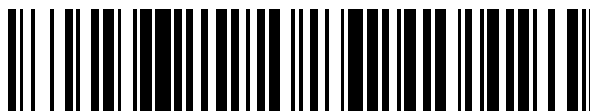


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 063**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7125** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2016** **PCT/US2016/033817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16196062**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2016** **E 16727089 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 3302502**

54 Título: **Administración intrapulmonar de agonistas polinucleotídicos del receptor de tipo toll 9 para el tratamiento del cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

**29.05.2015 US 201562168449 P**

**29.05.2015 US 201562168470 P**

**01.06.2015 US 201562169309 P**

**01.06.2015 US 201562169321 P**

**08.01.2016 US 201662276767 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2020**

73 Titular/es:

**DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION**  
**(100.0%)**

**2929 Seventh Street, Suite 100**  
**Berkeley, CA 94710, US**

72 Inventor/es:

**GUIDUCCI, CRISTIANA y**  
**COFFMAN, ROBERT L.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 752 063 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

Administración intrapulmonar de agonistas polinucleotídicos del receptor de tipo toll 9 para el tratamiento del cáncer de pulmón

**Campo**

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento del cáncer mediante la administración intrapulmonar de un agonista polinucleotídico del receptor de tipo Toll 9. Los métodos de la presente divulgación son adecuados para el tratamiento del cáncer primario de pulmón, así como cáncer metastásico al pulmón y cánceres extrapulmonares del mismo. Adicionalmente, la presente divulgación proporciona agonistas polinucleotídicos del receptor de tipo Toll 9 con perfiles inmunoestimuladores y de toxicidad adecuados para la administración intrapulmonar.

**Antecedentes**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y el cáncer de pulmón es uno de los cinco cánceres más comunes tanto en hombres como en mujeres. A pesar de los avances realizados en su tratamiento, a menos que se diagnostique en un estadio clínico temprano, la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón en los Estados Unidos mueren dentro de los cinco años posteriores al diagnóstico.

Los polinucleótidos que contienen dinucleótidos CG no metilados estimulan el sistema inmunitario innato mediante la activación de las células que expresan el receptor de tipo Toll 9 (TLR9). Se han analizado varios agonistas polinucleotídicos del TLR9 como agentes inmunoterapéuticos para el cáncer. Si bien los resultados de los ensayos preclínicos y de fase II de un agonista polinucleotídico de TLR9 fueron prometedores, el agonista polinucleotídico de TLR9 no mejoró la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico cuando se añadió a un régimen de quimioterapia (Schmidt, *Nature Biotechnology*, 25:825-826, 2007). Más recientemente, la vía de administración de los agonistas polinucleotídicos de TLR9 ha demostrado ser crítica, dando como resultado la inyección intratumoral respuestas inmunitarias antitumorales superiores que la inyección intravenosa (Lou *et al.*, *J Immunother*, 34:279-288, 2011).

La inyección intratumoral directa de tumores primarios y metastásicos en el pulmón generalmente no es factible. Sin embargo, se ha demostrado que el suministro intrapulmonar de agonistas polinucleotídicos de TLR9 produce respuestas antitumorales potentes en modelos de ratón de metástasis pulmonares (Sato *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 14:2198-2205, 2015; y Sfondrini *et al.*, *Inter J Cancer*, 133:383-394, 2013). Aun así, los agonistas polinucleotídicos de TLR9 deben tener una ventana terapéutica adecuada para la administración intrapulmonar a pacientes humanos con cáncer.

Por lo tanto, lo que la técnica necesita son agonistas polinucleotídicos de TLR9 con alta potencia y baja toxicidad.

**Sumario**

La presente divulgación se refiere a composiciones para su uso en métodos para el tratamiento del cáncer mediante la administración intrapulmonar de un agonista polinucleotídico del receptor de tipo Toll 9. Los métodos de la presente divulgación son adecuados para el tratamiento del cáncer primario de pulmón, así como cáncer metastásico al pulmón y cánceres extrapulmonares del mismo. Adicionalmente, la presente divulgación describe agonistas polinucleotídicos del receptor de tipo Toll 9 con perfiles inmunoestimuladores y de toxicidad adecuados para la administración intrapulmonar.

Específicamente, la presente invención proporciona un polinucleótido para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del polinucleótido mediante suministro intrapulmonar, en donde el polinucleótido consiste en la secuencia de: 5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGANx-3' (SEQ ID NO:2), en donde x es 0, 1 o 2, cada N es A, C o T, y en donde al menos un enlace internucleotídico es un enlace de fosforotioato. En algunas realizaciones preferentes, el polinucleótido consiste en la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el polinucleótido es bicatenario, mientras que, en otras realizaciones, el polinucleótido es monocatenario. En algunas realizaciones, todos los enlaces internucleotídicos son enlaces de fosforotioato.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un cáncer primario seleccionado del grupo que consiste en cáncer primario de pulmón y cáncer extrapulmonar. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer primario de pulmón. En un subconjunto de estas realizaciones, el cáncer primario de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o carcinoma de pulmón microcítico (CPM). En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer metastásico al pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer metastásico es una metástasis de un cáncer primario seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario. En realizaciones preferentes, el sujeto

mamífero es un ser humano.

Adicionalmente, en algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en actinomicina, afatinib, alectinib, asparaginasa, azacitidina, azatioprina, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, camptotecina, carboplatino, capecitabina, certinib, cisplatino, clorambucilo, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, erlotinib, epirubicina, epotilona, etopósido, fludarabina, flutamina, fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, lapatinib, letrozol, mecloretamina, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, raltitrexed, sorafenib, sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, tioguanina, topotecán, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en: i) ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina; ii) mitomicina, vindesina y cisplatino; iii) cisplatino y vinorelbina; y iv) cisplatino, etopósido e ifosfamida. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un antagonista de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios. En un subconjunto de estas realizaciones, la molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios se selecciona del grupo que consiste en PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 (CD152), LAG-3, TIM-3, TIGIT, IL-10 y TGF-beta. En algunas realizaciones, la molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un agonista de una molécula inmunoestimuladora. En un subconjunto de estas realizaciones, la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD40, OX40 (CD134), GITR, CD137, CD28 e ICOS (CD278). En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un anticuerpo monoclonal, un fragmento o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente uno o ambos de, la extirpación del cáncer primario y la administración de radioterapia. En algunas realizaciones particularmente preferentes, la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto sinérgico contra el cáncer de pulmón. En algunas realizaciones preferentes, la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto aditivo contra el cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto cooperativo contra el cáncer de pulmón. En algunas realizaciones preferentes, el tratamiento del cáncer de pulmón comprende uno o más de los siguientes: (a) el aumento del tiempo de supervivencia del sujeto; (b) la reducción del volumen del cáncer primario; (c) el retraso del crecimiento del cáncer primario; (d) la reducción del número de tumores metastásicos; (e) la reducción del volumen de tumores metastásicos; y (f) retardar el crecimiento de tumores metastásicos. En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer de pulmón comprende inducir la secreción en el pulmón de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en ligando de quimiocina con motivo CC 2 (CCL2), ligando de quimiocina con motivo CXC 10 (CXCL10), interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 p70 (IL-12p70), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). En algunas realizaciones preferentes, el tratamiento del cáncer de pulmón no da como resultado una toxicidad del pulmón inducida por polinucleótido de tal gravedad que la administración repetida del polinucleótido esté contraindicada. En algunas realizaciones preferentes, el tratamiento del cáncer de pulmón no da como resultado síntomas similares a la gripe inducidos por polinucleótido de tal gravedad que la administración repetida del polinucleótido esté contraindicada, en donde los síntomas similares a la gripe comprenden uno o más del grupo que consiste en fiebre, cefalea, escalofríos, mialgia y fatiga.

Adicionalmente, la presente divulgación describe un polinucleótido aislado, en donde el polinucleótido consiste en la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9, y en donde al menos un enlace internucleotídico es un enlace de fosforotioato. En algunos aspectos preferentes, todos los enlaces internucleotídicos son enlaces de fosforotioato. Adicionalmente, la presente divulgación describe composiciones farmacéuticas que comprenden el polinucleótido y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la composición es una solución isotónica estéril. En otros aspectos, la composición es un sólido deshidratado. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un antígeno polipeptídico. En algunos aspectos preferentes, el antígeno polipeptídico es un antígeno tumoral. La presente divulgación también describe métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, que comprenden: administrar la composición farmacéutica al sujeto en una cantidad suficiente para estimular la respuesta inmunitaria en el sujeto. La presente divulgación describe adicionalmente métodos para el aumento del interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) en un sujeto mamífero, que comprenden: administrar la composición farmacéutica al sujeto en una cantidad suficiente para aumentar el IFN- $\alpha$  en el sujeto. Además, la presente divulgación describe métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprenden: administrar la composición farmacéutica al sujeto en una cantidad suficiente para tratar el cáncer en el sujeto. En algunos aspectos preferentes, la composición farmacéutica se administra al sujeto por administración intrapulmonar, que puede implicar el uso de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un nebulizador, un inhalador de dosis medida, un pulverizador y un dispositivo de inhalación de polvo seco. En algunos aspectos preferentes, la composición farmacéutica se administra por inyección a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, intramuscular y subcutánea.

## Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que representa la producción de IFN- $\alpha$  (pg/ml) por CMSP humanas en respuesta a dosis crecientes de agonista polinucleotídico de TLR9 D60-1 o agonista de TLR9 D60-7. Datos mostrados como Media  $\pm$  ETM.

La FIG. 2 es un gráfico que representa la producción de IL-6 (pg/ml) por linfocitos B humanos en respuesta a dosis crecientes de agonista polinucleotídico de TLR9 D60-1 o agonista de TLR9 D60-7. Datos mostrados como Media  $\pm$  ETM.

La FIG. 3A-B muestra múltiples gráficos que representan los niveles de citocinas en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de ratones después de la administración intranasal de solución salina, agonista polinucleotídico de TLR9 D60-1 o agonista polinucleotídico de TLR9 D60-7, a 1, 5 o 20  $\mu$ g en los días 0, 14, 28 y 42. El LLBA se obtuvo 24 horas después del cuarto tratamiento. Datos mostrados como Media  $\pm$  ETM.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra las puntuaciones histopatológicas del tejido pulmonar de los ratones después de la administración intranasal de solución salina, agonista polinucleotídico de TLR9 D60-1 o agonista polinucleotídico de TLR9 D60-7, a 1, 5 o 20  $\mu$ g en los días 0, 14, 28 y 42. 24 horas después del cuarto tratamiento se sacrificaron los ratones y se recogieron muestras de pulmón. Los datos se muestran como la media con intervalos de confianza del 95 %.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra los cambios en el peso corporal (porcentaje de la medida inicial) de los ratones después de la administración intranasal de solución salina, 20  $\mu$ g de agonista polinucleotídico de TLR9 D60-1 o 20  $\mu$ g de agonista polinucleotídico de TLR9 D60-7, en los días 0, 14, 28 y 42. Datos mostrados como Media  $\pm$  ETM.

La FIG. 6 muestra la supervivencia de los ratones con tumor metastásico 4T1 tratado con D60-7 por vía intrapulmonar, anticuerpo sistémico anti PD-1 o una combinación de los dos agentes.

La FIG. 7 muestra el número de células 4T1 metastásicas en los pulmones de los ratones tratados con D60-7 por vía intrapulmonar, anticuerpo sistémico anti PD-1 o una combinación de los dos agentes.

## Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento del cáncer mediante la administración intrapulmonar de un agonista polinucleotídico del receptor de tipo Toll 9. Los métodos de la presente divulgación son adecuados para el tratamiento del cáncer primario de pulmón, así como cáncer metastásico al pulmón y cánceres extrapulmonares del mismo. Adicionalmente, la presente divulgación proporciona agonistas polinucleotídicos del receptor de tipo Toll 9 con perfiles inmunoestimuladores y de toxicidad adecuados para la administración intrapulmonar.

## I. Métodos generales y definiciones

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se describen por completo en la bibliografía, véase, por ejemplo: *Animal Cell Culture*, sexta edición (Freshney, Wiley-Blackwell, 2010); *Antibodies, A Laboratory Manual*, segunda edición (Greenfield, ed., Cold Spring Harbor Publications, 2013); *Bioconjugate Techniques*, tercera edición (Hermanson, Academic Press, 1996); *Current Protocols in Cell Biology* (Bonifacino *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Inc., 1996, incluidos suplementos hasta 2014); *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., 1991, incluidos suplementos hasta 2014); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., 1987, incluidos suplementos hasta 2014); *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (Egli *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Inc., 2000, incluidos suplementos hasta 2014); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook and Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook and Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (Herdewijn, ed., Humana Press, 2004); *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed., Humana Press, 1993); y *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998).

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el/la", incluyen referencias al plural, a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, "un" excipiente incluye uno o más excipientes.

La frase "que comprende", como se usa en el presente documento, es abierta, indicando que tales realizaciones pueden incluir elementos adicionales. Por el contrario, la frase "que consiste en" es cerrada, indicando que tales realizaciones no incluyen elementos adicionales (excepto pequeñas cantidades de impurezas). La frase "que consiste esencialmente en" es parcialmente cerrada, indicando que tales realizaciones pueden comprender adicionalmente elementos que no cambian materialmente las características básicas de tales realizaciones. Se entiende que los aspectos y realizaciones descritos en el presente documento como "que comprende" incluyen realizaciones "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento en referencia a un valor, abarca del 90 % al 110 % de ese valor (por ejemplo, aproximadamente 20  $\mu$ g de antígeno survivina se refiere a 18  $\mu$ g a 22  $\mu$ g de antígeno survivina e incluye 20  $\mu$ g de antígeno survivina).

Como se usa de manera indistinta en el presente documento, los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido

- nucleico" incluyen ADN monocatenario (ADNmc), ADN bicatenario (ADNbc), ARN monocatenario (ARNmc) y ARN bicatenario (ARNbc), oligonucleótidos y oligonucleósidos modificados, o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos son polímeros de nucleósidos unidos, en general, a través de enlaces fosfodiéster, aunque también pueden usarse enlaces alternativos, tales como ésteres de fosforotioato. Un nucleósido consiste en una base purina (adenina (A) o guanina (G), o derivados de las mismas) o pirimidina (timina (T), citosina (C) o uracilo (U), o derivado de las mismas) unida a un azúcar. Las cuatro unidades de nucleósido (o bases) en el ADN se llaman desoxiadenosina, desoxiguanosina, timidina y desoxicitidina. Las cuatro unidades de nucleósido (o bases) en el ARN se llaman adenosina, guanosina, uridina y citidina. Un nucleótido es un éster de fosfato de un nucleósido.
- 10 La expresión "secuencia palindrómica" o "palíndromo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es una repetición invertida, por ejemplo, ABCDD'C'B'A', donde las bases, por ejemplo, A y A', B y B', C y C', D y D', son capaces de formar pares de bases de Watson-Crick. Dichas secuencias pueden ser monocatenarias o pueden formar estructuras bicatenarias, o pueden formar estructuras de bucle en horquilla en algunas condiciones. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, "un palíndromo de 8 bases" se refiere a una secuencia de ácido nucleico en la que
- 15 la secuencia palindrómica tiene 8 bases de longitud, tal como ABCDD'C'B'A'. Una secuencia palindrómica puede ser parte de un polinucleótido que también contiene secuencias no palindrómicas. Un polinucleótido puede contener una o más porciones de secuencia palindrómica y una o más porciones de secuencia no palindrómica. Como alternativa, una secuencia polinucleotídica puede ser completamente palindrómica. En un polinucleótido con más de una porción de secuencia palindrómica, las porciones de secuencia palindrómica pueden o no solaparse entre sí.
- 20 Los términos "individuo" y "sujeto" se refieren a mamíferos. "Mamíferos" incluye, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), animales de granja, animales de deporte, roedores (por ejemplo, ratones y ratas) y mascotas (por ejemplo, perros y gatos).
- 25 El término "antígeno" se refiere a una sustancia que es reconocida por y se une específicamente a un anticuerpo, o a un receptor antigénico de linfocitos T. Los antígenos pueden incluir péptidos, polipéptidos, proteínas, glucoproteínas, polisacáridos, hidratos de carbono complejos, azúcares, gangliósidos, lípidos y fosfolípidos; porciones de los mismos y combinaciones de los mismos. Los antígenos, cuando están presentes en las composiciones de la presente divulgación, pueden ser sintéticos o pueden aislarse de la naturaleza. Los antígenos adecuados para la administración
- 30 en los métodos de la presente divulgación incluyen cualquier molécula capaz de suscitar una respuesta de linfocitos B o linfocitos T específica para un antígeno. Los haptenos están incluidos dentro del alcance del "antígeno". Un "hapteno" es un compuesto de bajo peso molecular que no es inmunogénico por sí mismo, pero se vuelve inmunogénico cuando se conjuga con una molécula inmunogénica (transportador) generalmente más grande.
- 35 "Antígenos polipeptídicos" puede incluir péptidos nativos purificados, péptidos sintéticos, péptidos recombinantes, extractos peptídicos crudos o péptidos en un estado activo parcialmente purificado o no purificado (tal como los péptidos que son parte de virus atenuados o inactivados, microorganismos o células), o fragmentos de tales péptidos. Los antígenos polipeptídicos tienen preferiblemente al menos seis restos de aminoácidos de longitud.
- 40 Como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" se refiere a la capacidad de un agente (por ejemplo, un antígeno polipeptídico) para suscitar una respuesta inmunitaria adaptativa tras la administración en condiciones adecuadas a un sujeto mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de linfocitos B (humoral) y/o de linfocitos T (celular).
- 45 "Adyuvante" se refiere a una sustancia que, cuando se mezcla con un agente inmunogénico tal como un antígeno, aumenta o potencia de forma inespecífica una respuesta inmunitaria frente al agente, tras la exposición a la mezcla.
- El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que active la señalización a través de un receptor. En algunas realizaciones, el agonista se une al receptor. Por ejemplo, un agonista de TLR9 se une a un receptor de TLR9 y activa una ruta de señalización de TLR9. En otro ejemplo, un agonista de la molécula
- 50 inmunoestimuladora CD27 se une y activa una ruta de señalización de CD27.
- El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee, al menos en parte, una actividad biológica de un agonista. En algunas realizaciones, el antagonista se une al agonista, mientras que, en otras realizaciones, el antagonista se une al ligando del agonista. Por ejemplo, un antagonista de la molécula inhibidora
- 55 PD-1 de puntos de control inmunitarios se une a y bloquea una ruta de señalización de PD-1.
- La expresión "secuencia inmunoestimuladora" y el término "ISS" se refieren a una secuencia de ácido nucleico que estimula una respuesta inmunitaria medible (por ejemplo, medida *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*). Para los fines de la presente divulgación, el término ISS se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende un dinucleótido CG no metilado. Los ejemplos de respuestas inmunitarias medibles incluyen, pero sin limitación, la producción de anticuerpos específicos para antígeno, la secreción de citocinas, la activación de linfocitos y la proliferación de linfocitos.
- 60 Los términos "CpG" y "CG" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una citosina y una guanina separadas por un fosfato. Estos términos se refieren a una secuencia lineal, en oposición al emparejamiento
- 65

de bases de citosina y guanina. Los polinucleótidos de la presente divulgación contienen al menos un dinucleótido CpG no metilado. Es decir, la citosina en el dinucleótido CpG no está metilada (es decir, no es 5-metilcitosina).

El término "antisentido" y la expresión "secuencia antisentido", como se usan en el presente documento, se refieren a una cadena no codificante de un polinucleótido que tiene una secuencia complementaria a la cadena codificante de un ARNm. En realizaciones preferentes, los polinucleótidos de la presente divulgación no son secuencias antisentido o moléculas de ARNi (miARN y ARNip). Es decir, en realizaciones preferentes, los polinucleótidos de la presente divulgación no tienen una homología significativa (o complementariedad) con los transcritos (o genes) de los sujetos mamífero en los que se utilizarán. Por ejemplo, un polinucleótido de la presente divulgación para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto humano es preferentemente menos del 80 % idéntico en su longitud a las secuencias de ácido nucleico del genoma humano (por ejemplo, un polinucleótido que tiene 50 nucleótidos de longitud no compartiría más de 40 de las 50 bases con un transcrito humano). Es decir, en realizaciones preferentes, los polinucleótidos son menos del 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20 %, idéntico a las secuencias de ácido nucleico de los sujetos mamíferos (por ejemplo, tal como seres humanos, primates no humanos, animales de granja, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, etc.) en los que se van a utilizar.

"Estimulación" de una respuesta o parámetro incluye suscitar y/o potenciar esa respuesta o parámetro, cuando se compara en las mismas condiciones excepto para un parámetro de interés o, alternatively, en comparación con otra condición (por ejemplo, aumento de la señalización de TLR en presencia de un agonista de TLR en comparación con la ausencia del agonista de TLR). Por ejemplo, "estimulación" de una respuesta inmunitaria significa un aumento de la respuesta.

"Inhibición" de una respuesta o parámetro incluye bloquear y/o suprimir esa respuesta o parámetro, cuando se compara en las mismas condiciones excepto para un parámetro de interés, o alternatively, en comparación con otra condición (por ejemplo, disminución de la señalización de PD-1 en presencia de un ligando de PD-1 y un antagonista de PD-1 en comparación con la presencia del ligando de PD-1 en ausencia del antagonista de PD-1). Por ejemplo, "inhibición" de una respuesta inmunitaria significa una disminución de la respuesta.

Una "cantidad eficaz" de un agente divulgado en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente en relación con el fin establecido. Una "cantidad eficaz" o una "cantidad suficiente" de un agente es la cantidad adecuada para afectar un efecto biológico deseado, tal como un resultado beneficioso, incluyendo un resultado clínico beneficioso. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente (por ejemplo, un agonista polinucleotídico de TLR9) eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Se puede administrar una "cantidad eficaz" o una "cantidad suficiente" de un agente en una o más dosis.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad se refieren a la ejecución de un protocolo, que puede incluir la administración de uno o más fármacos a un individuo (humano o no), en un esfuerzo por aliviar un signo o síntoma de la enfermedad. Por lo tanto, "tratar" o "tratamiento" no requiere un alivio completo de los signos o síntomas, no requiere una cura e incluye específicamente protocolos que solo tienen un efecto paliativo en el individuo. Como se usa en el presente documento, y es bien entendido en la técnica, un "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio o la mejora de uno o más síntomas, disminución del grado de una enfermedad, estado patológico estabilizado (es decir, sin empeoramiento), la prevención de la transmisión de la enfermedad, el retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o la atenuación del cuadro clínico y la remisión (bien total o parcial), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también significa prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si un individuo no se recibiera tratamiento. "Atenuar" una enfermedad o trastorno significa que el grado y/o las manifestaciones clínicas indeseables de la enfermedad o trastorno se reducen y/o el curso temporal de la progresión de la enfermedad o trastorno se ralentiza, en comparación con el resultado esperado no tratado. Adicionalmente, la atenuación y el tratamiento no se producen necesariamente mediante la administración de una dosis, sino que se suelen producir tras la administración de una serie de dosis.

## II. Agonistas polinucleotídicos del receptor de tipo Toll 9 (TLR9)

La presente divulgación describe polinucleótidos que consisten en la secuencia de: 5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTTCGANx-3' (SEQ ID NO:2), en donde x es 0, 1 o 2, cada N es A, C o T, y en donde al menos un enlace internucleotídico es un enlace de éster fosforotioato. En algunas realizaciones, el polinucleótido consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 7 (D60-7), la SEQ ID NO: 8 (D60-8) o la SEQ ID NO: 9 (D60-9). En algunas realizaciones, uno o más enlaces entre los nucleótidos son enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones, todos los enlaces entre los nucleótidos son enlaces de éster fosforotioato. En algunas realizaciones, el polinucleótido es monocatenario. En otras realizaciones, el polinucleótido es bicatenario. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un 2'-desoxirribopolinucleótido.

Los polinucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (D60-1) y la SEQ ID NO: 3 (D60-3) inducen, de forma potentemente, altos niveles de IFN- $\alpha$  a partir de CMSP humanas. Por tanto, se consideró que estos polinucleótidos eran menos convenientes para la administración intrapulmonar. Los polinucleótidos de la presente divulgación se desarrollaron

acortando gradualmente la longitud de la secuencia y del palíndromo de D60-3, eliminando de forma eficaz los nucleótidos del extremo 3' de D60-3 (véanse las Tablas 1-1 y 1-2). Sorprendentemente, se identificaron variantes más cortas de D60-3 que inducían niveles máximos más bajos de IFN- $\alpha$  a partir de CMSP humanas, mientras se mantenía la potencia (véase la Tabla 1-3). La reducción del palíndromo en 8 bases y de la longitud de la secuencia en 4 bases en relación con D60-3 no se pronosticaba que diera como resultado este perfil conveniente de actividad.

Como se demuestra en los ejemplos experimentales, los agonistas polinucleotídicos de TLR9 de la presente divulgación son particularmente adecuados para la administración intrapulmonar porque poseen perfiles convenientes de estimulación y toxicidad. Específicamente, los agonistas polinucleotídicos de TLR9 de la presente divulgación son inductores potentes de niveles moderados de IFN- $\alpha$  a partir de CMSP de mamífero, pero no se asocian con una toxicidad sustancial incluso después del suministro intrapulmonar repetido. Por tanto, se espera que los agonistas polinucleotídicos de TLR9 de la presente divulgación sean eficaces a dosis bajas, y no se espera que provoquen efectos secundarios graves o potencialmente mortales que requieran una reducción de la dosificación, la retirada temporal del tratamiento o la interrupción permanente del tratamiento. Se espera que los agonistas polinucleotídicos de TLR9 de la presente divulgación sean particularmente útiles para el tratamiento del cáncer de pulmón, como se detalla en el presente documento.

### III. Composiciones farmacéuticas

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista polinucleotídico de TLR9 de la presente divulgación. Las composiciones farmacéuticas contienen habitualmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un antígeno. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden estar en forma de una solución. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden ser un sólido deshidratado (por ejemplo, sólido liofilizado o secado por pulverización). Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están preferentemente estériles y preferentemente, están esencialmente exentas de endotoxinas. En el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se usa indistintamente con los términos "especialidad farmacéutica" y "medicamento".

#### A. Excipientes

Los excipientes farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, disolventes, agentes de carga, agentes tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad y conservantes (véase, por ejemplo, Pramanick *et al.*, Pharma Times, 45:65-77, 2013). En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un excipiente que funciona como uno o más de un disolvente, agente de carga, agente tamponador y un agente de ajuste de la tonicidad (por ejemplo, el cloruro de sodio en solución salina puede servir tanto como vehículo acuoso como agente de ajuste de la tonicidad). Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuadas para la administración parenteral. Es decir, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación no están destinadas a la administración entérica.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas comprenden como disolvente un vehículo acuoso. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y solución de Ringer. En algunos aspectos, la composición es isotónica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un agente de carga. Los agentes de carga son particularmente útiles cuando la composición farmacéutica se liofiliza antes de la administración. En algunos aspectos, el agente de carga es un protector que ayuda en la estabilización y prevención de la degradación de los agentes activos durante la liofilización o el secado por pulverización, y/o durante el almacenamiento. Los agentes de carga adecuados son azúcares (mono-, di- y polisacáridos), tales como sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbital, glucosa y rafinosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un agente tamponador. Los agentes tamponadores controlan el pH para inhibir la degradación del agente activo durante el procesamiento, el almacenamiento y opcionalmente la reconstitución. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, sales que comprenden acetato, citrato, fosfato o sulfato. Otros tampones adecuados incluyen, por ejemplo, aminoácidos tales como arginina, glicina, histidina y lisina. El agente tamponador puede comprender adicionalmente ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. En algunos aspectos, el agente tamponador mantiene el pH de la composición dentro de un rango de 4 a 9. En algunos aspectos, el pH es mayor que (límite inferior) 4, 5, 6, 7 u 8. En algunos aspectos, el pH es menor que (límite superior) 9, 8, 7, 6 u 5. Es decir, el pH está en el intervalo de aproximadamente 4 a 9, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un agente de ajuste de la tonicidad. Los agentes de ajuste de la tonicidad adecuados incluyen, por ejemplo, dextrosa, glicerol, cloruro de sodio, glicerina y manitol.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un conservante. Los conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, antioxidantes y agentes antimicrobianos. Sin embargo, en aspectos preferentes, la composición farmacéutica se prepara en condiciones estériles y se encuentra en un recipiente de un solo uso y, por lo tanto, no necesita la inclusión de un conservante.

## B. Antígenos

La presente divulgación describe adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un antígeno y un excipiente además de un agonista polinucleotídico de TLR9. En composiciones preferentes de la presente divulgación que comprenden un antígeno, el antígeno no está unido covalentemente al polinucleótido. En algunos aspectos preferentes, el antígeno es un antígeno polipeptídico. En algunos aspectos preferentes, el antígeno es un antígeno de polisacárido, que está, preferentemente, unido de forma covalente a una proteína transportadora. En algunos aspectos preferentes, el antígeno es un antígeno tumoral. En otros aspectos, el antígeno es un antígeno microbiano o un alérgeno.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un antígeno tumoral. En algunos aspectos, el antígeno tumoral es un antígeno de mamífero. Se han descrito antígenos tumorales adecuados en la técnica (véase, por ejemplo, Cheever *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 15:5323-5337, 2009). Por ejemplo, los antígenos tumorales adecuados incluyen WT1, MUC1, LMP2, E6 E7 de PVH, EGFRvIII, Her-2/neu, idiotype, MAGE A3, p53, NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/Mart1, Ras, gp100, proteinasa3 (PR1), bcrable, tirosinasa, survivina, PSA, hTERT, puntos de ruptura de translocaciones en sarcomas, EphA2, PAP, MP-IAP, AFP, EpCAM, ERG, NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, Phoc, TRP-2, GD3, fucosilo, GM1, mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumafina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2 y antígeno relacionado con Fos 1.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un antígeno microbiano seleccionado del grupo que consiste en un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico y un antígeno parasitario. En algunos aspectos preferentes, el antígeno microbiano es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano. En algunos aspectos, el antígeno microbiano procede de un microbio que provoca una enfermedad infecciosa en un sujeto mamífero no humano. En algunos aspectos, el antígeno microbiano procede de un microbio que provoca una enfermedad infecciosa en un sujeto humano. En algunos aspectos, la enfermedad infecciosa está provocada por un virus, una bacteria, un hongo o un parásito protozoico.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un alérgeno. En algunos aspectos, el alérgeno es un antígeno ambiental tal como los alérgenos de mamífero, insecto, planta y moho. En algunos aspectos, el alérgeno de mamífero incluye pelo y caspa.

## C. Kits

Adicionalmente, la presente divulgación describe kits que comprenden una composición farmacéutica (que comprende un excipiente y un agonista polinucleotídico de TLR9) y un conjunto de instrucciones relacionadas con el uso de la composición para los métodos descritos en el presente documento. La composición farmacéutica de los kits se envasa adecuadamente. Por ejemplo, si la composición farmacéutica es un poder liofilizado, normalmente se usa un vial con un tapón elástico para que el polvo se pueda resuspender fácilmente inyectando un líquido a través del tapón elástico. En algunos aspectos, los kits comprenden adicionalmente un dispositivo para la administración (por ejemplo, jeringa y aguja, nebulizador, dispositivo de inhalación de polvo seco, etc.) de la composición farmacéutica. Las instrucciones relacionadas con el uso de la composición farmacéutica generalmente incluyen información sobre la dosificación, pauta y vía de administración para los métodos de uso previstos. En algunos aspectos, en los que los kits comprenden un antígeno, el antígeno puede o no estar envasado en el mismo recipiente que el agonista polinucleotídico de TLR9.

## IV. Métodos de uso

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuadas para una pluralidad de usos que implican la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero que lo necesite. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, roedores, mascotas y animales de granja. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para lograr un resultado específico.

## A. Dosis y modo de administración

Como con todas las composiciones farmacéuticas, la cantidad eficaz y el modo de administración pueden variar en función de varios factores evidentes para un experto en la materia. Un factor importante a considerar es si la composición farmacéutica se administrará como un tratamiento independiente o como parte de una combinación de agentes terapéuticos. Otro factor es si la composición farmacéutica contiene además un antígeno. Otros factores a considerar incluyen el resultado a conseguir y el número de dosis a administrar.

Un intervalo de dosificación adecuado es aquel que proporcione el efecto deseado. La dosificación puede determinarse por la cantidad de polinucleótido administrada al sujeto. Un intervalo de dosificación ejemplar del polinucleótido proporcionado en la cantidad a suministrar por peso del sujeto es de aproximadamente 5 a 5000 mcg/kg. En algunos aspectos, la dosificación es mayor que aproximadamente (límite inferior) 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400,

450, 500, 750 o 1000 mcg/kg. En algunos aspectos, la dosificación es menor que aproximadamente (límite superior) 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 750, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 o 100 mcg/kg. Es decir, la dosificación está en cualquier lugar en el intervalo de aproximadamente 5 a 5000 mcg/kg, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. Un intervalo de dosificación ejemplar del polinucleótido proporcionado en la cantidad a suministrar a un sujeto humano es de aproximadamente 100 mcg a aproximadamente 100 mg. En algunos aspectos, la dosificación es mayor que aproximadamente (límite inferior) 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 5000 mcg. En algunos aspectos, la dosificación es menor que aproximadamente (límite superior) 100, 75, 50, 25, 20, 15 o 10 mg. Es decir, la dosificación está en cualquier lugar en el intervalo de aproximadamente 100 a 100.000 mcg, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En algunos aspectos, cuando la composición farmacéutica comprende adicionalmente un antígeno, el intervalo de dosificación del antígeno proporcionado en la cantidad a suministrar a un sujeto es de aproximadamente 1 mcg a 50 mg. En algunos aspectos, la dosificación del antígeno es mayor que aproximadamente (límite inferior) 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mcg. En algunos aspectos, la dosificación del antígeno es menor que aproximadamente (límite superior) 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 mcg. Es decir, la dosificación del antígeno está en cualquier lugar en el intervalo de aproximadamente 1 a 50 mcg, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están destinadas a la administración parenteral (por ejemplo, administración no oral o rectal). Las vías de administración adecuadas incluyen la inyección, la tópica y la inhalación. En particular, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse por una vía tal como intravenosa, intramuscular, subcutánea, epidérmica (pistola de genes), transdérmica e inhalación.

En algunos aspectos preferentes, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están destinadas a la administración intrapulmonar (también denominada en el presente documento administración pulmonar). Para el tratamiento de enfermedades pulmonares es preferente la administración intrapulmonar, tal como el cáncer de pulmón, para lograr el suministro local del polinucleótido terapéutico en el sitio de acción previsto, al tiempo que se reduce la probabilidad de efectos secundarios sistémicos adversos. Los dispositivos adecuados para la administración intrapulmonar incluyen nebulizadores, inhaladores de dosis medida, pulverizadores y dispositivos de inhalación de polvo seco.

Una pauta posológica adecuada es la que proporciona el efecto deseado en un contexto profiláctico o terapéutico. El número de dosis administradas por una vía elegida puede ser una o más de una. La frecuencia de dosificación puede variar de semanal, cada dos semanas, mensual, cada dos meses, o 3 a 12 meses entre dosis. En algunos aspectos, se administran 2 dosis, administrándose la segunda dosis uno o dos meses después de la primera dosis. En algunos aspectos, se administran 3 dosis, administrándose la segunda dosis uno o dos meses después de la primera dosis, y administrándose la tercera dosis uno a cinco meses después de la segunda dosis. En otros aspectos, se pueden administrar 3 o 4 dosis de forma quincenal o mensual. En otros aspectos, puede transcurrir entre las dosis un período de tiempo más corto o más largo. En determinados aspectos, el intervalo entre dosificaciones sucesivas puede variar en términos de número de semanas o de meses. En un aspecto, se puede administrar una serie de 2, 3, 4, 5 o 6 dosis semanales seguidas de una segunda serie de varias dosis semanales en un momento posterior. Un experto en la materia podrá ajustar el régimen de dosificación mediante la medición de los resultados biológicos como se ejemplifica en los ejemplos, tal como las respuestas de anticuerpos específicos para antígeno o la regresión tumoral.

## **B. Estimulación de una respuesta inmunitaria**

En resumen, la presente divulgación describe métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, que comprenden administrar a un sujeto mamífero una composición farmacéutica en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria en el sujeto mamífero. "Estimular" una respuesta inmunitaria significa aumentar la respuesta inmunitaria, lo que puede producirse al suscitar una respuesta inmunitaria *de novo* (por ejemplo, como consecuencia de un régimen de vacunación inicial) o al potenciar una respuesta inmunitaria existente (por ejemplo, como consecuencia de un régimen de vacunación de refuerzo). En algunos aspectos, estimular una respuesta inmunitaria comprende uno o más del grupo que consiste en: estimular la producción de citocinas; estimular la proliferación de linfocitos B; estimular la expresión génica asociada a la ruta del interferón; estimular la expresión génica asociada a quimioatrayentes; y estimular la maduración de células dendríticas plasmocitoides (pDC). Los métodos para medir la estimulación de una respuesta inmunitaria son conocidos en la técnica y se describen en los ejemplos biológicos de la presente divulgación. En aspectos en los que la composición farmacéutica comprende adicionalmente un antígeno, estimular una respuesta inmunitaria comprende inducir una respuesta de anticuerpos específica para antígeno.

Por ejemplo, en algunos aspectos en los que la composición farmacéutica comprende adicionalmente un antígeno, la presente divulgación describe métodos para inducir una respuesta de anticuerpos específica para antígeno en un sujeto mamífero mediante la administración a un sujeto mamífero de la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para inducir una respuesta de anticuerpos específica para antígeno en el sujeto mamífero. "Inducir" una respuesta de anticuerpos específica para antígeno significa aumentar el título de los anticuerpos específicos para antígeno por encima de un nivel umbral tal como un título de referencia preadministración o un nivel seroprotector.

El análisis (tanto cualitativo como cuantitativo) de la respuesta inmunitaria puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, medición de la producción de anticuerpos específicos para antígeno (incluyendo la medición de subclases de anticuerpos específicos), activación de poblaciones específicas de linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos T auxiliares, producción de citocinas tales como IFN-alfa, IL-6, IL-12 y/o liberación de histamina. Los métodos para medir las respuestas de anticuerpos específicos para antígeno incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La activación de poblaciones específicas de linfocitos se puede medir mediante ensayos de proliferación y con clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). La producción de citocinas también se puede medir mediante ELISA.

Preferentemente, se estimula una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (es decir, se suscita o potencia). Con referencia a la presente divulgación, la estimulación de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 puede determinarse *in vitro* o *ex vivo* midiendo la producción de citoquinas a partir de células tratadas con un agente activo de la presente divulgación (agonista polinucleotídico de TLR9), en comparación con células de control no tratadas con el agente activo. Los ejemplos de "citoquinas de tipo Th1" incluyen, pero sin limitación, IL-2, IL-12, IFN-gamma e IFN-alfa. Por el contrario, las "citoquinas de tipo Th2" incluyen, pero sin limitación, IL-4, IL-5 e IL-13. Las células útiles para la determinación de la actividad inmunoestimuladora incluyen células del sistema inmunitario, tales como linfocitos que sean células presentadoras de antígeno, preferentemente macrófagos y linfocitos T. Las células inmunitarias adecuadas incluyen células primarias tales como células mononucleares de sangre periférica, incluyendo células dendríticas plasmacitoides y linfocitos B, o esplenocitos aislados de un sujeto mamífero.

La estimulación de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 también se puede determinar en un sujeto mamífero tratado con un agente activo de la presente divulgación (agonista polinucleotídico de TLR9) midiendo los niveles de IL-2, IL-12 e interferón, antes y después de la administración o en comparación con un sujeto de control no tratado con el agente activo. La estimulación de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 también se puede determinar midiendo la relación de los títulos de anticuerpos de tipo Th1 con respecto a los de tipo Th2. Anticuerpos de "tipo Th1" incluye IgG1 e IgG3 humanas, e IgG2a murina. Por el contrario, los anticuerpos de "tipo Th2" incluyen IgG2, IgG4 e IgE humanas, e IgG1 e IgE murinas.

### **Cáncer**

La presente divulgación proporciona un polinucleótido para su uso en métodos de tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero, que comprenden administrar a un sujeto mamífero una composición farmacéutica que comprende un agonista polinucleotídico de TLR9 en una cantidad suficiente para tratar el cáncer en el sujeto mamífero. "Tratar" el cáncer significa lograr un resultado clínico beneficioso, tal como provocar una remisión o prolongar la supervivencia de otro modo en comparación con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento. En algunas realizaciones, cuando el cáncer es un tumor sólido, "tratar" el cáncer comprende reducir el tamaño del tumor sólido o reducir de otro modo el número de células cancerosas viables. En otras realizaciones, cuando el cáncer es un tumor sólido, "tratar" el cáncer comprende retardar el crecimiento del tumor sólido. En algunas realizaciones preferentes, la presente divulgación proporciona un polinucleótido para su uso en métodos de tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agonista polinucleotídico de TLR9 de la presente divulgación mediante administración intrapulmonar. En algunos aspectos, el polinucleótido está presente en una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un excipiente.

El cáncer de pulmón puede ser cáncer primario de pulmón o cáncer metastásico al pulmón. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un cáncer primario seleccionado del grupo que consiste en cáncer primario de pulmón y cáncer extrapulmonar. En algunas realizaciones, el cáncer primario de pulmón es carcinoma de pulmón microcítico (CPM), mientras que en otras realizaciones el cáncer primario de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM). Los tres tipos principales de CPNM son el adenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células grandes. El cáncer metastásico al pulmón es un cáncer secundario que se ha diseminado al pulmón desde un cáncer primario en un sitio distante. En algunas realizaciones, el cáncer metastásico es una metástasis de un cáncer primario seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario. En otras realizaciones, el cáncer metastásico es de un cáncer de origen primario desconocido.

En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra como un único agente terapéutico (monoterapia), mientras que, en otras realizaciones, el polinucleótido se administra junto con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico (terapia de combinación). Cada agente terapéutico de una terapia de combinación puede administrarse simultáneamente (en la misma composición farmacéutica), al mismo tiempo (en composiciones farmacéuticas separadas administradas una después de la otra en cualquier orden) o secuencialmente en cualquier orden (en composiciones farmacéuticas separadas administradas en ocasiones separadas). La administración secuencial es particularmente útil cuando los agentes terapéuticos de la terapia de combinación están en distintas formas farmacéuticas (por ejemplo, un agente es un polvo seco para administración pulmonar y el otro agente es una solución para administración por inyección). La administración secuencial también es útil cuando los agentes terapéuticos de la terapia de combinación se administran con pautas posológicas distintas (por ejemplo, un agente es un polinucleótido que se administra una vez cada una, dos, tres o cuatro semanas, y el otro agente es un agente quimioterapéutico que

se administra diariamente o con mayor frecuencia. En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra junto con una resección quirúrgica del cáncer primario y se puede administrar antes, durante y/o después de la cirugía. En algunas realizaciones, la resección quirúrgica es una lobectomía, mientras que en otras la resección quirúrgica es una resección en cuña (excisión sublobular).

La presente divulgación proporciona terapias de combinación para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende el polinucleótido como primer agente terapéutico y un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende uno del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un agente biológico y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente uno o ambos de, la extirpación del cáncer primario y la administración de radioterapia. El segundo agente terapéutico se administra a una dosis y una pauta aprobadas por el organismo oficial pertinente (por ejemplo, la FDA, la EMA, etc.) para su uso como monoterapia. Como alternativa, el segundo agente terapéutico se administra a una dosis más baja y/o una pauta menos frecuente que las aprobadas por el organismo oficial pertinente, para su uso como monoterapia.

En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en actinomicina, afatinib, alectinib, asparaginasa, azacitidina, azatioprina, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, camptotecina, carboplatino, capecitabina, certinib, cisplatino, clorambucilo, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, erlotinib, epirubicina, epotilona, etopósido, fludarabina, flutamina, fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, lapatinib, letrozol, mecloretamina, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, raltitrexed, sorafenib, sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, tioguanina, topotecán, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente biológico es una citocina o un anticuerpo. La citocina o anticuerpo puede ser un fragmento, un derivado o una proteína de fusión. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal completamente humano o un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti EGF, tal como necitumumab.

La presente divulgación proporciona terapias combinadas para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende un polinucleótido como primer agente terapéutico, y un segundo agente terapéutico que comprende un antagonista de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios. En algunas realizaciones, la molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios se selecciona del grupo que consiste en PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 (CD152), LAG-3, TIM-3, TIGIT, IL-10 y TGF-beta. En otras realizaciones, la molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO).

En otras realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona terapias combinadas para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende un polinucleótido como primer agente terapéutico, y un segundo agente terapéutico que comprende un agonista de una molécula inmunoestimuladora. En algunas realizaciones, la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD40, OX40 (CD134), GITR, CD137, CD28 e ICOS (CD278).

Preferentemente, la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto cooperativo contra el cáncer de pulmón. Un efecto cooperativo es un efecto que es mayor que el efecto que es el resultado de la administración del polinucleótido en ausencia del segundo agente terapéutico, pero que es menor que un efecto aditivo. Más preferentemente, la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto aditivo contra el cáncer de pulmón. Un efecto aditivo es un efecto que es aproximadamente la suma de los efectos que son el resultado de la administración del polinucleótido y del segundo agente terapéutico como monoterapias, pero que es menor que un efecto sinérgico. Aún más preferentemente, la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto sinérgico contra el cáncer de pulmón. Un efecto sinérgico es un efecto que es mayor que la suma de los efectos que son el resultado de la administración del polinucleótido y del segundo agente terapéutico como monoterapias.

La presente divulgación proporciona un polinucleótido para su uso en métodos para el tratamiento del cáncer de pulmón, ya sea como monoterapia o como terapia de combinación, que comprende un agonista polinucleotídico de TLR9. Algunos métodos logran una remisión completa o parcial durante un período de tiempo después del cese de la terapia. En algunas realizaciones, el método logra uno o más de los siguientes resultados:

- (a) el aumento del tiempo de supervivencia del sujeto;
- (b) la reducción del volumen del cáncer primario;
- (c) el retraso del crecimiento del cáncer primario;
- (d) la reducción del número de tumores metastásicos;
- (e) la reducción del volumen de tumores metastásicos; y
- (f) retardar el crecimiento de tumores metastásicos;

en donde el cáncer primario es pulmonar o extrapulmonar. En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer de pulmón comprende inducir la secreción en el pulmón de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en ligando de quimiocina con motivo CC 2 (CCL2), ligando de quimiocina con motivo CXC 10 (CXCL10), interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 p70 (IL-12p70), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer de pulmón no da como resultado una toxicidad del pulmón inducida por polinucleótido de tal gravedad que la administración repetida del polinucleótido esté contraindicada. En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer de pulmón no da como resultado síntomas similares a la gripe inducidos por polinucleótido de tal gravedad que la administración repetida del polinucleótido esté contraindicada, en donde los síntomas similares a la gripe comprenden uno o más del grupo que consiste en fiebre, cefalea, escalofríos, mialgia y fatiga.

### Otras enfermedades y trastornos

Adicionalmente, la presente divulgación describe métodos de prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto mamífero, que comprenden administrar a un sujeto mamífero una composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad infecciosa en el sujeto mamífero. Es decir, en algunos aspectos, la presente divulgación describe vacunas profilácticas. En algunos aspectos, el sujeto mamífero está en riesgo de exposición a un agente infeccioso. "Prevenir" una enfermedad infecciosa significa proteger a un sujeto del desarrollo de una enfermedad infecciosa. En algunos aspectos, prevenir una enfermedad infecciosa comprende adicionalmente proteger a un sujeto de infectarse con un agente infeccioso (por ejemplo, proteger a un sujeto de desarrollar una infección aguda o crónica). Adicionalmente, la presente divulgación describe métodos para mejorar un síntoma de una enfermedad infecciosa en un sujeto mamífero, que comprenden administrar a un sujeto mamífero una composición farmacéutica en una cantidad suficiente para mejorar un síntoma de una enfermedad infecciosa en el sujeto mamífero. Es decir, en algunos aspectos, la presente divulgación describe vacunas terapéuticas. En algunos aspectos, el sujeto está infectado de forma aguda o crónica con un agente infeccioso. La enfermedad infecciosa puede ser una enfermedad vírica, bacteriana, fúngica o parasitaria. En algunos aspectos, la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un antígeno vírico, bacteriano, fúngico o parasitario. "Mejorar" un síntoma de una enfermedad infecciosa significa mejorar un síntoma, preferentemente, disminuir el alcance de la enfermedad.

Además, la presente divulgación describe métodos para mejorar un síntoma de un trastorno relacionado con la IgE en un sujeto mamífero, que comprenden administrar a un sujeto mamífero una composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad suficiente para mejorar un síntoma de un trastorno relacionado con la IgE en el sujeto mamífero. En algunos aspectos preferentes, el trastorno relacionado con la IgE es una alergia. Las alergias incluyen, pero son limitación, rinitis alérgica (alergia al polen), sinusitis, eccema y urticaria. En algunos aspectos, la composición farmacéutica puede comprender además un alérgeno. "Mejorar" un síntoma de un trastorno relacionado con la IgE significa mejorar un síntoma, preferentemente, disminuir el alcance del trastorno. Por ejemplo, si el trastorno relacionado con la IgE es rinitis alérgica, mejorar un síntoma significa reducir la inflamación de la mucosa nasal, reducir la rinorrea (goteo nasal) y/o reducir los estornudos.

### Ejemplos

Abreviaturas: CTRL (control); ADN (ácido desoxirribonucleico); LLBA (líquido de lavado broncoalveolar); ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas); CE<sub>50</sub> (mitad de la concentración eficaz máxima); (FACS) clasificación de células activadas por fluorescencia; mcg o  $\mu$ g (microgramo); CMSP (células mononucleares de sangre periférica); PN (polinucleótido); TLR9 (receptor de tipo Toll 9); y TS (tipo silvestre).

Aunque la divulgación anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad y de comprensión, será evidente para los expertos en la materia que se pueden practicar determinados cambios y modificaciones.

**Tabla 1-1: Secuencias polinucleotídicas<sup>^</sup>**

| PN    | SEQ ID NO: | Secuencia                                     |
|-------|------------|-----------------------------------------------|
| D60-1 | 1          | 5'-TCG AAC GTT CGA ACG TTC GAA CGT TCG AAT-3' |
| D60-2 | 2          | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA Nx-3'          |
| D60-3 | 3          | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA ACG TTA-3'     |
| D60-4 | 4          | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA ACG TT-3'      |

(continuación)

| PN    | SEQ ID NO: | Secuencia                                      |
|-------|------------|------------------------------------------------|
| D60-5 | 5          | 5'-TCG TAA <b>CGT TCG AAC GTT CGA ACG</b> T-3' |
| D60-6 | 6          | 5'-TCG TAA <b>CGT TCG AAC GTT CGA ACG</b> -3'  |
| D60-7 | 7          | 5'-TCG TAA <b>CGT TCG AAC GTT CGA</b> AC-3'    |
| D60-8 | 8          | 5'-TCG TAA <b>CGT TCG AAC GTT CGA</b> A-3'     |
| D60-9 | 9          | 5'-TCG TAA <b>CGT TCG AAC GTT CGA</b> -3'      |

<sup>^</sup> El palíndromo más largo posible se muestra en negrita. Al menos un enlace internucleotídico es un enlace de fosforotioato en D60-2 y en la SEQ ID NO: 2, x es 0, 1 o 2, y N es A, C o T.

Tabla 1-2: Propiedades de los polinucleótidos

| PN    | SEQ ID NO: | n.º de CpG | Longitud del polinucleótido | Longitud del palíndromo |
|-------|------------|------------|-----------------------------|-------------------------|
| D60-1 | 1          | 7          | 30                          | 28                      |
| D60-2 | 2          | 5          | 21-24                       | 12-16                   |
| D60-3 | 3          | 6          | 27                          | 24                      |
| D60-4 | 4          | 6          | 26                          | 22                      |
| D60-5 | 5          | 6          | 25                          | 20                      |
| D60-6 | 6          | 6          | 24                          | 18                      |
| D60-7 | 7          | 5          | 23                          | 16                      |
| D60-8 | 8          | 5          | 22                          | 14                      |
| D60-9 | 9          | 5          | 21                          | 12                      |

5 La Tabla 1-1 muestra las secuencias de los nucleótidos y la Tabla 1-2 resume las características de las secuencias de los agonistas polinucleotídicos de TLR9 a los que se hace referencia en los ejemplos. A menos que se indique otra cosa, los polinucleótidos son 2'-desoxirribopolinucleótidos y los enlaces internucleótidos son enlaces de éster fosforotioato.

#### 10 Ejemplo 1: Aislamiento y estimulación de leucocitos humanos mediante polinucleótidos

Se evaluó la actividad de los polinucleótidos (PN) *in vitro* mediante la medición de la secreción de citocinas por parte de células mononucleares de sangre periférica humanas (CMSP) y linfocitos B aislados.

15 Las CMSP se aislaron de sangre de donantes humanos sanos utilizando Ficoll-Paque. Los linfocitos B se aislaron de las capas leucocitarias mediante selección positiva usando microperlas anti CD 19 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la inducción de IFN- $\alpha$ , se incubaron cultivos por duplicado de CMSP ( $2,5 \times 10^6$  células/ml) durante 24 horas con concentraciones crecientes de polinucleótidos. Los niveles de IFN- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo celular se midieron por ELISA (n=4 donantes). Para la inducción de IL-6, se incubaron cultivos por duplicado de linfocitos B ( $0,75 \times 10^6$  células/ml) durante 96 horas con concentraciones crecientes de polinucleótidos. Los niveles de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo celular se midieron por ELISA (n=12 donantes).

25 Todos los polinucleótidos analizados indujeron la producción de IFN- $\alpha$  a partir de CMSP humanas en un amplio intervalo de concentraciones (FIG. 1). Mientras que D60-1 indujo un nivel máximo de IFN- $\alpha$  más alto en comparación con D60-7, D60-7 no fue menos potente ya que D60-1 y D60-7 tenían valores de  $CE_{50}$  de IFN- $\alpha$  comparables, como se muestra en la Tabla 1-3. Tanto D60-1 como D60-7 también indujeron la producción de IL-6 a partir de linfocitos B humanos en un amplio intervalo de concentraciones (FIG. 2). D60-7 indujo un nivel máximo de IL-6 ligeramente más alto en comparación con D60-1.

30

**Tabla 1-3: Secreción de IFN- $\alpha$  por parte de CMSP humanas**

| Polinucleótido | CE <sub>50</sub> de IFN- $\alpha$ ( $\mu$ M) | Máximo de IFN- $\alpha$ (pg/ml) |
|----------------|----------------------------------------------|---------------------------------|
|                | Media $\pm$ ETM                              | Media $\pm$ ETM                 |
| D60-1          | 0,0353 $\pm$ 0,0014                          | 2819 $\pm$ 1295                 |
| D60-3          | 0,0228 $\pm$ 0,0433                          | 2473 $\pm$ 1068                 |
| D60-4          | 0,0285 $\pm$ 0,0050                          | 2893 $\pm$ 1300                 |
| D60-5          | 0,0293 $\pm$ 0,0083                          | 2965 $\pm$ 1340                 |
| D60-6          | 0,0238 $\pm$ 0,0055                          | 2902 $\pm$ 1335                 |
| D60-7          | 0,0248 $\pm$ 0,0088                          | 1869 $\pm$ 856                  |
| D60-8          | 0,0253 $\pm$ 0,0077                          | 1647 $\pm$ 813                  |

**Ejemplo 2: Evaluación de los polinucleótidos en ratones**

- 5 Se evaluó la actividad de los polinucleótidos (PN) *en vivo* mediante la medición de citocinas en líquido de lavado broncoalveolar (LLBA), de la puntuación histopatológica del tejido pulmonar y la determinación de los cambios en el peso corporal de los ratones después de la administración intranasal de solución salina, D60-1 o D60-7, en una pauta quincenal.
- 10 Se administró a ratones BALB/c (n=5/grupo) solución salina o un agonista polinucleotídico de TLR9 a una dosis de 1, 5 o 20  $\mu$ g por vía intranasal, en un volumen de 50  $\mu$ l, para asegurar el suministro a los pulmones. Los ratones recibieron tratamiento intranasal los días 0, 14, 28 y 42, con un total de cuatro tratamientos. Los ratones se pesaron dos veces por semana. Veinticuatro horas después del último (cuarto) tratamiento, se sacrificaron los ratones y se realizó un lavado broncoalveolar con solución salina, para obtener un lavado líquido de las vías respiratorias inferiores.
- 15 Posteriormente, se recogió tejido pulmonar y se conservó en formalina al 10 % para la inclusión en parafina, el corte y la tinción con hematoxilina y eosina en una preparación para la evaluación y puntuación histopatológica. Los cortes de tejido pulmonar se puntuaron en una escala de 1 a 5, donde 1 representaba pulmones no cambiados y puntuaciones más altas representaban una incidencia aumentada de infiltrados inflamatorios peribronquiolares y perivasculares, así como una incidencia aumentada de cambios estructurales y remodelado del tejido pulmonar. Los niveles de citoquinas en el LLBA se midieron utilizando el sistema multiplex MAGPIX® (Luminex, Austin, TX).
- 20

La administración de agonistas polinucleotídicos de TLR9 por vía intranasal induce una respuesta inmunitaria local según se determina midiendo las citocinas en LLBA (FIG. 3). A la dosis más bajas analizadas (1 o 5  $\mu$ g), D60-1 y D60-7 indujeron niveles comparables de muchas citocinas. Sin embargo, a la dosis más alta analizada (dosis de 20  $\mu$ g o de aproximadamente 1 mg/kg), D60-1 indujo niveles más altos de todas las citocinas en comparación con D60-7.

25

Se observó de forma local la toxicidad inducida por los polinucleótidos, mediante examen microscópico de tejido pulmonar y sistémicamente midiendo cambios en el peso corporal (Campbell *et al.*, J Clin Invest, 119:2564-2576, 2009). La puntuación histopatológica de los cortes de tejido pulmonar reflejó aumentos dependientes de la dosis en la infiltración celular peribronquiolar y perversa, cambios en las vías respiratorias y las paredes de los vasos sanguíneos, y el remodelado de tejidos en respuesta a D60-1 y D60-7, con efectos más pronunciados, en cada nivel de dosis, en los receptores de D60-1 (FIG. 4). A la dosis más alta analizada (20  $\mu$ g), D60-1 provocó una pérdida de peso postratamiento más pronunciada que D60-7, especialmente después de los 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> tratamientos, en los días 14 y 28, respectivamente (FIG. 5). Tomados en conjunto, estos datos indican que la administración intranasal de D60-7 está asociada con una toxicidad reducida en comparación con D60-1.

30

35

**Ejemplo 3: Evaluación de los polinucleótidos en modelos de ratón de cáncer de pulmón**

Se evalúa la actividad de los polinucleótidos (PN) *en vivo* en varios modelos de ratón distintos de cáncer metastásico de pulmón (Heppner *et al.*, Breast Cancer Res. 2:331-334, 2000).

40

**Inyección subcutánea (SC) de células de carcinoma.**

**D60-7 y el anti PD-1 actúan de forma sinérgica para aumentar la supervivencia de ratones con tumores de pulmón**

45

Las células de carcinoma de mama 4T1 metastatizan espontáneamente desde el espacio subcutáneo al pulmón, hígado, páncreas, huesos y sangre. Se inyectaron aproximadamente 10.000 células 4T1 por vía subcutánea en ratones BALB/c. Seis días después se inició el tratamiento con un anticuerpo (Ac) bloqueante anti PD-1. El Ac bloqueante se administró mediante inyección IP a una dosis de 250  $\mu$ g cada 3 o 4 días durante 5 semanas. El tumor

50

primario se extrajo quirúrgicamente el día 15. El agonista polinucleotídico de TLR9 D60-7 se administró por vía intranasal a una dosis de 10 µg en 50 µl de solución salina, comenzando día 16 y a partir de entonces dos veces por semana, durante tres semanas (por ejemplo, en los días 16, 19, 23, 26, 30, 34 y 41). El agonista polinucleotídico de TLR9 (D60-7) y el Ac bloqueante (anti PD-1) se proporcionaron solos o en combinación. La solución salina se administró como control a un grupo distinto de ratones y a los ratones que recibieron anti PD-1 solo. El número de ratones por grupo fue el siguiente: solución salina (control) n=11; D60-7 n=10; anti PD-1 n=10; anti PD-1 más D60-7 n=12. La capacidad de los tratamientos para aumentar la supervivencia de los ratones con tumor se evaluó durante 90 días. La FIG. 6 es una combinación de dos experimentos independientes que muestra una supervivencia potenciada de los ratones tratados con D60-7 y anti PD-1, en comparación con los ratones tratados con cualquiera de los agentes solos.

#### **D60-7 y el anti PD-1 actúan de forma sinérgica reduciendo el número de metástasis pulmonares**

Se inyectaron aproximadamente 10.000 células 4T1 por vía subcutánea en ratones BALB/c. Seis días después se inició el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti PD-1. Se administró el anti PD-1 mediante inyección IP a una dosis de 250 µg, dos veces por semana del día 6 al día 34. El tumor primario se extrajo quirúrgicamente el día 15. D60-7 se administró por vía intranasal a una dosis de 10 µg en 50 µl de solución salina, los días 16, 19, 21, 23, 27 y 30. D60-7 y el anti PD-1 se proporcionaron solos o en combinación. La solución salina se administró como control a un grupo distinto de ratones y a los ratones que recibieron anti PD-1 solo. El día 34 se sacrificaron los ratones. Se recogieron los pulmones y procesaron para contar el número de metástasis pulmonares mediante un ensayo en placas. En resumen, los pulmones se cortaron 15 veces con tijeras y se digirieron durante 30 min a 37 °C en 5 ml de HBSS que contenía colagenasa tipo IV 1 mg/ml y ADNasa I 0,25 mg/ml. Después de la incubación, la suspensión se lavó dos veces con HBSS y se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo de tejidos (RPMI más SFB al 10 %). La suspensión se diluyó en 10 ml de medio de cultivo de tejidos a distintas diluciones que variaban de 1:2 a 1:1000, y se sembró en placas de Petri. Después de 10 días, se contaron las colonias de tumores para evaluar el número de células formadoras de colonias metastásicas en el pulmón. El número de ratones por grupo fue el siguiente: solución salina (control) n=13; D-60-7 n=11; anti PD-1 n=14; anti PD-1 más D60-7 n=14. La FIG. 7 es una gráfica acumulativa de dos experimentos independientes que muestra que tanto D60-7 como el anti PD-1 condujeron, como agentes únicos, a reducciones significativas del número de metástasis. Sorprendentemente, la combinación de D60-7 o anti PD-1 actuaron de forma sinérgica produciendo una reducción aún mayor del número de metástasis pulmonares. Los valores de P se calcularon usando el programa informático Prism, usando la prueba de la *t* para datos independientes de Mann Whitney.

#### **Inyección intravenosa (IV) de células de carcinoma.**

Se inyectan en ratones BALB/c aproximadamente 20.000 células de carcinoma de colon CT26 por vía intravenosa, o se inyectan en ratones C57BL/6 aproximadamente 50.000 células de carcinoma de pulmón de Lewis por vía intravenosa. Se administra un anticuerpo anti PD-1 o un anticuerpo (Ac) bloqueante anti PDL-1 mediante inyección IP a una dosis de 250 µg, los días 7, 11, 15, 18, 21, 25, 28 y 32. Se administró un agonista polinucleotídico de TLR9 por vía intranasal a una dosis de 10 o 5 o 1 µg en 50 µl de solución salina, los días 7, 11, 15, 18, 21, 25, 28 y 32. El agonista polinucleotídico de TLR9 y el Ac bloqueante se proporcionaron solos o en combinación. La capacidad de los tratamientos para aumentar la supervivencia de los ratones con tumor se evalúa durante hasta 200 días.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION

<120> ADMINISTRACIÓN INTRAPULMONAR DE AGONISTAS POLINUCLEOTÍDICOS DEL RECEPTOR DE TIPO TOLL 9 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN

<130> 377882006040

<140> PCT/US2016/033817

<141> 23-05-2016

<150> US 62/276.767

<151> 08-01-2016

<150> US 62/169.309

<151> 01-06-2015

<150> US 62/169.321

<151> 01-06-2015

<150> US 62/168.449

<151> 29-05-2015

|    |                                                                         |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <150> US 62/168.470                                                     |    |
|    | <151> 29-05-2015                                                        |    |
| 5  | <160> 9                                                                 |    |
|    | <170> FastSEQ para Windows versión 4.0                                  |    |
| 10 | <210> 1                                                                 |    |
|    | <211> 30                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                              |    |
| 15 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Construcción sintética                                            |    |
|    | <400> 1                                                                 |    |
|    | tcgaacgttc gaacgttcga acgttcgaat                                        | 30 |
| 20 | <210> 2                                                                 |    |
|    | <211> 23                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                              |    |
| 25 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Construcción sintética                                            |    |
| 30 | <220>                                                                   |    |
|    | <221> misc_feature                                                      |    |
|    | <222> 22, 23                                                            |    |
|    | <223> n = A, C o T y hasta 2 de ellos pueden estar presentes o ausentes |    |
| 35 | <400> 2                                                                 |    |
|    | tcgtaacgtt cgaacgttcg ann                                               | 23 |
| 40 | <210> 3                                                                 |    |
|    | <211> 27                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                              |    |
| 45 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Construcción sintética                                            |    |
|    | <400> 3                                                                 |    |
|    | tcgtaacgtt cgaacgttcg aacgtta                                           | 27 |
| 50 | <210> 4                                                                 |    |
|    | <211> 26                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                              |    |
| 55 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Construcción sintética                                            |    |
|    | <400> 4                                                                 |    |
|    | tcgtaacgtt cgaacgttcg aacgtt                                            | 26 |
| 60 | <210> 5                                                                 |    |
|    | <211> 25                                                                |    |
|    | <212> ADN                                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                              |    |
| 65 | <220>                                                                   |    |
|    | <223> Construcción sintética                                            |    |
|    | <400> 5                                                                 |    |

|    |                                                                |    |
|----|----------------------------------------------------------------|----|
|    | tcgtaacggt cgaacgttcg aacgt                                    | 25 |
| 5  | <210> 6<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 10 | <220><br><223> Construcción sintética                          |    |
|    | <400> 6<br>tcgtaacggt cgaacgttcg aacg                          | 24 |
| 15 | <210> 7<br><211> 23<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 20 | <220><br><223> Construcción sintética                          |    |
|    | <400> 7<br>tcgtaacggt cgaacgttcg aac                           | 23 |
| 25 | <210> 8<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 30 | <220><br><223> Construcción sintética                          |    |
|    | <400> 8<br>tcgtaacggt cgaacgttcg aa                            | 22 |
| 35 | <210> 9<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 40 | <220><br><223> Construcción sintética                          |    |
| 45 | <400> 9<br>tcgtaacggt cgaacgttcg a                             | 21 |

## REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del polinucleótido mediante suministro intrapulmonar, en donde el polinucleótido consiste en la secuencia de:  
5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTTCGANx-3' (SEQ ID NO:2), en donde x es 0, 1 o 2,  
cada N es A, C o T, y en donde al menos un enlace internucleotídico es un enlace de fosforotioato.
2. El polinucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
  - (a) el polinucleótido consiste en la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9; y/o
  - (b) el polinucleótido es bicatenario; y/o
  - (c) todos los enlaces internucleotídicos son enlaces de fosforotioato.
3. El polinucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto tiene un cáncer primario seleccionado del grupo que consiste en cáncer primario de pulmón y cáncer extrapulmonar.
4. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
  - (a) el cáncer de pulmón es cáncer primario de pulmón, en donde, opcionalmente, el cáncer primario de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o carcinoma de pulmón microcítico (CPM); o
  - (b) el cáncer de pulmón es cáncer metastásico al pulmón, opcionalmente en donde el cáncer metastásico es una metástasis de un cáncer primario seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario.
5. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el sujeto mamífero es un ser humano.
6. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico.
7. El polinucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo agente terapéutico comprende un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en actinomicina, afatinib, alectinib, asparaginasa, azacitidina, azatioprina, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, camptotecina, carboplatino, capecitabina, certinib, cisplatino, clorambucilo, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, erlotinib, epirubicina, epotilona, etopósido, fludarabina, flutamina, fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecán, lapatinib, letrozol, mecloretamina, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, raltitrexed, sorafenib, sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, tioguanina, topotecán, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y combinaciones de los mismos.
8. El polinucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el agente quimioterapéutico comprende:
  - (a) uno o más del grupo que consiste en ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina;
  - (b) uno o más del grupo que consiste en mitomicina, vindesina y cisplatino;
  - (c) uno o ambos del grupo que consiste en cisplatino y vinorelbina; o
  - (d) uno o ambos del grupo que consiste en cisplatino, etopósido e ifosfamida.
9. El polinucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde:
  - (a) el segundo agente terapéutico es un antagonista de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios, opcionalmente en donde la molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios se selecciona del grupo que consiste en PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 (CD152), LAG-3, TIM-3, TIGIT, IL-10 y TGF-beta;
  - (b) el segundo agente terapéutico es un antagonista de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios, opcionalmente en donde la molécula inhibidora de puntos de control inmunitarios es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO); o
  - (c) el segundo agente terapéutico es un agonista de una molécula inmunoestimuladora, opcionalmente en donde la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD40, OX40 (CD134), GITR, CD137, CD28 e ICOS (CD278).
10. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 9(a) y 9(c), en donde el segundo agente terapéutico comprende un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo.
11. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde el método comprende adicionalmente uno o ambos de, la extirpación del cáncer primario y la administración de radioterapia.

12. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en donde:

- (a) la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto sinérgico contra el cáncer de pulmón;
- (b) la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto aditivo contra el cáncer de pulmón; o
- (c) la cantidad eficaz del polinucleótido y la cantidad eficaz del segundo agente terapéutico juntas dan como resultado un efecto cooperativo contra el cáncer de pulmón.

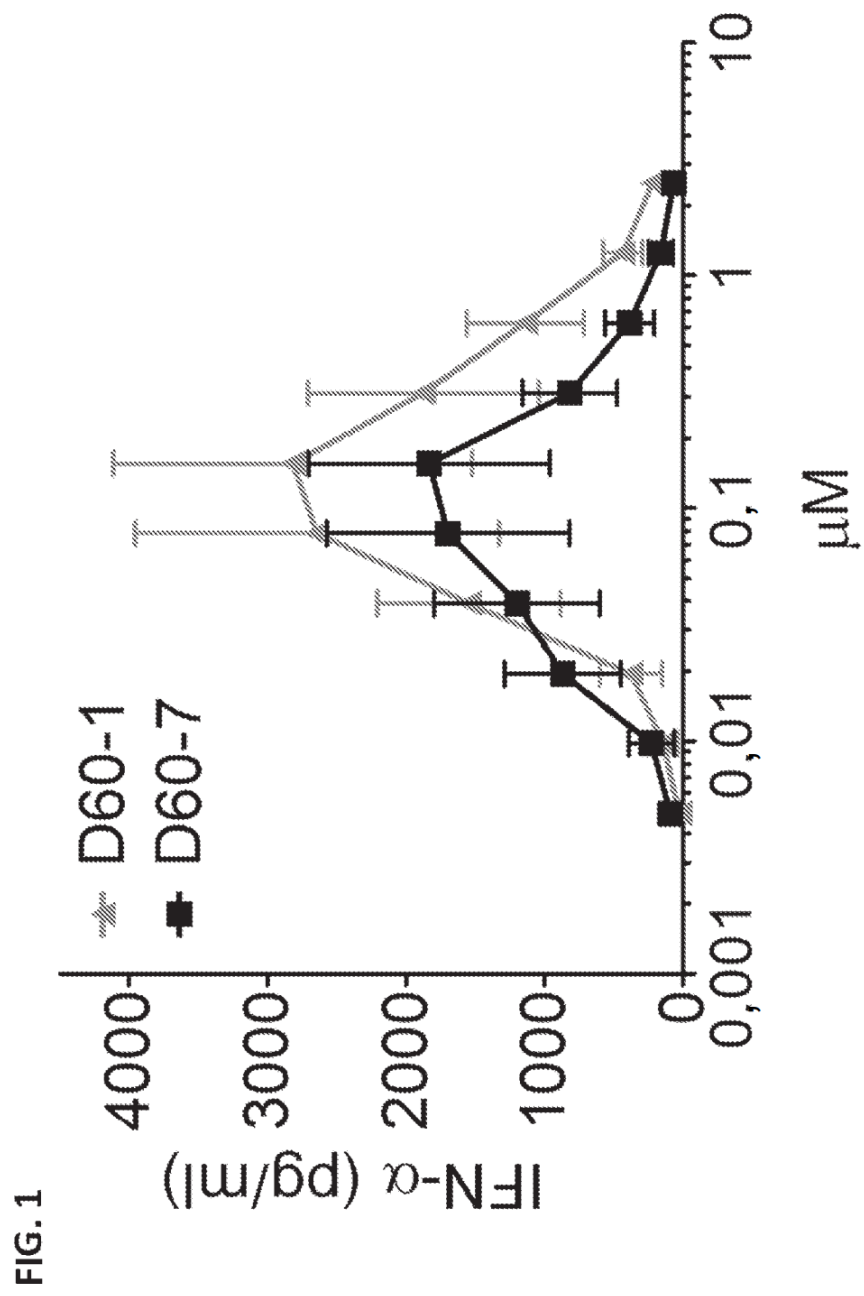
13. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en donde el tratamiento del cáncer de pulmón comprende uno o más de los siguientes:

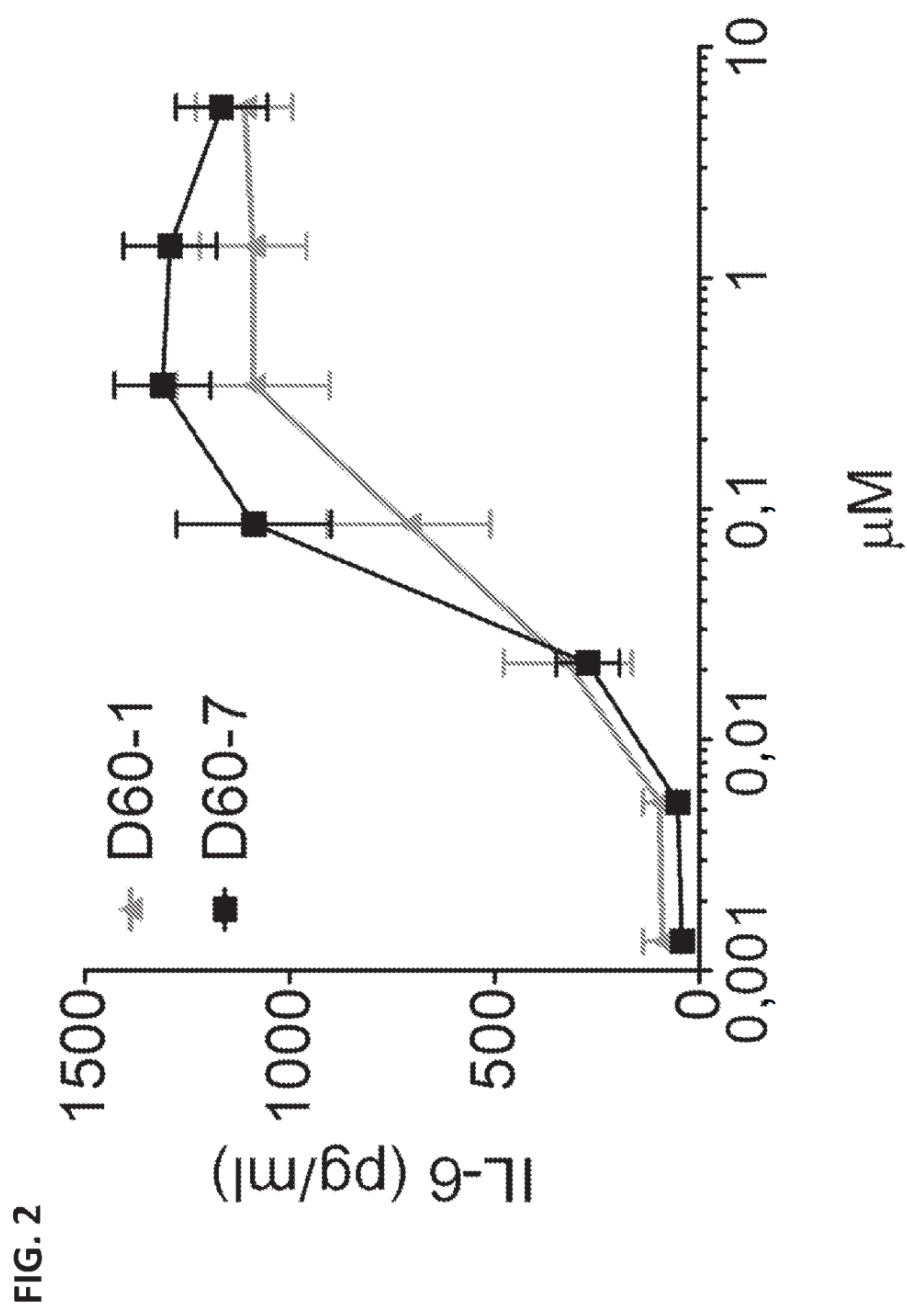
- (a) el aumento del tiempo de supervivencia del sujeto;
- (b) la reducción del volumen del cáncer primario;
- (c) el retraso del crecimiento del cáncer primario;
- (d) la reducción del número de tumores metastásicos;
- (e) la reducción del volumen de tumores metastásicos; y
- (f) el retraso del crecimiento de tumores metastásicos.

14. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el tratamiento del cáncer de pulmón comprende inducir la secreción en el pulmón de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en ligando de quimiocina con motivo CC 2 (CCL2), ligando de quimiocina con motivo CXC 10 (CXCL10), interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 p70 (IL-12p70), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

15. El polinucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde:

- (a) el tratamiento del cáncer de pulmón no da como resultado una toxicidad del pulmón inducida por polinucleótido de tal gravedad que la administración repetida del polinucleótido esté contraindicada; o
- (b) el tratamiento del cáncer de pulmón no da como resultado síntomas similares a la gripe inducidos por polinucleótido de tal gravedad que la administración repetida del polinucleótido esté contraindicada, en donde los síntomas similares a la gripe comprenden uno o más del grupo que consiste en fiebre, cefalea, escalofríos, mialgia y fatiga.





**FIG. 3A**

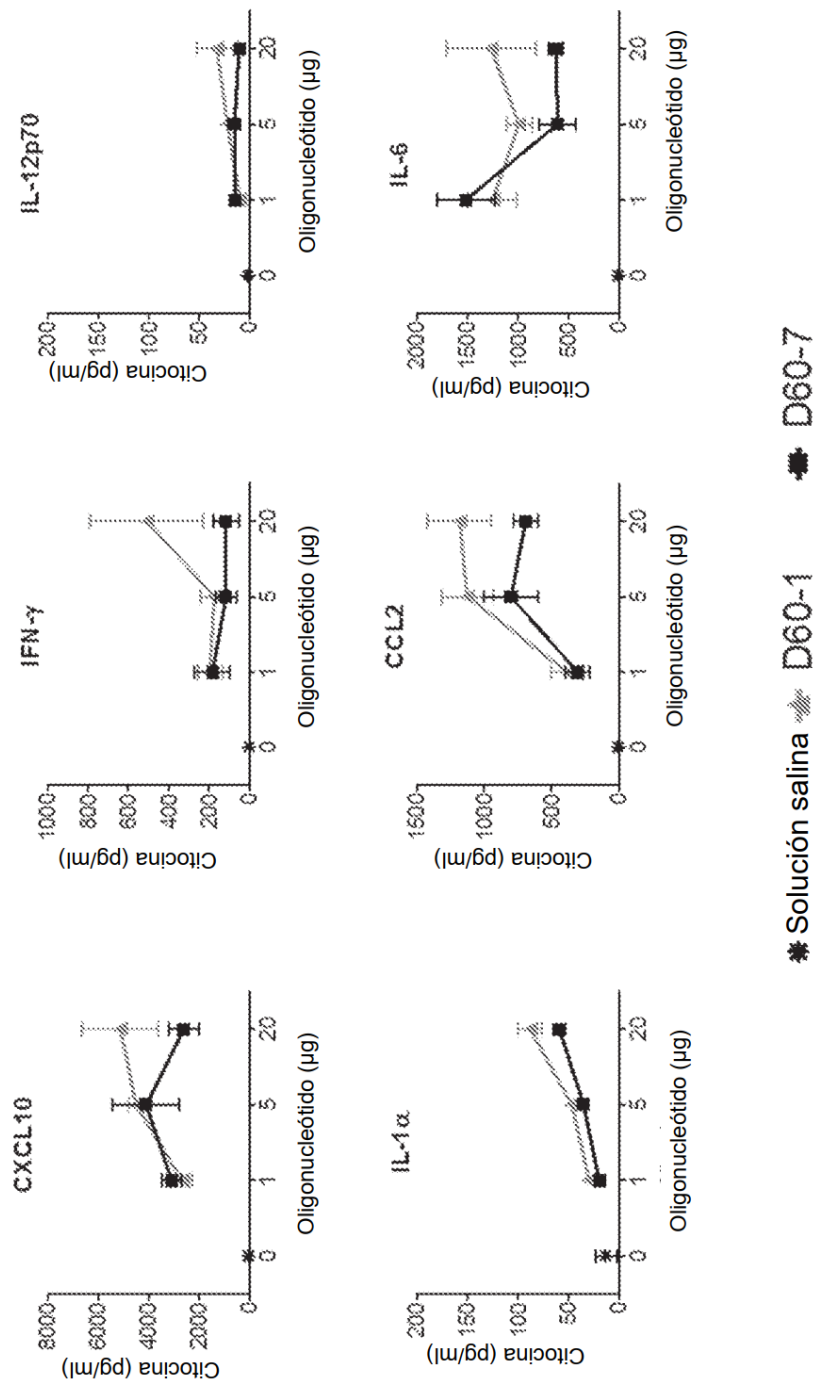


FIG. 3B

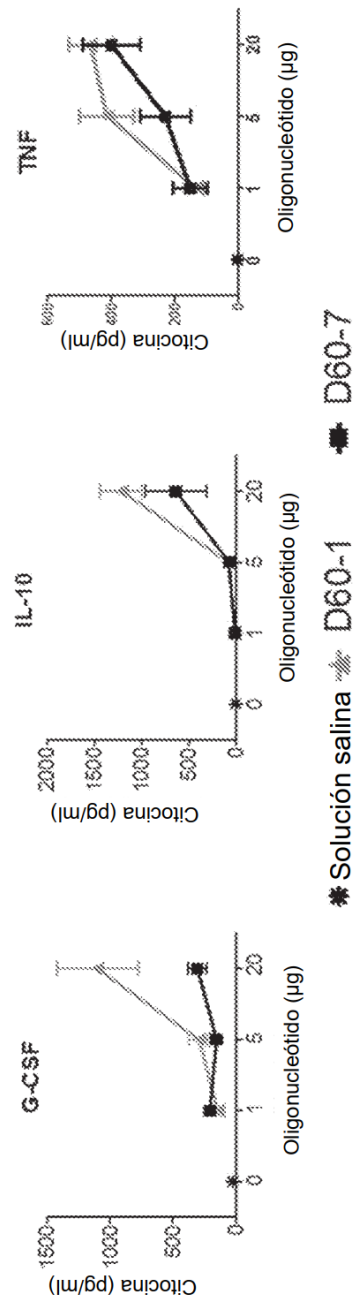
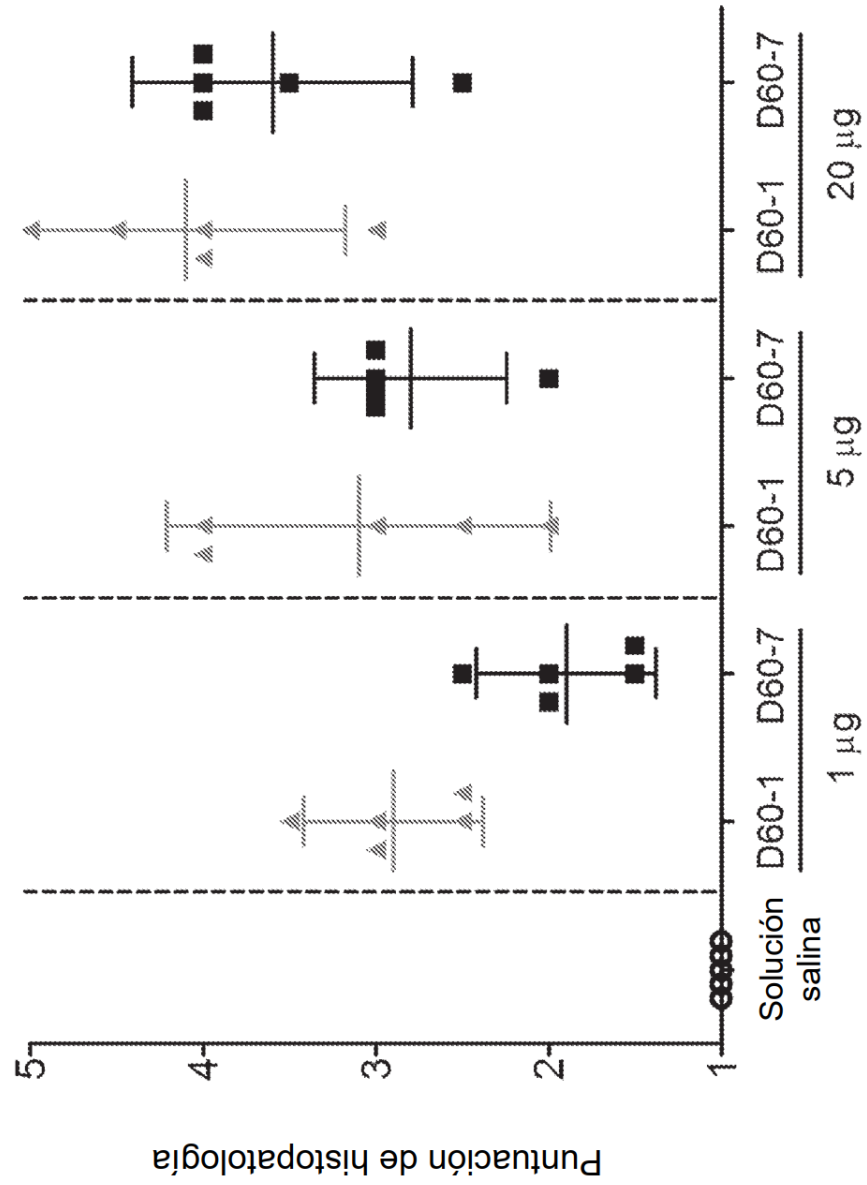


FIG. 4



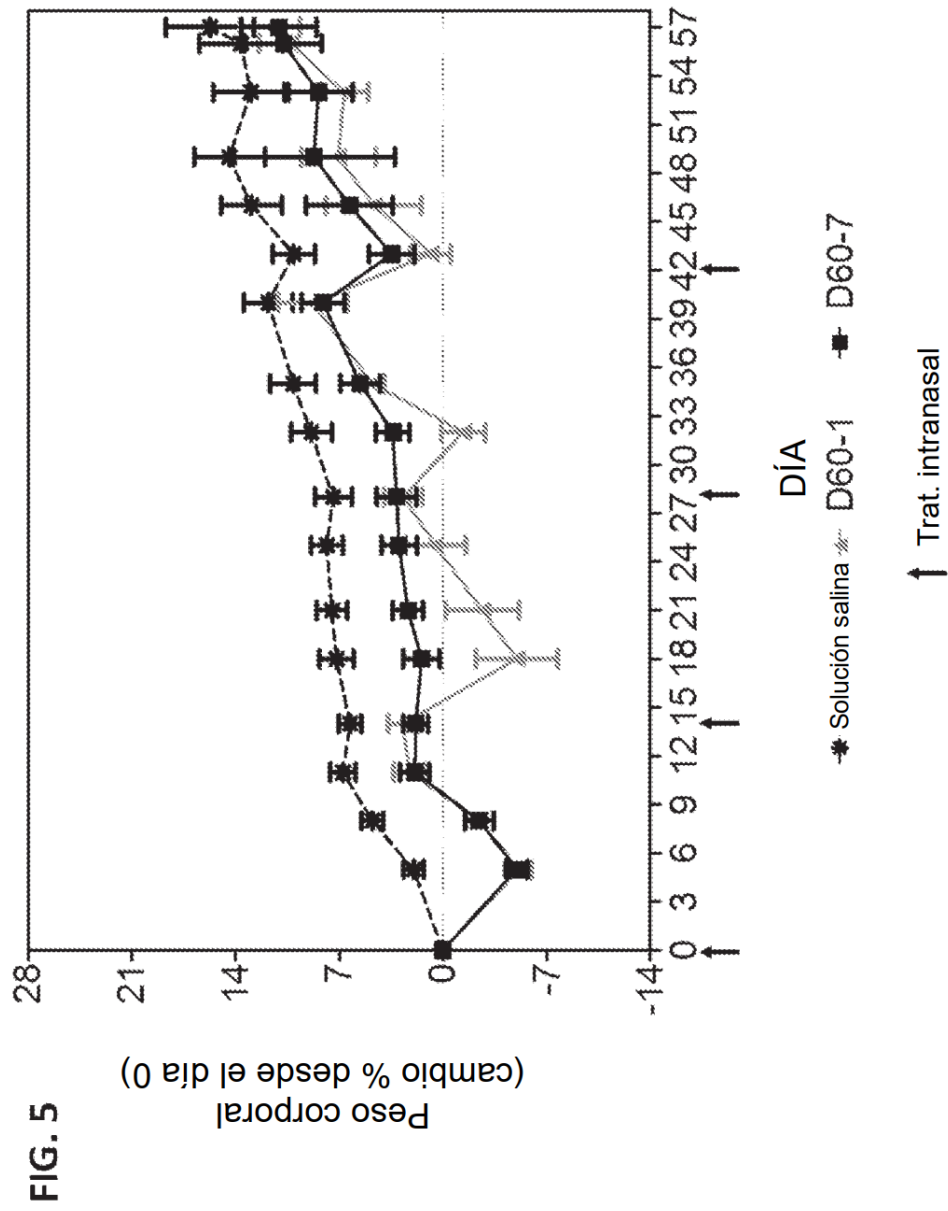


FIG. 6

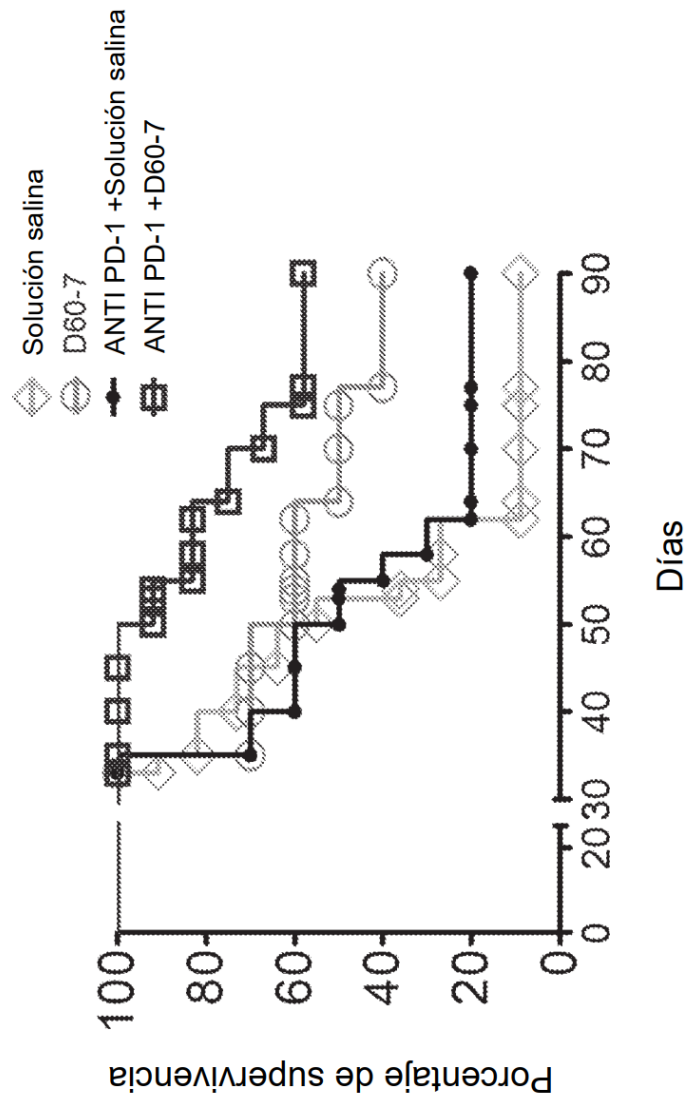


FIG. 7

