

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 394**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61N 5/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2016** **E 21159163 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3892284**

54 Título: **Combinación de un antagonista de PD-1 y un oligonucleótido de tipo CpG-C para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168449 P
01.06.2015 US 201562169309 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2024

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME LLC (50.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US y
TRISALUS LIFE SCIENCES, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

YU, YING;
DENKER, ANDREW EVAN;
SADEKOVA, SVETLANA;
PHAN, UYEN TRUONG;
KASTELEIN, ROBERT A.;
KAUFMAN, DAVID ROSS;
COFFMAN, ROBERT L.;
GUIDUCCI, CRISTIANA y
JANSSEN, ROBERT S.

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 985 394 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de un antagonista de PD-1 y un oligonucleótido de tipo CpG-C para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a terapias combinadas útiles para el tratamiento del cáncer. En concreto, la invención se refiere a una terapia combinada que comprende un antagonista de una proteína de muerte programada 1 ("Programmed Death 1", PD-1) y un oligonucleótido de tipo CpG-C, que es un agonista del receptor de tipo Toll 9 ("Toll-like receptor 9", TLR9).

Antecedentes de la invención

- 10 La PD-1 está reconocida como una molécula importante en la regulación inmunitaria y el mantenimiento de la tolerancia periférica. La PD-1 se expresa moderadamente en linfocitos T, B y NKT indiferenciados y se regula al alza por la transducción de señales del receptor de linfocitos T/B en linfocitos, monocitos y células mieloides (1).

- 15 Dos ligandos conocidos para PD-1, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), se expresan en cánceres humanos que aparecen en diversos tejidos. En grandes conjuntos de muestras, por ejemplo, de cáncer de ovario, renal, colorrectal, de páncreas, de hígado y melanoma, se ha demostrado que la expresión de PD-L1 se correlacionaba con un mal pronóstico y una menor supervivencia global, independientemente del tratamiento posterior (2-13). Del mismo modo, se ha observado que la expresión de PD-1 en los linfocitos infiltrantes del tumor marca los linfocitos T disfuncionales en el cáncer de mama y el melanoma (14-15) y se correlaciona con un mal pronóstico en el cáncer renal (16). Así, se ha propuesto que las células tumorales que expresan PD-L1 interactúan con los linfocitos T que expresan PD-1 para atenuar la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunitaria, contribuyendo así a una respuesta
- 20 inmunitaria deficiente contra el tumor.

- Varios anticuerpos monoclonales que inhiben la interacción entre PD-1 y uno o ambos de sus ligandos PD-L1 y PD-L2 están en desarrollo clínico para tratar el cáncer. Se ha propuesto que la eficacia de dichos anticuerpos podría potenciarse si se administraran combinados con otras terapias contra el cáncer aprobadas o experimentales, por ejemplo, radiación, cirugía, agentes quimioterapéuticos, terapias dirigidas, agentes que inhiben otras vías de transducción de señales que están desreguladas en los tumores y otros agentes potenciadores de la inmunidad.
- 25

- La administración de determinadas secuencias de ADN, generalmente conocidas como secuencias inmunoestimuladoras, induce una respuesta inmunitaria con un sesgo de tipo Th1, como indica la secreción de citocinas asociadas a Th1. La administración de un polinucleótido inmunoestimulador con un antígeno provoca una respuesta inmunitaria de tipo Th1 contra el antígeno administrado. Roman *et al.* (1997), *Nature Med.*, 3:849-854. Por ejemplo, los ratones inyectados intradérmicamente con β -galactosidasa (β -Gal) de *Escherichia coli* (*E. coli*) en solución salina o en el adyuvante alumbre respondieron produciendo anticuerpos IgG1 e IgE específicos y células CD4⁺ que secretaban IL-4 e IL-5, pero no IFN- γ , lo que demuestra que los linfocitos T eran predominantemente del subconjunto Th2. Sin embargo, los ratones a los que se inyectó intradérmicamente (o con un aplicador de rascado cutáneo Tyne) ADN plasmídico (en solución salina), que codificaba β -Gal y contenía una secuencia inmunoestimuladora,
- 30 respondieron produciendo anticuerpos IgG2a y células CD4⁺ que secretaban IFN- γ , pero no IL-4 e IL-5, lo que demuestra que los linfocitos T eran predominantemente del subconjunto Th1. Además, la producción de IgE específica por parte de los ratones inyectados con ADN plasmídico se redujo en un 66-75 %. Raz *et al.* (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5141-5145. En general, la respuesta a la inmunización con ADN desnudo se caracteriza por la producción de IL-2, TNF α e IFN- γ por los linfocitos T CD4⁺ estimulados con antígeno, lo que es indicativo de una respuesta de tipo Th1. Esto es especialmente importante en el tratamiento de la alergia y el asma, como demuestra la disminución de la producción de IgE. La capacidad de los polinucleótidos inmunoestimuladores para estimular una respuesta inmunitaria de tipo Th1 se ha demostrado con antígenos bacterianos, antígenos víricos y con alérgenos (véase, por ejemplo, el documento WO 98/55495). Tanto los agonistas de TLR9 como los anticuerpos anti-PD-1 son conocidos individualmente para tratar el cáncer: véanse los documentos US 2010/184834, WO 2012/135408 y WO 2008/156712.
- 35

- 40 Existe una necesidad en la técnica de mejorar la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer. Por lo tanto, es deseable explorar la terapia combinada de antagonistas de PD-1 y secuencias de oligonucleótidos inmunoestimuladores.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

- 50 Las referencias a procedimientos de tratamiento en el resumen y la descripción detallada de la invención en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una terapia combinada que comprende un antagonista de PD-1 y un agonista de TLR9, en el que el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C según las reivindicaciones.

5 En otra realización, la invención proporciona un medicamento que comprende un antagonista de PD-1 para su uso combinado con un agonista de TLR9 para tratar el cáncer, en el que el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C. En otra realización más, la invención proporciona un medicamento que comprende un agonista de TLR9 para su uso combinado con un antagonista de PD-1 para tratar el cáncer, en el que el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C según las reivindicaciones.

10 Otras realizaciones proporcionan el uso de un antagonista de PD-1 para tratar el cáncer en un individuo cuando se administra combinado con un agonista de TLR9, y el uso de un agonista de TLR9 para tratar el cáncer en un individuo cuando se administra combinado con un antagonista de PD-1. En tales realizaciones, el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C según las reivindicaciones.

15 En otra realización, la invención proporciona el uso de un antagonista de PD-1 y un agonista de TLR9 para tratar el cáncer en un individuo, en el que el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C según las reivindicaciones. En algunas realizaciones no reivindicadas, los medicamentos comprenden un kit, y el kit también comprende un prospecto que incluye instrucciones para usar el antagonista de PD-1 combinado con el agonista de TLR9 para tratar el cáncer en un individuo.

En otra realización, la terapia combinada de los procedimientos, medicamentos o kits mencionados anteriormente comprende además un anticuerpo anti-IL-10.

20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera y cadena pesada para un ejemplo de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 útil en la presente invención (SEQ ID NO:1-6).

La figura 2 muestra secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera y cadena pesada para otro ejemplo de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 útil en la presente invención (SEQ ID NO:7-12).

25 La figura 3 muestra secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y de la cadena pesada de longitud completa para un ejemplo de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 útil en la presente invención (SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO: 14).

La figura 4 muestra secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena ligera alternativas para un ejemplo de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 útil en la presente invención (SEQ ID NO: 15-17).

30 La figura 5 muestra secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras alternativas para un ejemplo de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 útil en la presente invención, y la figura 5A muestra las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras K09A-L-11 y K09A-L-16 (SEQ ID NO:18 y 19, respectivamente) y la figura 5B muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera K09A-L-17 (SEQ ID NO:20).

35 La figura 6 muestra secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de pembrolizumab (SEQ ID NO: 21 y 22, respectivamente).

La figura 7 muestra secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de nivolumab (SEQ ID NO: 23 y 24, respectivamente).

La figura 8 muestra secuencias de aminoácidos de anti-IL-10 hum 12G8, con la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 34.

40 La figura 9 muestra secuencias de aminoácidos de anti-IL-10 TC40.11D8, con la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 36.

45 La figura 10 muestra el crecimiento tumoral de los tumores inyectados en el modelo tumoral bilateral TC-1 de ratón. El panel A muestra el volumen de los tumores inyectados en cada animal y el número de regresiones completas (RC) por grupo. El panel B muestra la mediana del volumen de los tumores inyectados con una barra de error que indica un intervalo de confianza del 68 %. El panel C compara los volúmenes de los tumores inyectados entre los grupos de tratamiento por día. El panel D muestra los valores de p no ajustados y ajustados por multiplicidad para la comparación de los volúmenes de los tumores inyectados entre tratamientos. El valor de p no ajustado se refiere a los valores de p bilaterales basados en la versión de Peto y Peto de la estadística de prueba no paramétrica de Gehan-Breslow para datos censurados a la derecha. Los valores de p se estimaron a partir de 20 000 reasignaciones aleatorias de animales entre los dos tratamientos comparados. Los valores de p ajustados por multiplicidad se refieren a los valores de p ajustados para controlar la tasa de error familiar en todos los puntos temporales para un par de tratamientos

determinado. El ajuste se realizó aplicando el procedimiento maxT de Westfall y Young a las distribuciones de permutación.

La figura 11 muestra el crecimiento tumoral de los tumores no inyectados en el modelo tumoral bilateral TC-1 de ratón. El panel A muestra el volumen de los tumores no inyectados de cada animal y el número de regresiones completas (RC) por grupo. El panel B muestra la mediana del volumen de los tumores no inyectados con una barra de error que indica un intervalo de confianza del 68 %. El panel C compara los volúmenes de los tumores no inyectados entre los grupos de tratamiento por día. El panel D muestra los valores de p no ajustados y ajustados por multiplicidad para la comparación de los volúmenes de tumores no inyectados entre tratamientos. El valor de p no ajustado se refiere a los valores de p bilaterales basados en la versión de Peto y Peto de la estadística de prueba no paramétrica de Gehan-Breslow para datos censurados a la derecha. Los valores de p se estimaron a partir de 20 000 reasignaciones aleatorias de animales entre los dos tratamientos comparados. Los valores de p ajustados por multiplicidad se refieren a los valores de p ajustados para controlar la tasa de error familiar en todos los puntos temporales para un par de tratamientos determinado. El ajuste se realizó aplicando el procedimiento maxT de Westfall y Young a las distribuciones de permutación.

La figura 12 muestra la inducción de IFN α 2a e IL-10 en PBMC humanas (2 donantes) con tratamiento de C59-08 durante 24 horas.

La figura 13 muestra la inducción de la expresión de ARNm de genes inducibles por IFN α (panel A), citocinas (panel B) y marcadores de activación inmunitaria (panel C) en un histocultivo de carcinoma de células renales humanas después del tratamiento con C59-08 durante 24 horas.

La figura 14A muestra la distribución del tamaño de los nódulos tumorales en ratones inyectados con células de carcinoma de colon CT-26. La figura 14B muestra el número de leucocitos infiltrantes del tumor (ILL) por gramo de tejido tumoral. La significación se calculó mediante una prueba no apareada con el programa Prism GraphPad. La figura 14C muestra los niveles de expresión génica de diversos marcadores de infiltración y activación de linfocitos T, mientras que la figura 14D muestra los niveles de expresión génica de diversos marcadores sensibles al interferón (IFN) de tipo I en tejido tumoral, frente al tamaño del tumor.

La figura 15A muestra el tamaño medio del tumor, la figura 15B muestra el porcentaje de supervivencia, y la figura 15C muestra el porcentaje de supervivencia de diferentes grupos de ratones tratados y no tratados, que fueron inyectados con células de carcinoma de colon CT-26.

La figura 16 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones inyectados con células de carcinoma de colon CT-26, que recibieron Ab anti-PD-1 sistémicamente y C59-08 intratumoralmente, en presencia o ausencia de linfocitos CD4 o CD8, o que no se trataron.

La figura 17 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones inyectados bilateralmente con células de carcinoma de colon CT-26, que recibieron Ab anti-PD-1 sistémicamente y C59-08 intratumoralmente o que no se trataron.

La figura 18A muestra el volumen tumoral de ratones inyectados con células de carcinoma de colon CT-26, que recibieron diversos tratamientos, en relación con el volumen tumoral medio de ratones tratados con oligonucleótidos de control. La figura 18 B muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ entre los leucocitos CD45+ infiltrantes del tumor, y el número total de linfocitos T CD8+ por gramo de tejido tumoral. Las figuras 18C y 18D muestran los niveles de producción de TNF- α e IFN- γ por 150 000 leucocitos infiltrantes del tumor, medidos por tinción intracelular y citometría de flujo acotada para linfocitos T CD8+, tras ser estimulados durante 3 horas con PMA e ionomicina en presencia de BFA (barras de rayado más separado) o BFA solo (barras de rayado denso). Para la figura 18C, los números marcados en el eje Y son 10^3 , 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 de abajo a arriba, respectivamente, y los números marcados en el eje X son 10^3 , 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 de izquierda a derecha, respectivamente.

La figura 19A muestra la curva de crecimiento tumoral de ratones inyectados con células de carcinoma de colon CT-26, que recibieron C59-08 intratumoralmente, o un oligonucleótido de control intratumoralmente. La figura 19B muestra los niveles de expresión de diversos genes que responden al interferón de tipo I en leucocitos infiltrantes del tumor de ratones tratados con C59-08 o con un oligonucleótido de control. Los datos se representan como ciclo umbral relativo (CT) del gen de interés en relación con el gen de mantenimiento, ubiquitina.

Descripción detallada

Abreviaturas. A lo largo de la descripción detallada y los ejemplos de la invención se utilizarán las siguientes abreviaturas:

- MRG: Mejor respuesta global
- BID: Una dosis dos veces al día
- TBC: Tasa de beneficio clínico
- CDR: Región determinante de la complementariedad
- 5 CHO: Ovario de hámster chino
- RC: Respuesta completa
- TCE: Tasa de control de la enfermedad
- SSE: Supervivencia sin enfermedad
- TLD: Toxicidad limitante de la dosis
- 10 DR: Duración de la respuesta
- TEED: Tasa de enfermedad estable duradera
- FFPE: Fijados con formol, incluidos en parafina
- FR: Región marco
- IgG: Inmunoglobulina G
- 15 IHC: Inmunohistoquímica o inmunohistoquímico
- irRC: Criterios de respuesta inmunitaria
- IV: Por vía intravenosa
- DMT: Dosis máxima tolerada
- NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica
- 20 NCI: Instituto Nacional del Cáncer
- TRO: Tasa de respuesta objetiva
- SG: Supervivencia global
- EP: Enfermedad progresiva
- PD-1: Muerte programada 1
- 25 PD-L1: Ligando 1 de muerte celular programada 1
- PD-L2: Ligando 2 de muerte celular programada 1
- SSP: Supervivencia sin progresión
- RP: Respuesta parcial
- Q2W: Una dosis cada dos semanas
- 30 Q3W: Una dosis cada tres semanas
- QD: Una dosis al día
- RECIST: Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos
- EE: Enfermedad estable
- VH: Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
- 35 VK: Región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina
1. Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen específicamente algunos términos y expresiones técnicos y científicos. A menos que se definan específicamente en otra parte del presente documento, todos los demás términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado que entiende habitualmente una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Tal como se utilizan en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras como "un/una" y "el/la" incluyen sus correspondientes referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 10 "Administración", tal como se aplica a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o líquido biológico, se refiere al contacto de un agente o composición farmacéutica, terapéutica o de diagnóstico exógena con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o líquido biológico. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un líquido, cuando el líquido está en contacto con la célula. El término "sujeto" incluye cualquier organismo, preferentemente un animal, más preferentemente un mamífero (por ejemplo, rata, ratón, perro, gato, conejo) y más preferentemente un ser humano.

- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que presente la actividad biológica o de unión deseada. Por lo tanto, se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente, aunque sin limitarse a ellos, los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos), los anticuerpos humanizados, los anticuerpos totalmente humanos, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos de dominio único camelizados. "Anticuerpos originarios" son anticuerpos obtenidos por exposición de un sistema inmunitario a un antígeno antes de la modificación de los anticuerpos para un uso previsto, tal como la humanización de un anticuerpo para su uso como sustancia terapéutica humana.

- 25 En general, la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par con una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de entre aproximadamente 100 y 110 aminoácidos o más, responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de la cadena pesada puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas suelen clasificarse como mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, en general, *Fundamental Immunology*, cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed., Raven Press, N.Y. (1989)).

- 35 Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Así, en general, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son, en general, los mismos.

- 40 Normalmente, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad ("complementarity determining regions", CDR), que están situadas dentro de regiones marco ("framework regions", FR) relativamente conservadas. Las CDR suelen estar alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. En general, de N-terminal a C-terminal, los dominios variables de las cadenas ligera y pesada comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se ajusta, en general, a las definiciones de *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Kabat, *et al.*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 5ª ed.; NIH Publ. n.º 91-3242 (1991); Kabat (1978), *Adv. Prot. Chem.*, 32:1-75; Kabat, *et al.* (1977), *J. Biol. Chem.*, 252:6609-6616; Chothia, *et al.* (1987), *J. Mol. Biol.*, 196:901-917; o Chothia, *et al.* (1989), *Nature*, 342:878-883.

- 45 Tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión al antígeno" se refiere a fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, es decir, fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que conservan una o más regiones CDR. Algunos ejemplos de fragmentos de unión a anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario, por ejemplo, sc-Fv; nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

- 55 Un anticuerpo que se "une específicamente a" una proteína diana específica es un anticuerpo que muestra una unión preferente a esa diana en comparación con otras proteínas, pero esta especificidad no requiere una especificidad de unión absoluta. Un anticuerpo se considera "específico" para su diana prevista si su unión es determinante de la presencia de la proteína diana en una muestra, por ejemplo, sin producir resultados no deseados, tales como falsos positivos. Los anticuerpos, o fragmentos de unión de los mismos, útiles en la presente invención se unirán a la proteína diana con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor, y lo más preferentemente al menos 100 veces mayor que la afinidad con proteínas que no son la diana. Tal como se utiliza en el presente documento, se dice que un anticuerpo se une

específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos determinada, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una molécula de PD-1 humana madura o de PD-L1 humana, si se une a polipéptidos que comprenden esa secuencia, pero no se une a proteínas que carecen de esa secuencia.

Por "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie concreta (por ejemplo, ser humano) o que pertenece a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de un anticuerpo derivado de otra especie (por ejemplo, ratón), humana) o que pertenece a otra clase o subclase, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Un "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidratos murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. Del mismo modo, un "anticuerpo de ratón" o un "anticuerpo de rata" se refieren a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de inmunoglobulina de ratón o de rata, respectivamente.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), así como de anticuerpos humanos. Estos anticuerpos contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. El prefijo "hum", "hu" o "h" se añade a las denominaciones de clones de anticuerpos cuando es necesario para distinguir los anticuerpos humanizados de los anticuerpos originarios de roedores. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores comprenderán generalmente las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos originarios de roedores, aunque pueden incluirse determinadas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado o por otras razones.

Una "respuesta antitumoral", cuando se refiere a un paciente con cáncer tratado con un régimen terapéutico, tal como una terapia combinada descrita en el presente documento, significa al menos un efecto terapéutico positivo, tal como por ejemplo, la reducción del número de células cancerosas, la reducción del tamaño del tumor, la reducción de la tasa de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, la reducción de la tasa de metástasis o crecimiento tumoral, o la supervivencia sin progresión. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer pueden medirse de varias maneras (véase, W. A. Weber, J. Null. Med., 50:1S-10S (2009); Eisenhauer *et al.*, *supra*). En algunas realizaciones, una respuesta antitumoral a una terapia combinada descrita en el presente documento se evalúa utilizando los criterios RECIST 1.1, irRC bidimensional o irRC unidimensional. En algunas realizaciones, una respuesta antitumoral es cualquiera de EE, RP, RC, SSP o SSE.

Por "irRC bidimensional" se entiende el conjunto de criterios descritos en Wolchok J.D., *et al.*, Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria, Clin. Cancer Res., 2009, 15(23):7412-7420. Estos criterios utilizan mediciones tumorales bidimensionales de las lesiones diana, que se obtienen multiplicando el diámetro más largo y el diámetro perpendicular más largo (cm²) de cada lesión.

Por "agente bioterapéutico" se entiende una molécula biológica, tal como un anticuerpo o una proteína de fusión, que bloquea la transducción de señales de ligando/receptor en cualquier vía biológica que favorezca el mantenimiento y/o el crecimiento tumoral o suprima la respuesta inmunitaria antitumoral. Las clases de agentes bioterapéuticos incluyen, entre otros, anticuerpos contra VEGF, EGFR, Her2/neu, otros receptores de factores de crecimiento, CD20, CD40, CD-40L, CTLA-4, OX-40, 4-1BB e ICOS.

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se suele caracterizar por un crecimiento celular no regulado. Algunos ejemplos de cáncer son, entre otros: Cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; Pulmón: carcinoma broncogénico (células escamosas, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; Gastrointestinal: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma), colorrectal; Tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); Hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticuladas),

mieloma múltiple, cordoma tumoral maligno de células gigantes, osteocronfronoma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; Sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma medular, meningioma, glioma, sarcoma); Ginecológicos: útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma de cuello uterino, displasia de cuello uterino pretumoral), ovarios (carcinoma ovárico [cistoadenocarcinoma seroso, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células de la granulosa de la teca, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rabortomiosarcoma embrionario), trompas de Falopio (carcinoma), mama; Hematológicos: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano [linfoma maligno]; Piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares de nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y Glándulas suprarrenales: neuroblastoma. En otra realización, el cáncer es carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Otros ejemplos más concretos de tales cánceres incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiple, cáncer gastrointestinal (tracto), cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer cerebral, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello. Otro ejemplo concreto de cáncer es el carcinoma de células renales. Otro ejemplo concreto de cáncer es el linfoma no hodgkiniano o linfoma cutáneo de linfocitos T. Otro ejemplo concreto de cáncer es la leucemia mieloide aguda (LMA) o síndrome mielodisplásico. Los cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos caracterizados por una expresión elevada de uno o ambos PD-L1 y PD-L2 en muestras de tejido analizadas.

Los "ON CpG-C" u "oligonucleótidos de tipo CpG-C" son oligonucleótidos de 12 a 100 bases de longitud, que tienen uno o más trinucleótidos 5'-TCG, en los que el 5'-T está situado a 0, 1, 2 o 3 bases del extremo 5' del oligonucleótido, y al menos una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud que comprende uno o más dinucleótidos CG no metilados. Sólo los oligonucleótidos según las reivindicaciones forman parte de la invención. La secuencia de dichos uno o más trinucleótidos 5'-TCG puede estar separada del extremo 5' de la secuencia palindrómica por 0, 1 o 2 bases o la secuencia palindrómica puede contener toda o parte de la secuencia de uno o más trinucleótidos 5'-TCG. En una realización, el oligonucleótido es un oligodesoxinucleótido (ODN). En una realización, el oligonucleótido es un 2'-oligodesoxinucleótido. Los ODN CpG-C tienen la capacidad de estimular los linfocitos B, inducir la maduración de las células dendríticas plasmocitoides ("plasmacytoid dendritic cell", PDC) y provocar la secreción de altos niveles de interferones de tipo I (por ejemplo, IFN- α , IFN- γ , etc.). En algunas realizaciones, los ODN CpG-C tienen de 12 a 100 bases de longitud, preferentemente de 12 a 50 bases de longitud, preferentemente de 12 a 40 bases de longitud, o preferentemente de 12 a 30 bases de longitud. En algunas realizaciones, el ODN tiene al menos (límite inferior) 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 bases de longitud. En algunas realizaciones, el ODN tiene como máximo (límite superior) 100, 90, 80, 70, 60, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 o 30 bases de longitud. En algunas realizaciones, dicha al menos una secuencia palindrómica tiene de 8 a 97 bases de longitud, preferentemente de 8 a 50 bases de longitud, o preferentemente de 8 a 32 bases de longitud. En algunas realizaciones, dicha al menos una secuencia palindrómica tiene al menos (límite inferior) 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 bases de longitud. En algunas realizaciones, dicha al menos una secuencia palindrómica tiene como máximo (límite superior) 50, 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12 o 10 bases de longitud. En una realización, el oligonucleótido es un oligodesoxinucleótido. En una realización, uno o más de los enlaces internucleotídicos del ODN CpG-C son enlaces modificados. En una realización, uno o más de los enlaces internucleotídicos de ODN CpG-C son enlaces fosforotioato (PS). En una realización, todos los enlaces internucleotídicos de ODN CpG-C son enlaces fosforotioato (PS). Un esqueleto de fosforotioato se refiere a que todos los enlaces internucleotídicos de ODN CpG-C son enlaces de fosforotioato (PS).

Los ODN de tipo CpG-C y SEQ ID NO: 38-51 analizados en el presente documento están en su forma de sal farmacéuticamente aceptable a menos que se indique lo contrario. Algunos ejemplos de sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como las sales de sodio, litio y potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como las sales de calcio y magnesio, sales de cinc, sales con bases orgánicas (por ejemplo, aminas orgánicas), tales como N-Me-D-glucamina, cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, colina, trometamina, diciclohexilaminas, t-butilaminas, y sales con aminoácidos, tales como arginina, lisina y similares. En una realización, los ODN de tipo CpG-C están en forma de sal de amonio, sodio, litio o potasio. En una realización preferida, los ODN de tipo CpG-C están en forma de sal de sodio. El ODN CpG-C puede suministrarse en una solución farmacéutica que comprenda un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, el ODN CpG-C puede proporcionarse en forma de un sólido liofilizado, que posteriormente se reconstituye en agua estéril, solución salina o un tampón farmacéuticamente aceptable antes de su administración.

- Los excipientes farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, disolventes, agentes de carga, agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad y conservantes (véase, por ejemplo, Pramanick *et al.*, Pharma Times, 45:65-77, 2013). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un excipiente que actúe como uno o más de los siguientes: un disolvente, un agente de carga, un agente tamponante y un agente de ajuste de la tonicidad (por ejemplo, el cloruro de sodio en solución salina puede actuar como vehículo acuoso y como agente de ajuste de la tonicidad). Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuadas para la administración parenteral.
- En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un vehículo acuoso, tal como un disolvente. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y solución de Ringer. En algunas realizaciones, la composición es isotónica.
- Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un agente de carga. Los agentes de carga son especialmente útiles cuando la composición farmacéutica debe liofilizarse antes de su administración. En algunas realizaciones, el agente de carga es un protector que ayuda a estabilizar y prevenir 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 tamponante. Los agentes tamponantes controlan el pH para inhibir la degradación del agente activo durante el procesado, el almacenamiento y, opcionalmente, la reconstitución. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, sales acetato, citrato, fosfato o sulfato. Otros tampones adecuados son, por ejemplo, aminoácidos, tales como la arginina, la glicina, la histidina y la lisina. El agente tamponante puede comprender además ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. En algunas realizaciones, el agente tamponante mantiene el pH de la composición dentro de un intervalo de 4 a 9. En algunas realizaciones, el pH es superior (límite inferior) a 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, el pH es inferior (límite superior) a 9, 8, 7, 6 o 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. Entre los agentes adecuados para ajustar la tonicidad se encuentran, por ejemplo, la dextrosa, el glicerol, el cloruro de sodio, la glicerina y el manitol.
- Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un conservante. Los conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, antioxidantes y agentes antimicrobianos. Sin embargo, en las realizaciones preferidas, la composición farmacéutica se prepara en condiciones estériles y se presenta en un envase de un solo uso, por lo que no es necesario incluir un conservante.
- La expresión "secuencia palindrómica" o el término "palíndromo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es una repetición invertida, por ejemplo, ABCDD'C'B'A', en la que 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 formar estructuras bicatenarias o formar estructuras de bucle en horquilla en determinadas condiciones. Por ejemplo, tal como se utiliza en el presente documento, "un palíndromo de 8 bases" se refiere a una secuencia de ácido nucleico en la que la secuencia palindrómica tiene 8 bases de longitud, tal como ABCDD'C'B'A'. Una secuencia palindrómica puede formar parte de un oligonucleótido que también contenga secuencias no palindrómicas. Un oligonucleótido puede contener una o más porciones de secuencia palindrómica y una o más porciones de secuencia no palindrómica. Como alternativa, una secuencia de oligonucleótidos puede ser totalmente palindrómica. En un oligonucleótido con más de una porción de secuencia palindrómica, las porciones de secuencia palindrómica pueden o no solaparse entre sí.
- Sólo los oligonucleótidos según las reivindicaciones forman parte de la invención; todos los oligonucleótidos se presentan como parte de la divulgación de la presente descripción. En una realización, los ODN CpG-C de la presente divulgación comprenden:
- (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_zN_v$ (SEQ ID NO:38), en la que N son nucleósidos, $x = 0, 1, 2$ o 3 , $y = 1, 2, 3$ o 4 , $w = 0, 1$ o 2 , $p = 0$ o 1 , $q = 0, 1$ o 2 , $v = 0$ a 89 y $z = 1$ a 20 , X_1 y X_1' son nucleósidos autocomplementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos autocomplementarios, y en el que la 5'-T de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases del extremo 5' del oligonucleótido; y
- (b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud, en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ (SEQ ID NO:55) de las secuencias $(X)X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 56), en el que el ODN tiene de 12 a 100 bases de longitud. En algunas realizaciones, $x = 0$, $y = 1$, $w = 0$, $p = 0$ o 1 , $q = 0, 1$ o 2 , $v = 0$ a 20 y $z = 1, 2, 3$ o 4 . En algunas realizaciones, X_1 y X_2 son cada uno A o T. En algunas realizaciones, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases de más de un tercio de A y T. En algunas realizaciones, el ODN CpG-C comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:38-51.
- En algunas realizaciones, los ODN CpG-C de la presente divulgación consisten en $TCGN_q(X_1X_2CGX_2'X_1'CG)_zN_v$ (SEQ ID NO:39), en la que N son nucleósidos, $q = 0, 1, 2, 3, 4, 5$, $v = 0$ a 20 , $z = 1$ a 4 , X_1 y X_1' son nucleósidos autocomplementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos autocomplementarios, y en el que el ODN tiene al menos 12 bases de

longitud. En algunas realizaciones, el ODN CpG-C consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:38-51.

En algunas realizaciones, los ODN CpG-C de la presente divulgación consisten en 5'-TCGN_qTTTGAACGTTTGAACGTTN_s-3' (SEQ ID NO:40), en la que N son nucleósidos, q = 0, 1, 2, 3, 4, o 5, s = 0 a 20, y en el que el ODN tiene al menos 12 bases de longitud. En una realización, s = 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones que no forman parte de las reivindicaciones a menos que se indique, el ODN CpG-C consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en 5'-TCGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO: 42) q = 0 y s = 4, 5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTT-3' (SEQ ID NO: 43) q = 4 y s = 0, 5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO: 45) q = 4 y s = 5 (que se reivindica), 5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAACGTTA-3' (SEQ ID NO: 46) q = 5 y s = 1, y 5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAACGTT-3' (SEQ ID NO: 47) q = 5 y s = 0.

En una realización reivindicada, el agonista de TLR9 es un ODN CpG-C que consiste en la secuencia 5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:45). En otra realización, el ODN CpG-C es la sal de sodio de 5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:45). Las siguientes realizaciones no forman parte de la invención reivindicada. En otra realización, el oligonucleótido de tipo CpG-C tiene una secuencia que consiste en 5'-TCGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:42). En otra realización, el oligonucleótido de tipo CpG-C es una sal de sodio de 5'-TCGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:42).

En otra realización, el oligonucleótido de tipo CpG-C agonista de TLR9 se selecciona del grupo que consiste en:

5'-TCGTCTGAACGTTTGAAGATGAT-3' (SEQ ID NO: 41);

5'-TCGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:42);

5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTT-3' (SEQ ID NO:43);

5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAATTTT-3' (SEQ ID NO:44);

5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:45);

5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAACGTTA-3' (SEQ ID NO:46);

5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAACGTT-3' (SEQ ID NO:47);

5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAACGT-3' (SEQ ID NO:48);

5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAACG-3' (SEQ ID NO:49);

5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAAC-3' (SEQ ID NO:50); y

5'-TCGTAACGTTTGAACGTTTGAAT-3' (SEQ ID NO:51).

Tabla 1: Motivo y secuencias de los oligonucleótidos de tipo CpG-C

Compuesto n.º	SEQ ID NO:	Secuencia
C59-01	38	5'-N _x (TCG(N _q)) _y N _w (X ₁ X ₂ CGX ₂ 'X ₁ '(CG) _p) _z N _v -3'
C59-02	39	5'-TCGN _q (X ₁ X ₂ CGX ₂ 'X ₁ 'CG) _z N _v -3'
C59-03	40	5'-TCGN _q TTTGAACGTTTGAACGTTN _s -3'
C59-04	41	5'-TCGTCTGAACGTTTGAAGATGAT-3'
C59-05	42	5'-TCGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3'
C59-06	43	5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTT-3'
C59-07	44	5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAATTTT-3'
C59-08	45	5'-TCGAACGTTTGAACGTTTGAACGTTTGAAT-3'

Compuesto n.º	SEQ ID NO:	Secuencia
C59-09	46	5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGAACGTTA-3'
C59-10	47	5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGAACGTT-3'
C59-11	48	5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGAACGT-3'
C59-12	49	5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGAACG-3'
C59-13	50	5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGAAC-3'
C59-14	51	5'-TCGTAACGTTCTGAACGTTCTGAA-3'

Se entiende que, con respecto a las fórmulas o motivos de secuencia descritos en el presente documento, todos y cada uno de los parámetros se seleccionan independientemente. Por ejemplo, si $x = 0-2$, entonces y puede seleccionarse independientemente del valor de x (o de cualquier otro parámetro seleccionable en una fórmula), siempre que se cumpla la limitación de longitud total del oligonucleótido.

Otros oligonucleótidos CpG-C que tienen secuencias incluidas en los motivos de la presente divulgación son adecuados para su uso en los procedimientos y medicamentos divulgados en el presente documento. Una pluralidad de oligonucleótidos CpG-C adicionales que tienen secuencias incluidas en los motivos de la presente divulgación se describen en las patentes de EE. UU. n.ºs 7 745 606, 8 158 768 y 8 871 732 de Dynavax Technologies Corporation.

Los oligonucleótidos CpG se han descrito en la técnica y su actividad puede determinarse fácilmente mediante ensayos convencionales, que miden diversos aspectos de las respuestas inmunitarias (por ejemplo, secreción de citocinas, producción de anticuerpos, activación de células NK, proliferación de linfocitos B, proliferación de linfocitos T, etc.). Se describen ejemplos de procedimientos en los documentos WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275, WO 98/55495 y WO 00/61151 así como en las patentes de EE. UU. n.ºs 7 745 606, 8 158 768 y 8 871 732 de Dynavax Technologies Corporation. Por consiguiente, estos y otros procedimientos pueden utilizarse para detectar y cuantificar la actividad inmunomoduladora de los oligonucleótidos CpG.

Los oligonucleótidos CpG-C pueden contener modificaciones. Las modificaciones adecuadas incluyen, entre otras, modificaciones del grupo 3'OH o 5'OH, modificaciones de la base nucleotídica, modificaciones del componente de azúcar y modificaciones del grupo fosfato. Las bases modificadas pueden incluirse en la secuencia palindrómica siempre que la base o bases modificadas mantengan la misma especificidad por su complemento natural a través del apareamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, la porción palindrómica del oligonucleótido CpG-C sigue siendo autocomplementaria).

Los oligonucleótidos CpG-C pueden ser lineales, circulares o incluir porciones circulares y/o un bucle en horquilla. Los oligonucleótidos CpG-C pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los oligonucleótidos CpG-C pueden ser ADN, ARN o un híbrido de ADN/ARN.

Los oligonucleótidos CpG-C pueden contener bases naturales o modificadas no naturales, y pueden contener azúcar, fosfato y/o terminales modificados. Por ejemplo, además de los enlaces fosfodiéster, las modificaciones de fosfato incluyen, entre otras, metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato (en puente o no), fosfotriéster y fosforoditioato y pueden utilizarse en cualquier combinación. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos CpG-C tienen sólo enlaces fosforotioato, sólo enlaces fosfodiéster, o una combinación de enlaces fosfodiéster y fosforotioato.

También pueden realizarse y combinarse con cualquier modificación de fosfato las modificaciones de azúcar conocidas en el campo, tales como análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN y otras descritas en el presente documento. Algunos ejemplos de modificaciones de bases incluyen, entre otras, la adición de un resto que retira electrones a C-5 y/o C-6 de una citosina del oligonucleótido CpG-C (por ejemplo, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-yodocitosina) y C-5 y/o C-6 de un uracilo del oligonucleótido CpG-C (por ejemplo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-yodouracilo). Como se ha señalado anteriormente, el uso de una modificación de base en una secuencia palindrómica de un oligonucleótido CpG-C no debe interferir con la autocomplementariedad de las bases implicadas para el apareamiento de bases de Watson-Crick. Sin embargo, fuera de una secuencia palindrómica, pueden utilizarse bases modificadas sin esta restricción. Por ejemplo, la 2'-O-metil-uridina y la 2'-O-metil-citidina pueden utilizarse fuera de la secuencia palindrómica, mientras que la 5-bromo-2'-desoxicitidina puede utilizarse tanto dentro como fuera de la secuencia palindrómica. Otros nucleótidos modificados, que pueden emplearse tanto dentro como fuera de la secuencia palindrómica, incluyen 7-desaza-8-aza-dG, 2-amino-dA y 2-tio-dT.

- Las formas dúplex (es decir, bicatenarias) y de horquilla de la mayoría de los oligonucleótidos están en equilibrio dinámico, con la forma de horquilla generalmente favorecida a baja concentración de oligonucleótidos y temperaturas más altas. Los enlaces cruzados covalentes intercatenarios o intracatenarios aumentan la estabilidad del dúplex o de la horquilla, respectivamente, frente a los cambios conformacionales inducidos por el calor, la fuerza iónica, el pH y la concentración. Los enlaces cruzados químicos pueden utilizarse para fijar el polinucleótido en forma de dúplex o de horquilla para su caracterización fisicoquímica y biológica. Los oligonucleótidos con enlaces cruzados que son conformacionalmente homogéneos y están "bloqueados" en su forma más activa (dúplex u horquilla) podrían ser potencialmente más activos que sus homólogos sin enlaces cruzados. En consecuencia, algunos oligonucleótidos CpG-C de la presente divulgación contienen enlaces cruzados covalentes intercatenarios y/o intracatenarios.
- Se conocen en la técnica diversas formas de la formación de enlaces cruzados en el ADN dúplex por medios químicos. Puede utilizarse cualquier procedimiento de formación de enlaces cruzados siempre que el producto polinucleotídico con enlaces cruzados posea la actividad inmunomoduladora deseada. Un procedimiento, por ejemplo, da lugar a un puente disulfuro entre dos timidinas opuestas en el extremo del dúplex u horquilla. Para este procedimiento de formación de enlaces cruzados, el oligonucleótido u oligonucleótidos de interés se sintetizan con una 5'-DMT-N3-(tBu-SS-etil)timidina-3'-fosforamida ("T*"). Para formar el puente disulfuro, se reducen los enlaces disulfuro mixtos, se purifica el oligonucleótido, se hibridan las cadenas y se oxida al aire el compuesto para formar el enlace cruzado intracatenario en el caso de una forma de horquilla o el enlace cruzado intercatenario en el caso de una forma dúplex. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden hibridarse primero y luego reducirse, purificarse y oxidarse al aire. Tales procedimientos y otros se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Glick *et al.*, J. Org. Chem., 56:6746-6747, 1991; Glick *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 114:5447-5448, 1992; Goodwin *et al.*, Tetrahedron Letters, 35:1647-1650, 1994; Wang *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 117:2981-2991, 1995; Osborne *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 6:2339-2342, 1996; y Osborne *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 118:11993-12003, 1996).
- Otro procedimiento de formación de enlaces cruzados forma un puente disulfuro entre residuos desplazados en la estructura dúplex u horquilla. Para este procedimiento de formación de enlaces cruzados, el oligonucleótido u oligonucleótidos de interés se sintetizan con nucleósidos convertibles (disponibles en el mercado, por ejemplo, en Glen Research). Este procedimiento utiliza, por ejemplo, un puente disulfuro A-A o disulfuro C-A y también son posibles enlaces a través de otras bases. Para formar el polinucleótido modificado con disulfuro, el polinucleótido que contiene el nucleósido convertible se hace reaccionar con cistamina (u otra amina que contenga disulfuro). Para formar el puente disulfuro, se reducen los enlaces disulfuro mixtos, se purifica el oligonucleótido, se hibridan las cadenas y se oxida al aire el compuesto para formar el enlace cruzado intracatenario en el caso de una forma de horquilla o el enlace cruzado intercatenario en el caso de una forma dúplex. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden hibridarse primero y luego reducirse, purificarse y oxidarse al aire. Tales procedimientos se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Ferentz *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 113:4000-4002, 1991; y Ferentz *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 115:9006-9014, 1993).
- Las técnicas para fabricar polinucleótidos y polinucleótidos modificados son conocidas en la técnica. El ADN o ARN natural, que contiene enlaces fosfodiéster, se sintetiza generalmente acoplando secuencialmente el nucleósido de fosforamida adecuado al grupo 5'-hidroxil del oligonucleótido en crecimiento unido a un soporte sólido en el extremo 3', seguido de la oxidación del triéster fosfito intermedio a un triéster fosfato. Una vez sintetizada la secuencia polinucleotídica deseada, el polinucleótido se retira del soporte, los grupos triéster fosfato se desprotegen a diésteres fosfato y las bases nucleosídicas se desprotegen utilizando amoníaco acuoso u otras bases (véase, por ejemplo, Beaucage, "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" en Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties (Agrawal, ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 1993; Warner *et al.*, DNA, 3:401, 1984; y patente de EE. UU. n.º 4 458 066).
- El oligonucleótido CpG-C puede contener oligonucleótidos modificados con fosfato, algunos de los cuales se sabe que estabilizan el oligonucleótido. En consecuencia, algunas realizaciones incluyen oligonucleótidos CpG-C estabilizados. La síntesis de oligonucleótidos que contienen enlaces fosfato modificados o enlaces que no son fosfato también es conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Matteucci, "Oligonucleotide Analogs: an Overview" en Oligonucleotides as Therapeutic Agents (D.J. Chadwick y G. Cardew, ed.), John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1997). El derivado fosforoso (o grupo fosfato modificado), que puede unirse al resto de azúcar o análogo de azúcar en el oligonucleótido, puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato o similar. La preparación de los análogos de fosfato mencionados anteriormente y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, *per se*, ya ha sido bien descrita (véase, por ejemplo, Peyrottes *et al.*, Nucleic Acids Res., 24:1841-1848, 1996; Chaturvedi *et al.*, Nucleic Acids Res., 24:2318-2323, 1996; y Schultz *et al.*, Nucleic Acids Res., 24:2966-2973, 1996). Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato es similar a la descrita anteriormente para los oligonucleótidos naturales, salvo que la etapa de oxidación se sustituye por una etapa de sulfurización (Zon, "Oligonucleoside Phosphorothioates" en Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties (Agrawal, ed.) Humana Press, págs. 165-190, 1993).
- Los oligonucleótidos CpG-C pueden comprender uno o más ribonucleótidos (que contienen ribosa como único o principal componente de azúcar), desoxirribonucleótidos (que contienen desoxirribosa como principal componente de azúcar), azúcares modificados o análogos de azúcar. Así, además de ribosa y desoxirribosa, el resto de azúcar puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa y un grupo ciclopentilo análogo

- al azúcar. El azúcar puede estar en forma de piranosilo o furanosilo. En el oligonucleótido CpG-C, el resto de azúcar es preferentemente el furanosido de ribosa, desoxirribosa, arabinosa o 2'-O-alkilribosa, y el azúcar puede unirse a las bases heterocíclicas respectivas en configuración anomérica. Las modificaciones del azúcar incluyen, entre otras, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN. Por ejemplo, una modificación de azúcar en el oligonucleótido CpG-C incluye, entre otras, 2'-O-metil-uridina y 2'-O-metil-citidina. La preparación de estos azúcares o análogos de azúcar y de los respectivos nucleósidos en los que dichos azúcares o análogos están unidos a una base heterocíclica (base de ácido nucleico) es conocida *per se* y, por lo tanto, no es necesario describirla en el presente documento. También pueden realizarse modificaciones de azúcar y combinarse con cualquier modificación de fosfato en la preparación de un oligonucleótido CpG-C.
- 10 Las bases heterocíclicas, o bases de ácido nucleico, que se incorporan en el oligonucleótido CpG-C pueden ser las principales bases naturales de purina y pirimidina (a saber, uracilo, timina, citosina, adenina y guanina, como se ha mencionado anteriormente), así como modificaciones naturales y sintéticas de dichas bases principales. Así, un oligonucleótido CpG-C puede incluir uno o más de inosina, 2'-desoxiuridina y 2-amino-2'-desoxiadenosina.
- "TBC" o "tasa de beneficio clínico" significa RC + RP + EE duradera.
- 15 "CDR", tal como se utiliza en el presente documento, significa una o más regiones determinantes de la complementariedad en una región variable de inmunoglobulina, definidas utilizando el sistema de numeración de Kabat, a menos que se indique lo contrario.
- Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otras: agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de cinasas, alcaloides de plantas tóxicas que afectan al huso mitótico, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, fotosensibilizadores, antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE), antiprogesteronas, reguladores a la baja de los receptores de estrógenos ("estrogen receptor down-regulators", ERD), antagonistas de los receptores de estrógenos, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante, antiandrógenos, inhibidores de la aromataasa, inhibidores del EGFR, inhibidores del VEGF y oligonucleótidos antisentido que inhiben la expresión de genes implicados en la proliferación celular anómala o el crecimiento tumoral. Los agentes quimioterapéuticos útiles en los procedimientos de tratamiento de la presente invención incluyen agentes citostáticos y/o citotóxicos.
- 20 "Chothia", tal como se utiliza en el presente documento, significa un sistema de numeración de anticuerpos descrito en Al-Lazikani *et al.*, JMB, 273:927-948 (1997).
- 25 "Comprende" o variaciones tales como "que comprende" o "comprendiendo" se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero no para excluir la presencia o adición de otras características que puedan mejorar materialmente el funcionamiento o la utilidad de cualquiera de las realizaciones de la invención, a menos que el contexto requiera lo contrario debido al lenguaje expreso o a una implicación necesaria.
- 30 "Variantes modificadas de modo conservador" o "sustitución conservadora" se refiere a sustituciones de aminoácidos en una proteína por otros aminoácidos que tienen características similares (por ejemplo, carga, tamaño de la cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofiliidad, conformación y rigidez del esqueleto, etc.), de tal manera que los cambios pueden realizarse con frecuencia sin alterar la actividad biológica u otra propiedad deseada de la proteína, tal como la afinidad y/o especificidad del antígeno. Los expertos en la materia reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no cruciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson *et al.* (1987), Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 (4ª ed.)). Además, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos estructural o funcionalmente similares alteren la actividad biológica. En la tabla 2 se presentan ejemplos de sustituciones conservadoras.
- 35
- 40

Tabla 2. Ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos

Residuo original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Gly, Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln, His
Asp (D)	Glu, Asn
Cys (C)	Ser, Ala

Residuo original	Sustitución conservadora
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

"Consiste fundamentalmente en" y variaciones tales como "consiste fundamentalmente de" o "que consiste fundamentalmente en", tal como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos mencionados, y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos mencionados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas de la pauta posológica, el procedimiento o la composición especificados. Como ejemplo no limitante, un antagonista de PD-1 que consiste fundamentalmente en una secuencia de aminoácidos indicada también puede incluir uno o más aminoácidos, incluidas sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos, que no afectan materialmente a las propiedades del compuesto de unión.

"TCE" o "tasa de control de la enfermedad" significa RC + RP + EE.

Un "anticuerpo monoclonal anti-PD-L de diagnóstico" significa un mAb que se une específicamente a la forma madura del PD-L indicado (PD-L1 o PDL2) que se expresa en la superficie de determinadas células de mamífero. Un PD-L maduro carece de la secuencia líder presecretora, también denominada péptido líder. El término "PD-L" y la expresión "PD-L maduro" se utilizan indistintamente en el presente documento, y se entenderá que se refieren a la misma molécula a menos que se indique lo contrario o resulte evidente por el contexto.

Tal como se utiliza en el presente documento, un mAb anti-PD-L1 humano de diagnóstico o un mAb anti-PD-L1 se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PD-L1 humano maduro. Una molécula de PD-L1 humano maduro consta de los aminoácidos 19-290 de la siguiente secuencia:

MRIFAVFIEMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYMEMEDKNI I
 QFVHGEEDLKVQESSYRQARLLLEDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKBITVKV
 NAFYNKINQRI LVVDPVISEHELTCAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTS
 TLRINTTTNELFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFR
 LRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:25).

Algunos ejemplos específicos de mAb anti PD-L1 humanos de diagnóstico útiles como mAb de diagnóstico para la detección por inmunohistoquímica (IHC) de la expresión de PD-L1 en secciones de tejido tumoral fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) son el anticuerpo 20C3 y el anticuerpo 22C3, que se describen en la solicitud de patente internacional en tramitación junto con la presente PCT/US13/075932, presentada el 18 de diciembre de 2013 y publicada como WO2014/100079 el 26 de junio de 2014. Otro mAb anti-PD-L1 humano que se ha descrito como útil para la detección por IHC de la expresión de PD-L1 en secciones de tejido FFPE (Chen, B.J. *et al.*, Clin. Cancer Res., 19: 3462-3473 (2013)) es un mAb anti-PD-L1 humano de conejo de acceso público en Sino Biological, Inc. (Pekín, R.P. de China; número de catálogo 10084-R015).

Un "anticuerpo anti-IL-10" significa un anticuerpo antagonista que se une a la IL-10 para inhibir la actividad de la IL-10. Otros nombres o sinónimos de IL-10 incluyen: interleucina-10, factor inhibidor de la síntesis de citocinas o CSIF ("cytokine synthesis inhibitor factor"). Las secuencias de aminoácidos de la IL-10 humana pueden encontrarse en la patente de EE. UU. 6217857. La secuencia de aminoácidos de la proteína de IL-10 humana madura es la siguiente:

SPFGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMRQQLDNLLLLKESLLEDKFGYLGCCQAL
 SEMIQFYLEEVMPQAEHQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRKRCHRFPCENKSKAVEQVKNAFNK
 LQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (SEQ ID NO: 52)

Los anticuerpos anti-IL-10 útiles en cualquiera de los procedimientos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención incluyen un anticuerpo monoclonal (mAb), o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-10, y preferentemente se une específicamente a IL-10 humana. El mAb puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y, en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante de IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo formado por fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv.

En algunas realizaciones preferidas del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, el anticuerpo anti-IL-10 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende: (a) CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, 27 y 28 y CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 29, 30 y 31 de anti-IL-10 hum12G8.

En otras realizaciones preferidas del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, el anticuerpo anti-IL-10 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-10 humana y comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:32 o una variante de la misma, y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:33 o una variante de la misma. Una variante de una secuencia de región variable de cadena pesada es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que tiene hasta 17 sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco (es decir, fuera de las CDR), y preferentemente tiene menos de diez, nueve, ocho, siete, seis o cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco. Una variante de una secuencia de región variable de cadena ligera es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que tiene hasta cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco (es decir, fuera de las CDR), y preferentemente tiene menos de cuatro, tres o dos sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco.

La tabla 3 a continuación proporciona una lista de ejemplos de secuencias de aminoácidos de mAb anti-IL-10 para su uso en el procedimiento de tratamiento, en medicamentos y en los usos de la presente invención, y las secuencias se muestran en las figuras 8-9.

Tabla 3. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti IL-10 humana	
A. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hum12G8 en la patente de EE. UU. 7662379	
CDRL1	SEQ ID NO:26 KTSQNIFENLA
CDRL2	SEQ ID NO:27 YNASPLQA

Tabla 3. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti IL-10 humana	
A. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hum12G8 en la patente de EE. UU. 7662379	
CDRL3	SEQ ID NO:28 HQYYSGYT
CDRH1	SEQ ID NO:29 GFTFSDYHMA
CDRH2	SEQ ID NO:30 SITLDATYTYRDSVRG
CDRH3	SEQ ID NO:31 HRGFSVWLDY
B. Comprende la región variable de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera de hum12G8 en la patente de EE. UU. 7662379	
Cadena pesada VR	SEQ ID NO:32
	<p>QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSDYHMAWVRQAPGKGLEWVAS</p> <p>ITLDATYTYRDSVRGRFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHR</p> <p>GFSVWLDYWGOGTLVTSSA</p>
Cadena ligera VR	SEQ ID NO:33
	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKTSQNIENLAWYQOKPGKAPKLLIYN</p> <p>ASPLQAGVPSRFSQSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQVYSGYTFGPG</p> <p>TKLELKRTVAA</p>
C. Comprende la cadena pesada y la cadena ligera de hum12G8 en la patente de EE. UU. 7662379	
Cadena pesada	SEQ ID NO:34
Cadena ligera	SEQ ID NO:35
D. Comprende la cadena pesada y la cadena ligera de TC40.11D8 en la patente de EE. UU. 8226947	
Cadena pesada	SEQ ID NO: 36
Cadena ligera	SEQ ID NO: 37

Tal como se utiliza en el presente documento, una "variante de anti-IL-10 hum 12G8" significa un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de cadena pesada y cadena ligera que son idénticas a las del anti-IL-10 hum 12G8, excepto por tener tres, dos o una sustituciones conservadoras de aminoácidos en posiciones que están situadas fuera de las CDR de la cadena ligera, y seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sustituciones conservadoras de aminoácidos que están situadas fuera de las CDR de la cadena pesada, por ejemplo, las posiciones variantes están situadas en las regiones FR o en la región constante. En otras palabras, el anti-IL-10 hum 12G8 y una variante de anti-IL-10 hum 12G8 comprenden secuencias CDR idénticas, pero que difieren entre sí por tener una sustitución conservadora de aminoácidos en no más de otras tres o seis posiciones en sus secuencias de cadena ligera y pesada de longitud completa, respectivamente. Una variante de anti-IL-10 hum 12G8 es sustancialmente igual que el anti-IL-10 hum 12G8 con respecto a las siguientes propiedades: afinidad de unión a IL-10 y efecto neutralizante *in vivo*.

"TEED" o "tasa de enfermedad estable duradera" significa EE durante ≥ 23 semanas.

"Región marco" o "FR", tal como se utiliza en el presente documento, significa las regiones variables de la inmunoglobulina excluyendo las regiones CDR.

"Kabat", tal como se utiliza en el presente documento, significa un sistema de alineación y numeración de inmunoglobulinas ideado por Elvin A. Kabat ((1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

"Anticuerpo monoclonal" o "mAb" o "Mab", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpo que comprenden la población son idénticas en secuencia de aminoácidos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. En cambio, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) suelen incluir una multitud de anticuerpos diferentes que tienen distintas secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, en especial sus CDR, que a menudo son específicos para distintos epítopos. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse en el sentido de que requiera la producción del anticuerpo mediante un procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975), *Nature*, 256: 495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4 816 567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bancos de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624-628; y Marks *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, por ejemplo. Véase también Presta (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116:731.

Un "paciente no respondedor", cuando se refiere a una respuesta antitumoral específica al tratamiento con una terapia combinada descrita en el presente documento, significa que el paciente no presentó la respuesta antitumoral.

"TRR" o "tasa de respuesta objetiva" se refiere, en algunas realizaciones, a RC + RP, y TRR_(semana 24) se refiere a RC y RP medidos usando irRECIST en cada paciente de una cohorte después de 24 semanas de tratamiento con oligonucleótido de tipo CpG-C combinado con pembrolizumab.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier sujeto individual para el que se desea una terapia o que participa en un ensayo clínico, estudio epidemiológico o que se utiliza como control, incluidos los seres humanos y los pacientes veterinarios mamíferos, tales como el ganado vacuno, los caballos, los perros y los gatos.

Un "antagonista de PD-1" significa cualquier compuesto químico o molécula biológica que bloquea la unión de PD-L1 expresado sobre una célula cancerosa a PD-1 expresada sobre una célula inmunitaria (linfocito T, linfocito B o célula NKT) y, preferentemente, también bloquea la unión de PD-L2 expresado sobre una célula cancerosa a la PD-1 expresada sobre la célula inmunitaria. Los nombres alternativos o sinónimos de PD-1 y sus ligandos incluyen: PDCD1, PD1, CD279 y SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 y B7-H para PD-L1; y PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc y CD273 para PD-L2. En cualquiera de los procedimientos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención en los que se está tratando a un individuo humano, el antagonista de PD-1 bloquea la unión de PD-L1 humano a PD-1 humana, y preferentemente bloquea la unión tanto de PD-L1 humano como de PD-L2 humano a PD-1 humana. Las secuencias de aminoácidos de PD-1 humana se encuentran en NCBI Locus n.º: NP_005009. Las secuencias de aminoácidos de PD-L1 y PD-L2 humanos se encuentran en NCBI Locus n.º: NP_054862 y NP_079515, respectivamente.

Los antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los procedimientos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención incluyen un anticuerpo monoclonal (mAb), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y preferentemente se une específicamente a PD-1 humana o PD-L1 humano. El mAb puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y, en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante de IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo formado por fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv.

Algunos ejemplos de mAb que se unen a PD-1 humana y útiles en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención, se describen en los documentos US7488802, US7521051, US8008449, US8354509, US8168757, WO2004/004771, WO2004/072286, WO2004/056875 y US2011/0271358. Los mAb anti-PD-1 humana específicos útiles como antagonista de PD-1 en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención incluyen: pembrolizumab (también conocido como MK-3475), un mAb IgG4 humanizado con la estructura descrita en WHO Drug Information, vol. 27, n.º 2, páginas 161-162 (2013) y que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que se muestran en la figura 6; nivolumab (BMS-936558), un mAb IgG4 humanizado con la estructura descrita en WHO Drug Information, vol. 27, n.º 1, páginas 68-69 (2013) y que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que se muestran en la figura 7; los anticuerpos humanizados h409A11, h409A16 y h409A17, que se describen en el documento WO2008/156712, y AMP-514, que está siendo desarrollado por MedImmune.

Algunos ejemplos de mAb que se unen a PD-L1 humano y útiles en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención, se describen en los documentos WO2013/019906, WO2010/077634 A1 y US8383796. Los mAb anti-PD-L1 humano específicos útiles como antagonista de PD-1 en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención incluyen MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C y un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:21, respectivamente, del documento WO2013/019906.

Otros antagonistas de PD-1 útiles en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención incluyen una inmunoadhesina que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y preferentemente se une específicamente a PD-1 humana o PD-L1 humano, por ejemplo, una proteína de fusión que contiene la porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada con una región constante, tal como una región Fc de una molécula de inmunoglobulina. Algunos ejemplos de moléculas de inmunoadhesión que se unen específicamente a PD-1 se describen en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342. Las proteínas de fusión específicas útiles como antagonista de PD-1 en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención incluyen AMP-224 (también conocida como B7-DCIg), que es una proteína de fusión PD-L2-FC y se une a PD-1 humana.

En algunas realizaciones preferidas del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende: (a) CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 4, 5 y 6; o b) CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 10, 11 y 12.

En otras realizaciones preferidas del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 humana y comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:13 o una variante de la misma, y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:15 o una variante de la misma; SEQ ID NO:16 o una variante de la misma; y SEQ ID NO: 17 o una variante de la misma. Una variante de una secuencia de región variable de cadena pesada es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que tiene hasta 17 sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco (es decir, fuera de las CDR), y preferentemente tiene menos de diez, nueve, ocho, siete, seis o cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco. Una variante de una secuencia de región variable de cadena ligera es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que tiene hasta cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco (es decir, fuera de las CDR), y preferentemente tiene menos de cuatro, tres o dos sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco.

En otra realización preferida del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PD-1 humana y comprende (a) una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14 y (b) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:20.

En otra realización preferida del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PD-1 humana y comprende (a) una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14 y (b) una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:18.

En todos los procedimientos de tratamiento, medicamentos y usos anteriores, el antagonista de PD-1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1, y preferentemente también inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas realizaciones del procedimiento de tratamiento, medicamentos y usos anteriores, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 o a PD-L1 y bloquea la unión de PD-L1 a PD-1. En una realización, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y en el que las cadenas pesada y ligera comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura 6 (SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22).

La tabla 4 a continuación proporciona una lista de ejemplos de secuencias de aminoácidos de mAb anti-PD-1 para su uso en el procedimiento de tratamiento, en los medicamentos y en los usos de la presente invención, y las secuencias se muestran en las figuras 1-5.

Tabla 4. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti IL-10 humana

A. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hPD-1.08A en el documento WO2008/156712

CDRL1	SEQ ID NO:1
CDRL2	SEQ ID NOT

Tabla 4. Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti IL-10 humana	
A. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hPD-1.08A en el documento WO2008/156712	
CDRL3	SEQ ID NOT
CDRH1	SEQ ID NOT
CDRH2	SEQ ID NO:5
CDRH3	SEQ ID NO:6
B. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hPD-1.09A en el documento WO2008/156712	
CDRL1	SEQ ID NO:7
CDRL2	SEQ ID NO:8
CDRL3	SEQ ID NOT
CDRH1	SEQ ID NO: 10
CDRH2	SEQ ID NO:11
CDRH3	SEQ ID NO:12
C. Comprende la región variable de cadena pesada de h109A maduro y una de las regiones variables de cadena ligera de K09A maduro en el documento WO2008/156712	
Cadena pesada VR	SEQ ID NO:13
Cadena ligera VR	SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:17
D. Comprende la cadena pesada de 409 maduro y una de las cadenas ligeras de K09A maduro en el documento WO2008/156712	
Cadena pesada	SEQ ID NO: 14
Cadena ligera	SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:20

La tabla 5 proporciona una breve descripción de las secuencias de antagonistas de PD-1 en el listado de secuencias.

SEQ ID NO:	Descripción
1	hPD-1.08A CDR1 de cadena ligera
2	hPD-1.08A CDR2 de cadena ligera
3	hPD-1.08A CDR3 de cadena ligera
4	hPD-1.08A CDR1 de cadena pesada
5	hPD-1.08A CDR2 de cadena pesada
6	hPD-1.08A CDR3 de cadena pesada

SEQ ID NO:	Descripción
7	hPD-1.09A CDR1 de cadena ligera
8	hPD-1.09A CDR2 de cadena ligera
9	hPD-1.09A CDR3 de cadena ligera
10	hPD-1.09A CDR1 de cadena pesada
11	hPD-1.09A CDR2 de cadena pesada
12	hPD-1.09A CDR3 de cadena pesada
13	109A-H región variable de cadena pesada
14	409A-H cadena pesada de longitud completa
15	K09A-L-11 región variable de cadena ligera
16	K09A-L-16 región variable de cadena ligera
17	K09A-L-17 región variable de cadena ligera
18	K09A-L-11 cadena ligera de longitud completa
19	K09A-L-16 cadena ligera de longitud completa
20	K09A-L-17 cadena ligera de longitud completa
21	Pembrolizumab Cadena pesada
22	Pcmbrolizumab Cadena ligera
23	Nivolumab Cadena pesada
24	Nivolumab cadena ligera

Tabla 6. Características del anticuerpo monoclonal MEB037.22C3

Característica del anticuerpo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Cadena ligera		
CDRL1	KSSQSLHTSTRKNYLA	55
CDRL2	WASTRES	56
CDRL3	KQSYDWT	57
Región variable madura		58

Tabla 6. Características del anticuerpo monoclonal MEB037.22C3		
Característica del anticuerpo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Cadena ligera		
	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSLIHTSTRKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFLTISVQAE DLAVYYCKOSYDVVTFGAGTKLELK	
Cadena pesada		
CDRH1 Kabat	Defin. SYWIH	59
CDRH1 Chothia	Defin. GTTFTSYWIH	60
CDRH2	YINP S SGYHEYNQKFID	61
CDRH3	SGWLIHGDYYFDF	62
Región variable madura	XVHLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWIHWIKRPG QGLEWIGYINPSSGYHEYNQKFIDKATLTADRSSSTAYMHLTSL TSEDSAVYYCARSGWLIHGDYYFDFWGQGTTTLTVSS, en la que X = Q o pE	63

- La expresión de "PD-L1" o "PD-L2", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier nivel detectable de expresión de la proteína PD-L indicada en la superficie celular o del ARNm de PD-L indicado dentro de una célula o tejido. La expresión de la proteína PD-L puede detectarse con un anticuerpo contra PD-L de diagnóstico en un ensayo de IHC de una sección de tejido tumoral o por citometría de flujo. Como alternativa, la expresión de la proteína PD-L por las células tumorales puede detectarse mediante obtención de imágenes PET, utilizando un agente de unión (por ejemplo, fragmento de anticuerpo, aficuerpo y similares) que se une específicamente a la diana PD-L deseada, por ejemplo, PD-L1 o PD-L2. Las técnicas para detectar y medir la expresión del ARNm de PD-L incluyen la RT-PCR y la RT-PCR cuantitativa en tiempo real.
- 5 Se han descrito varios enfoques para cuantificar la expresión de la proteína PD-L1 en ensayos de IHC de secciones de tejido tumoral. Véase, por ejemplo, Thompson, R. H., *et al.*, PNAS, 101 (49): 17174-17179 (2004); Thompson, R. H. *et al.*, Cancer Res., 66:3381-3385 (2006); Gadot, J., *et al.*, Cancer, 117:2192-2201 (2011); Taube, J. M. *et al.*, Sci. Transl. Med., 4, 127ra37 (2012); y Toplian, S. L. *et al.*, New Eng. J. Med., 366 (26): 2443-2454 (2012).
- 10 Un enfoque emplea un criterio de evaluación binario simple de positivo o negativo para la expresión de PD-L1, definiéndose un resultado positivo atendiendo al porcentaje de células tumorales que muestran evidencia histológica de tinción de la membrana de la superficie celular. Una sección de tejido tumoral se considera positiva para la expresión de PD-L1 si tiene al menos el 1 %, y preferentemente el 5 % de células tumorales totales.
- 15 En otro enfoque, la expresión de PD-L1 en la sección de tejido tumoral se cuantifica en las células tumorales, así como en las células inmunitarias infiltrantes, que comprenden predominantemente linfocitos. El porcentaje de células tumorales y de células inmunitarias infiltrantes que muestran tinción de membrana se cuantifica por separado como <5%, 5 al 9 %, y luego en incrementos del 10 % hasta el 100 %. Para las células tumorales, la expresión de PD-L1 se considera negativa si la puntuación es <5 % y positiva si la puntuación es ≥5 %. La expresión de PD-L1 en el infiltrado inmunitario se notifica como una medida semicuantitativa denominada puntuación de inflamación ajustada ("adjusted inflammation score", AIS), que se determina multiplicando el porcentaje de células con tinción de membrana por la intensidad del infiltrado, que se clasifica como nulo (0), leve (puntuación de 1, linfocitos escasos), moderado (puntuación de 2, infiltración focal del tumor por agregados linfohistiocíticos) o fuerte (puntuación de 3, infiltración difusa). Una sección de tejido tumoral se considera positiva para la expresión de PD-L1 por infiltrados inmunitarios si la AIS es ≥5.
- 20
- 25

El nivel de expresión de ARNm de PD-L puede compararse con los niveles de expresión de ARNm de uno o más genes de referencia que se utilizan con frecuencia en la RT-PCR cuantitativa, tal como la ubiquitina C.

En algunas realizaciones, se determina que un nivel de expresión de PD-L1 (proteína y/o ARNm) por células malignas y/o por células inmunitarias infiltrantes dentro de un tumor está "sobrexpresado" o "elevado" basándose en la comparación con el nivel de expresión de PD-L1 (proteína y/o ARNm) por un control apropiado. Por ejemplo, un nivel de expresión de proteína PD-L1 o ARNm de control puede ser el nivel cuantificado en células no malignas del mismo tipo o en una sección de un tejido normal equiparable. En algunas realizaciones preferidas, se determina que la expresión de PD-L1 en una muestra tumoral es elevada si la proteína PD-L1 (y/o el ARNm de PD-L1) en la muestra es al menos un 10 %, un 20 % o un 30 % más alto que en el control.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "variante de pembrolizumab" significa un anticuerpo monoclonal que comprende secuencias de cadena pesada y cadena ligera que son idénticas a las del pembrolizumab, excepto por tener tres, dos o una sustituciones conservadoras de aminoácidos en posiciones que están situadas fuera de las CDR de cadena ligera, y seis, cinco, cuatro, tres, dos o una sustituciones conservadoras de aminoácidos que están situadas fuera de las CDR de cadena pesada, por ejemplo, las posiciones variantes están situadas en las regiones FR o en la región constante. En otras palabras, pembrolizumab y una variante de pembrolizumab comprenden secuencias CDR idénticas, pero que difieren entre sí por tener una sustitución conservadora de aminoácidos en no más de tres o seis posiciones en sus secuencias de cadena ligera y pesada de longitud completa, respectivamente. Una variante de pembrolizumab es sustancialmente igual que el pembrolizumab con respecto a las siguientes propiedades: afinidad de unión a PD-1 y capacidad para bloquear la unión de cada uno de PD-L 1 y PD-L2 a PD-1.

Los "criterios de respuesta RECIST 1.1", tal como se utilizan en el presente documento, se refiere a las definiciones establecidas en Eisenhauer *et al.*, E.A. *et al.*, Eur. J. Cancer, 45:228-247 (2009) para lesiones diana o lesiones que no son la diana, según proceda en función del contexto en el que se esté midiendo la respuesta.

Un "paciente respondedor", cuando se refiere a una respuesta antitumoral específica al tratamiento con una terapia combinada descrita en el presente documento, significa que el paciente presentó la respuesta antitumoral.

Una "respuesta sostenida" significa un efecto terapéutico sostenido tras la interrupción del tratamiento con un agente terapéutico, o una terapia combinada descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la respuesta sostenida tiene una duración que es al menos igual a la duración del tratamiento, o al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3 veces mayor que la duración del tratamiento.

Una "sección de tejido" se refiere a una sola parte o pieza de una muestra de tejido, por ejemplo, una rebanada delgada de tejido cortada de una muestra de un tejido normal o de un tumor.

"Tratar" el cáncer, tal como se utiliza en el presente documento, significa administrar una terapia combinada de un antagonista de PD-1 y un oligonucleótido de tipo CpG-C a un sujeto que padece cáncer, o al que se le ha diagnosticado cáncer, para lograr al menos un efecto terapéutico positivo, tal como, por ejemplo, la reducción del número de células cancerosas, la reducción del tamaño del tumor, la reducción de la tasa de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, o la reducción de la tasa de metástasis tumoral o de crecimiento tumoral. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer pueden medirse de varias maneras (véase, W. A. Weber, J. Nucl. Med., 50:1S-10S (2009)). Por ejemplo, con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, según las normas del NCI, un T/C \leq 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C < 10 % se considera un nivel alto de actividad antitumoral, siendo T/C (%) = Mediana del volumen tumoral de la persona tratada/Mediana del volumen tumoral del control \times 100. En algunas realizaciones, la respuesta a una terapia combinada descrita en el presente documento se evalúa utilizando los criterios RECIST 1.1 o irRC (bidimensional o unidimensional) y el tratamiento que se logra con una combinación de la invención es cualquiera de RP, RC, OR, SSP, SSE y SG. La SSP, también denominada "tiempo hasta la progresión del tumor", indica el tiempo durante y después del tratamiento en el que el cáncer no crece, e incluye el tiempo en el que los pacientes han experimentado una RC o una RP, así como el tiempo en el que los pacientes se han mantenido con EE. La SSE se refiere al tiempo durante y después del tratamiento que el paciente permanece sin enfermedad. La SG se refiere a una prolongación de la esperanza de vida en comparación con individuos o pacientes sin tratamiento previo o no tratados. En algunas realizaciones, la respuesta a una combinación de la invención es cualquiera de RP, RC, SSP, SSE, OR y SG que se evalúa utilizando los criterios de respuesta RECIST 1.1. El régimen de tratamiento para una combinación de la invención que sea eficaz para tratar a un paciente con cáncer puede variar en función de factores tales como el cuadro clínico, la edad y el peso del paciente, y la capacidad de la terapia para provocar una respuesta contra el cáncer en el sujeto. Si bien una realización de cualquiera de los aspectos de la invención puede no ser eficaz para lograr un efecto terapéutico positivo en todos los sujetos, debe hacerlo en un número estadísticamente significativo de sujetos según lo determinado por cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba de la *t* de Student, la prueba de χ^2 , la prueba de la U según Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba de la H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

Las expresiones "régimen de tratamiento", "protocolo de administración" y "pauta posológica" se utilizan indistintamente para referirse a la dosis y el momento de administración de cada agente terapéutico en una combinación de la invención.

"Tumor", tal como se aplica a un sujeto diagnosticado de cáncer, o sospechoso de padecerlo, se refiere a una neoplasia o masa tisular maligna o potencialmente maligna de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasias secundarias. Un tumor sólido es un crecimiento anómalo o masa de tejido que no suele contener quistes ni zonas líquidas. Los distintos tipos de tumores sólidos reciben su nombre del tipo de células que los forman. Algunos ejemplos de tumores sólidos son los sarcomas, los carcinomas y los linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) no suelen formar tumores sólidos (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

La "carga tumoral" se refiere a la cantidad total de material tumoral distribuido por todo el cuerpo. La carga tumoral se refiere al número total de células cancerosas o al tamaño total del tumor o tumores, en todo el cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos y la médula ósea. La carga tumoral puede determinarse por medio de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones del tumor o tumores tras extirparlos del sujeto, por ejemplo, utilizando calibradores, o mientras se encuentra dentro del cuerpo utilizando técnicas de obtención de imágenes, por ejemplo, ultrasonidos, gammagrafía ósea, tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM).

La expresión "tamaño del tumor" se refiere al tamaño total del tumor que puede medirse como la longitud y la anchura de un tumor. El tamaño del tumor puede determinarse por diversos procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones del tumor o tumores tras extirparlos del sujeto, por ejemplo, utilizando calibradores, o mientras se encuentra dentro del cuerpo utilizando técnicas de obtención de imágenes, por ejemplo, gammagrafía ósea, ecografía, tomografía computarizada o resonancia magnética.

"irRC unidimensional" significa el conjunto de criterios descritos en Nishino M., Giobbie-Hurder A., Gargano M., Suda M., Ramaiya N.H., Hodi F.S., Developing a Common Language for Tumor Response to Immunotherapy: Immune-related Response Criteria using Unidimensional measurements. Clin. Cancer Res., 2013, 19(14):3936-3943). Estos criterios utilizan el diámetro más largo (cm) de cada lesión.

Las "regiones variables" o la "región V", tal como se utilizan en el presente documento, significan el segmento de las cadenas de IgG cuya secuencia es variable entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el residuo de Kabat 109 en la cadena ligera y 113 en la cadena pesada.

En algunas realizaciones del procedimiento de tratamiento, los medicamentos y los usos anteriores de la invención, el individuo es un ser humano y el cáncer es un tumor sólido y, en algunas realizaciones, el tumor sólido es cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de riñón de células claras, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de pulmón, melanoma maligno, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales (CCR), cáncer de pulmón microcítico (CPM) o cáncer de mama triple negativo. En algunas realizaciones, el cáncer es CPNM, cáncer de endometrio, cáncer urotelial, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello o melanoma.

En otras realizaciones del procedimiento de tratamiento, los medicamentos y los usos anteriores de la invención, el individuo es un ser humano y el cáncer es una hemopatía maligna y, en algunas realizaciones, la hemopatía maligna es leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), DLBCL positivo para VEB, linfoma mediastínico primario de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin (LH), linfoma de células del manto (LCM), mieloma múltiple (MM), leucemia de células mieloides con proteína-1 (Mcl-1), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma no hodgkiniano (LNH) o linfoma linfocítico pequeño (LLP).

Además, en algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos de tratamiento, medicamentos y usos anteriores, el cáncer tiene un resultado positivo para la expresión de uno o ambos PD-L1 y PD-L2. En otras realizaciones, el cáncer tiene una expresión elevada de PD-L1.

En una realización del procedimiento de tratamiento, los medicamentos y los usos anteriores, el individuo es un ser humano, el cáncer tiene un resultado positivo para PD-L1 humano y se selecciona del grupo que consiste en CPNM, cáncer de endometrio, cáncer urotelial, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello o melanoma. En una realización del procedimiento de tratamiento, los medicamentos y los usos anteriores, el individuo es un ser humano, el cáncer tiene un resultado positivo para PD-L1 humano y es un melanoma avanzado o metastásico.

II. Métodos, usos y medicamentos

En un aspecto de la invención, la invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una terapia combinada que comprende un antagonista de PD-1 y un oligonucleótido de tipo CpG-C.

La terapia combinada también puede comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales. El agente terapéutico adicional puede ser, por ejemplo un quimioterapéutico distinto del oligonucleótido de tipo CpG-C, un agente bioterapéutico, un agente inmunogénico (por ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos tumorales, células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas pulsadas con antígenos o ácidos nucleicos derivados del

tumor, citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes, tales como GM-CSF, entre otras). La dosis específica y la pauta posológica del agente terapéutico adicional pueden variar aún más, y la dosis óptima, la pauta posológica y la vía de administración se determinarán en función del agente terapéutico específico que se esté utilizando. En una realización, el agente bioterapéutico es un anticuerpo anti-IL-10 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida; alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, tales como altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en especial criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clorafanfazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluida la dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos de la cromoproteína antibiótica enediina relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluida la morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como la mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purinas, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidinas, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico, tales como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinán; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y las ansamitocinas; mitoguaazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; rizoxina; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclosfosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido, edatrexato; daunomicina; aminopterina, xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DNIFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen los agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE), entre los que se incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol y anastrozol; y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Cada agente terapéutico en una terapia combinada de la invención puede administrarse solo o en un medicamento (también denominado en el presente documento composición farmacéutica) que comprende el agente terapéutico y uno o más vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables, según la práctica farmacéutica habitual.

Cada agente terapéutico en una terapia combinada de la invención puede administrarse simultáneamente (es decir, en el mismo medicamento), concurrentemente (es decir, en medicamentos separados administrados uno justo después del otro en cualquier orden) o secuencialmente en cualquier orden. La administración secuencial es especialmente útil cuando los agentes terapéuticos de la terapia combinada están en diferentes formas farmacéuticas (un agente es un comprimido o cápsula y otro agente es un líquido estéril) y/o se administran en diferentes pautas posológicas, por ejemplo, un quimioterapéutico que se administra al menos diariamente y un bioterapéutico que se administra con menos frecuencia, tal como una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido de tipo CpG-C se administra antes de la administración del antagonista de PD-1, mientras que en otras realizaciones, el oligonucleótido de tipo CpG-C se administra después de la administración del antagonista de PD-1. En otra realización, el oligonucleótido de tipo CpG-C se administra concurrentemente con el antagonista de PD-1.

- 5 En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes terapéuticos en la terapia combinada se administra usando la misma pauta posológica (dosis, frecuencia y duración del tratamiento) que se suele emplear cuando el agente se usa como monoterapia para tratar el mismo cáncer. En otras realizaciones, el paciente recibe una cantidad total menor de al menos uno de los agentes terapéuticos en la terapia combinada que cuando el agente se utiliza como monoterapia, por ejemplo, dosis más pequeñas, dosis menos frecuentes y/o una duración más corta del tratamiento.

- 10 Cada agente terapéutico de molécula pequeña en una terapia combinada de la invención puede administrarse por vía oral o parenteral, incluidas las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal, tópica y transdérmica.

Una terapia combinada de la invención puede usarse antes o después de la cirugía para extirpar un tumor y puede usarse antes, durante o después de la radioterapia.

- 15 En algunas realizaciones, una terapia combinada de la invención se administra a un paciente que no ha sido tratado previamente con un agente bioterapéutico o quimioterapéutico, es decir, que no ha recibido tratamiento. En otras realizaciones, la terapia combinada se administra a un paciente que no ha logrado una respuesta sostenida tras una terapia previa con un agente bioterapéutico o quimioterapéutico, es decir, que tiene experiencia en el tratamiento.

- 20 Una terapia combinada de la invención se suele utilizar para tratar un tumor que es lo suficientemente grande como para ser descubierto por palpación o por técnicas de obtención de imágenes bien conocidas en la técnica, tales como resonancia magnética, ultrasonido o tomografía computarizada.

- 25 Una terapia combinada de la invención se administra preferentemente a un paciente humano que padece un cáncer que arroja un resultado positivo en las pruebas de expresión de PD-L1. En algunas realizaciones preferidas, la expresión de PD-L1 se detecta utilizando un anticuerpo de diagnóstico anti-PD-L1 humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en un ensayo de IHC en una sección de tejido FFPE o congelada de una muestra tumoral extraída del paciente. Normalmente, el médico del paciente encargará una prueba diagnóstica para determinar la expresión de PD-L1 en una muestra de tejido tumoral extraída del paciente antes del inicio del tratamiento con el antagonista de PD-1 y el oligonucleótido de tipo CpG-C, pero se prevé que el médico podría encargar la primera o posteriores pruebas diagnósticas en cualquier momento después del inicio del tratamiento, tal como, por ejemplo, después de la finalización de un ciclo de tratamiento.

- 30 La selección de una pauta posológica (también denominada en el presente documento régimen de administración) para una terapia combinada de la invención depende de varios factores, incluidos la tasa de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad, y la accesibilidad de las células, tejido u órgano diana en el individuo que se va a tratar. Preferentemente, una pauta posológica maximiza la cantidad de cada agente terapéutico administrado al paciente en conformidad con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad y frecuencia de la administración de cada agente bioterapéutico y quimioterapéutico de la combinación depende en parte del agente terapéutico concreto, de la gravedad del cáncer que se está tratando y de las características del paciente. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert *et al.* (2003), *New Engl. J. Med.*, 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999), *New Engl. J. Med.*, 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001), *New Engl. J. Med.*, 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000), *New Engl. J. Med.*, 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003), *New Engl. J. Med.*, 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000), *New Engl. J. Med.*, 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference, 2003 (Physicians' Desk Reference, 57ª ed.); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57ª edición (noviembre de 2002). La determinación de la pauta posológica adecuada puede ser realizada por el médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica que afectan al tratamiento o que se prevé que afecten al tratamiento, y dependerá, por ejemplo, del historial clínico del paciente (por ejemplo, tratamiento previo), del tipo y estadio del cáncer que se va a tratar y de biomarcadores de respuesta a uno o más de los agentes terapéuticos de la terapia combinada.

- 55 Los agentes bioterapéuticos en una terapia combinada de la invención pueden administrarse por infusión continua, o por dosis a intervalos, por ejemplo, diariamente, cada dos días, tres veces por semana, o una vez cada semana, dos semanas, tres semanas, mensualmente, bimensualmente, etc. Una dosis semanal total es generalmente de al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, por ejemplo, Yang *et al.* (2003), *New Engl. J. Med.*, 349:427-434; Herold *et al.* (2002), *New Engl. J. Med.*, 346:1692-1698; Liu *et al.* (1999), *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 67:451-456; Portielji *et al.* (2003), *Cancer Immunol. Immunother.*, 52:133-144.

En algunas realizaciones que emplean un mAb anti-PD-1 humana como el antagonista de PD-1 en la terapia combinada, la pauta posológica comprenderá administrar el mAb anti-PD-1 humano en una dosis de 1, 2, 3, 5 o 10 mg/kg a intervalos de aproximadamente 14 días (± 2 días) o aproximadamente 21 días (± 2 días) o aproximadamente 30 días (± 2 días) a lo largo del curso del tratamiento.

- 5 En otras realizaciones que emplean un mAb anti-PD-1 humana como el antagonista de PD-1 en la terapia combinada, la pauta posológica comprenderá la administración del mAb anti-PD-1 humana en una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, con escalado de dosis intrapaciente. En otras realizaciones de dosis escalonadas, el intervalo entre las dosis se acortará progresivamente, por ejemplo, aproximadamente 30 días (± 2 días) entre la primera y la segunda dosis, aproximadamente 14 días (± 2 días) entre la segunda y la tercera dosis. En determinadas realizaciones, el intervalo de administración será de aproximadamente 14 días (± 2 días) para las dosis posteriores a la segunda dosis.

En determinadas realizaciones, se administrará a un sujeto una infusión intravenosa (IV) de un medicamento que comprende cualquiera de los antagonistas de PD-1 descritos en el presente documento.

- 15 En una realización preferida de la invención, el antagonista de PD-1 en la terapia combinada es el nivolumab, que se administra por vía intravenosa en una dosis seleccionada del grupo que consiste en: 1 mg/kg Q2W, 2 mg/kg Q2W, 3 mg/kg Q2W, 5 mg/kg Q2W, 10 mg Q2W, 1 mg/kg Q3W, 2 mg/kg Q3W, 3 mg/kg Q3W, 5 mg/kg Q3W y 10 mg Q3W.

- 20 En otra realización preferida de la invención, el antagonista de PD-1 en la terapia combinada es el pembrolizumab, o una variante del pembrolizumab, que se administra en un medicamento líquido en una dosis seleccionada del grupo que consiste en 1 mg/kg Q2W, 2 mg/kg Q2W, 3 mg/kg Q2W, 5 mg/kg Q2W, 10 mg Q2W, 1 mg/kg Q3W, 2 mg/kg Q3W, 3 mg/kg Q3W, 5 mg/kg Q3W, 10 mg Q3W y equivalentes de dosis planas de cualquiera de estas dosis, es decir, tal como 200 mg Q3W. En algunas realizaciones, el pembrolizumab se suministra en forma de un medicamento líquido que comprende 25 mg/ml de pembrolizumab, sacarosa al 7 % (p/v), polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) en tampón de histidina 10 mM, pH 5,5.

- 25 En algunas realizaciones, la dosis seleccionada de pembrolizumab se administra por infusión IV. En una realización, la dosis seleccionada de pembrolizumab se administra mediante infusión IV durante un periodo de tiempo de entre 25 y 40 minutos, o de aproximadamente 30 minutos.

- 30 En una realización de la invención, el oligonucleótido de tipo CpG-C en la terapia combinada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 45. Sin embargo, otros oligonucleótidos de tipo CpG-C que tengan los motivos y secuencias descritos en el presente documento también son adecuados para su uso en las terapias combinadas de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que cualquier descripción relativa a los procedimientos o medicamentos que comprenden el oligonucleótido de tipo CpG-C de SEQ ID NO: 45 también es aplicable a otros oligonucleótidos de tipo CpG-C, en concreto C59-01 a C59-14 (SEQ ID NO: 38-51). En aras de la brevedad, esta interpretación no se repetirá a lo largo del texto. En una realización de la invención, el oligonucleótido de tipo CpG-C en la terapia combinada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 45, y se administra intratumoralmente en una dosis de 0,1 a 16,0 mg una vez a la semana, preferentemente de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 u 8,0 mg una vez a la semana. En otra realización de la invención, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra intratumoralmente en una dosis de 0,1 a 16,0 mg una vez a la semana durante cuatro semanas, preferentemente de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 7,0 u 8,0 mg una vez a la semana durante cuatro semanas. En otra realización de la invención, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra intratumoralmente en una dosis de 0,1 a 16,0 mg una vez cada tres semanas, preferentemente de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 7,0 u 8,0 mg una vez cada tres semanas. En otra realización de la invención, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra por vía intratumoral en una dosis de 2,0, 4,0 u 8,0 mg una vez a la semana durante cuatro semanas. En otra realización de la invención, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra por vía intratumoral en una dosis de 2,0, 4,0 u 8,0 mg una vez a la semana durante cuatro semanas, seguidas de una vez cada tres semanas. En una realización, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra hasta la progresión o durante un máximo de 12-24 semanas después de la primera dosis. En otra realización, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra en un total de 4, 5, 6, 7 u 8 dosis. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de tipo CpG-C de SEQ ID NO: 45 se administra dos veces por semana, una vez por semana, cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes o cada dos meses.

- 50 La dosis óptima de pembrolizumab combinado con el oligonucleótido de tipo CpG-C puede identificarse escalando o desescalando la dosis de uno o ambos de estos agentes. En una realización, el pembrolizumab se administra a 200 mg Q3W y el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra intratumoralmente en una dosis de 1 a 16 mg una vez a la semana, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg una vez a la semana. En una realización, un paciente se trata con 200 mg de pembrolizumab Q3W el día 1 y se trata con el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 administrado intratumoralmente en una dosis de 1 a 16 mg el día 1, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg el día 1, una vez a la semana durante cuatro semanas, seguido de una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg una vez cada tres semanas. En una realización, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra hasta la progresión o durante un máximo de 24 semanas después de la primera dosis. En otra realización, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra intratumoralmente en una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg el día 1, una vez a la semana durante cuatro semanas, seguida de una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg una vez cada tres semanas durante nueve semanas. En otra realización, el

oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra hasta la progresión o durante un máximo de 24 semanas después de la primera dosis. En una realización, se confirma que el paciente tiene enfermedad progresiva mientras recibe terapia anti-PD-1 previa. En otra realización, el pembrolizumab se administra por vía intravenosa y se administra hasta la progresión o durante un máximo de 45 semanas.

- 5 En otra realización, un paciente se trata con 200 mg de pembrolizumab Q3W el día 1 y se trata con el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 intratumoralmente en una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg el día 22 una vez a la semana durante cuatro semanas, seguida de una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg una vez cada tres semanas. En otra realización, el oligonucleótido de SEQ ID NO: 45 se administra intratumoralmente en una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg el día 1 una vez a la semana durante cuatro semanas, seguida de una dosis de 1 a 16 mg, preferentemente de 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 o 16,0 mg una vez cada tres semanas durante nueve semanas. En una realización, el paciente no ha recibido tratamiento anti-PD-1/L1. En otra realización, el pembrolizumab se administra por vía intravenosa. En otra realización, el pembrolizumab se administra por vía intravenosa y se administra hasta la progresión o durante un máximo de 45 semanas.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, el paciente se trata con la terapia combinada durante al menos 24 semanas, por ejemplo, ocho ciclos de 3 semanas. En algunas realizaciones, el tratamiento con la terapia combinada continúa hasta que el paciente muestra evidencia de EP o una RC.

- En otro aspecto de la invención, la terapia combinada que comprende un antagonista de PD-1 y un oligonucleótido de tipo CpG-C comprende además un anticuerpo anti-IL-10. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-10 en la terapia combinada es anti-IL 10 hum 12G8, que se administra por vía intravenosa en una dosis seleccionada del grupo que consiste en: 1 mg/kg Q3W, 2 mg/kg Q3W, 3 mg/kg Q3W, 4 mg/kg Q3W, 5 mg/kg Q3W, 6 mg/kg Q3W, 7 mg/kg Q3W, 8 mg/kg Q3W, 9 mg/kg Q3W, 10 mg/kg Q3W, 11 mg/kg Q3W, 12 mg/kg Q3W, 13 mg/kg Q3W, 14 mg/kg Q3W y 15 mg/kg Q3W. En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-10 en la terapia combinada es anti-IL-10 hum 12G8, que se administra por vía intravenosa en una dosis de 1 mg/kg Q3W. En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-10 en la terapia combinada es anti-IL 10 hum 12G8, que se administra por vía intravenosa en una dosis de 3 mg/kg Q3W. En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-10 en la terapia combinada es anti-IL 10 hum 12G8, que se administra por vía intravenosa en una dosis de 10 mg/kg Q3W
- 20
- 25

- En una realización preferida de la invención, el anticuerpo anti-IL-10 en la terapia combinada es anti-IL-10 hum 12G8, o una variante de anti-IL-10 hum 12G8, que se administra en un medicamento líquido en una dosis seleccionada del grupo que consiste en 1 mg/kg Q3W, 2 mg/kg Q3W, 3 mg/kg Q3W, 4 mg/kg Q3W, 5 mg/kg Q3W, 6 mg/kg Q3W, 7 mg/kg Q3W, 8 mg/kg Q3W, 9 mg/kg Q3W, 10 mg/kg Q3W, 11 mg/kg Q3W, 12 mg/kg Q3W, 13 mg/kg Q3W, 14 mg/kg Q3W y 15 mg/kg Q3W.
- 30

- En algunas realizaciones, el paciente es seleccionado para el tratamiento con la terapia combinada de la invención si el paciente ha sido diagnosticado con CPNM, CCR, cáncer de endometrio, cáncer urotelial, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello o melanoma.
- 35

La presente invención también proporciona un medicamento que comprende un antagonista de PD-1 como se ha descrito anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando el antagonista de PD-1 es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un mAb, el antagonista puede producirse en células CHO utilizando tecnologías convencionales de cultivo celular y recuperación/purificación.

- 40 En algunas realizaciones, un medicamento que comprende un anticuerpo anti-PD-1 como antagonista de PD-1 puede proporcionarse en forma de una formulación líquida o prepararse reconstituyendo un polvo liofilizado con agua estéril para inyección antes del uso. El documento WO 2012/135408 describe la preparación de medicamentos líquidos y liofilizados que comprenden pembrolizumab que son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, un medicamento que comprende pembrolizumab se suministra en un vial de vidrio que contiene aproximadamente 100 mg de pembrolizumab en 4 ml de solución. Cada 1 ml de solución contiene 25 mg de pembrolizumab y está formulado en: L-histidina (1,55 mg), polisorbato 80 (0,2 mg), sacarosa (70 mg) y agua para inyección, USP. La solución requiere dilución para la infusión intravenosa.
- 45

- La presente invención también proporciona un medicamento que comprende un agonista de TLR9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C. El oligonucleótido de tipo CpG-C puede reconstituirse en un tampón fisiológico para su inyección intratumoral.
- 50

- Los medicamentos descritos en el presente documento pueden suministrarse en forma de un kit que comprende un primer recipiente y un segundo recipiente y un prospecto. El primer recipiente contiene al menos una dosis de un medicamento que comprende un antagonista de PD-1, el segundo recipiente contiene al menos una dosis de un medicamento que comprende un oligonucleótido de tipo CpG-C, y el prospecto, o etiqueta, que comprende instrucciones para tratar a un paciente de cáncer utilizando los medicamentos. El primer y el segundo recipiente pueden tener la misma o distinta forma (por ejemplo, viales, jeringas y botellas) y/o material (por ejemplo, plástico o vidrio). El kit puede incluir además otros materiales que pueden ser útiles para administrar los medicamentos, tales como diluyentes, filtros, bolsas y vías intravenosas, agujas y jeringas. En algunas realizaciones preferidas del kit, el
- 55

antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 y las instrucciones indican que los medicamentos están destinados a utilizarse en el tratamiento de un paciente con un cáncer que tiene un resultado positivo para la expresión de PD-L1 mediante un ensayo de IHC.

- 5 Estos y otros aspectos de la invención, incluidas las realizaciones específicas ejemplares enumeradas a continuación, se desprenderán de las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Procedimientos generales

- 10 Los procedimientos convencionales en biología molecular se describen en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1982 y 1989, 2ª edición, 2001, 3ª edición), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993), *Recombinant DNA*, vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). También aparecen procedimientos convencionales en Ausbel, *et al.* (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y la mutagénesis del ADN (vol. 1), la clonación en células de mamíferos y levaduras (vol. 2), los glucoconjugados y la expresión de proteínas (vol. 3) y la bioinformática (vol. 4).

- 15 Se han descrito procedimientos para la purificación de proteínas, que incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización (Coligan, *et al.* (2000), *Current Protocols in Protein Science*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York). Se han descrito el análisis químico, la modificación química, la modificación postraduccional, la producción de proteínas de fusión y la glicosilación de proteínas (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2000), *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, *et al.* (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, págs. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001, *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO, págs. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001), *BioDirectory*, Piscataway, N.J., págs. 384-391). Se han descrito la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (Coligan, *et al.* (2001), *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999), *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*). Existen técnicas convencionales para caracterizar las interacciones ligando/receptor (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2001), *Current Protocols in Immunology*, vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

- 30 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados (véase, por ejemplo, Sheperd y Dean (eds.) (2000), *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, Nueva York, NY; Kontermann y Dubel (eds.) (2001), *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Nueva York; Harlow y Lane (1988), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 139-243; Carpenter, *et al.* (2000), *J. Immunol.*, 165:6205; He, *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 160:1029; Tang *et al.* (1999), *J. Biol. Chem.*, 274:27371-27378; Baca *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272:10678-10684; Chothia *et al.* (1989), *Nature*, 342:877-883; Foote y Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 224:487-499; patente de EE. UU. n.º 6 329 511).

- 35 Una alternativa a la humanización es utilizar bancos de anticuerpos humanos presentados sobre fagos o bancos de anticuerpos humanos en ratones transgénicos (Vaughan *et al.* (1996), *Nature Biotechnol.*, 14:309-314; Barbas (1995), *Nature Medicine*, 1:837-839; Méndez *et al.* (1997), *Nature Genetics*, 15:146-156; Hoogenboom y Chames (2000), *Immunol. Today*, 21:371-377; Barbas *et al.* (2001), *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Kay *et al.* (1996), *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin *et al.* (1999), *Nature Biotechnol.*, 17:397-399).

- 40 La purificación del antígeno no es necesaria para la generación de anticuerpos. Los animales pueden inmunizarse con células portadoras del antígeno de interés. A continuación, se pueden aislar esplenocitos de los animales inmunizados, y los esplenocitos se pueden fusionar con una línea celular de mieloma para producir un hibridoma (véase, por ejemplo, Meygaard *et al.* (1997), *Immunity*, 7:283-290; Wright *et al.* (2000), *Immunity*, 13:233-242; Preston *et al.*, *supra*; Kaithamana *et al.* (1999), *J. Immunol.*, 163:5157-5164).

- 45 Los anticuerpos pueden conjugarse, por ejemplo, con fármacos de molécula pequeña, enzimas, liposomas, polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos son útiles para fines terapéuticos, diagnósticos, kits u otros, e incluyen anticuerpos acoplados, por ejemplo, a colorantes, radioisótopos, enzimas o metales, por ejemplo, oro coloidal (véase, por ejemplo, Le Doussal *et al.* (1991), *J. Immunol.*, 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 160:3891-3898; Hsing y Bishop (1999), *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002), *J. Immunol.*, 168:883-889).

- 50 Están disponibles procedimientos para citometría de flujo, incluida la clasificación celular activada por fluorescencia ("fluorescence activated cell sorting", FACS), están disponibles (véase, por ejemplo, Owens, *et al.* (1994), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001), *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003), *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Existen reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluidos cebadores y sondas de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos, para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico (catálogo de Molecular Probes (2003), Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; catálogo de Sigma-Aldrich (2003), St. Louis, MO).

Se han descrito procedimientos convencionales de histología del sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986), *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Filadelfia, PA; Louis, *et al.* (2002), *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

- 5 Existen paquetes de informáticos y bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glucosilación y alineaciones de secuencias (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000), *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000), *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren, *et al.* (2002), *Comput. Methods Programs Biomed.*, 68: 177-181; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.*, 133:17-21; von Heijne (1986), *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunomodulación de células humanas mediante C59-08

- 15 C59-08 es una sal sódica del oligodesoxinucleótido 5'-TCGAACGTTCTGAACGTTCTGAAT-3' (SEQ ID NO: 45) con un esqueleto de fosforotioato.

- 20 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de la capa leucoplaquetaria de dos donantes con Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) utilizando procedimientos de separación convencionales. Las PBMC aisladas se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato ("phosphate buffered saline", PBS) que contenía suero bovino fetal ("fetal bovine serum", FBS) al 2 % y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Las células se resuspendieron y se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo en U a 1×10^6 células por pocillo en RPMI 1640 con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Las células se cultivaron en presencia de C59-08 en dosis que variaron de 0,016 µM a 5 µM o 7 µM de ODN control 1040 en una estufa de incubación humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂ en un volumen final de 0.2 ml durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para IFNα2a e IL-10 utilizando los kits de cultivo tisular Meso Scale Discovery human IFNα2a y human IL-10 (Rockville, MD).

Los resultados se muestran en la figura 12. C59-08 induce tanto la producción de IFNα2a como de IL-10 en PBMC humanas con una concentración óptima de 0.2 µM.

Ejemplo 2: Inmunomodulación de muestras de tumores humanos mediante C59-08

Histocultivos de tumores humanos

- 30 Se obtuvieron muestras de tumores humanos de pacientes de fuentes comerciales (Bio-Options, Folio, Coversant Bio y Boston BioSource) y de la Universidad de Rochester. Se recogieron tejidos tumorales frescos en la hora siguiente a la cirugía y se introdujeron en medios de transporte AQIX (AQIX, Reino Unido). Los tejidos se transportaron durante la noche a 4 °C a Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA.

- 35 Los tumores se incluyeron en agarosa UltraPure™ de bajo punto de fusión (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cortaron a 400 µm con Mcllwain™ Tissue Chopper (Stoelting Co., Wood Dale, IL). Los cortes tumorales se situaron en primer lugar en el inserto de cultivo celular Millicell-CM (Millipore, Billerica, CA) y se cultivaron en la interfase entre aire y medio de 1 ml de DMEM suplementado con glucosa 4,5 g/l, L-glutamina, piruvato de sodio (Mediatech, Inc., Manassas, VA), FBS al 10 % (SAFC Biosciences, Lenexa, Kansas), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml en una estufa de incubación humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂.

- 40 Los cortes tumorales fueron cultivados en presencia de 0.1, 0.5, y 1 µM de C59-08 o 1 µM de ODN control 1040 durante 24 horas. Las muestras tumorales se congelaron en hielo seco y se conservaron a 37 °C antes de su procesamiento.

Aislamiento del ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

- 45 El ARN total se aisló por homogeneización en ARN STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX) utilizando un homogeneizador Polytron. El ARN total se extrajo siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la precipitación con isopropanol, el ARN total se volvió a extraer con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) utilizando tubos de luz de bloqueo de fase.

- 50 El ARN total tratado con ADNasa se sometió a transcripción inversa utilizando QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Valencia, CA) según el protocolo del fabricante. Los cebadores se obtuvieron en el mercado en Life Technologies (Foster City, CA). La PCR cuantitativa en tiempo real de 10 ng de ADNc de cada muestra se realizó utilizando cebadores no marcados a 900 nM cada uno con 250 nM de sonda marcada con FAM en una reacción TAQMAN™ RTqPCR en el sistema de detección de secuencias Fluidigm Biomark (Fluidigm, Foster City, CA). Los niveles de ubiquitina se midieron en una reacción separada y se utilizaron para normalizar los datos mediante el

procedimiento $\Delta\Delta$ Ct. Utilizando el valor medio del umbral de ciclo (Ct) para la ubiquitina y el gen de interés para cada muestra, se utilizó la siguiente ecuación para obtener los valores normalizados: $1,8^{(Ct \text{ de ubiquitina} - Ct \text{ del gen de interés})} \times 10^4$.

Resultados del tratamiento

5 El tratamiento *ex vivo* de tumores humanos con C59-08 indujo genes inducibles por IFN α (IFN α 2, MCP1, MCP2, OAS2, IP-10, GBP1, ISG-54, MxB, y TRAIL), citocinas (IFN β , IL-10, IL-12, IL-6, y TNF α) y marcadores de activación inmunitaria (CD80, CD86, CD40, CD70 y OX40L) en histocultivos de carcinoma de células renales (RC) (n = 5), cáncer de pulmón no microcítico (CPCNP) (n = 3) y cáncer de vejiga (n = 1) y colorrectal (n = 1). Los datos con una muestra de un donante de CCR se muestran en la figura 13: (A) genes inducibles por IFN α ; (B) citocinas; y (C) marcadores de activación inmunitaria.

10 Ejemplo 3: Actividad antitumoral de la combinación de anti-IL-10 y C59-08 intratumoral en un modelo animal

El TC40.11D8 es un anticuerpo monoclonal IgG1/kappa de ratón dirigido contra la IL-10 de ratón. El control de isotipo IgG1 de ratón es un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el hexón 25 adenoviral. Ambos anticuerpos se obtuvieron de fuentes internas en forma de caldo congelado (-80 °C).

Formulaciones de anticuerpos

15 El tampón de formulación es específico para cada anticuerpo para estabilizar las proteínas y evitar la precipitación. Las formulaciones tanto para el TC40.11D8 como para el control de isotipo IgG1 de ratón fueron cloruro de sodio 75 mM, fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 3 %, pH 7,3.

Oligodesoxinucleótidos

20 El oligodesoxinucleótido (ODN) de fosforotioato basado en citidina fosfo-guanosina (CpG) CpG 1826 5'-tccatgacgttcctgacgtt-3' (SEQ ID NO: 53) (InvivoGen, San Diego, CA) es un agonista específico de TLR9 de ratón. El CpG 1826 tiene una secuencia de tipo CpG-B. El ODN de fosforotioato basado en CpG C59-08 (Dynavax, Berkeley, CA) es un agonista que activa tanto el TLR9 humano como el de ratón. C59-08 tiene una secuencia de tipo CpG-C: 5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT-3' (SEQ ID NO:45), en la que el 5' y el 3' es un grupo OR.

25 El ODN de control (Dynavax, Berkeley, CA) tiene una secuencia no-CpG con un esqueleto de fosforotioato 5'-TGA CTG TGAACC TTA GAGATG A-3' (SEQ ID NO:54).

Formulaciones de oligodesoxinucleótidos

30 El CpG 1826 se reconstituyó en cloruro de sodio al 0,9 % a una concentración de 2 mg/ml, se dividió en partes alícuotas y se conservó a -20 °C. C59-08 se reconstituyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 4,53 mg/ml, se dividió en partes alícuotas y se conservó a -20 °C. El ODN de control se reconstituyó en PBS a una concentración de 4,47 mg/ml, se dividió en partes alícuotas y se conservó a -20 °C.

Animales

35 Se obtuvieron ratones hembra C57BL/6J de aproximadamente siete a ocho semanas de edad del Laboratorio Jackson (Sacramento, CA). Se suministró pienso convencional y agua sin restricciones. Los animales fueron alojados durante una semana antes del inicio del estudio. El peso promedio de los animales al inicio del estudio (es decir, la implantación del tumor) era de 19 gramos.

40 Los procedimientos relacionados con el cuidado y uso de animales en el estudio fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de los Laboratorios de Investigación Merck. Durante el estudio, el cuidado y la utilización de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en las directrices de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC), la Ley de Bienestar Animal, el Panel de Eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (American Veterinary Medical Association, AVMA) y la Guía para el Cuidado y la Utilización de Animales de Laboratorio del Instituto para la Investigación de Animales de Laboratorio (Institute for Laboratory Animal Research, ILAR).

Preparación e implantación de líneas celulares tumorales

45 La línea celular TC-1, proporcionada por la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, MD) se deriva de células epiteliales pulmonares primarias de ratón que fueron cotransformadas con los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH-16) y el oncogén c-Ha.ras (Lin *et al.*, Cancer Res., 56:21-6, 1996). Los linfocitos TC-1 son singénicos con la cepa de ratón C57BL6/J.

50 Los linfocitos TC-1 se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y geneticina 0,4 mg/ml. Se inyectaron linfocitos TC-1 subconfluentes por vía subcutánea (SC) en 0,1 ml de DMEM sin suero en ambos flancos dorsales inferiores (1×10^5 en el flanco derecho y $0,5 \times 10^5$ en el flanco izquierdo) de cada animal. En primer lugar, se afeitó a los animales con una maquinilla eléctrica en las zonas en que se iban a realizar el implante.

Medidas del tumor y peso corporal

- 5 Los tumores se midieron el día antes de la primera dosis y dos veces por semana a partir de entonces. La longitud y la anchura del tumor se midieron con calibradores electrónicos y el volumen tumoral se determinó mediante la fórmula: $\text{Volumen (mm}^3\text{)} = 0,5 \times \text{Longitud} \times \text{Anchura}^2$, en la que la longitud es la dimensión más larga. Los animales se pesaron el día anterior a la primera dosis y dos veces por semana a partir de entonces. Para evitar sesgos, se eliminaron todos los valores atípicos por peso o volumen tumoral y los ratones restantes se agruparon en diferentes grupos de tratamiento en función del volumen tumoral en el flanco derecho (denominado tumor inyectado).

Preparación de la solución de administración

- 10 Se descongeló el caldo congelado de anticuerpos y se transfirió a hielo húmedo. Para evitar la congelación y descongelación repetidas, cada vial de caldo se descongeló una vez y se dividió en partes alícuotas en volúmenes suficientes para un solo uso. Para ello se utilizaron tubos de polipropileno de baja adherencia. Las partes alícuotas se conservaron a -80°C . Antes de cada administración, se descongeló una parte alícuota y se diluyó hasta la concentración nominal en el diluyente apropiado.
- 15 Antes de cada administración, se descongelaron partes alícuotas de los ODN (ODN de control, CpG 1826, y C59-08) y se diluyeron hasta la concentración nominal en cloruro de sodio al 0,9 %.

Administración de anticuerpos y oligodesoxinucleótidos

- Se administraron mlgG1 de control del isotipo y mlgG1 anti-IL-10 por vía intraperitoneal (IP) a 10 mg/kg en los días 0, 4, 8 y 12. Se administraron ODN de control (2,5 mg/kg), CpG 1826 (1 mg/kg) y C59-08 (2,5 mg/kg) por vía intratumoral (IT) sólo en los tumores del lado derecho en los días 0, 4, 8 y 12.
- 20 Procedimientos estadísticos

- Se compararon los volúmenes tumorales entre tratamientos en cada día de seguimiento. El seguimiento de animales individuales podía interrumpirse anticipadamente debido a una carga tumoral excesiva o a otras razones. En función del motivo y del tamaño del tumor en la última medición, el último volumen tumoral observado se trató como un límite inferior del volumen en todos los días posteriores para ese animal (datos censurados a la derecha).
- 25 Para comparar dos grupos de tratamiento en un día determinado, se utilizó una generalización de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (o prueba del orden de Wilcoxon) que permite datos censurados a la derecha: la versión de Peto y Peto de la prueba de Gehan-Breslow. Los valores de p de dos caras se estimaron a partir de 20 000 reasignaciones aleatorias de animales entre los dos tratamientos comparados. Para controlar la tasa de error familiar en todos los puntos temporales de un determinado par de tratamientos, los valores de p se ajustaron por multiplicidad aplicando el procedimiento maxT de Westfall y Young a las distribuciones de permutación. Se utilizó un valor de p inferior a 0,05 para definir la significación estadística.
- 30

- A efectos descriptivos, los volúmenes de cada día y grupo de tratamiento se resumieron por su mediana. Para tener en cuenta la censura, se estimó una función de distribución para cada día y grupo de tratamiento mediante el procedimiento de Kaplan-Meier, con una banda de confianza utilizando la fórmula de Greenwood en una escala logarítmica. La mediana se estimó como el 50º percentil de la función de distribución, y el intervalo de confianza se obtuvo invirtiendo la banda de confianza. Se utilizó un nivel de confianza del 68 % para que fuera comparable al formato habitual de "media \pm EE" para resumir datos, ya que este último es aproximadamente un intervalo de confianza del 68 % para la media.
- 35

- Cuando el seguimiento de un animal terminaba antes de tiempo, la razón se categorizó y los datos del animal se trataron como sigue: (1) carga tumoral: censor derecho en el último valor medido; (2) ulceración tumoral: censor derecho en el último valor medido, siempre que supere un umbral (1000 mm³); de lo contrario, omitir el animal en momentos posteriores; (3) pérdida de peso/enfermedad (incluido hallado muerto con evidencia de enfermedad): omitir el animal en momentos posteriores; y (4) no relacionado con el tratamiento (por ejemplo, accidente hallado muerto sin evidencia de enfermedad, cese administrativo): censor derecho en el último valor medido, siempre que supere un umbral (1000 mm³); de lo contrario, omitir el animal en momentos posteriores.
- 40
- 45

Resultados del tratamiento

- Los ratones C57BL/6J portadores de tumores TC-1 se agruparon en 5 grupos de tratamiento el día anterior a la primera dosis cuando el volumen medio de los tumores en el flanco derecho alcanzó aproximadamente 60 mm³ (39 mm³-87 mm³): (1) control de isotipo mlgG1 + ODN de control; (2) control de isotipo mlgG1 + C59-08; (3) anti-IL-10 + CpG 1826; (4) anti-IL-10 + ODN de control; y (5) anti-IL-10 + C59-08. El intervalo de volúmenes de los tumores en el flanco izquierdo fue de 0 mm³-113 mm³. La regresión completa (RC) de un tumor se definió como la ausencia de un tumor medible en el momento en que se realizó la medición, dado que un tumor era medible el día en que se agruparon los animales.
- 50

Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11. La combinación de anti-IL-10 con CpG 1826 intratumoral (grupo 3) o C59-08 (grupo 5) produjo una RC de los tumores inyectados en al menos 3 animales (figura 10A). Sin embargo, sólo el anti-IL-10 combinado con C59-08 (grupo 5) produjo una RC (tres de diez animales) de los tumores no inyectados (figura 11A). Otros tratamientos, incluidos la monoterapia con C59-08 (grupo 2), no produjeron RC tanto en tumor inyectados como no inyectados. En comparación con el tratamiento de control, la monoterapia con anti-IL-10 y la monoterapia con C59-08, la administración de anti-IL-10 combinado con C59-08 (IT) produjo una reducción significativa de los volúmenes de los tumores inyectados en los días 6, 9 y 12 ($p < 0,05$, multiplicidad ajustada en todos los puntos temporales) (figura 10B-D). En comparación con el tratamiento de control y la monoterapia anti-IL-10, la administración de anti-IL-10 combinado con C59-08 (IT) produjo una reducción significativa de los volúmenes de los tumores no inyectados en los días 6, 9 y 12 ($p < 0,05$, multiplicidad ajustada en todos los puntos temporales) (figura 11B-D).

Ejemplo 4: Actividad antitumoral de una combinación de anticuerpo anti-PD-1 sistémico y oligonucleótido CpG-C intratumoral

Anticuerpos.

Se utilizaron dos anticuerpos bloqueantes anti-PD-1: 29F.1A12 en estudios iniciales y RMP1-14 en estudios posteriores. Cada dosis contenía 250 µg de anticuerpo/inyección. 29F.1A12 es un anticuerpo anti-PD-1 de ratón purificado de rata (n.º de catálogo 135202) obtenido en BioLegend (San Diego, CA). El anticuerpo anti-PD-1 de BioLegend es un anticuerpo monoclonal IgG2a, kappa de rata. El clon RMP1-14 es un anticuerpo anti-PD-1 de ratón purificado de rata (n.º de catálogo BE0146) obtenido en BioXCell Inc. (West Lebanon, NH). El anticuerpo anti-PD-1 de BioXCell es un anticuerpo monoclonal IgG2a de rata.

Oligodesoxinucleótidos.

El oligodesoxinucleótido de control no-CpG (CTRL-ODN) tiene la secuencia 5'-TGA CTG TGA ACC TTA GAG ATG A-3' (SEQ ID NO:54) con un esqueleto de fosforotioato. Cada dosis contenía 50 µg ODN/inyección.

Animales y células.

Los ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de edad se obtuvieron de Harlan Laboratories (Indianápolis, IN). CT26 es una línea celular murina de fibroblastos (CT26.WT, n.º de catálogo CRL-2638™) obtenida en American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). CT26 es una línea celular de carcinoma de colon indiferenciado inducida por N-nitroso-N-metiluretano que se utiliza con frecuencia como modelo para ensayar tratamientos de inmunoterapia (Wang *et al.*, J. Immunol., 154: 4685-4692, 1995).

Pauta posológica en monoterapia.

Se inyectaron aproximadamente 8×10^4 células CT26 por vía subcutánea (SC) en el flanco de ratones BALB/c ($n = 5$ a 6/grupo) el día 0, utilizando un procedimiento publicado anteriormente (Brattain *et al.*, Cancer Res., 40:2142-2146, 1980). Se inyectó el anticuerpo bloqueante anti-PD-1 por vía intraperitoneal (IP) los días 5, 8, 11, 14 y 18.

Pauta posológica de la terapia combinada.

Se inyectaron aproximadamente 8×10^4 células CT26 por vía subcutánea (SC) en el flanco de ratones BALB/c ($n = 5$ a 6/grupo) el día -7 (Brattain *et al.*, *supra*, 1980). Los regímenes de tratamiento comenzaron el día 0 del estudio (7 días después de la implantación de las células tumorales; longitud promedio del tumor 5 mm). Los ratones se dejaron sin tratar o se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con 200 mcg de un anticuerpo bloqueante anti-PD-1 de ratón en un volumen de 200 µl (formulación pura suministrada por el fabricante). Se administraron inyecciones de anti-PD-1 los días 0, 3, 7, 10, 14, 18, 21 y 25. Tras varias inyecciones de anti-PD-1 (día 12), se inyectó a los ratones por vía intratumoral (IT) 50 mcg de C59-08 o CTRL-ODN en un volumen de 150 µl de PBS. Las inyecciones de C59-08 y CTRL-ODN fueron administradas en los días 12, 14, 18, 21, 25 y 28. En ambos grupos, el tratamiento con anti-PD-1 continuó como se ha descrito anteriormente. A otro grupo de ratones con tumores de tamaño similar (las células tumorales se inyectaron el día 0 del estudio) se les inyectó C59-08 solo los días 12, 14, 18, 21, 25 y 28, en ausencia de pretratamiento con anti-PD-1.

Administración de la terapia combinada y régimen de reducción de linfocitos T.

Se inyectaron aproximadamente 8×10^4 células tumorales CT-26 SC en el flanco de los ratones el día 0 (Brattain *et al.*, *supra*, 1980). Los ratones se dejaron sin tratar o se trataron con anti-PD-1 mediante inyección IP los días 5, 9, 12, 15, 19, 22, 26 y 29. Tras varias inyecciones de anti-PD-1 (Día 15), los ratones fueron tratados con C59-08 mediante inyección IT los días 15, 19, 22, 26 y 29, o se dejaron sin tratar. Se administraron anticuerpos reductores anti-CD8 o anti-CD4 mediante inyección IP los días 14, 15, 16, 19, 22, 26 y 29 a los ratones del grupo tratado con anti-PD1/C59-08. Los ratones tratados con anti-PD-1 recibieron 250 µg/inyección del anticuerpo BioXCell RMP1-14. Los ratones también recibieron 50 µg/inyección de C59-08. Para las reducciones, los ratones recibieron 250 µg/inyección de un Ab anti-CD8 (YTS 169.4) o un Ab anti-CD4 (GK1.5), ambos obtenidos de BioXCell.

Administración de la terapia combinada y régimen de rechazo tumoral contralateral.

Se inyectaron aproximadamente 8×10^4 células CT-26 SC en el flanco izquierdo el día 0 y en el flanco derecho el día 2. Los ratones se dejaron sin tratar (n = 18) o se inyectaron con Ab anti-PD-1, IP (n = 19) en los días 5, 7, 11, 14, 21, 23 y 26. Después de varias inyecciones de Ab anti-PD-1 (día 14), los ratones tratados con anti-PD-1 fueron inyectados con C59-08 en el tumor izquierdo los días 14, 19, 21, 23 y 26. Los ratones tratados con Ab anti-PD-1 recibieron 250 µg/inyección del anticuerpo BioXCell RMP1-14, y 50 µg/inyección de C59-08.

Procesamiento del tumor para la extracción de leucocitos infiltrantes del tumor.

Los tumores se situaron en una placa de Petri con unas pinzas y se añadieron 5 ml de FCS al 5 % en medio RPMI. Los tumores se cortaron en trozos pequeños con tijeras y se picaron con la parte inferior de un émbolo de una jeringa de 3 ml hasta que el tejido tumoral pudo pipetearse con una pipeta de 50 µl. La suspensión de tejido tumoral se transfirió a un tubo de 50 ml y la placa de Petri se enjuagó con 5 ml de FCS al 5 % en medio RPMI dos veces. La suspensión de tejido se digirió en una mezcla de enzimas de digestión tumoral 100X que contenía collagenasa 4 50 mg/ml (Sigma-Aldrich C5138-100MG collagenasa de *Clostridium histolyticum*) y ADNasa I 2 mg/ml (Sigma-Aldrich DN25-100MG desoxirribonucleasa I de páncreas bovino). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 minutos con agitación suave cada 3 min. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 70 µm, y el filtro se lavó posteriormente con FCS al 5 % en RPMI. Las muestras se centrifugaron a 1400 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente. Las células se volvieron a suspender en 1 a 5 volúmenes de FCS al 5 % en RPMI en función del tamaño del tumor. Las células de la suspensión resultante se contaron con un hemocitómetro.

Extracción de ARN de tumores completos para el análisis de la expresión génica.

Los tumores enteros se congelaron en RNeasy (n.º de catálogo 76104) obtenido en Qiagen (Venlo, NL). Tras la descongelación, se aisló el ARN total a partir de 30 mg de tumor total homogeneizado utilizando el kit RNeasy Mini Kit (n.º de catálogo 74106) de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los tumores enteros conservados en reactivo de estabilización de ARN RNeasy se descongelaron, se pesaron y se introdujeron en un tubo Eppendorf PCRclean Safe-Lock de 2 ml que contenía una esfera de acero inoxidable de 5 mm y tampón RLT con BME (700 µl/30 mg de tejido, hasta 1 ml de RLT por tubo). Los tubos se situaron en el TissueLyser Adapter Set 2x24, que se hizo funcionar dos veces durante 2 min a 25 Hz. Los lisados se centrifugaron durante 3 minutos a 13 500 rpm. El sobrenadante se transfirió posteriormente a un nuevo tubo de 15 ml. Se añadió tampón RLT según fuera necesario para cumplir el requisito de 700 µl/30 mg. Se utilizaron aproximadamente 700 µl de lisado y el resto se conservó a -80 °C. Se añadió un volumen de etanol al 70 % al lisado aclarado y se transfirieron 700 µl de la muestra a una columna de centrifugación RNeasy en un tubo de recogida de 2 ml y se centrifugó durante 1 minuto a 13 500 rpm. Si la muestra superaba los 700 µl, se procesaron partes alícuotas sucesivas en la misma columna de centrifugación RNeasy y se desechó la corriente. Se añadieron 350 µl de tampón RW1 a la columna de centrifugación RNeasy y se centrifugaron las muestras. Se añadió la mezcla de incubación DNase I (80 µl:10 µl de solución madre de DNase I más 70 µl de tampón RDD) directamente a la columna de centrifugación RNeasy y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 350 µl de tampón RW1, se centrifugaron los tubos y se transfirió la columna de centrifugación RNeasy a un tubo nuevo. Se añadieron a la columna dos volúmenes de 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 1 minuto para lavar la columna. La columna de centrifugación RNeasy se transfirió a un nuevo tubo de recogida de 2 ml y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. La columna de centrifugación RNeasy se transfirió a un nuevo tubo de recogida de 15 ml y se añadieron 45 µl de agua sin ARNase (Life Technologies) a la columna y se centrifugó durante 1 min a 13 500 rpm para eluir el ARN.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real cuantitativa (TAQMAN)

Cinco (5) µg de ARN eluido se sometieron a transcripción inversa utilizando tampón de primera cadena 5X (Life Technologies), albúmina de suero bovino (Life Technologies), inhibidor de ribonucleasas RNasin recombinante (Promega, Madison, WI), Oligo(dT)15 (Promega), cebadores aleatorios (Promega), dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), DTT (Life Technologies) y transcriptasa inversa SuperScript III (Life Technologies) utilizando una máquina de PCR en tiempo real MyiQ (Bio-Rad). Los datos se normalizaron en función de la expresión de ubiquitina con condiciones de ciclado de 15 min a 95 °C, seguidos de 40 rondas de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. La cuantificación del ARNm se realizó con la mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Life Technologies) Tanto la cuantificación como el análisis se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus de Applied Biosystems (Carlsbad, CA) utilizando el software StepOne v2.1. Los niveles relativos de expresión génica se calcularon mediante la siguiente fórmula: $1.8^{(Ct \text{ promedio de ubi-Ct del gen})} \times 100\,000$.

Separación de células tumorales con medio de separación de células de mamífero Lympholyte®.

Este procedimiento se utilizó para separar los leucocitos infiltrantes del tumor ("tumor infiltrating leukocytes", TIL) de las células tumorales. La suspensión celular obtenida de los tumores se llevó a 7 ml añadiendo FCS al 5 % en RPMI según fuera necesario. Se añadieron 7 ml de medio de separación de células de mamífero Lympholyte® (Cedarlane, n.º de catálogo: CL5120) a un tubo cónico de centrifuga de 15 ml y, a continuación, se vertieron cuidadosamente 7 ml de la suspensión celular en la parte superior. Las células se centrifugaron a $800 \times g$ durante 20 min a temperatura ambiente sin frenado. La capa superior que se formó se transfirió a un tubo de 50 ml y se rellenó con FCS al 5 % en

medio RPMI hasta la marca de 50 ml. Las células se sedimentaron a 1800 rpm durante 7 min a temperatura ambiente, con aceleración y frenado máximos. Se aspiró el medio y el sedimento que contenía TTL se resuspendió en 1 ml de FCS al 5 % en medio RPMI. Una fracción de las células (150 µl) se situó en placas de 96 pocillos con fondo en U, se sedimentó a 2000 rpm durante 3 min y se resuspendió con 250 µl de tampón RLT para los ensayos de expresión génica. El resto de las células se utilizó para el análisis FACS, utilizándose aproximadamente 100-150 µl de la muestra de TIL para cada panel de tinción.

Estimulación in vitro de leucocitos infiltrantes del tumor para la producción de citocinas.

Se estimularon aproximadamente $1,5 \times 10^5$ TIL aislados con medio de separación de células de mamífero Lympholyte® (Cedarlane, n.º de catálogo: CL5120) durante 3 horas a 37 °C con un cóctel de activación de leucocitos que contenía BD GolgiPlug (500X) obtenido en BD Biosciences (n.º de catálogo 550583) con acetato miristato de forbol (PMA), ionomicina y brefeldina A (BFA) o BFA solo (3 µg/ml de concentración final), en un volumen final de 200 µl. Se analizó la producción de citocinas en las muestras mediante tinción intracelular y citometría de flujo.

Tinción celular y análisis FACS (clasificación celular activada por fluorescencia)

Todos los reactivos se mantuvieron a 4 °C. Todos los lavados consistieron en pipetear las suspensiones celulares cultivadas en placa arriba y abajo tres veces, seguido de una centrifugación a 1800 rpm durante 3 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Las células se precipitaron después de la estimulación durante 3 horas y se resuspendieron en 80 µl/pocillo de tampón FACS (PBS, FBS al 10 %, azida de sodio al 0,1 %) para cada muestra para crear un cóctel que incluía 2 µl de bloqueador de Fc y 0,51 µg/ml de cada anticuerpo de interés por muestra. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 20 minutos antes de lavarlas y resuspenderlas en 200 µl/pocillo de tampón FACS. Para fijar las células, se añadieron 200 µl de paraformaldehído al 1 % a cada pocillo y se incubó la placa en la oscuridad a 4 °C durante 20 minutos para la tinción de la superficie. A continuación, las células se lavaron, se precipitaron y se resuspendieron en 300 µl/pocillo de tampón FACS, y los datos se adquirieron inmediatamente utilizando un citómetro de flujo (LSRII de BD Bioscience).

Para la tinción intracelular, las muestras almacenadas durante la noche a 4 °C se sedimentaron y resuspendieron en tampón de saponina al 0,5 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente para permeabilizar las células. Después de un centrifugado adicional, las células se tiñeron con 80 µl de mezcla de tinción más 2 µl de bloqueador de Fc y anticuerpos de interés en tampón de saponina al 0,5 % en PBS durante 30 min a 4 °C: 2,5 µl de anti-IFN-γ-PE de ratón (Tonbo Biosciences, n.º de catálogo 50-7311-U100), y 2,5 µl de anti-TNF-α-APC de ratón (Biolegend, n.º de catálogo 506308). Las células se precipitaron y lavaron antes de resuspenderlas en 300 µl de tampón FACS, y los datos se adquirieron inmediatamente utilizando un citómetro de flujo (LSRII de BD bioscience).

Los ratones portadores de nódulos tumorales CT-26 producen una respuesta heterogénea al bloqueo sistémico de PD-1.

El tamaño de los nódulos tumorales se midió 2 días después de la última inyección de anti-PD-1 (día 21). La figura 14A muestra que 17 de 43 (un 40 %) tumores mostraron una respuesta al tratamiento con anti-PD-1, y 8 de los 17 tumores (un 19 %) habían remitido completamente. Los 26 tumores restantes del total de 43 tumores presentaban una distribución de tamaño similar a la de los ratones de control (CTRL) no tratados. Es decir, el 60 % de los tumores respondieron al bloqueo de PD-1. Como se muestra en la figura 14B, los tumores que tuvieron una respuesta al tratamiento anti-PD-1 tienen un mayor número de leucocitos infiltrantes del tumor (TIL) en comparación con los tumores no tratados (CTRL) o los tumores que no respondieron al tratamiento con anti-PD-1. Los tumores enteros, que se recogieron 2-4 días después de la última inyección de anti-PD-1, se procesaron para el análisis de la expresión génica utilizando un ensayo TAQMAN. La respuesta al anti-PD-1 se correlacionó con el nivel de expresión de marcadores de infiltración y activación de linfocitos T (figura 14C) y marcadores de respuesta al interferón de tipo I (figura 14D).

Estos datos demuestran que el modelo tumoral CT-26 sigue una clara respuesta bimodal: los ratones capaces de producir una respuesta antitumoral presentan un control significativo del crecimiento tumoral, mientras que los ratones que no son capaces de responder al tratamiento avanzan al mismo ritmo de crecimiento que los tumores no tratados. Además, estos datos muestran una correlación negativa entre el volumen tumoral y la expresión de la infiltración y activación de linfocitos T, y los genes que responden al interferón de tipo I.

El C59-08 intratumoral revierte el escape tumoral del tratamiento con anti-PD-1 y conduce a un control inmunomediado a largo plazo del crecimiento tumoral.

La figura 15A muestra el volumen tumoral medio a lo largo del tiempo, mientras que la figura 15B-C muestra la supervivencia a largo plazo de ratones de diferentes grupos de tratamiento. El C59-08 intratumoral con tratamiento anti-PD-1 continuado mejora la tasa de supervivencia en comparación con la monoterapia con C59-08 o anti-PD-1. Este estudio demostrativo preliminar indica que la combinación de C59-08 con un anticuerpo anti-PD-1 es capaz de convertir a los no respondedores en respondedores capaces de un rechazo completo del tumor.

Los linfocitos TCD8+, pero no los linfocitos T CD4-, son necesarios para la eficacia del tratamiento combinado de anti-PD-1 más C59-08.

La figura 16 demuestra que la reducción de linfocitos T CD8+ suprime la eficacia del tratamiento combinado de anti-PD-1 más C59-08.

La terapia combinada de anti-PD-1 más C59-08 permite el rechazo de tumores contralaterales.

La figura 17 demuestra que 13 de 19 ratones (un 68 %) sobrevivieron y rechazaron tanto los nódulos tumorales inyectados con C59-08 como los no inyectados con C59-08 en el grupo tratado con anti-PD-1 más C59-08. Los ratones no tratados no presentaron una reducción del tamaño del tumor ni rechazaron ningún tumor (un 0 % de supervivencia). Por lo tanto, la respuesta antitumoral generada por la terapia combinada de C59-08 más anti-PD-1 es capaz de eliminar tumores en un sitio distante de la inyección de C59-08.

El C59-08 combinado con un bloqueo de PD-1 induce fuertemente la infiltración y activación de linfocitos T CD8+ polifuncionales.

En el momento de la recogida, los tumores tratados con anti-PD-1 se agruparon en función de la tasa de respuesta. El volumen tumoral (mm^3) se calculó según la fórmula: $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud}/2$. Los tumores clasificados como no respondedores al anti-PD-1 presentaron una reducción promedio del volumen de aproximadamente un 20 % en comparación con los tumores tratados con oligonucleótidos de control. Por el contrario, los tumores clasificados como respondedores al anti-PD-1 presentaron una reducción promedio del volumen de aproximadamente un 80 % en comparación con los tumores tratados con oligonucleótidos de control.

Como se muestra en la figura 18A-D, se demostró que C59-08 sinergiza fuertemente con anti-PD-1 para inducir la infiltración y diferenciación de linfocitos T CD8 en células polifuncionales capaces de producir concomitantemente IFN-gamma y TNF-alfa. En resumen, el aumento en el número y el estado de activación del infiltrado de linfocitos T CD8+ de los tumores tratados con la combinación es incluso mejor que el de los tumores que responden al anti-PD-1 en ausencia de C59-08. Esto indica que el C59-08 tiene la capacidad de mejorar las respuestas antitumorales tanto en respondedores a anti-PD-1, como en no respondedores a anti-PD-1.

La monoterapia con C59-08 es eficaz para reducir el volumen tumoral e inducir la expresión de genes inflamatorios y estimulados por interferón.

Ratones portadores de carcinomas de colon CT26 fueron tratados intratumoralmente (IT) con C59-08 o un oligodesoxinucleótido de control. El día 25 (3 días después del último tratamiento), el grupo inyectado con el CTRL-ODN recibió eutanasia debido al aumento excesivo del tamaño de los tumores. El día 35 (13 días después del último tratamiento), el grupo inyectado con C59-08 recibió eutanasia. En el día 35, dos de los seis ratones tratados con C59-08 rechazaron el tumor, sin dejar tejido disponible para la recogida. En estos casos, se utilizó un valor cero para calcular el volumen tumoral medio. Los cuatro nódulos tumorales restantes de un total de seis se utilizaron para extraer TIL.

Como se muestra en la figura 19A-B, el C59-08 fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral e inducir la expresión de genes estimulados por IFN (ISG15, ISG20, IRF7, MX1, IP-10, e IFIT) e inflamatorios (MIG, TNF-alfa, e IFN-gamma) en leucocitos purificados de los tumores tratados. Esto indica que el C59-08 es capaz de inducir una regulación al alza de larga duración de un patrón de expresión génica favorable en los TIL.

Resumen

Un anticuerpo contra el receptor PD-1 de la superficie de los linfocitos T actúa bloqueando la vía de inhibición inmunitaria que activan las células cancerosas (Wolchok y Chan, Nature, 515:496-498, 2014). Ahora bien, tal como se describe en el presente documento, un ODN de CpG-C denominado C59-08 demostró ser eficaz cuando se administra solo, o combinado con un anticuerpo contra PD-1, para inhibir el crecimiento de tumores establecidos en el modelo murino CT26 de carcinoma de colon trasplantable. En concreto, el C59-08 fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral, aumentar el número de TIL e inducir un patrón de expresión génica deseable. Aunque C59-08 administrado solo no pudo afectar el rechazo tumoral, se demostró que C59-08 sinergiza con el tratamiento con anti PD-1 dando como resultado el rechazo de tumores establecidos y un aumento en la duración de la supervivencia sin recaída. De modo llamativo, la adición de C59-08 intratumoral al tratamiento con anti-PD-1 establecida dio como resultado la infiltración conspicua de linfocitos T activadas que se correlaciona con el rechazo tumoral. Así, la combinación de un anticuerpo anti-PD1 y un ODN CpG-C ha demostrado ser superior en la inducción del rechazo tumoral que cualquiera de los dos agentes por separado.

Ejemplo 5: Ensayo de fase Ib/2 de C59-08 intratumoral combinado con pembrolizumab en pacientes con melanoma metastásico.

La parte 1 (fase 1b de escalada de la dosis) evalúa 3 niveles de dosis escalonadas de C59-08 en pacientes con melanoma metastásico, y la parte 2 (fase 2 de expansión) consistirá en cohortes de expansión para evaluar más a fondo la eficacia y la seguridad en poblaciones específicas de melanoma. Las poblaciones de pacientes incluyen:

- 1) Pacientes con melanoma metastásico que no han recibido tratamiento con el receptor de muerte programada-1/ligando-1 (anti-PD-1/L1);

2) Pacientes con melanoma metastásico con enfermedad progresiva confirmada mientras reciben tratamiento con anti-PD-1.

En ambas partes, los pacientes son tratados con 200 mg IV de pembrolizumab cada 3 semanas hasta la progresión o durante un máximo de 45 semanas después de la primera dosis.

5 En la parte 1, a partir del día 1, los pacientes son tratados con 4 dosis semanales de C59-08 de 2, 4 u 8 mg, seguidas de 1 dosis cada 3 semanas hasta la progresión o durante un máximo de 24 semanas después de la primera dosis. El C59-08 se inyecta intratumoralmente en la lesión A, el mismo sitio utilizado durante todo el ensayo. Si en algún momento durante el tratamiento, la lesión A ha remitido completamente, las inyecciones restantes de C59-08 se administran mediante inyección peritumoral en el lugar de la lesión A.

10 En la parte 2 en las cohortes de expansión, cada paciente se trata con pembrolizumab combinado con C59-08 usando la dosis seleccionada de la parte 1.

En la cohorte 1 (no ha recibido tratamiento con anti-PD-1/L1), a partir del día 22, los pacientes se tratan con C59-08 una vez por semana durante 4 semanas, seguido de una vez cada 3 semanas durante 9 semanas.

15 En la cohorte 2 (enfermedad progresiva tras tratamiento con anti-PD-1), a partir del día 1, los pacientes se tratan con C59-08 una vez por semana durante 4 semanas, seguido de una vez cada 3 semanas durante nueve semanas.

En la parte 2, el C59-08 se inyecta intratumoralmente en hasta cuatro lesiones (lesión A, lesión B, lesión C, lesión D), y se utiliza el mismo sitio o sitios durante todo el ensayo. Si en algún momento durante el tratamiento la lesión o lesiones inyectadas remiten completamente, el C59-08 se administra mediante inyección peritumoral en el sitio o sitios de las lesiones inyectadas.

20 Referencias bibliográficas

1. Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed R. y Freeman G.J., The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection, *Nature Immunology* (2007), 8:239-245.
2. Dong H. *et al.*, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion, *Nat. Med.*, agosto de 2002, 8(8):793-800.
- 25 3. Yang *et al.*, PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells *in vitro*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, junio de 2008, 49(6) (2008): 49: 2518-2525.
4. Ghebeh *et al.*, The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors, *Neoplasia* (2006), 8: 190-198.
- 30 5. Hamanishi J. *et al.*, Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer, *Proceeding of the National Academy of Sciences* (2007): 104: 3360-3365.
6. Thompson R.H. *et al.*, Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer, *Clinical genitourin. Cancer* (2006): 5: 206-211.
- 35 7. Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., *et al.*, Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer, *Clinical Cancer Research* (2007), 13:2151-2157.
8. Ohigashi Y. *et al.*, Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand 2 expression in human esophageal cancer, *Clin. Cancer Research* (2005): 11: 2947-2953.
- 40 9. Inman *et al.*, PD-L 1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression, *Cancer* (2007): 109: 1499-1505.
10. Shimauchi T. *et al.*, Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and nonneoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell Leukemia/ Lymphoma, *Int. J. Cancer* (2007): 121:2585-2590.
- 45 11. Gao *et al.*, Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma, *Clinical Cancer Research* (2009), 15:971-979.
12. Nakanishi J., Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers, *Cancer Immunol. Immunother.*, (2007), 56: 1173-1182.
13. Hino *et al.*, Tumor cell expression of programmed cell death-1 is a prognostic factor for malignant melanoma, *Cancer* (2010): 00: 1-9.

14. Ghebeh H., Foxp3+ tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: implication for immunotherapy, BMC Cancer, febrero de 2008, 23, 8:57.

15. Ahmadzadeh M. *et al.*, Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired, Blood (2009), 114: 1537-1544.

5 16. Thompson R.H. *et al.*, PD-1 is expressed by tumor infiltrating cells and is associated with poor outcome for patients with renal carcinoma, Clinical Cancer Research (2007), 15: 1757-1761.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una terapia combinada que comprende un antagonista de PD-1 y un agonista de TLR9, en la que el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C, en la que:
 - 5 (a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende: (a) CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:1, 2 y 3 y CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:4, 5 y 6; o (b) CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:7, 8 y 9 y CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:10, 11 y 12; y
 - 10 (b) el agonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CpG-C, en la que el oligonucleótido de tipo CpG-C comprende 5'-TCG N_q TTCGA ACG TTC GAA CGT TCG AAT-3', en la que N son nucleósidos y q = 4.
2. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del cáncer en el individuo de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido de tipo CpG-C es una sal de sodio, y el oligonucleótido es un oligodesoxinucleótido con un esqueleto de fosforotioato.
3. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - 15 cáncer en el individuo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 humana y bloquea la unión de PD-L1 humano a PD-1 humana.
4. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - 20 cáncer en el individuo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antagonista de PD-1 también bloquea la unión de PD-L2 humano a PD-1 humana.
5. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - cáncer en el individuo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la cadena pesada comprende SEQ ID NO:21, y la cadena ligera comprende SEQ ID NO:22.
6. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - 25 cáncer en el individuo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el antagonista de PD-1 es pembrolizumab o una variante de pembrolizumab.
7. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - 30 cáncer en el individuo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el cáncer es un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer de riñón de células claras, un carcinoma de células escamosas de cabeza/cuello, un carcinoma de células escamosas de pulmón, un melanoma maligno, un cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un cáncer de células renales, un cáncer de pulmón microcítico (CPM) o un cáncer de mama triple negativo.
8. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - 35 cáncer en el individuo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el cáncer es un melanoma avanzado o metastásico.
9. La composición que comprende un antagonista de PD-1 o un agonista de TLR9 para su uso en el tratamiento del
 - 40 cáncer en el individuo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el cáncer tiene un resultado positivo para PD-L1 humano.

hPD-1.08ACDR1 de cadena ligera(SEQ ID NO:1)

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His

hPD-1.08ACDR2 de cadena ligera(SEQ ID NO:2)

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

hPD-1.08ACDR3 de cadena ligera(SEQ ID NO:3)

Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr

hPD-1.08ACDR1 de cadena pesada(SEQ ID NO:4)

Ser Tyr Tyr Leu Tyr

hPD-1.08ACDR2 de cadena pesada(SEQ ID NO:5)

Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys Ser

hPD-1.08ACDR3 de cadena pesada(SEQ ID NO:6)

Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr

FIG. 1

hPD-1.09A CDR1 de cadena ligera(SEQ ID NO:7)

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His

hPD-1.09A CDR2 de cadena ligera(SEQ ID NO:8)

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser

hPD-1.09A CDR3 de cadena ligera(SEQ ID NO:9)

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr

hPD-1.09A CDR1 de cadena pesada(SEQ ID NO:10)

Asn Tyr Tyr Met Tyr

hPD-1.09A CDR2 de cadena pesada(SEQ ID NO:11)

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn

hPD-1.09A CDR3 de cadena pesada(SEQ ID NO:12)

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr

FIG. 2

109A-H región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:13)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser
 Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr
 Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

409A-H cadena pesada de longitud completa (SEQ ID NO:14)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser
 Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr
 Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

FIG. 3

K09A-L-11 región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:15)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr
Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe
Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

K09A-L-16 región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:16)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu
Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr
Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

K09A-L-17 región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:17)

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu
Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr
Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

FIG. 4

K09A-L-11 cadena ligera de longitud completa (SEQ ID NO:18)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
 Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr
 Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

K09A-L-16 cadena ligera de longitud completa (SEQ ID NO:19)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu
 Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr
 Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

FIG. 5A

K09A-L-17 cadena ligera de longitud completa (SEQ ID NO:20)

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu
 Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr
 Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

FIG. 5B

Pembrolizumab

Cadena pesada (SEQ ID NO: 21)

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG 50
 INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD 100
 YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK 150
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT 200
 YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT 250
 LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT 350
 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL 400
 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK 447

Cadena ligera (SEQ ID NO:22)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPKGQAPRL 50
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL 100
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV 150
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLISKADY EKHKVYACEV 200
 THQGLSSPVT KSFNRGEC 219

FIG. 6

Nivolumab

Cadena pesada (SEQ ID NO:23)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV 50
 IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND 100
 DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV 150
 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH 200
 KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP 250
 EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300
 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE 350
 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY 400
 SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440

Cadena ligera (SEQ ID NO:24)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ 100
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
 LSSPVTKSFN RGEC 214

FIG. 7

Humanizado x [IL-10_H] mAb (JES3.12G8) IgG1 / Kappa (CK)

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de hul2G8.
Las CDR están subrayadas.

```

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKTSONIE ENLAWYQQKP GKAPKLLIYN
51 ASPLQAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCHQ YYSGYTFGPG
101 TKLELKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD
151 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT TL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
201 SSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 35)

```

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hul2G8.
Las CDR están subrayadas.

```

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTES DYHMAWVRQA PGKGLEWVAS
51 ITLDATYTTY RDSVRGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARHR
101 GFSVWLDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVQLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY
201 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
      (SEQ ID NO: 34)

```

FIG.8

Ratón x IL-10_M mAb (TC40.11D8) IgG1/ Kappa (HY)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 11D8

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD DYGHSEFMHWY QKPGQPPKL
51 LIWRASTLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDVATY YCQQGNEDPW
101 TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO: 37)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 11D8

1 QVQLKQSGPG LVQPSQSLSI TCTVSGFSLT NYGVHWVRQS PGKGLEWLGV
51 IWSGGSTDYN AAFISRLSIN KDNSKSQVFF KMNSLQANDT AIYYCARNRG
101 YDVYFDYWGQ GTTLTVSS (SEQ ID NO: 36)

FIG.9

Volúmenes individuales de tumores inyectados en el modelo TC-1 bilateral

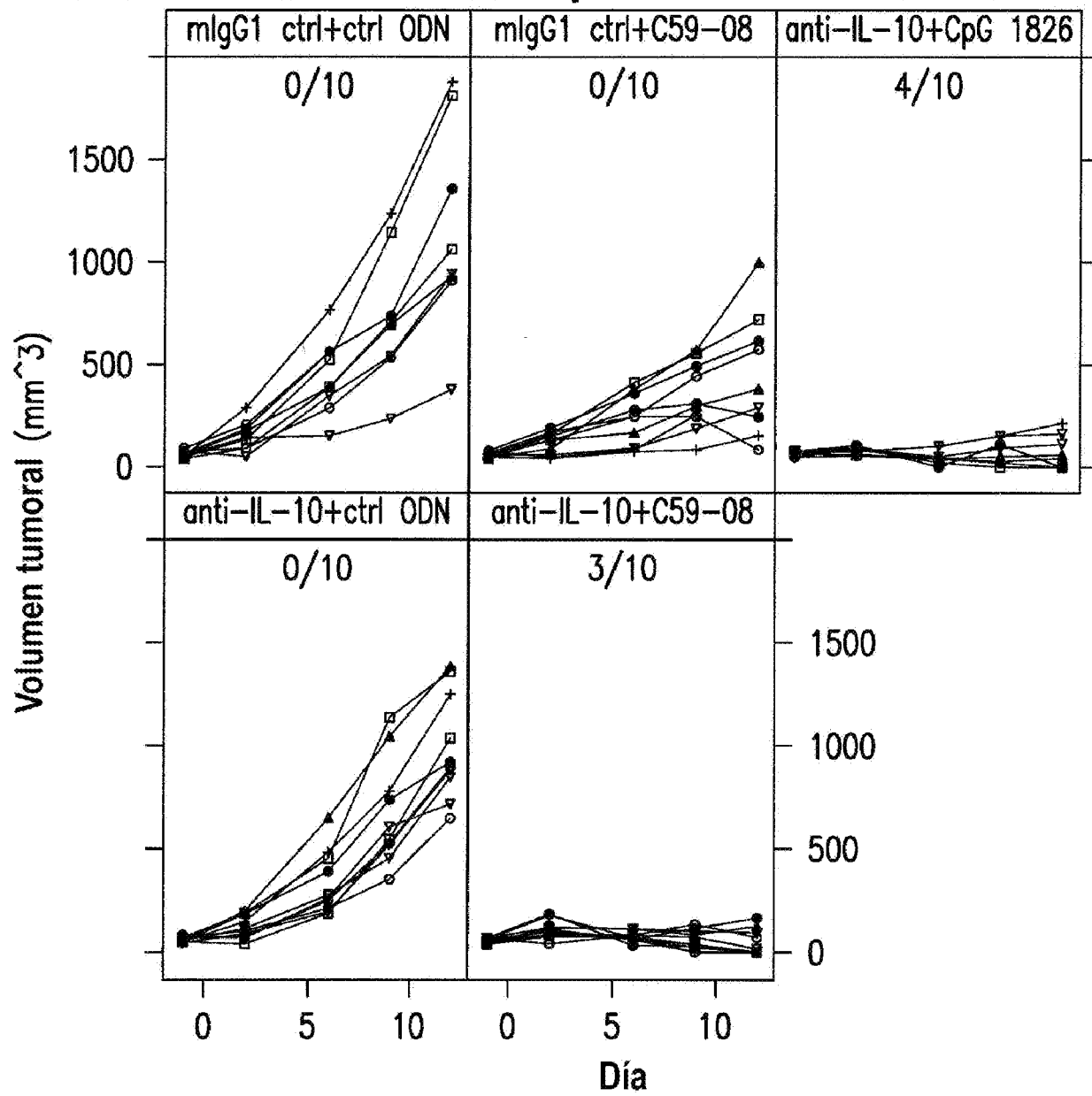
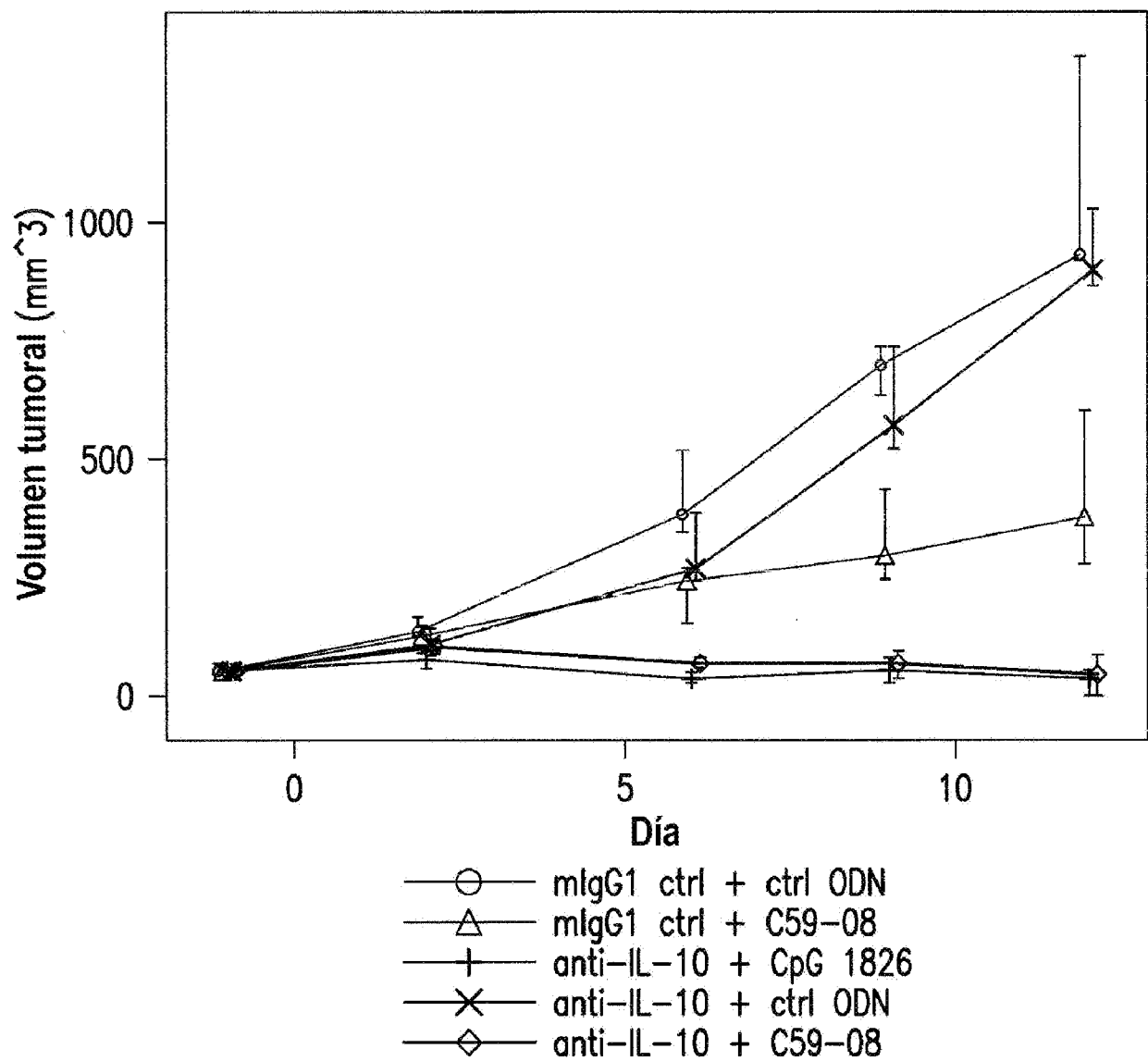


FIG.10A

Mediana de los volúmenes de tumores inyectados en el modelo TC-1 bilateral



(las barras de error muestran los intervalos de confianza del 68 %)

FIG. 10B

Comparación de los volúmenes de tumores inyectados entre tratamientos, por día en el modelo de tumor bilateral TC-1

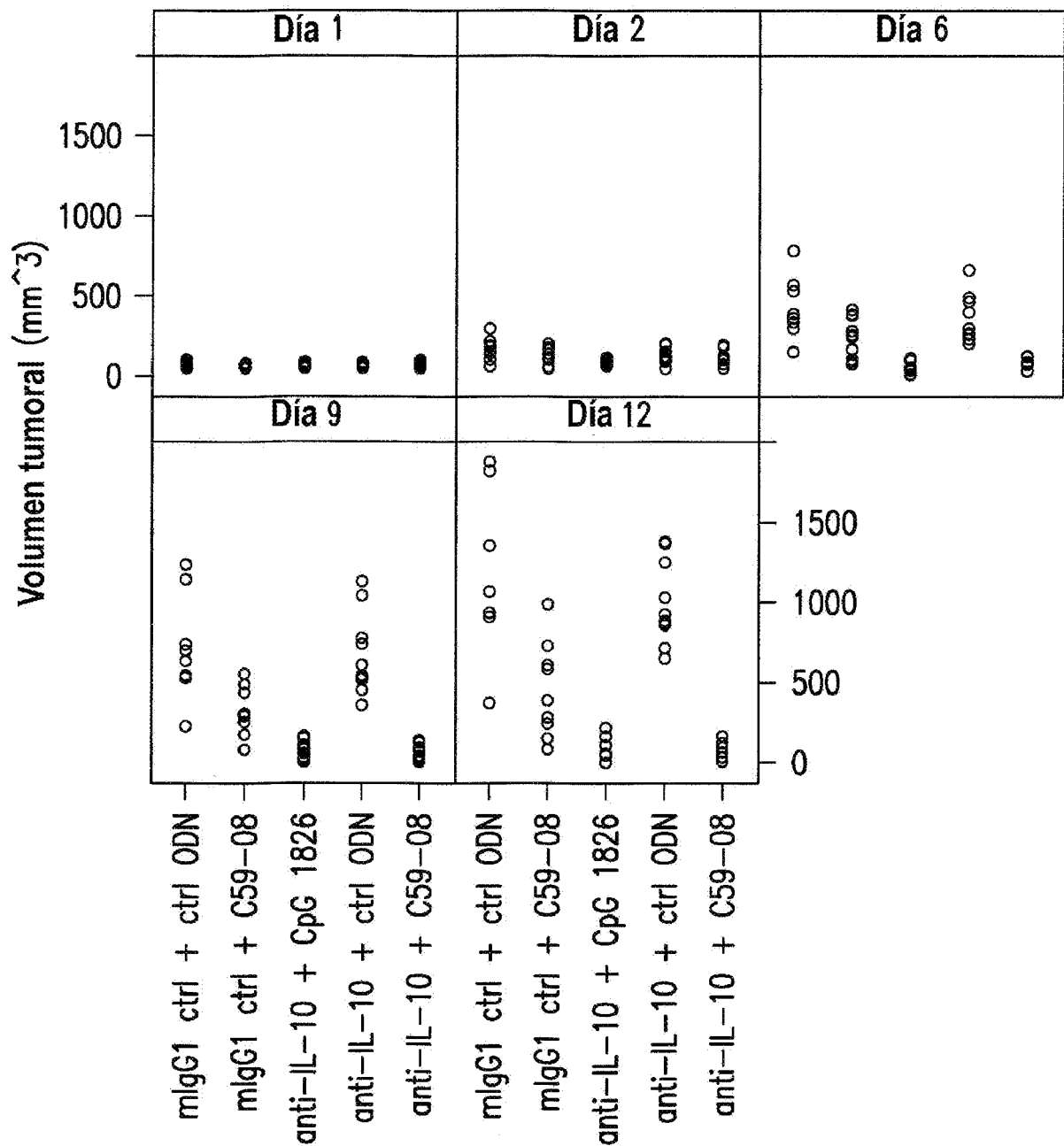


FIG.10C

Valores de p para la comparación de los volúmenes de tumores inyectados entre tratamientos,
por día en el modelo de tumor bilateral TC-1

	Comparación	Día 2	Día 6	Día 9	Día 12
Valor de p no ajustado	mlgG1 ctrl + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,43275	0,01470	0,00590	0,00300
	anti-IL-10 + CpG 1826 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,00680	0,00005	0,00005	0,00005
	anti-IL-10 + ctrl ODN vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,43870	0,21605	0,60770	0,31680
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,16680	0,00005	0,00005	0,00010
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + C59-08	0,68310	0,00085	0,00035	0,00075
	anti-IL-10 + C59-08 vs anti-IL-10 + ctrl ODN	0,68895	0,00005	0,00005	0,00005
Valor de p ajustado por multiplicidad	mlgG1 ctrl + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,75145	0,03890	0,01530	0,01110
	anti-IL-10 + CpG 1826 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,01770	0,00005	0,00005	0,00005
	anti-IL-10 + ctrl ODN vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,73685	0,43530	0,90605	0,57020
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,36930	0,00005	0,00010	0,00030
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + C59-08	0,96850	0,00320	0,00095	0,00325
	anti-IL-10 + C59-08 vs anti-IL-10 + ctrl ODN	0,96100	0,00005	0,00005	0,00010

FIG.10D

Volúmenes individuales de tumores no inyectados en el modelo TC-1 bilateral

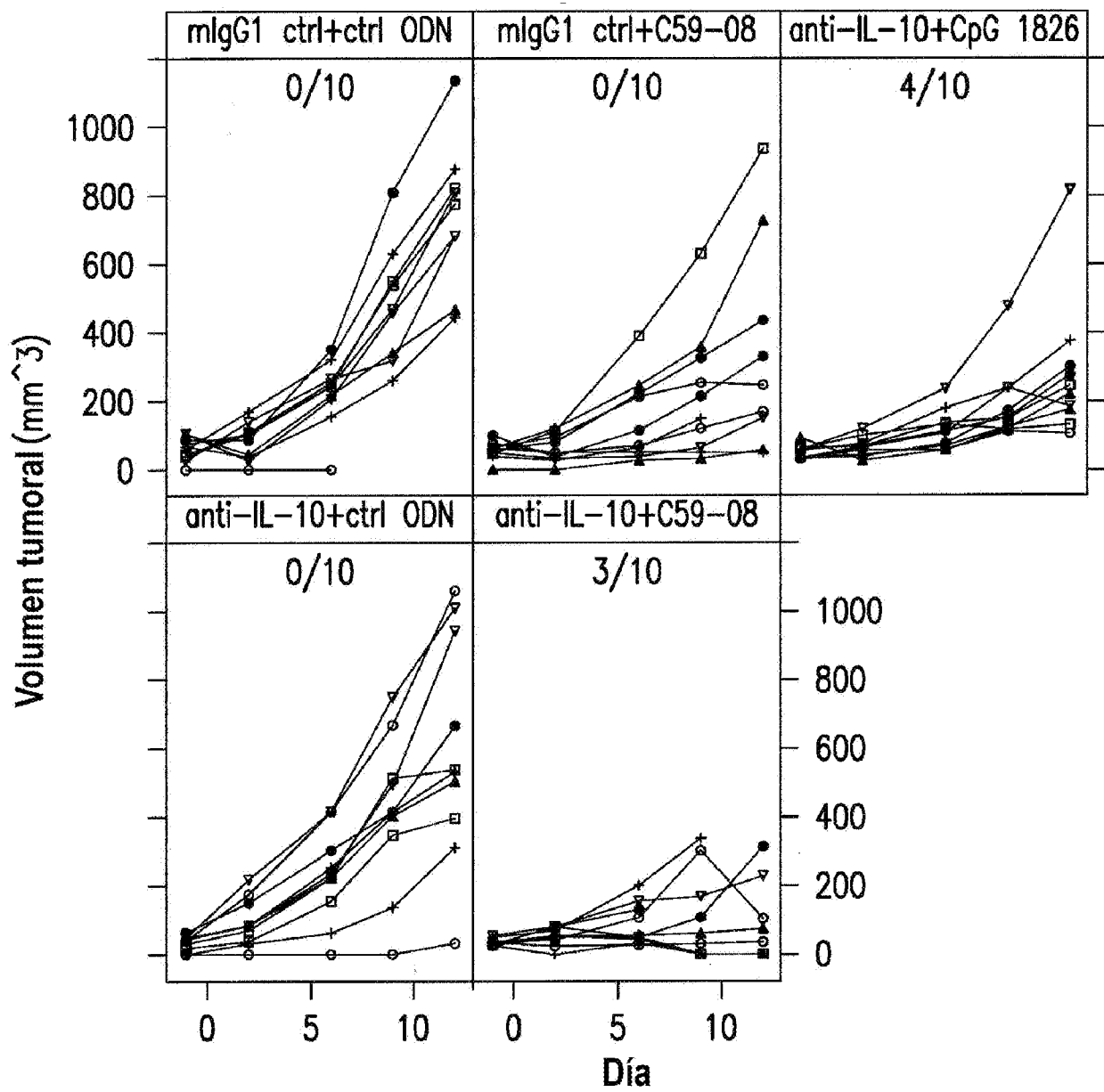
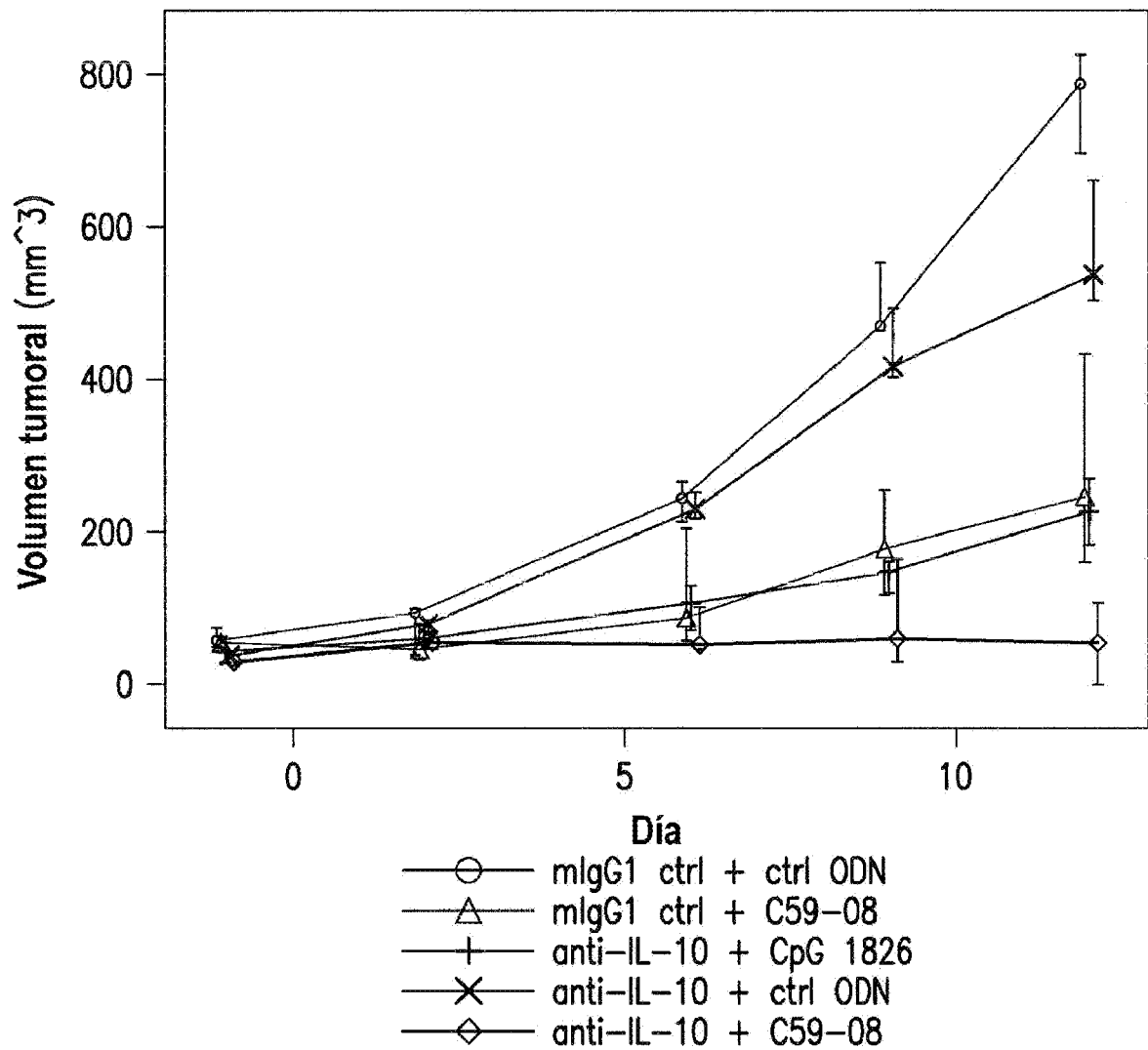


FIG.11A

Mediana de los volúmenes de tumores no inyectados en el modelo TC-1 bilateral



(las barras de error muestran los intervalos de confianza del 68 %)

FIG. 11B

Comparación de los volúmenes de tumores no inyectados entre tratamientos, por día en el modelo de tumor bilateral TC-1

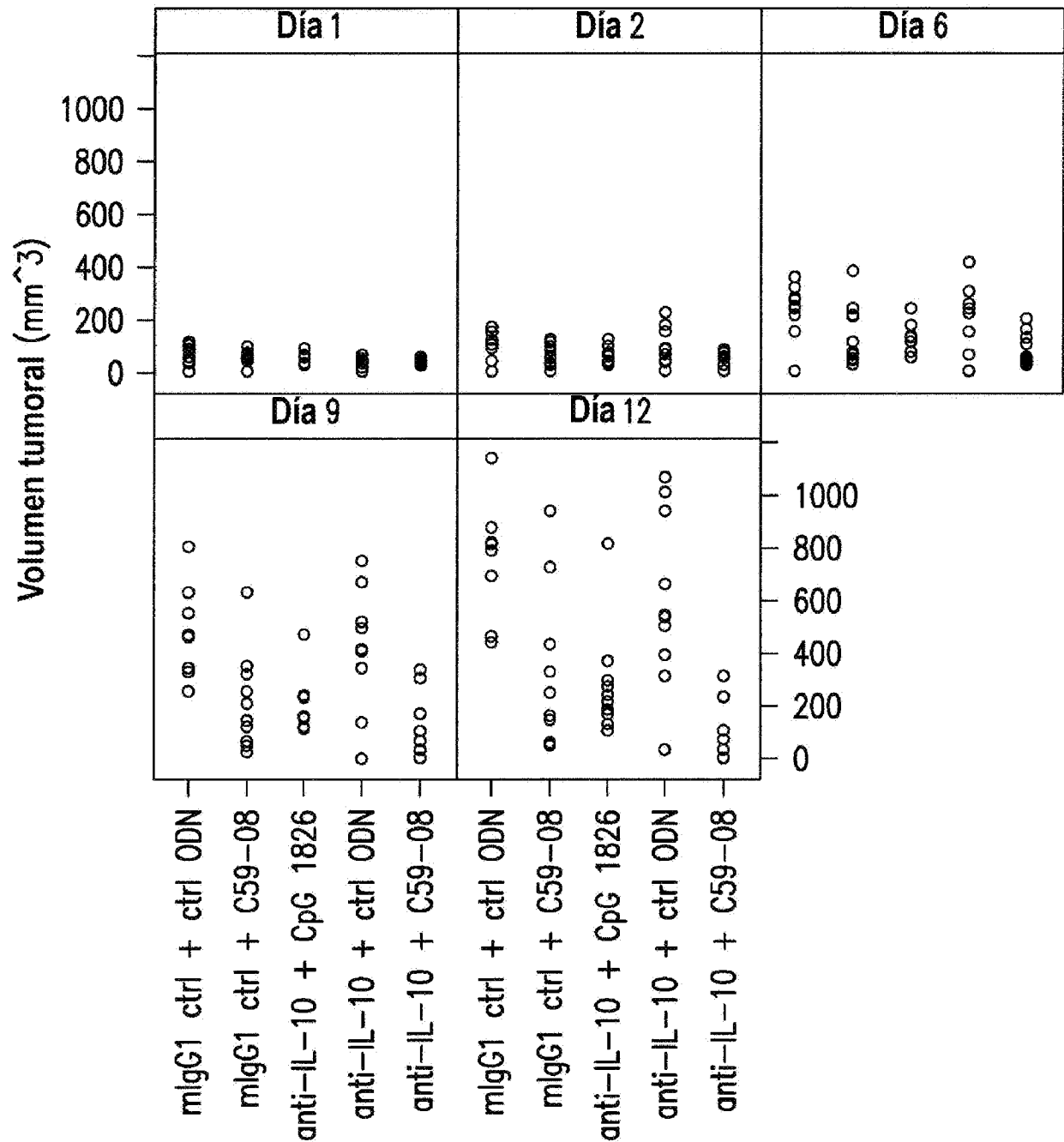
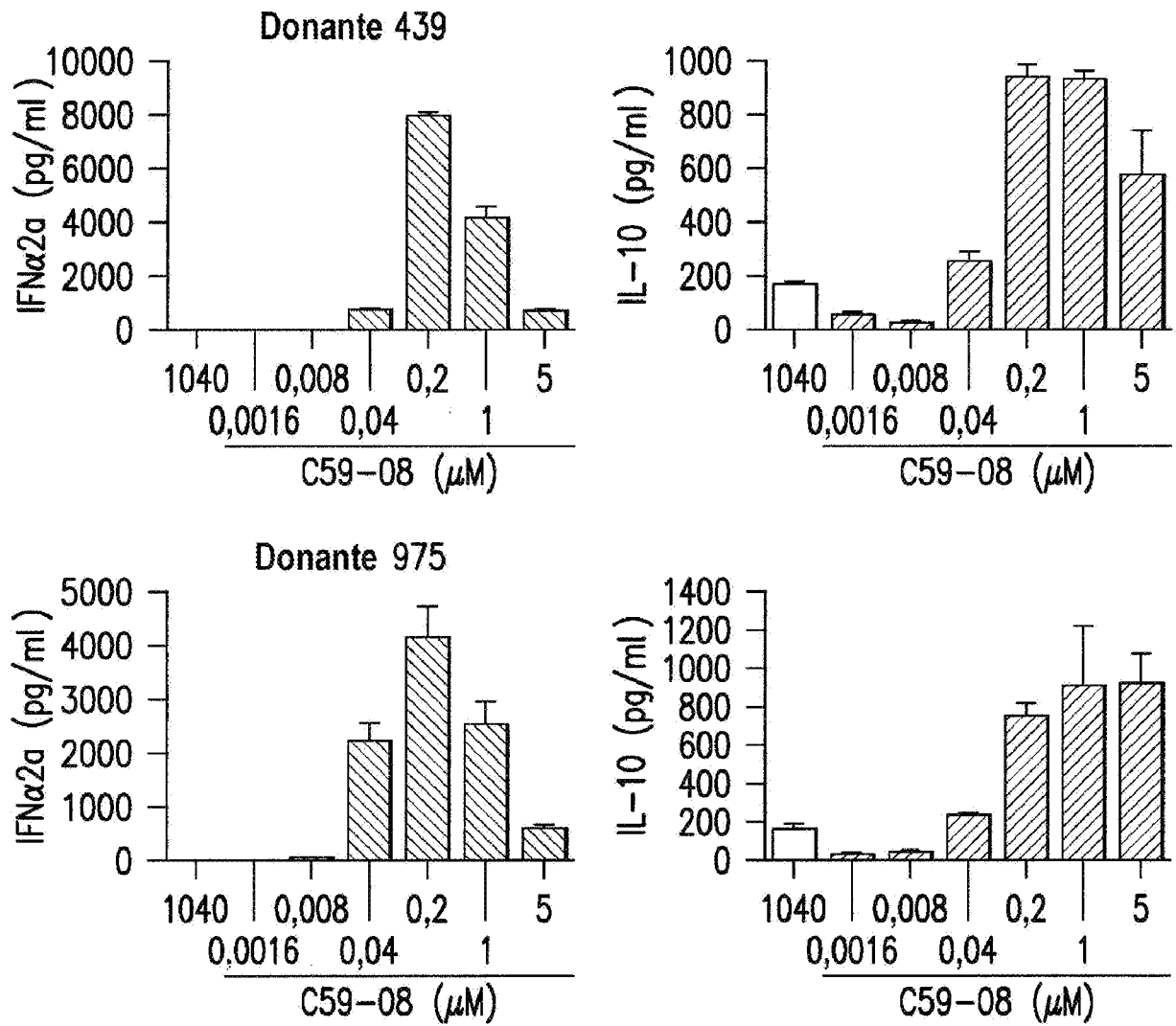


FIG.11C

Valores de p para la comparación de los volúmenes de tumores no inyectados entre tratamientos,
por día en el modelo de tumor bilateral TC-1

	Comparación	Día 2	Día 6	Día 9	Día 12
Valor de p no ajustado	mlgG1 ctrl + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,24825	0,05340	0,00415	0,00980
	anti-IL-10 + CpG 1826 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,39125	0,00525	0,00020	0,00035
	anti-IL-10 + ctrl ODN vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,98835	0,98865	0,60180	0,31865
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,22955	0,00300	0,00015	0,00010
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + C59-08	0,98865	0,31145	0,13025	0,02500
	anti-IL-10 + C59-08 vs anti-IL-10 + ctrl ODN	0,29085	0,00840	0,00350	0,00090
Valor de p ajustado por multiplicidad	mlgG1 ctrl + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,44670	0,10775	0,01075	0,02525
	anti-IL-10 + CpG 1826 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,66245	0,01250	0,00065	0,00085
	anti-IL-10 + ctrl ODN vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	1,00000	1,00000	0,87455	0,53805
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + ctrl ODN	0,42555	0,00750	0,00080	0,00040
	anti-IL-10 + C59-08 vs mlgG1 ctrl + C59-08	1,00000	0,58620	0,26395	0,06245
	anti-IL-10 + C59-08 vs anti-IL-10 + ctrl ODN	0,47835	0,01915	0,00700	0,00250

FIG.11D

C59-08 induce la producción de IFN α 2 α e IL-10 por PBMC humanas**FIG.12**

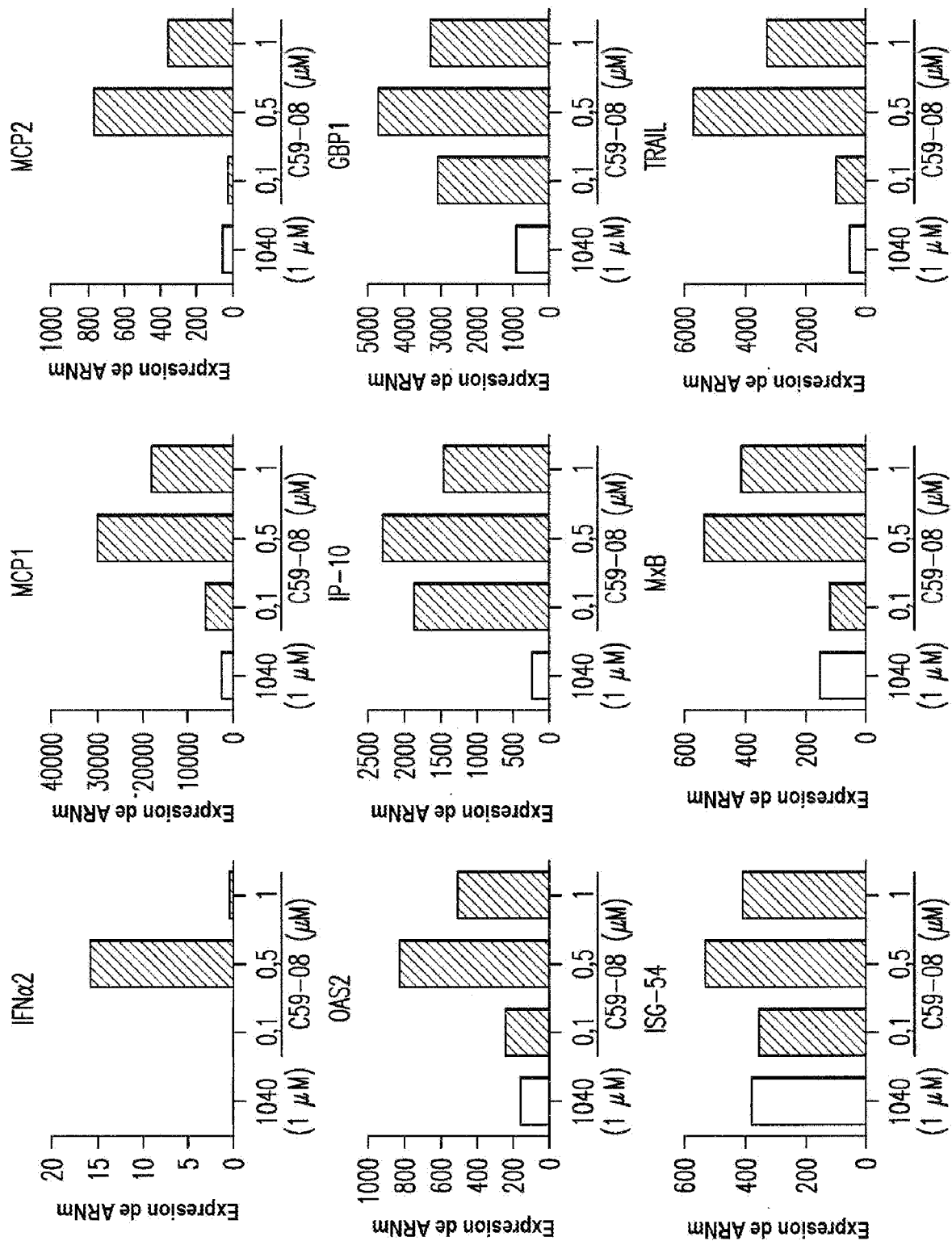


FIG.13A

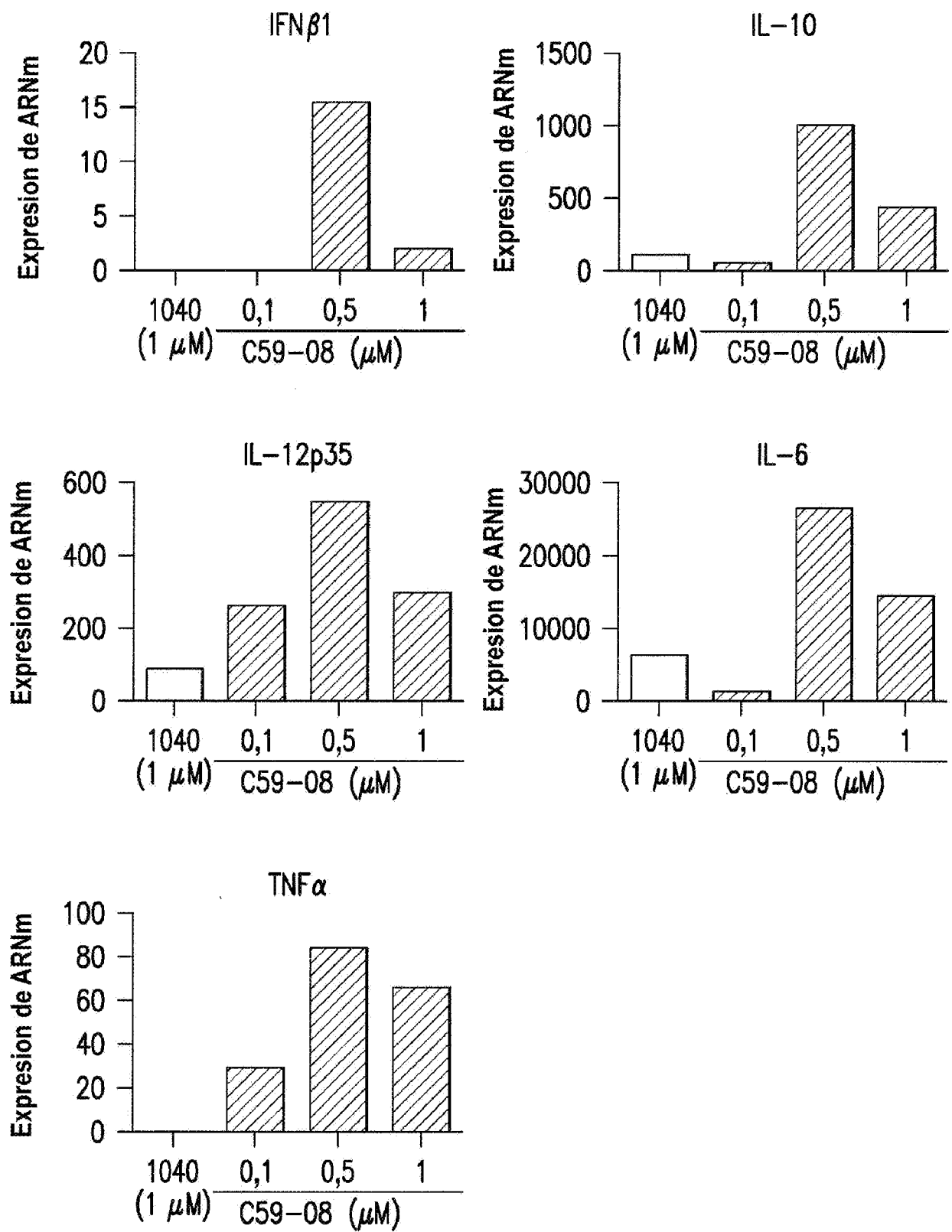


FIG.13B

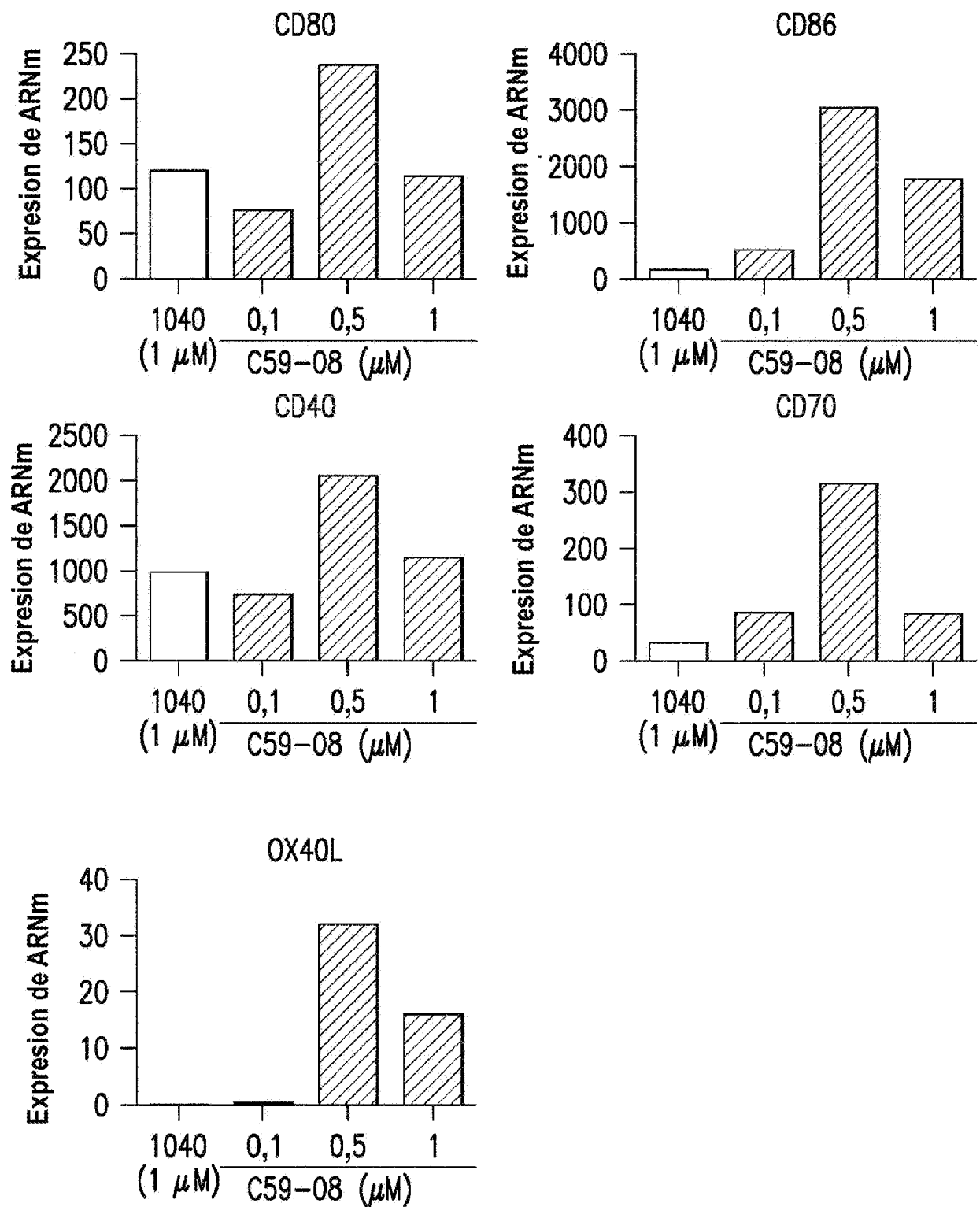


FIG.13C

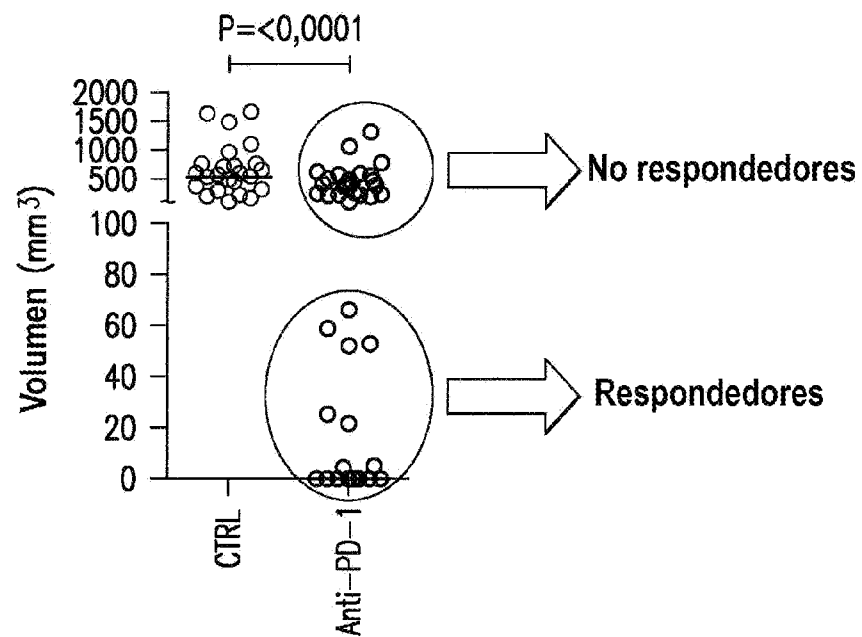


FIG.14A

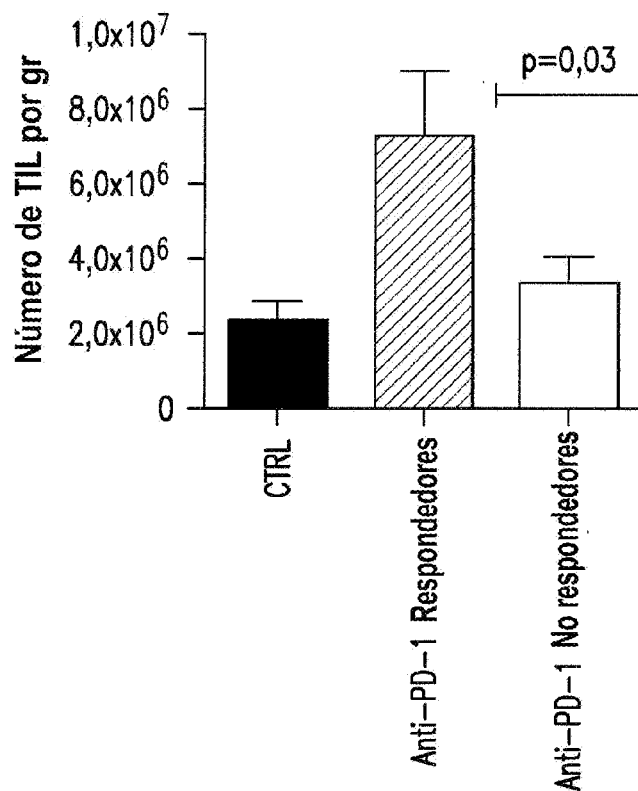


FIG.14B

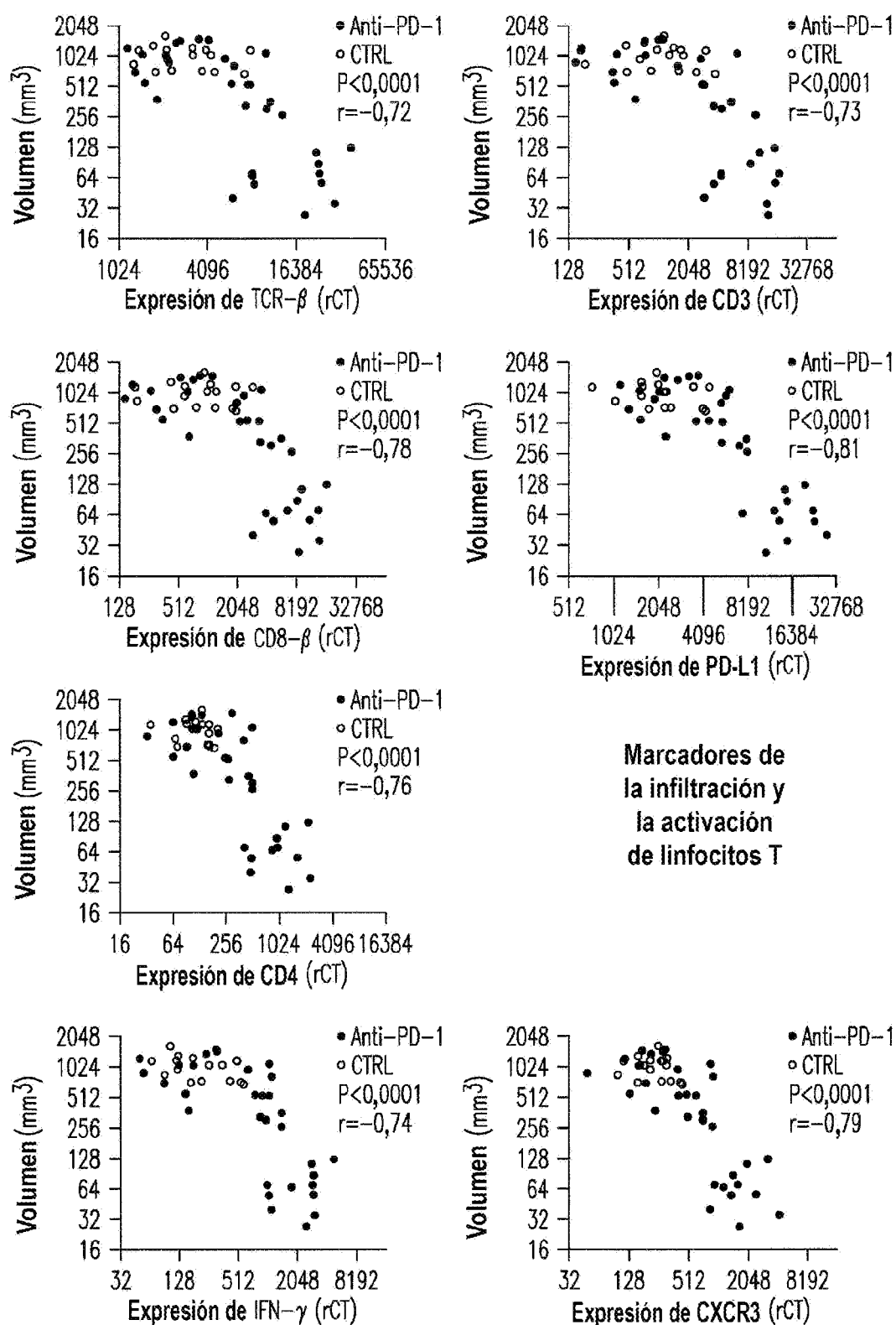


FIG.14C

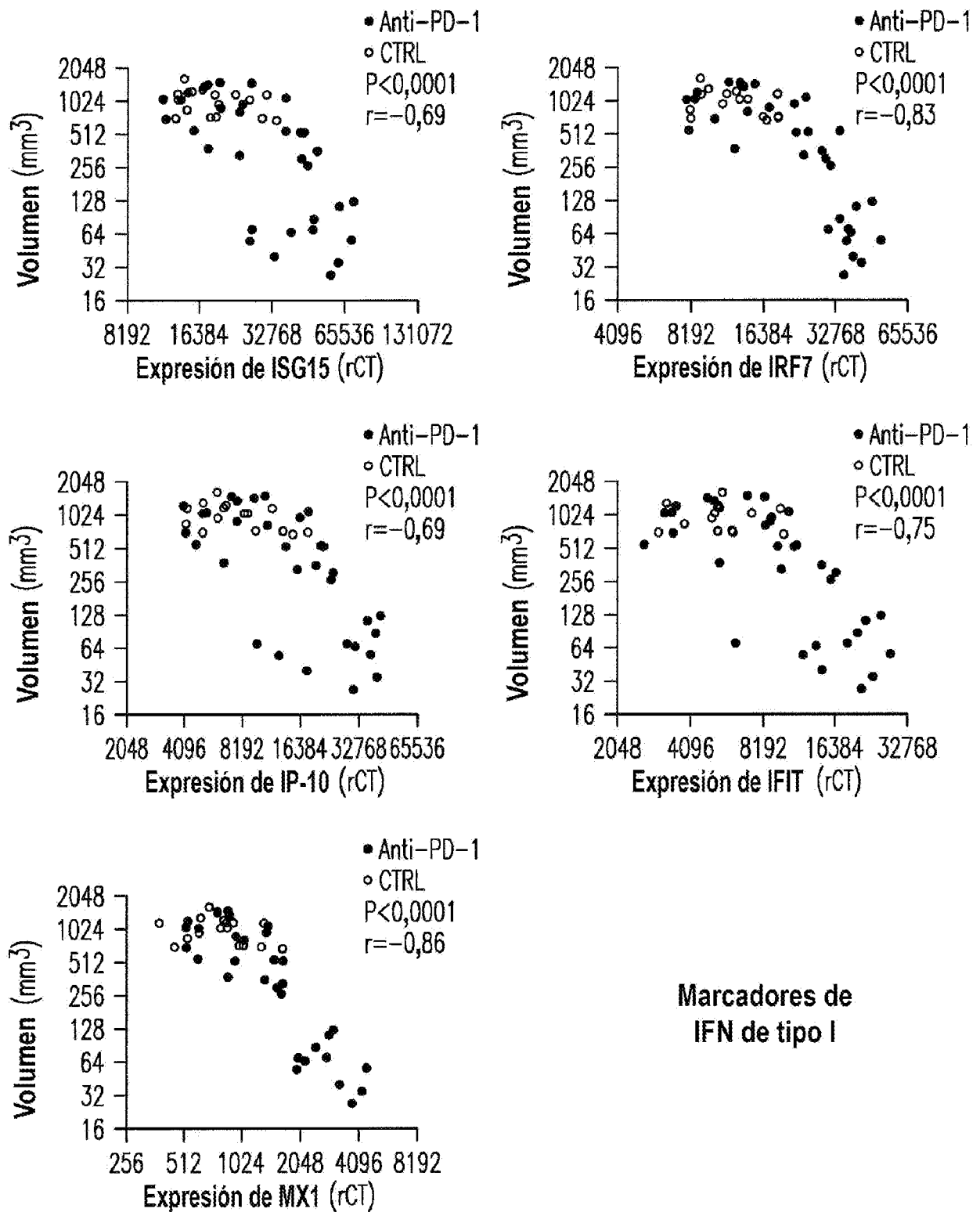


FIG.14D

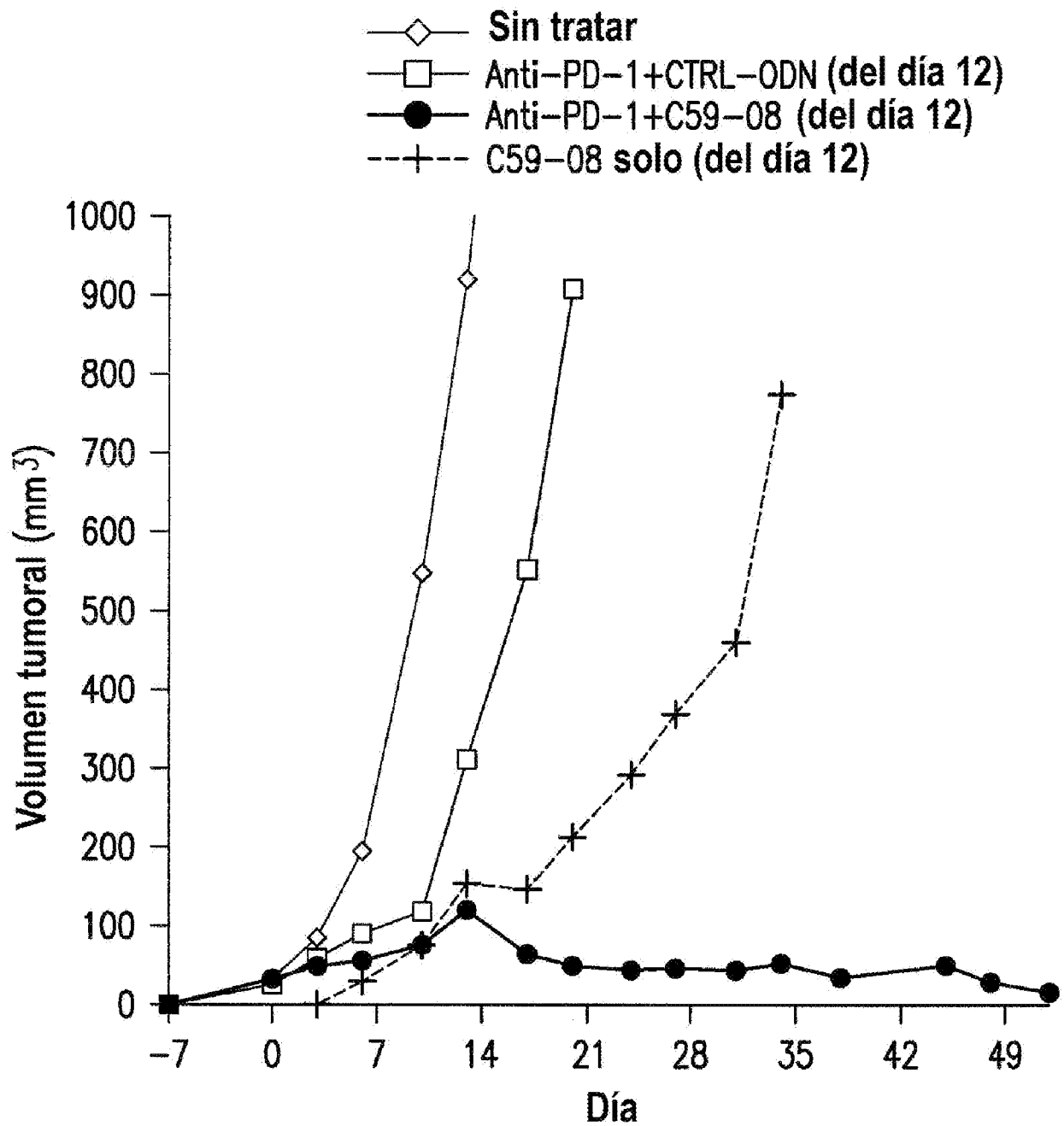
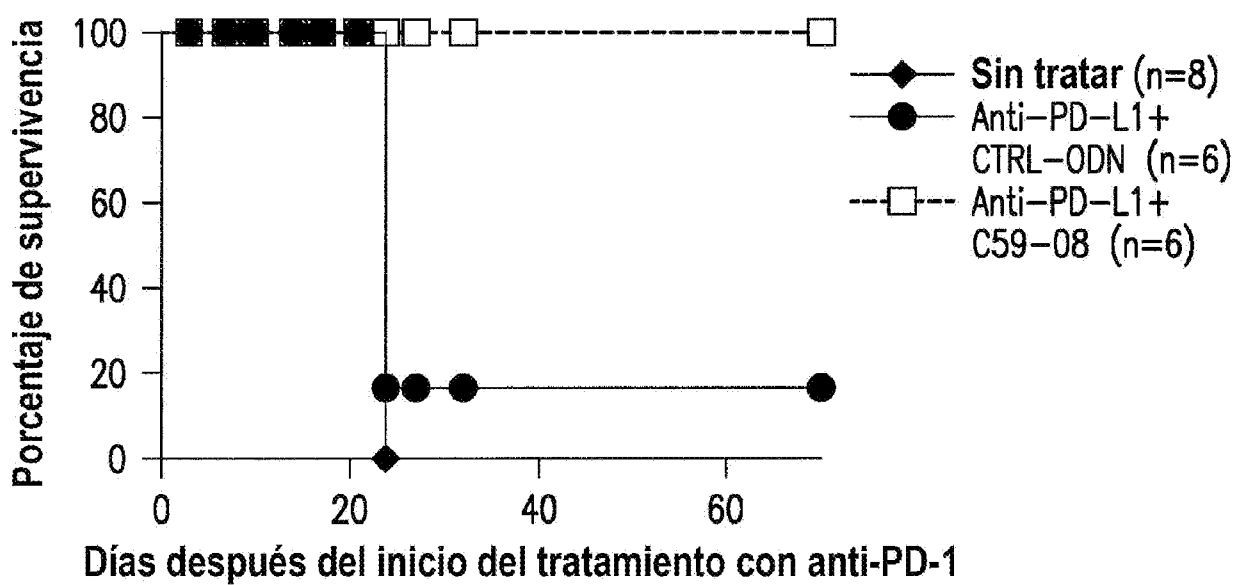
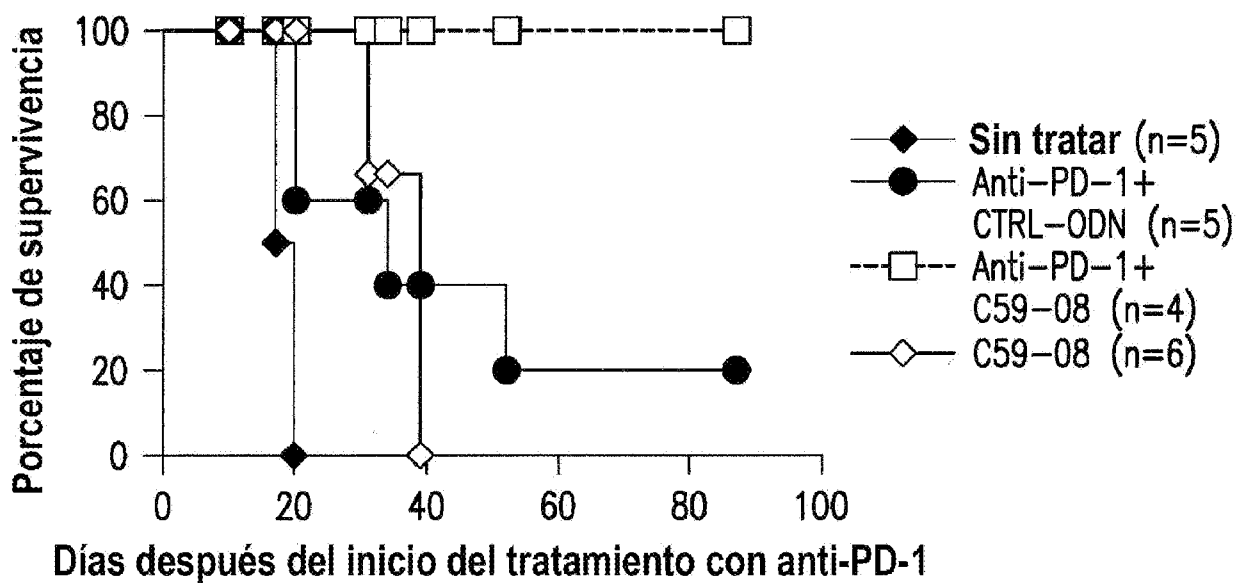


FIG.15A



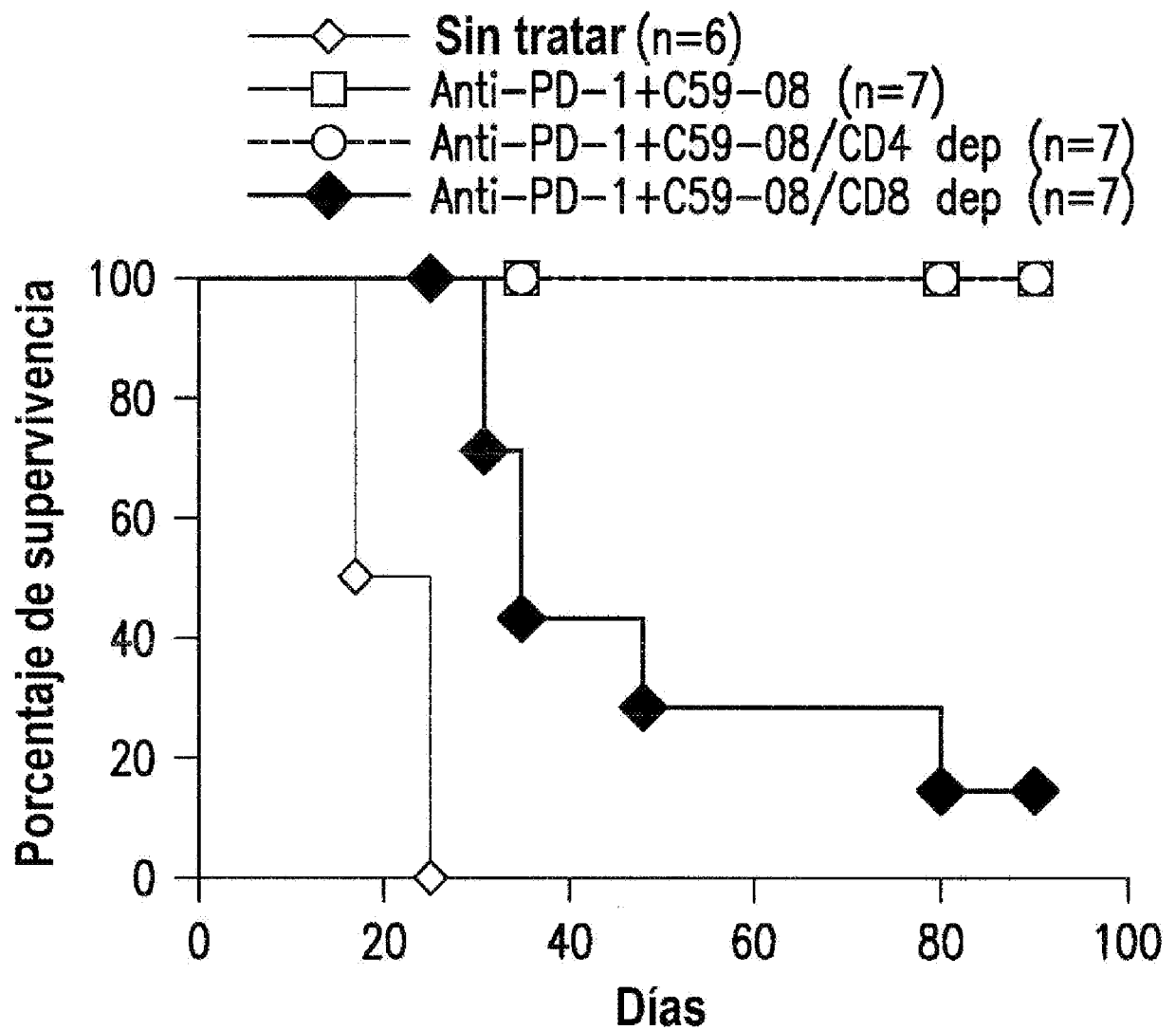


FIG.16

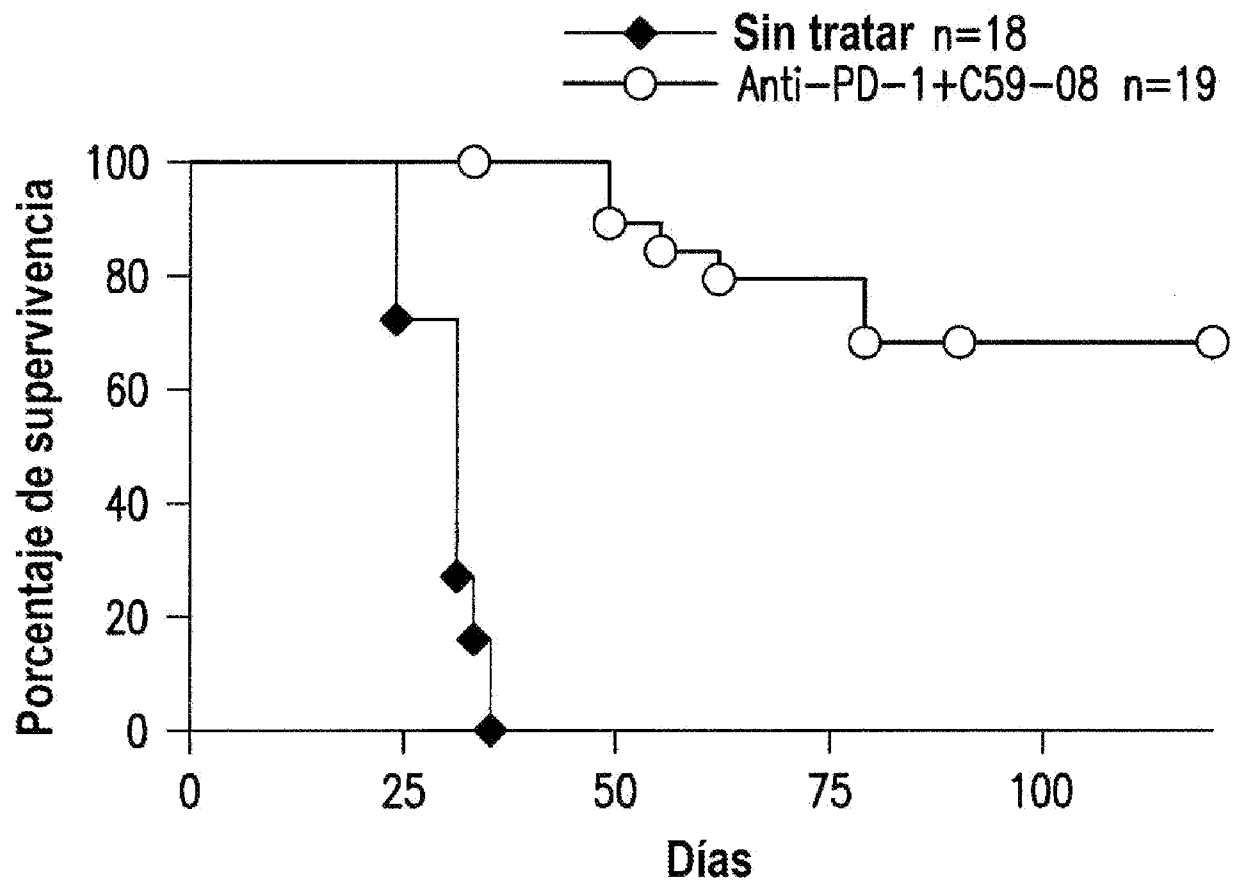


FIG.17

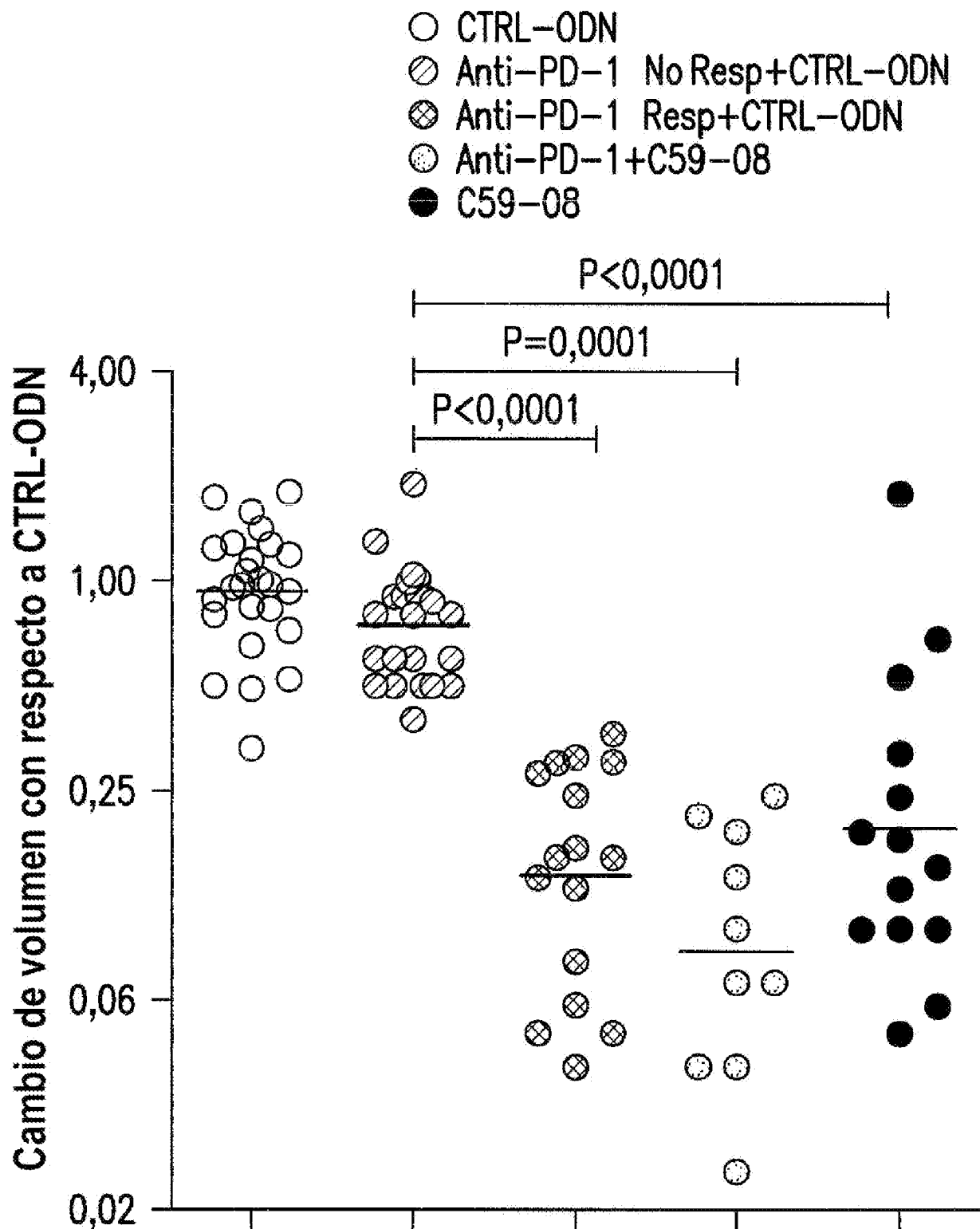


FIG. 18A

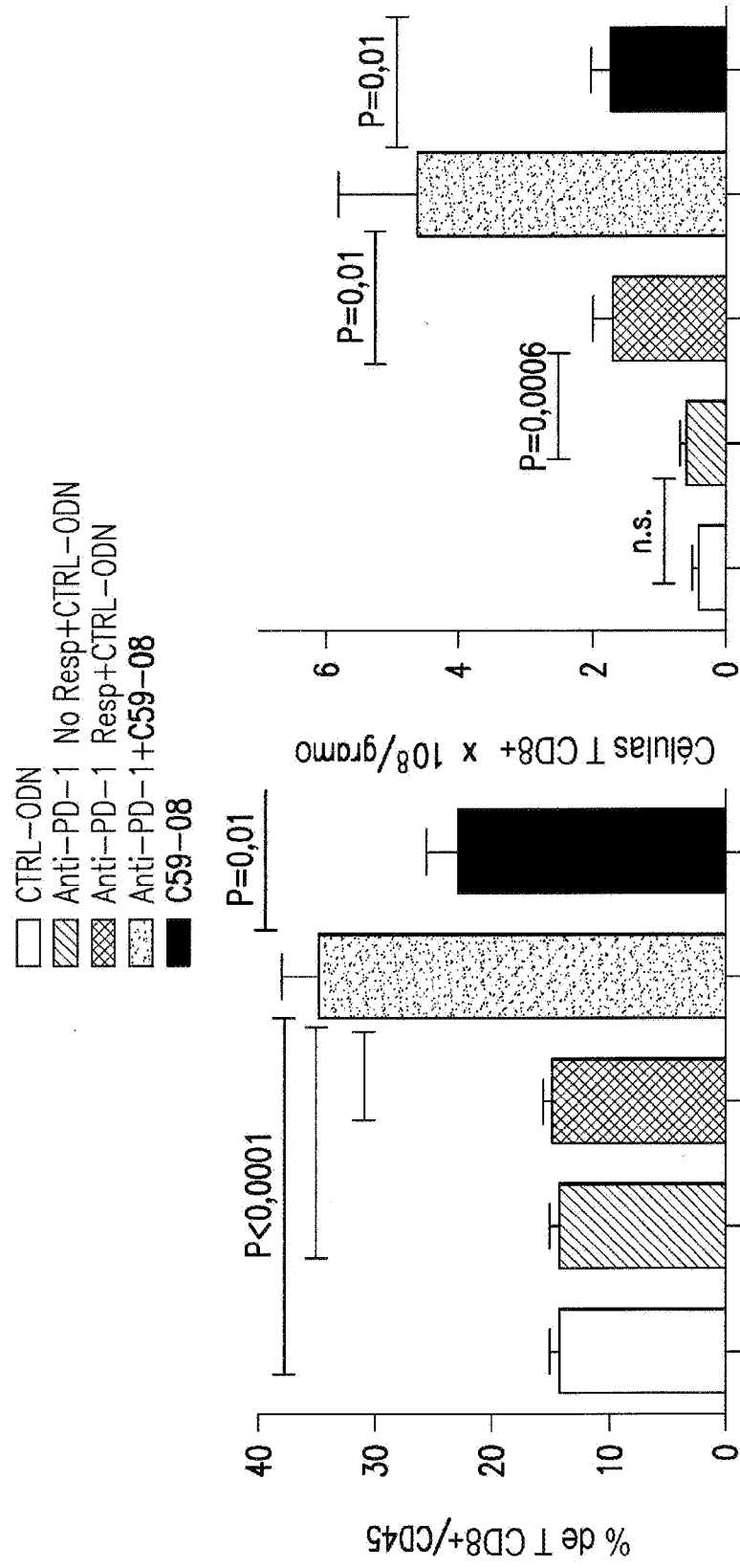


FIG.18B

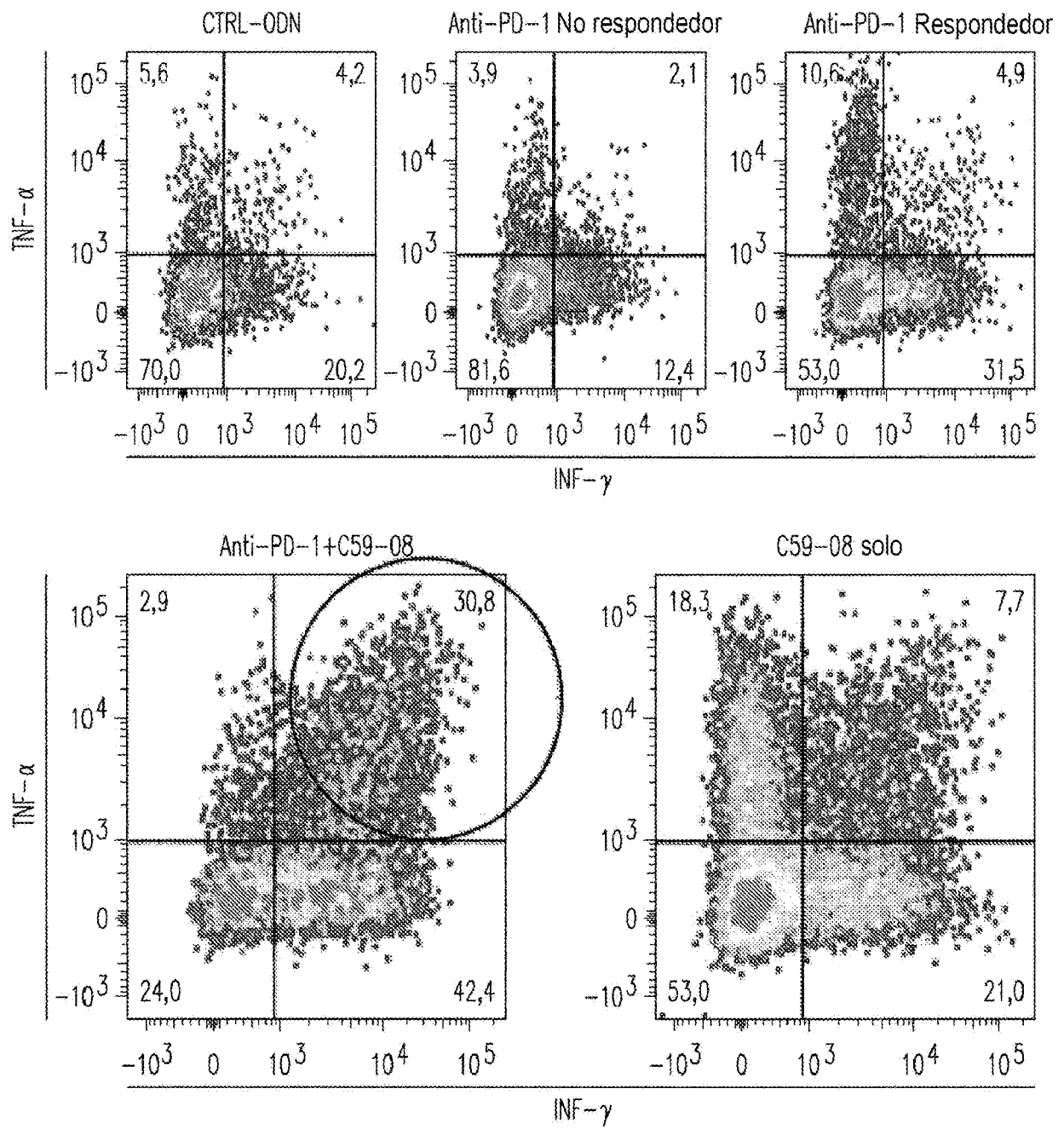


FIG.18C

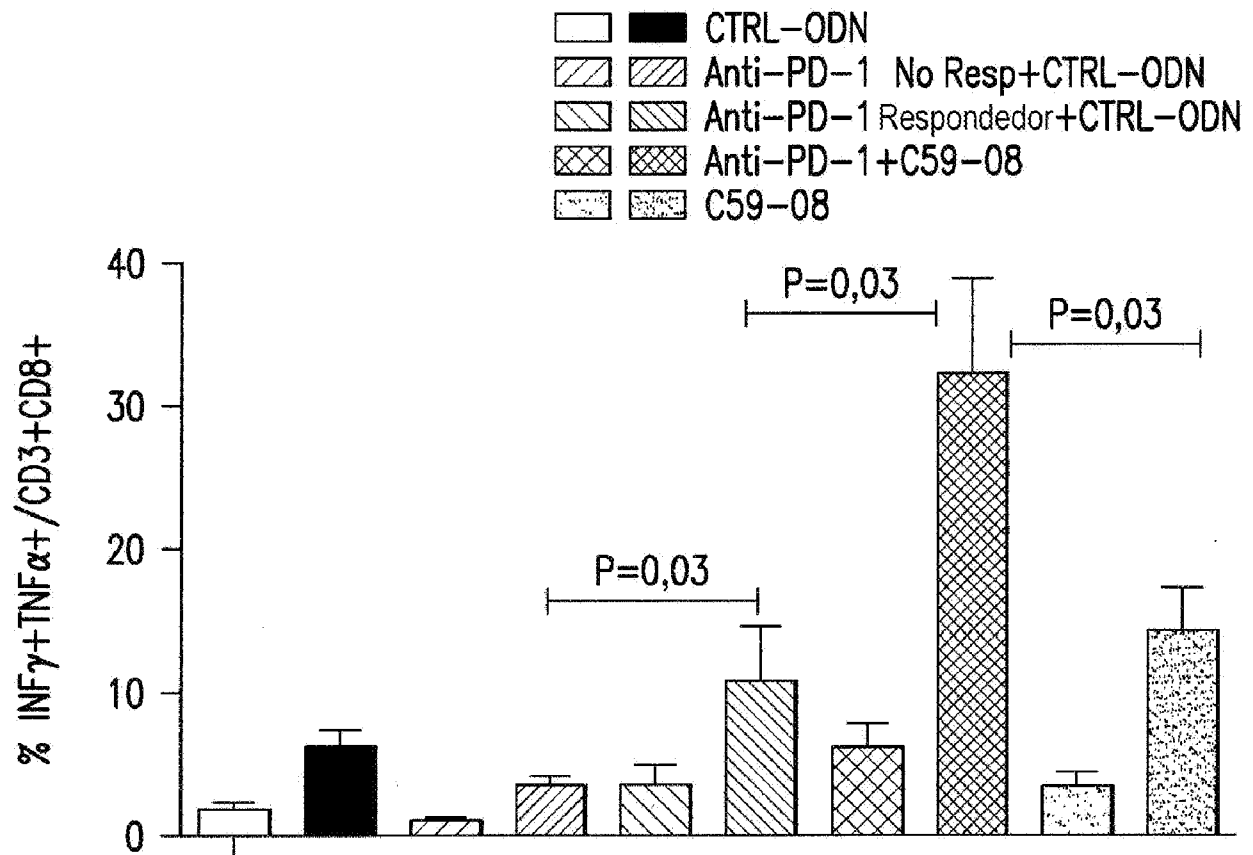


FIG.18D

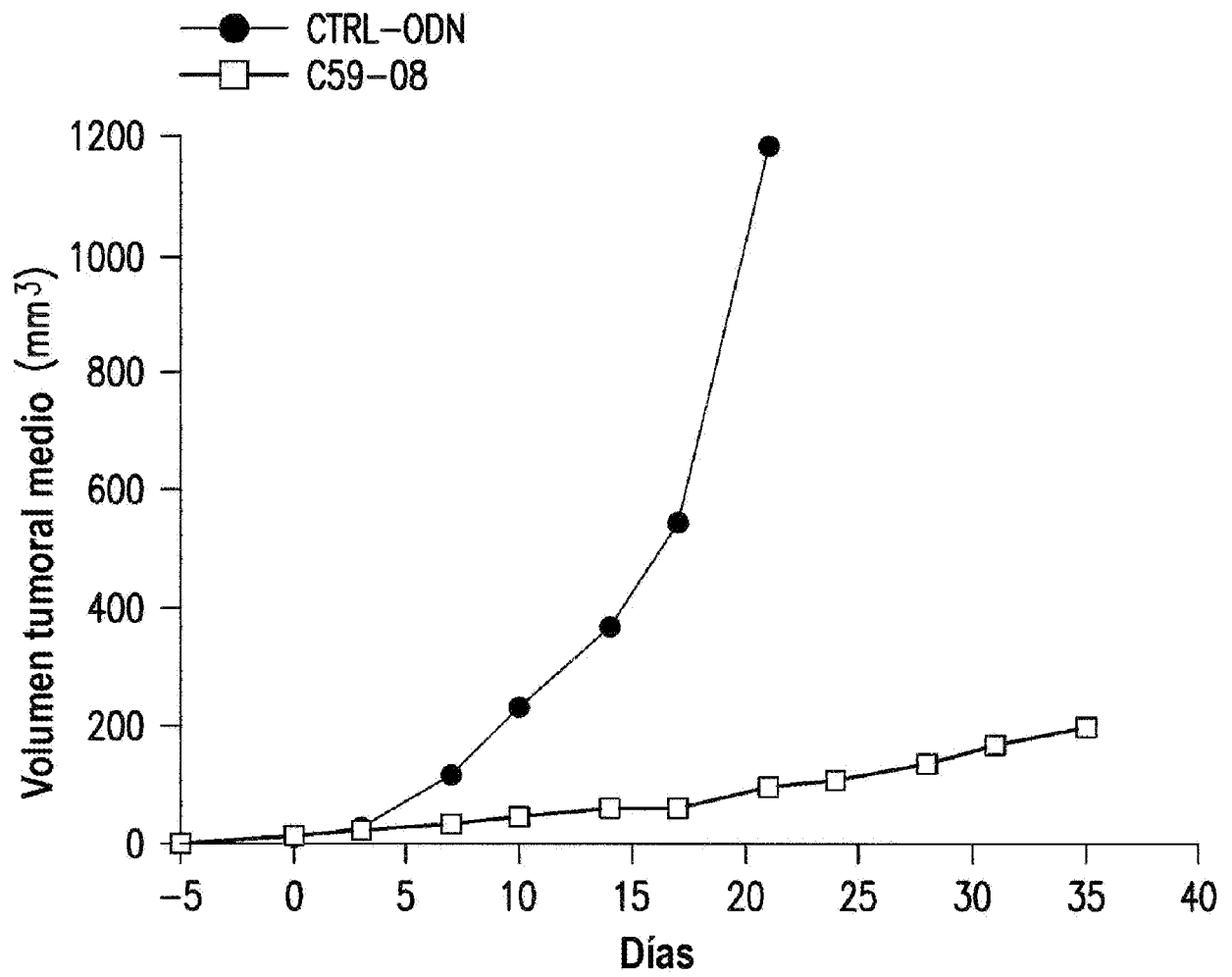


FIG.19A

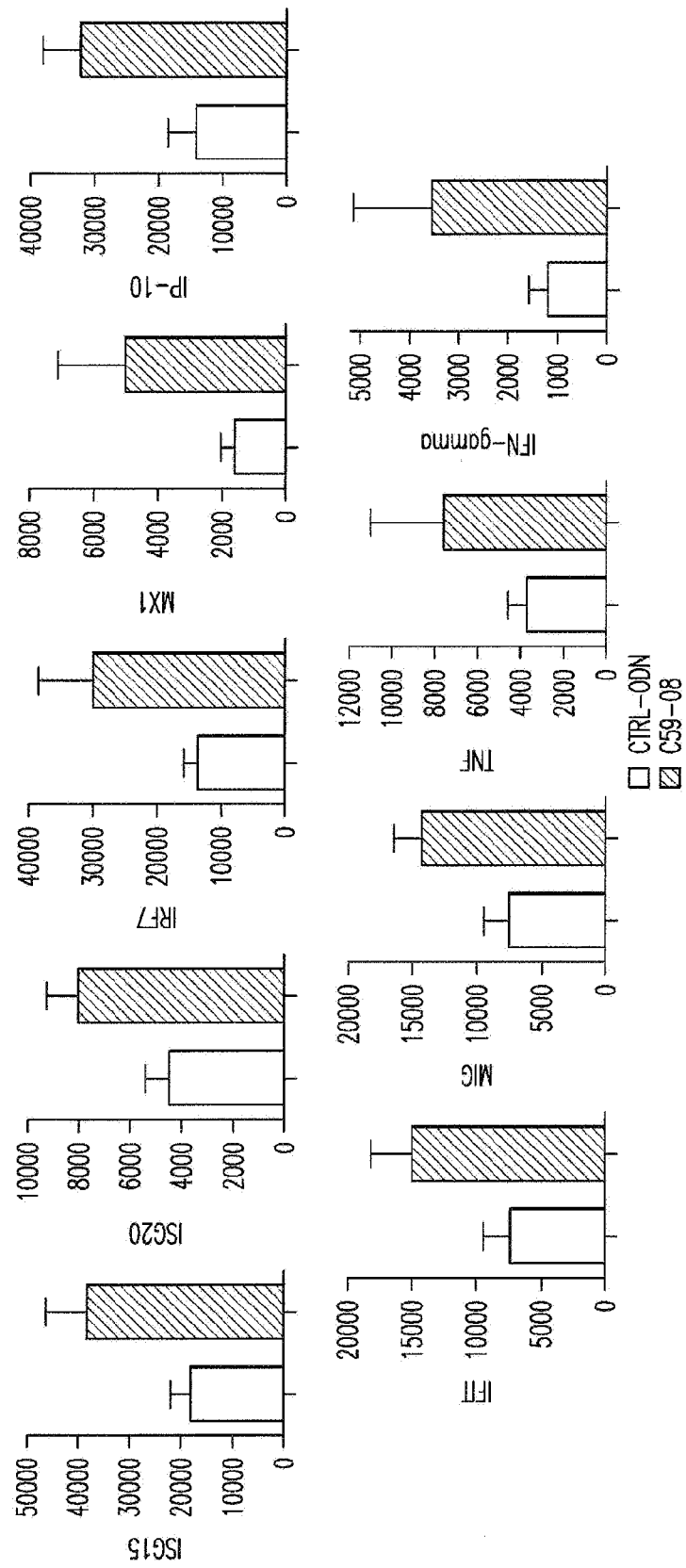


FIG. 19B