Femex) y una línea celular de riñón embrionario (HEK293) mediante transferencia de Western antes y después del tratamiento anti-OX40 (días 0, 8, 15, 29, 36). La flecha en la FIG. 9c sigue una banda de 27 kd que está presente en los carriles de lisado de melanoma y aumenta en intensidad a lo largo del tiempo después de la administración de anti-OX40, pero está ausente en los carriles del lisado renal. La banda de 27 kd también se detectó en otras dos líneas celulares de melanoma con los

sueros del día 15 de este paciente (datos no mostrados). Por lo tanto, parece que el tratamiento anti-OX40 aumentó la producción de anticuerpos específicos de tumor de este paciente al menos para un antígeno.

5 Se llevarán a cabo experimentos para mostrar que las respuestas inmunitarias tanto endógenas como específicas de vacuna contra el tumor aumentan si se combinara un agonista de OX40 con una vacuna contra el tumor.

10 La divulgación anterior es suficiente para permitir a otros, mediante la aplicación del conocimiento dentro de la experiencia de la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente la divulgación para diversas aplicaciones relacionadas sin experimentación indebida. Por lo tanto, se pretende que dichas adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado de la divulgación, basándose en las enseñanzas y orientación presentadas en el presente documento. Debe entenderse que la fraseología o terminología en el presente documento es para el fin de descripción y no de limitación, de modo que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por el experto en la materia a la luz de las enseñanzas y orientación.

15 La amplitud y el alcance de la divulgación no deberían estar limitados por ninguna de las realizaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente, pero deberían definirse solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.

Tabla 1. Características de los pacientes	
	Número (porcentaje o intervalo)
Hombre/Mujer	24/6 (80/20)
Mediana de la edad	60 (intervalo 36-80)
ECOG	
0	23 (77)
1	7 (23)
Sitio primario del tumor	
Melanoma	7 (23)
GI	7 (23)
Renal	5 (17)
Próstata	5 (17)
Pulmón	3 (10)
Otros	3 (10)
Sitios de metástasis	
Ganglio linfático	15 (50)
Pulmón	12 (40)
Hígado	10 (33)
Hueso	7 (23)
Otros	14 (47)
Mediana del número de sitios metastásicos	2 (intervalo 1 - 4)
Cirugía	21 (70)
Radiación	14 (47)
Quimioterapia	19 (63)
Inmunoterapia	13 (43)
Agentes dirigidos	9 (30)
Terapia hormonal	5 (17)

Tabla 2. Acontecimientos adversos				
Toxicidad	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Linfopenia	3	10	6	1
Fatiga	7	12		
Erupción/Cambios en la piel	4	6		
Prurito	5	1		
Fiebre/Escalofríos	11	2		
Esplenomegalia	7			
Artralgias/Mialgias	5	5		
Náuseas/vómitos	4	3		
AST, ALT o fosfatasa alcalina aumentados	2	1		
Anemia	1	8		

REIVINDICACIONES

1. Un método para supervisar si un paciente con cáncer a quien se le ha administrado una dosis de un agonista de OX40 responderá al tratamiento con el agonista de OX40, que comprende:
- 5 (a) detectar el nivel de expresión de Ki-67 en una muestra de los linfocitos T CD8⁺ del paciente, obtenida del paciente en uno o más puntos temporales después de la administración del agonista de OX40; y
(b) comparar el nivel de expresión de Ki-67 obtenido en (a) con un nivel basal correspondiente de la expresión de Ki-67,
- 10 en donde un aumento sobre el valor inicial en el nivel de expresión de Ki-67 en los linfocitos T CD8⁺ obtenidos tras la administración del agonista de OX40 identifica a un paciente que responderá al tratamiento con un agonista de OX40 y
15 en donde el agonista de OX40 es un anticuerpo agonista anti-OX40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un polipéptido de fusión que comprende el ligando de OX40 (OX40L).
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el agonista de OX40 es un anticuerpo que se une específicamente a OX40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, opcionalmente, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo de OX40 que el mAb 9B12.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido de fusión comprende en una dirección N-terminal a C-terminal:
- 25 un dominio de inmunoglobulina, en donde el dominio de inmunoglobulina comprende un dominio Fc; un dominio de trimerización, en donde el dominio de trimerización comprende un dominio de trimerización de superhélice de TRAF2 o Matriina-4, o una combinación de los mismos; y un dominio de unión a receptor, en donde el dominio de unión a receptor es un dominio de unión a receptor OX40, y;
- 30 en donde el polipéptido de fusión se autoensambla en una proteína de fusión trimérica.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la dosis del agonista de OX40 es de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg o aproximadamente 2 mg/kg.
- 35 5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer es una neoplasia maligna sólida metastásica, que se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer gastrointestinal, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cualquier combinación de los mismos.

Figura 1

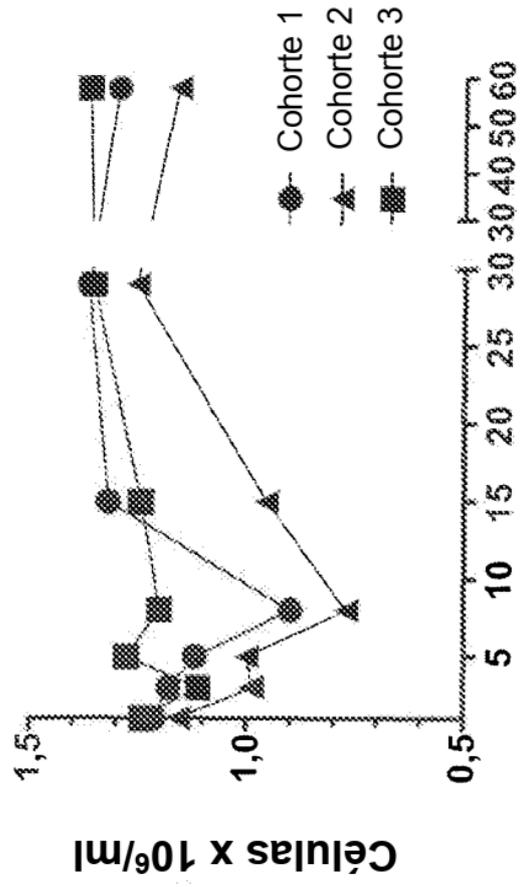


Figura 2

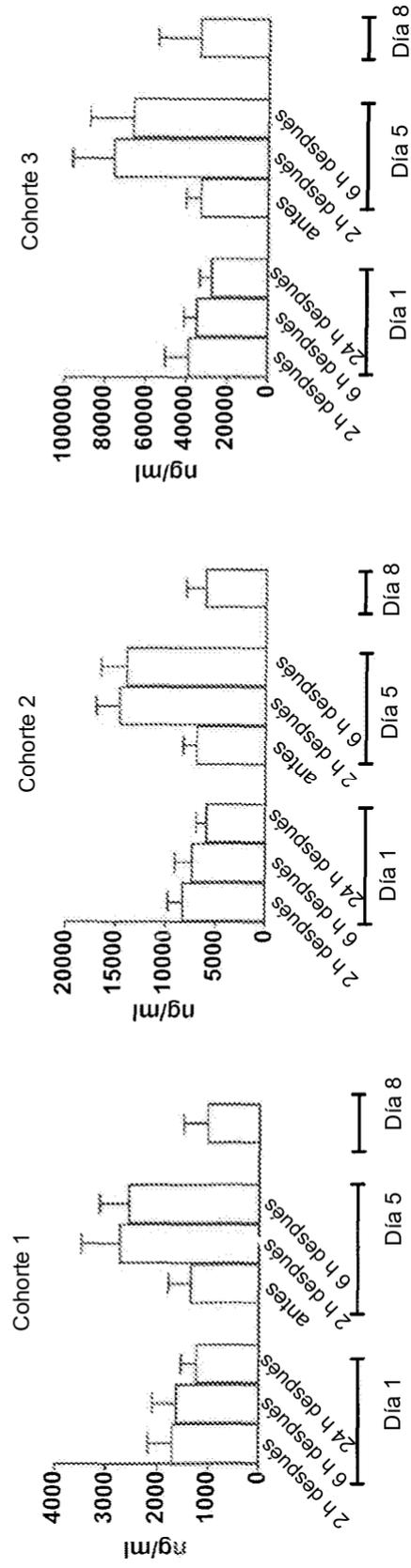


Figura 3

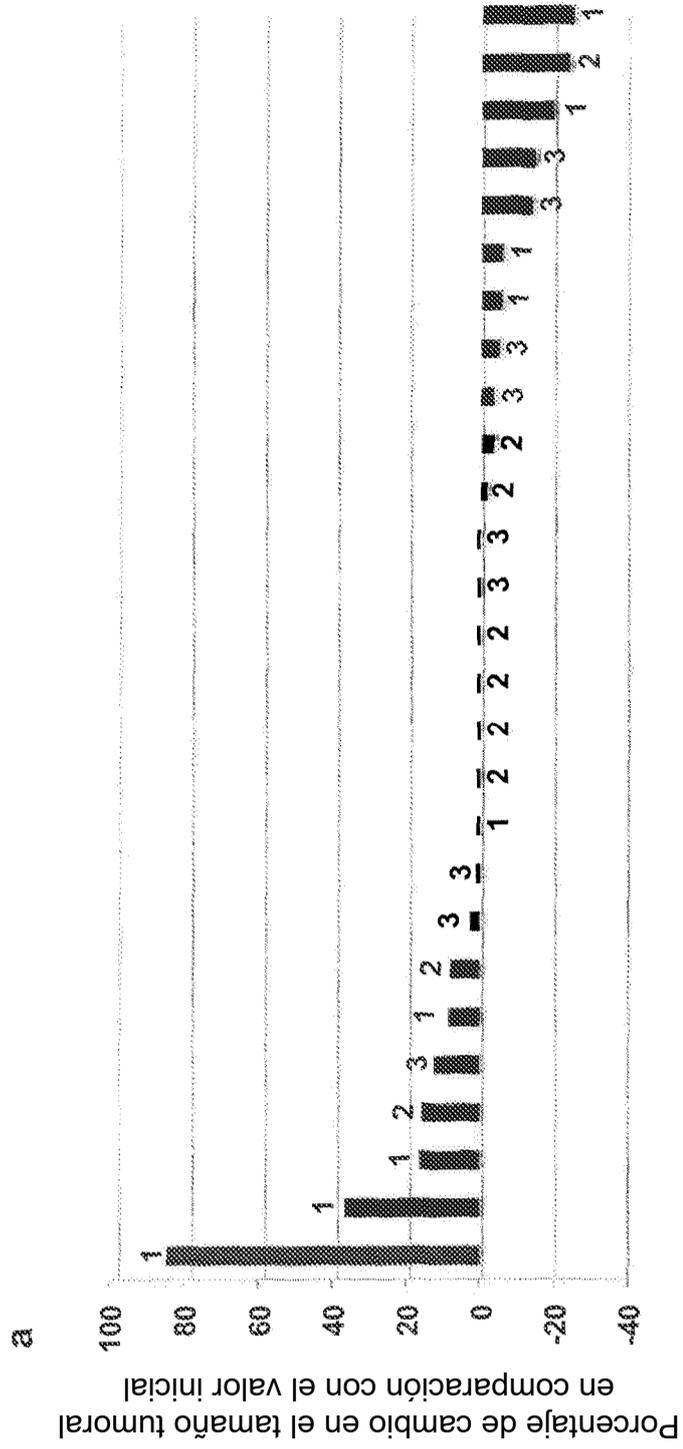
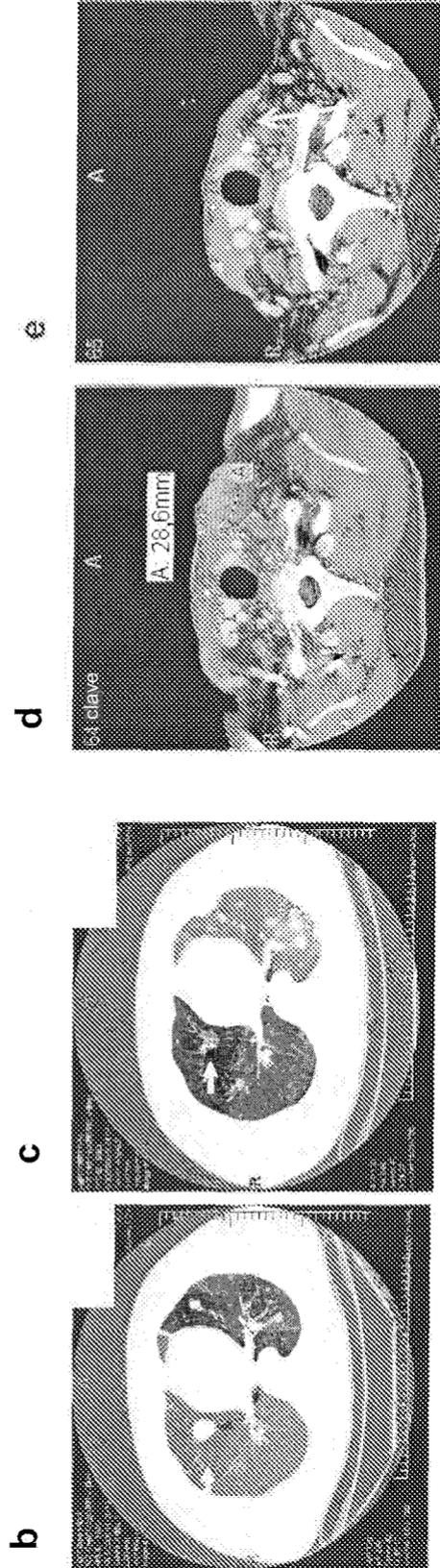


Figura 3



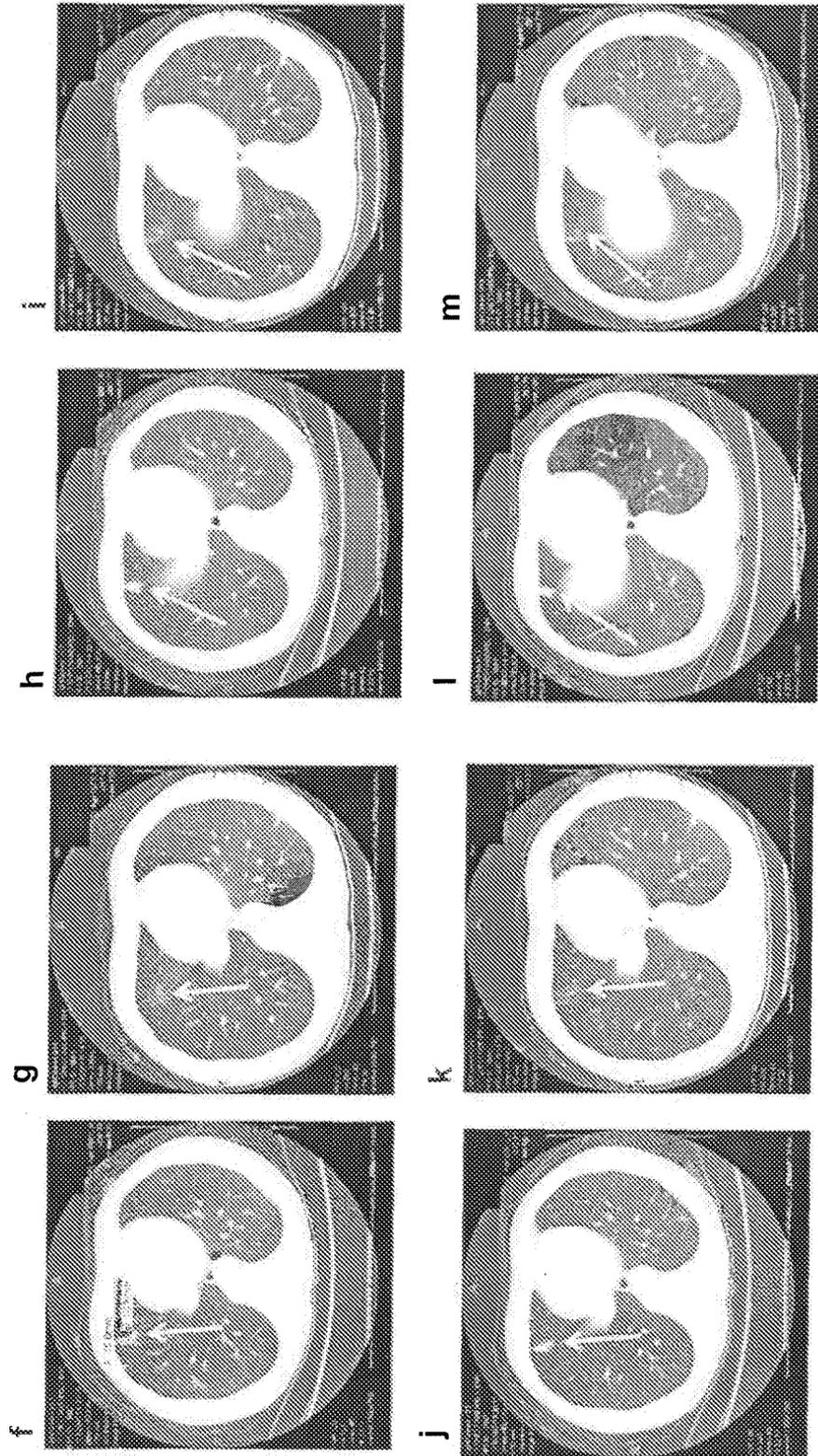
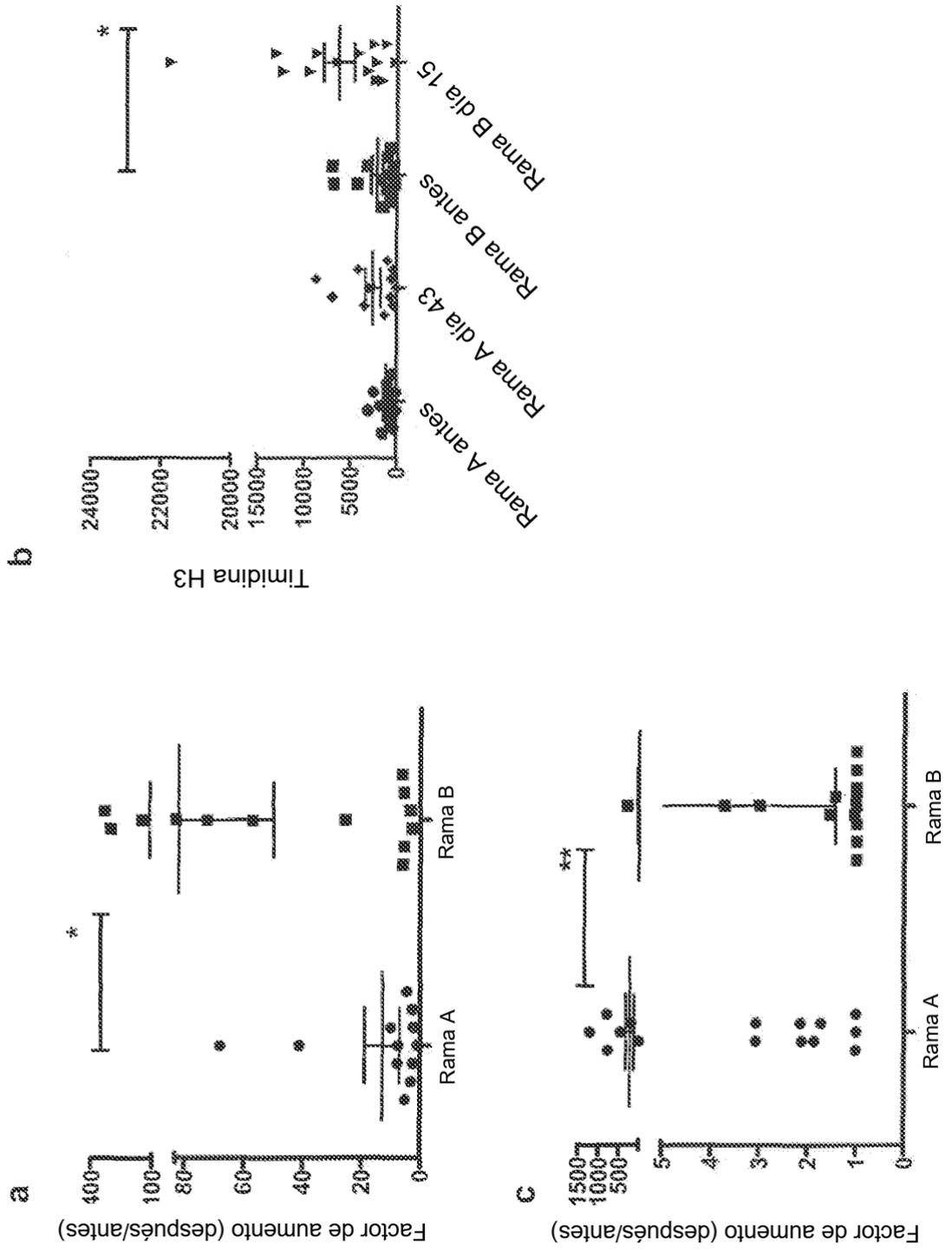


Figura 3

Figura 4



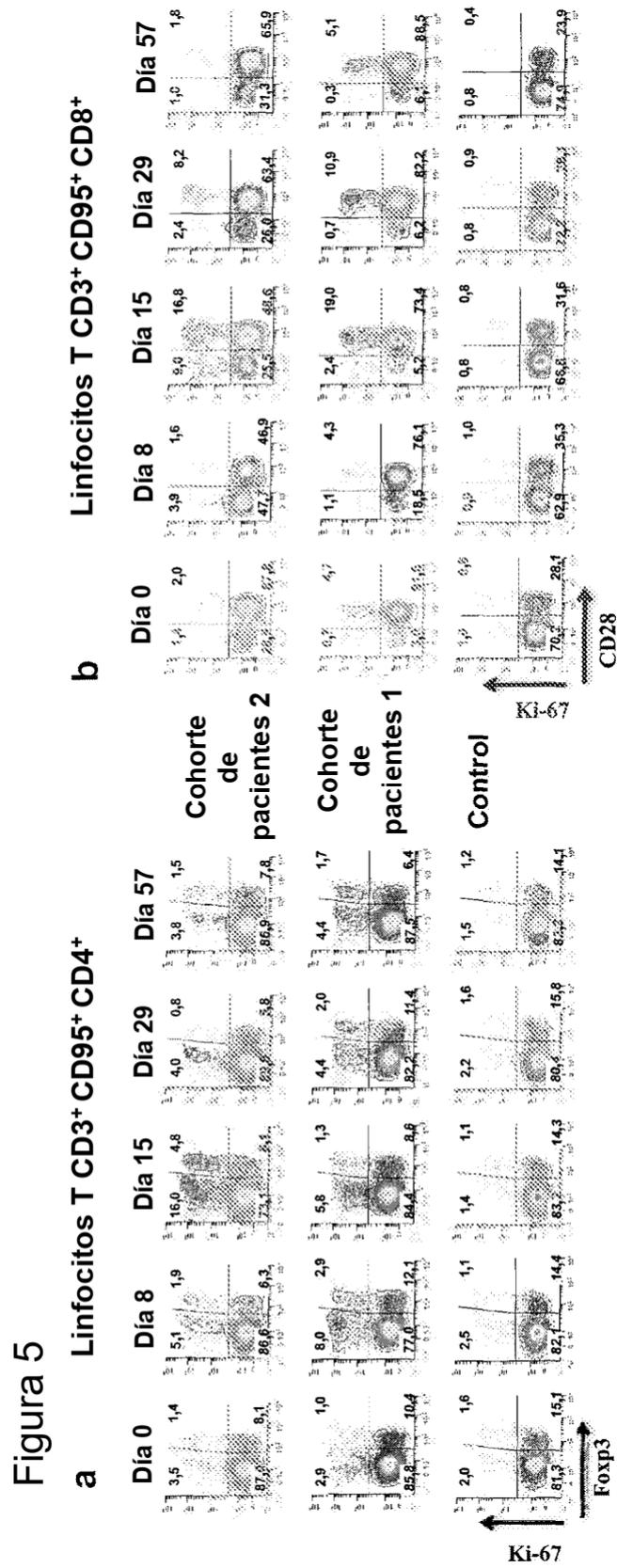


Figura 6

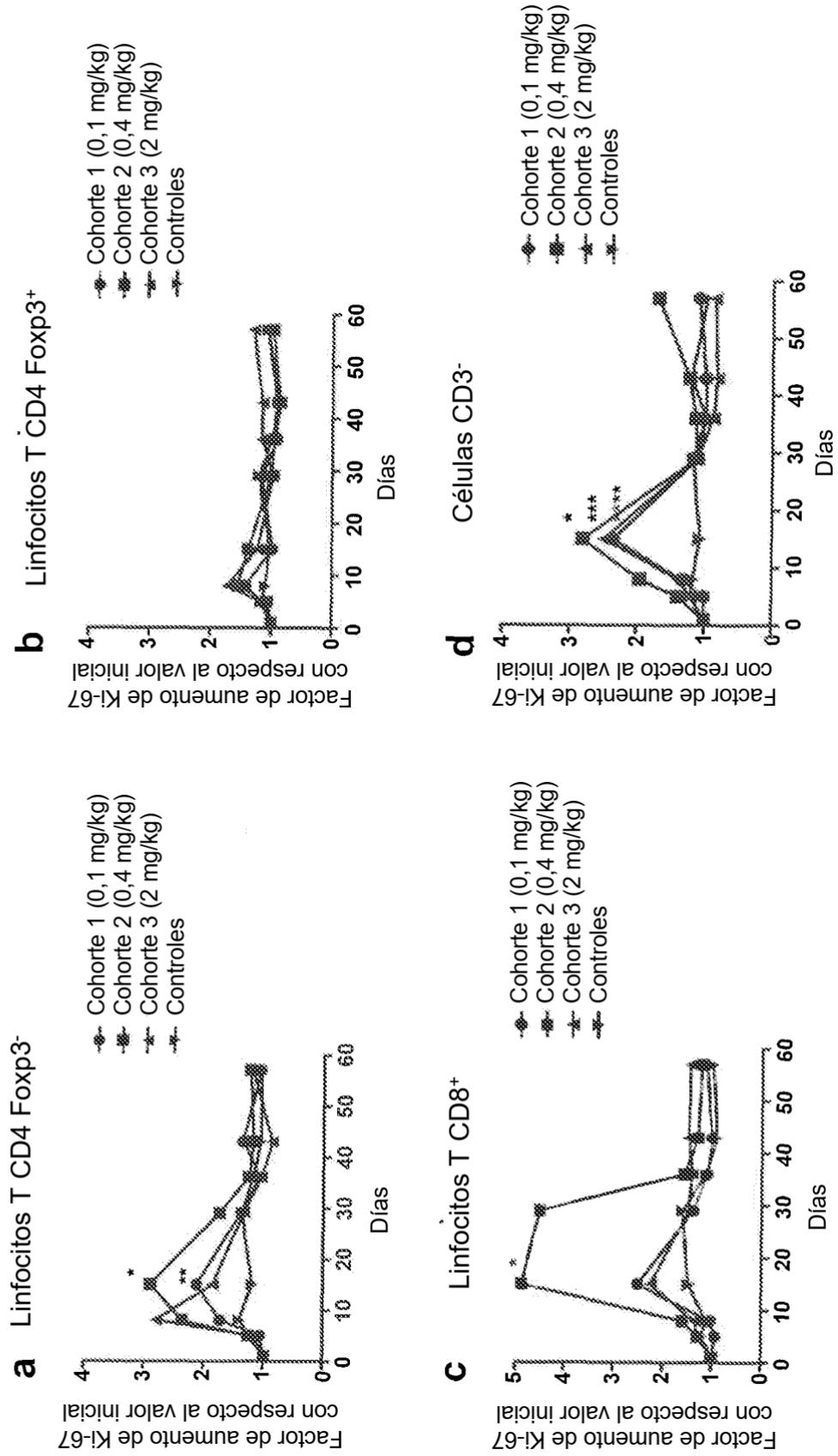


Figura 7

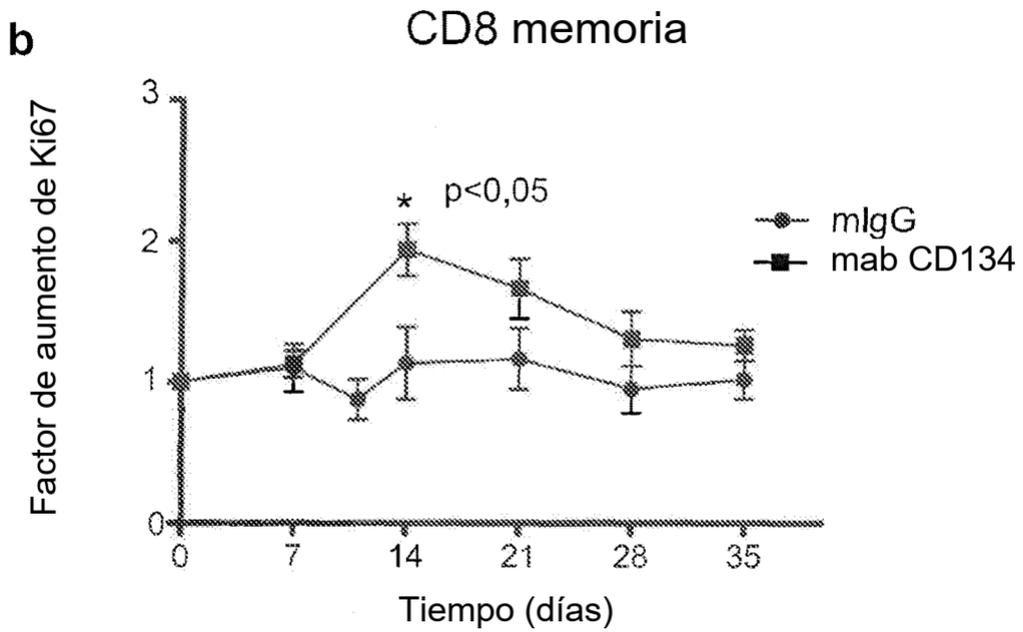
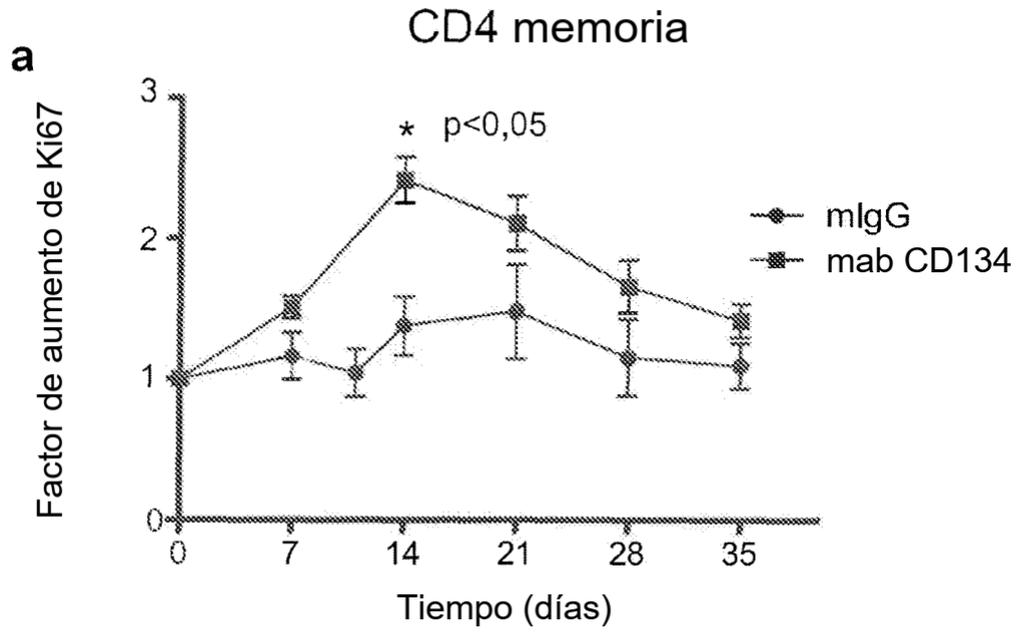


Figura 8

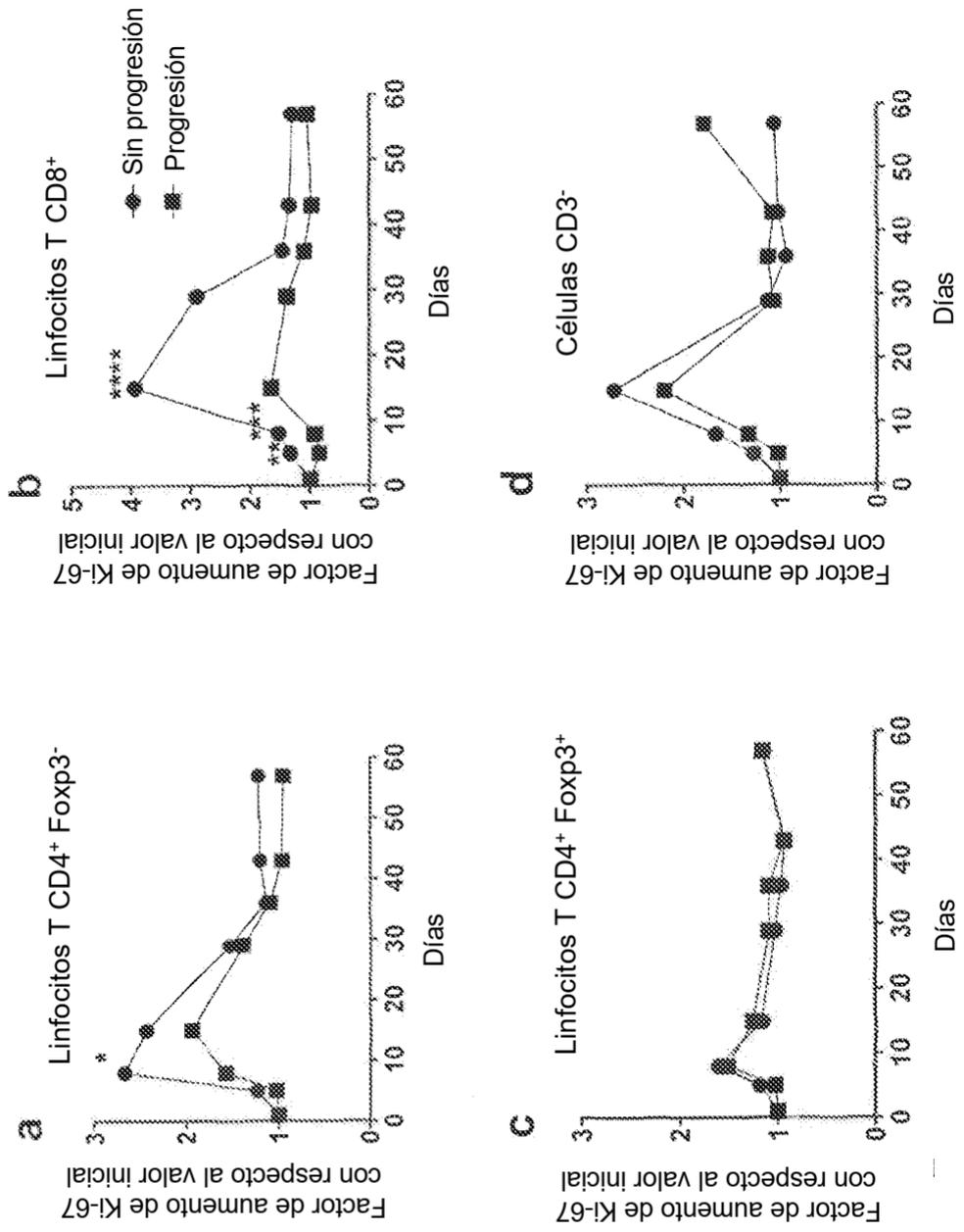


Figura 9

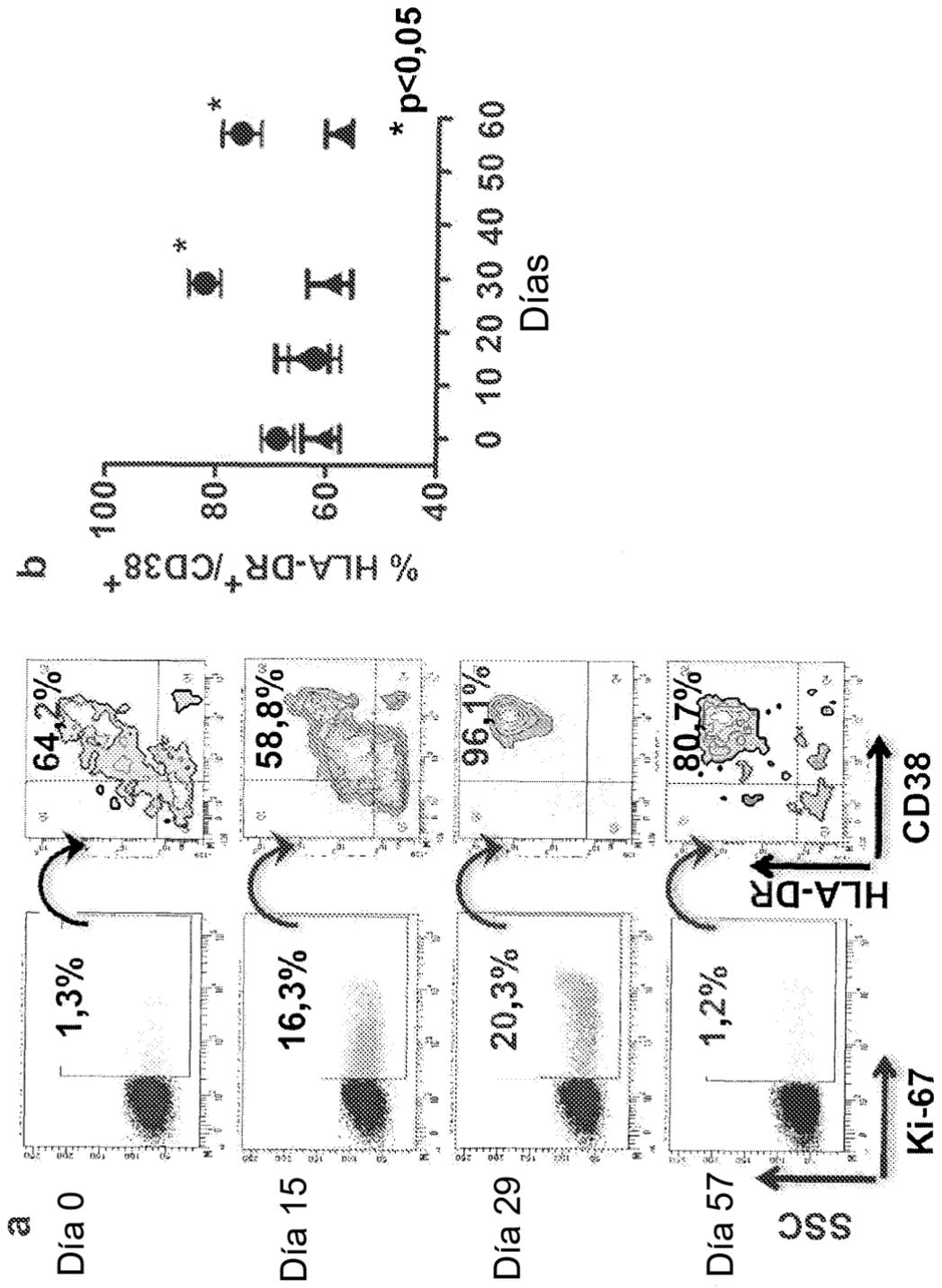


Figura 10

