# COMBINACIONES DE UN ANTICUERPO OX40 Y UN MODULADOR DE TLR4 Y USOS DE LAS MISMAS

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer en un mamífero y a combinaciones útiles en dicho tratamiento. En particular, la presente invención se refiere a combinaciones de proteínas de unión antigénicas anti-OX40 (ABP) y uno o más moduladores de TLR4.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tratamiento eficaz de los trastornos hiperproliferativos, incluyendo el cáncer, es un objetivo continuo en el campo de la oncología. Generalmente, el cáncer es el resultado de una desregulación de los procesos normales que controlan la división de las células, la diferenciación y la muerte apoptótica celular y se caracteriza por la proliferación de células malignas que poseen un potencial de crecimiento ilimitado, de expansión local y de metástasis sistémica. La desregulación de los procesos normales incluye anomalías en las rutas de transducción de señales y responde a factores que difieren de los encontrados en las células normales.

Las inmunoterapias son un enfoque para tratar los trastornos hiperproliferativos. Un obstáculo principal que los científicos y los médicos han encontrado en el desarrollo de los diversos tipos de inmunoterapias contra el cáncer ha sido romper la tolerancia a los propios antígenos (cáncer) con el fin de provocar una respuesta anti-tumoral contundente que conduzca a la regresión del tumor. A diferencia del tradicional desarrollo de agentes de moléculas pequeñas y grandes que reconocen a los tumores, las células diana de las inmunoterapias del cáncer del sistema inmune, que disponen de potencial para generar una serie de memorias de las células efectoras, inducen los efectos más perdurables y minimizan la recurrencias.

El OX40 es una molécula co-estimuladora implicada en múltiples procesos del sistema inmune. Las proteínas de unión a antígenos y anticuerpos que se unen al

receptor de OX40 y que modulan la señalización de OX40 se conocen en la técnica y se describen como una inmunoterapia, por ejemplo, para el cáncer.

Los glucosaminida fosfatos de aminoalquilo (AGP) son ligandos sintéticos del Receptor tipo Toll 4 (TLR4). Los AGP se sabe que son útiles como adyuvantes para vacunas y para estimular las producción de citoquinas, activar los macrófagos, promover la respuesta inmune innata y aumentar la producción de anticuerpos en animales inmunizados.

Aunque ha habido muchos avances recientes en el tratamiento del cáncer, queda una necesidad de un tratamiento más eficaz y/o mejorado de los individuos que sufren los efectos del cáncer. Las combinaciones y los métodos en este documento, que se refieren a combinar enfoques terapéuticos para potenciar la inmunidad anti-tumoral, abordan esta necesidad.

## COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En este documento se proporcionan combinaciones de proteínas de unión antigénicas anti-OX40 (ABP) y uno o más moduladores de TLR4. También se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un ser humano con las composiciones de la invención, y usos de las combinaciones para terapias, tales como las terapias contra el cáncer. Además se proporcionan métodos para modular la respuesta inmune de un sujeto en necesidad de un tratamiento contra el cáncer, tal como un ser humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de las combinaciones, por ejemplo, en una o más composiciones farmacéuticas.

En una realización, las proteínas de unión antigénicas de OX40 son las descritas en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En otra realización, la proteína de unión antigénica comprende las regiones CDR de un anticuerpo descrito en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011, o las regiones CDR con 90% de identidad respecto a las secuencias CDR descritas. En una realización más, la proteína de

unión antigénica comprende una región VH, una región VL, o ambas del anticuerpo descrito en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 Agosto 2011, o una región VH o una región VL con 90% de identidad respecto a las secuencias de VH o VL descritas.

En otra realización, se describen proteínas de unión antigénicas de OX40 en el documento WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012. En otra realización, la proteína de unión antigénica comprende las regiones CDR de un anticuerpo descrito en el documento WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012, o las regiones CDR con 90% de identidad respecto a las secuencias CDR descritas. En una realización más, la proteína de unión antigénica comprende una región VH, una región VL, o ambas de un anticuerpo descrito en el documento WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012, o una región VH o una región VL con 90% de identidad respecto a las secuencias de VH o VL descritas.

En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una o más de las secuencias de las regiones CDR o VH o VL, o secuencias con 90% de identidad entre sí, mostradas en las Figuras de este documento.

En una realización, el ABP o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 106-222, por ejemplo, de las Figuras 6-7 en este documento, por ejemplo, CDRH1, CDRH2, y CDRH3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs 1, 2, y 3, como se describe en la Figura 6, y por ejemplo, las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3 que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NOs 7, 8, y 9, respectivamente. En una realización, el ABP o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 106-222, Hu106 o Hu106-222 como se describe en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones VH y VL del anticuerpo 106-222 como se describe en las Figuras 6-7 en este documento, por ejemplo, una región VH que tiene la

secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:4 y una región VL como en la Figura 7 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10. En otra realización, el ABP o anticuerpo de la invención comprende una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 en la Figura 6 en este documento, y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11 en la Figura 7 en este documento. En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones VH y VL del anticuerpo Hu106-222 o el anticuerpo 106-222 o el anticuerpo Hu106 como se describe en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención es 106-222, Hu106-222 o Hu106, por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En una realización más, el ABP o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR o VH o VL o secuencias de anticuerpo con 90% de identidad respecto a las secuencias en este párrafo.

En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 119-122, por ejemplo, de las Figuras 10-11 en este documento, por ejemplo, CDRH1, CDRH2, y CDRH3 que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs 13, 14, y 15 respectivamente. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 119-122 o Hu119 o Hu119-222 como se describe en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16 en la Figura 10 en este documento, y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 como se muestra en la Figura 11 en este documento. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23. En una

realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones VH y VL del anticuerpo 119-122 o Hu119 o Hu119-222 como se describe en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En una realización más, el ABP o anticuerpo de la invención es el anticuerpo 119-222 o Hu119 o Hu119-222, por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. En una realización más, el ABP o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR o VH o VL o secuencias de anticuerpo con 90% de identidad respecto a las secuencias en este párrafo.

En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 119-43-1, por ejemplo, como se describe en las Figuras 14-15 en este documento. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 119-43-1 como se describe en el documento WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012. En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una de las regiones VH y una de las regiones VL de anticuerpo 119-43-1como se describe en las Figuras 14-17. En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende las regiones VH y VL de anticuerpo 119-43-1como se describe en el documento WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012. En una realización más, el ABP o anticuerpo de la invención es el agente quimérico 119-43-1 o 119-43-1 como se describe en la Figuras 14-17 en este documento. En una realización más, el ABP o anticuerpo de la invención como se describe en el documento WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012. En otras realizaciones, cualquiera de los ABP o anticuerpos descritos en este párrafo están humanizados. En otras realizaciones, uno cualquiera de los ABP o anticuerpos descritos en este párrafo se modifican genéticamente para preparar un anticuerpo humanizado. En una realización más, el ABP o anticuerpo de la invención

comprende las regiones CDR o VH o VL o secuencias de anticuerpo con 90% de identidad respecto a las secuencias en este párrafo.

En otra realización, cualesquiera secuencias de ratón o quiméricas de cualquier ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención se modifican genéticamente para preparar un anticuerpo humanizado.

En una realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 9.

En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 15; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 19; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 20; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 21.

En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 13; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó 14; y/o una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ó 15, o una región variable de cadena pesada CDR que tiene el 90% de identidad respecto a ella.

En todavía otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende: una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 ó 19; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 ó 20 y/o una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 ó 21, o una región variable de cadena pesada que tiene el 90 por ciento de identidad respecto a ésta.

En una realización más, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende: una región variable de cadena ligera ("VL") que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 22 ó 23, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 22 ó 23. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada ("VH") que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5, 16 y 17, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5, 16 y 17. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO:5 y una secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 11, o una secuencia que tiene 90 por ciento de identidad respecto a ésta. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO:17 y una secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 23 o una secuencia que tiene 90 por ciento de identidad respecto a ésta.

En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera variable codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 12, o 24, o una secuencia de ácido nucleico con al menos 90 por ciento de identidad respecto a las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 12 o 24. En otra realización, el ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención comprende una

cadena pesada variable codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 o 18, o una secuencia de ácido nucleico con al menos 90 por ciento de identidad respecto a las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 ó 18.

También se proporcionan en este documento anticuerpos monoclonales. En una realización, los anticuerpos monoclonales comprenden una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ó 22, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ó 22. Además se proporcionan anticuerpos monoclonales que comprenden una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ó 16, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90 por ciento de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ó 16.

Otra realización de la invención incluye las regiones CDR, las regiones VH y las regiones VL, y anticuerpos y ácidos nucleicos que codifican los mismos como se describe en el Listado de Secuencias más abajo.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**La Figura 1A** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) del agonista de TLR4 (CRX-527) en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon. Los resultados son el promedio de 10 animales.

La **Figura 1B** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86) en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon. Los resultados son el promedio de 10 animales; los tratamientos de control en la Figura 1A son los mismos que aquellos de la Figura 1B.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), 5 μg del agonista de TLR4 (CRX-527), y la

combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon. Los resultados son el promedio de 10 animales.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), 25 μg del agonista de TLR4 (CRX-527), y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon medido en 38 días. Los resultados son el promedio de 10 animales; los tratamientos de control en la Figura 2 representan animales idénticos a los de la Figura 3.

Las **Figuras 4A–4F** son gráficos que muestran la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) en ratones individuales de un anticuerpo control (IgG), anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), 5 o 25 μg del agonista de TLR4 (CRX-527), y la combinación de OX86 y CRX-527 en un grupo de ratones en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon medido en 42 días. El volumen de tumor del grupo promedio para ratones que quedaban en el estudio en las Figuras 4A-4F se usó para generar las representaciones en las Figuras 2-3.

La **Figura 5** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 4, 20 ó 100 μg del agonista de TLR4 (CRX-601) en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon.

Las **Figuras 6-12** muestran las secuencias de los ABP y anticuerpos de la invención, por ejemplo, las secuencias de CDR y VH y VL.

Las **Figuras 13-17** muestran las secuencias de los ABP y anticuerpos de la invención, por ejemplo, las secuencias de CDR y VH y VL.

La **Figura 18** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intratumoral en un modelo de tumor de ratón singénico de CT-26.

La **Figura 19** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con el agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intratumoral en un modelo de tumor de ratón singénico de CT-26. (valores *p ≤ 0,05).

La **Figura 20** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) del agonista de TLR4 CRX-601 en un modelo de tumor de ratón singénico de CT-26. (valores *p ≤ 0,05)

La **Figura 21** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con el agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa en un modelo de tumor de ratón singénico de CT-26 (valores *p ≤ 0,05).

La **Figura 22** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un clon OX-86 del anticuerpo OX40 anti-ratón de rata, la actividad anti-tumoral administrada (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un clon OX-86 del anticuerpo OX40 anti-ratón de rata, administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, 10 μg o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26.
(valores *p ≤ 0,05)

La **Figura 23** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, 10 μg ó 25 μg del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (valores *p ≤ 0,05)

La **Figura 24** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un

anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (valores *p ≤0,05)

La **Figura 25** muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (valores *p ≤ 0,05)

Las **Figuras 26 A-C** son gráficos que muestran el incremento de leucocitos y la activación inmune en ratones tratados con 10 μg del agonista de TLR4 CRX-601, 25 μg de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon medido a 8 días después de la administración.

Las **Figuras 27 A-B** son gráficos que muestran los incrementos de la activación inmune de citoquinas TNF alfa (A) y IL-12p70 (B) en ratones tratados con 10 μg del agonista de TLR4 CRX-601, un anticuerpo del receptor OX40R anti-ratón de rata (clon OX-86), y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon medido a 1 y 8 días después de la administración.

La **Figura 28** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para CRX-601). (valores *p <0,05)

La **Figura 29** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intratumoral 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para CRX-601). (valores *p <0,05)

La **Figura 30** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo OX40 anti-ratón de rata (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para CRX-601) (valores *p < 0,05)

La **Figura 31** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intratumoral 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para CRX-601) (valores *p < 0,05)

La **Figura 32** es un gráfico que muestra re-exposición tumoral de CT-26 de ratones sin tumor en el estudio 6. 68 días después de la primera dosis, los ratones sin tumor fueron re-expuestos con células de tumor CT-26. También se incluyeron a los ratones control sin tratamiento. Aunque los tumores crecieron como se esperaba en los ratones control sin tratamiento, los tumores fueron rechazados y ningún tumor creció en los grupos de tratamiento.

La **Figura 33** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para Administración intravenosa de CRX-601.) (valores *p <0,05)

La **Figura 34** es un gráfico que muestra la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) de 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intratumoral 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (Formulación de liposomas DOPC/CHOL usada para Administración intratumoral de CRX-601) (valores *p <0,05).

La **Figura 35** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para la administración intravenosa de CRX-601) (valores *p < 0,05).

La **Figura 36** es un gráfico que muestra curvas de supervivencia de ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX-86), administrado por medio de inyección intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601

administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. (vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa usado para la administración intravenosa de CRX-601) (valores *p < 0,05).

La **Figura 37** es un gráfico que muestra la re-exposición tumoral de CT-26 de ratones sin tumor en el estudio 7. 80 días después de la primera dosis, los ratones sin tumor fueron re-expuestos con células de tumor CT-26 en el número de ratones especificado. También se incluyeron los ratones control sin tratamiento. Aunque los tumores crecieron como se esperaba en los ratones control sin tratamiento, los tumores fueron rechazados y ningún tumor creció en los grupos de tratamiento.

La **Figura 38** es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral de ratones individuales del Grupo 7: CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total.

La **Figura 39** es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral de ratones individuales del Grupo 8: CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intratumoral una vez a la semana en el tumor del lado izquierdo para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total.

La **Figura 40** es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral de ratones individuales del Grupo 12: CRX-601 25 μg/ratón (en liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana en el tumor del lado izquierdo para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

La **Figura 41A-D** son gráficos que muestran curvas de supervivencia para todos los grupos de tratamiento en el estudio 8. Los ratones que quedaban en el estudio el día 60 estaban completamente libres de tumores.

La **Figura 42A-C** son gráficos que muestran la regulación al alza de la expresión de OX40 inducida por tratamiento con CRX601 a una gama de concentraciones (0,01 - 1000 ng/ml) sobre células T CD4+ (A), células dendríticas (B), y monocitos (C) a las 24 horas en cultivo celular *in vitro*.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### Composiciones y Combinaciones

La mejoría de la función del sistema inmune es un objetivo de la inmunoterapia contra el cáncer. Aunque no se vincule a ninguna teoría, se piensa que para que el sistema inmune sea activado y cause una regresión eficaz o elimine los tumores, debe haber una inter-comunicación eficiente entre los diversos sectores del sistema inmune así como en el lecho del tumor. El efecto tumoricida depende de una o más etapas, por ejemplo, la captación del antígeno por las células dendríticas inmaduras y la presentación del antígeno procesado vía MHC I y II por las células dendríticas maduras a los linfocitos CD8 sin tratamiento (citotóxicos) y CD4 (auxiliares), respectivamente, en el drenaje de los nodos linfáticos. Las células T sin tratamiento expresan moléculas, tales como CTLA-4 y CD28, que enlazan con moléculas co-estimuladoras de la familia B7 en células presentadoras de antígeno (APC), tales como en las células dendríticas. Con el fin de mantener las células T en control durante la supervivencia inmune, las B7 en las APC preferiblemente se unen a CTLA-4, una molécula inhibidora en los linfocitos T. Sin embargo, en la unión del receptor de células T (TCR) con receptores de MHC Clase I o II vía la presentación del péptido del mismo origen en las APC, la molécula co-estimuladora se desenlaza de CTLA-4 y en vez de unirse a la molécula estimuladora CD28 de menor afinidad, causa la activación y la proliferación de las células T. Esta población expandida de linfocitos T cebados retiene la memoria del antígeno que se presentó a estos ya que se desplazan a sitios del tumor distantes. En el encuentro de una célula tumoral que lleva al mismo antígeno de origen, estos eliminan el tumor por medio de mediadores citolíticos, tales como granzima B y perforinas. Esta secuencia aparentemente

simplista de eventos es altamente dependiente de varias citoquinas, moléculas co-estimuladoras y moduladores de punto de control que activan y diferencian estos linfocitos T cebados en un grupo de memoria de células que pueden eliminar el tumor.

Por lo tanto, una estrategia inmunoterapéutica emergente es reconocer moléculas co-estimuladoras de células T, por ejemplo, OX40. El OX40 (por ejemplo, hOX40 o hOX40R) es un miembro de la familia del receptor de factor necrosis tumoral que se expresa, entre otras células, en células T CD4 y CD8 activadas. Una de sus funciones es la diferenciación y la supervivencia a largo plazo de estas células. El ligando para OX40 (OX40L) se expresa mediante células presentadoras de antígeno activadas. En una realización, los ABP y anticuerpos de la invención modulan OX40 y promueven el crecimiento y/o la diferenciación de células T y aumentan las poblaciones a largo plazo de células T de memoria, por ejemplo, en mecanismos sobrelapantes como los de OX40L, “que se unen a” OX40. Por tanto, en otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención se unen y engarzan con OX40. En todavía otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención modulan OX40. En una realización más, los ABP y anticuerpos de la invención modulan OX40 imitando a OX40L. En otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención son anticuerpos agonistas. En otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención modulan OX40 y causan la proliferación de células T. En una realización más, los ABP y anticuerpos de la invención modulan OX40 y mejoran, aumentan, potencian, o incrementan la proliferación de células T CD4. En otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención mejoran, aumentan, potencian, o incrementan la proliferación de células T CD8. En una realización más, los ABP y anticuerpos de la invención mejoran, aumentan, potencian, o incrementan la proliferación de ambas células T CD4 y CD8. En otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención potencian la función de las células T, por ejemplo, de células T CD4 o CD8, o ambas células T CD4 y CD8. En una realización más, los ABP y anticuerpos de la invención potencian la función de células T efectoras. En otra realización, los ABP y anticuerpos de la invención mejoran, aumentan, potencian, o incrementan la supervivencia a largo

plazo de células T CD8. En otras realizaciones, cualesquiera de los efectos anteriores ocurre en un ambiente tumoral.

De igual importancia es el bloqueo de una respuesta inmunodepresora potencialmente robusta en el sitio tumoral mediante mediadores producidos tanto por células T reguladoras (Treg) como por el propio tumor (por ejemplo, Factor Transformante del Crecimiento (TGF-β) e interleuquina-10 (IL-10)). Una importante patogénesis inmune del cáncer puede ser la implicación de las Treg que se encuentran en lechos tumorales y sitios de inflamación. En general, las células Treg aparecen naturalmente en la circulación y ayudan a que el sistema inmune se vuelva apaciguado, aunque en estado vigilante, después del encuentro y la eliminación de los patógenos externos. Las células T reguladoras ayudan a mantener la tolerancia frente a los autoantígenos y son naturalmente depresivas en su función, y son caracterizadas fenotípicamente como células CD4+, CD25+, FOXP3+. Con el fin de romper la tolerancia en ciertos canceres eficazmente tratados, un modo de terapia es eliminar las Treg preferiblemente en sitios tumorales. El reconocimiento y la eliminación de las Treg que conducen a una respuesta anti-tumoral han sido más exitosos en tumores que son inmunógenos comparado con los que son escasamente inmunógenos. Muchos tumores secretan citoquinas, por ejemplo, TGF-β que pueden dificultar la respuesta inmune provocando que las células CD4+25+ precursoras adquieran el fenotipo FOXP3+ y una función tipo Treg.

“Modular” como se usa en este documento, por ejemplo, con respecto a un receptor u otra diana, significa cambiar cualquier función natural o existente del receptor, por ejemplo significa afectar a la unión de ligandos naturales o artificiales al receptor o a la diana; incluye iniciar cualesquiera cambios parciales o completos conformacionales o de señalización a través del receptor o de la diana, y también incluye la prevención parcial o completa de la unión del receptor o de la diana con sus ligandos naturales o artificiales. También se incluyen en el caso de receptores unidos a membrana o dianas cualesquiera cambios en la ruta que el receptor o la interacción de la diana con otras proteínas o moléculas en la membrana o cambio en cualquier localización (o co-localización con otras moléculas) dentro de los

compartimentos de membrana como se compara con su estado natural o invariable. Los moduladores son, por lo tanto, compuestos o ligandos o moléculas que modulan una diana o un receptor. “Modular” incluye agonizar, por ejemplo, señalizar, así como antagonizar, o bloquear la señalización o interacciones con un ligando o compuesto o molécula que cambia del estado invariable o no modulado. Por tanto, los moduladores pueden ser agonistas o antagonistas. Además, cualquier experto en la técnica reconocerá que no todos los moduladores tendrán absoluta selectividad para una diana o un receptor, aunque todavía sean considerados un modulador para dicha diana o receptor; por ejemplo, un modulador de TLR4 también puede unirse a otro TLR, y todavía ser considerado como modulador de TLR4. Se sabe que otros moduladores tienen múltiples especificidades, tales como los moduladores de TLR7/8 que modulan ambos TLR7 y TLR8. Las moléculas con tales especificidades doble o múltiple conocidas se consideran moduladores de cada una de sus dianas; es decir, un modulador de TLR7/8 es un modulador de TLR7 como se usa en este documento y del mismo modo un modulador de TLR7/8 es un modulador de TLR8 como se usa en este documento.

Los “agonistas” de una diana o receptor son moléculas o compuestos o ligandos que imitan una o más funciones de un ligando natural o molécula que interacciona con la diana o el receptor e incluyen iniciar uno o más eventos de señalización a través del receptor, imitando una o más funciones de un ligando natural, iniciando uno o más cambios conformacionales parciales o completos que se observan en la funcionalización conformacional o la señalización a través del receptor.

Por tanto, en una realización, el ABP OX40 o el anticuerpo inhibe el efecto depresor de células T reguladoras en otras células T, por ejemplo, dentro del ambiente tumoral.

La acumulación de pruebas sugiere que la proporción de células Treg a T efectoras en el tumor se correlaciona con la respuesta antitumoral. Por lo tanto, en una realización, los ABP OX40 o anticuerpos de la invención modulan OX40 para aumentar el número y la función de T efectoras e inhiben la función de Treg.

La potenciación, aumentación, mejora, incremento y otros cambios del efecto anti-tumoral de OX40 son un objeto de la invención. Se describen en este documento combinaciones de un ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención y otro compuesto, tal como un modulador de TLR descrito en este documento.

Por tanto, como se usa en este documento la expresión “combinación de la invención” se refiere a una combinación que comprende un ABP anti-OX40 o anticuerpo y un modulador de TLR4, tal como un AGP, cada uno de los cuales puede administrarse de forma separada o simultánea como se describe en este documento.

Como se usa en este documento, los términos "cáncer," "neoplasma" y "tumor," se usan de forma intercambiable y en cada una de formas singulares o plurales, se refiere a células que han sufrido una transformación maligna o sufren cambios celulares que producen un crecimiento aberrante o desregulado o una hiperproliferación. Dichos cambios o transformaciones malignas normalmente hacen a dichas células patológicas frente al organismo huésped, así las células precancerígenas o pre-cancerosas que son o que podrían volverse patológicas y que requieren o podrían beneficiarse de una intervención también se pretende que sean incluidas. Las células cancerosas primarias (es decir, las células obtenidas desde cerca del sitio de la transformación maligna) pueden fácilmente distinguirse de las células no cancerígenas por técnicas bien establecidas, tal como el examen histológico. La definición de una célula cancerígena, como se usa en este documento, incluye no solo a una célula cancerígena primaria, sino a cualquier célula derivada de una célula cancerígena predecesora. Esto incluye células cancerígenas metatizadas, y cultivos *in vitro* y líneas celulares derivadas de células cancerígenas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es uno que es detectable basado en la masa tumoral; por ejemplo, mediante procedimientos tales como exploración CAT, visualización MR, rayos X, ultrasonidos o palpación, y/o que es detectable debido a la expresión de uno o más antígenos específicos de cáncer en una muestra obtenible a partir de un paciente. En otras palabras, los términos en este documento incluyen células,

neoplasmas, canceres, y tumores de cualquier etapa, incluyendo a lo que un médico se refiere como un precáncer, tumores, crecimientos *in situ*, así como crecimientos metastásicos de etapa avanzada. Los tumores pueden ser tumores hematopoyéticos, por ejemplo, tumores de células sanguíneas o similares, lo que significa que son tumores líquidos. Los ejemplos específicos de condiciones clínicas basadas en dicho tumor incluyen leucemia, tales como leucemia crónica mielocítica o leucemia aguda mielocítica; mielomas, tales como mielomas múltiple; linfomas y similares.

Como se usa en este documento, el término, “agente”, significa una sustancia que produce un efecto deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero, ser humano u otro sujeto. De acuerdo con esto, la expresión, “agente anti-neoplásico” significa una sustancia que produce un efecto anti-neoplásico en un tejido, sistema, animal, mamífero, ser humano, u otro sujeto. El término, “agente”, puede ser un compuesto sencillo o una combinación o composición de dos o más compuestos.

Mediante el término “tratar” y sus derivados, como se usan en este documento, se entiende una terapia terapéutica. Con referencia a una condición particular, tratar significa: (1) mejorar la condición o una o más de las manifestaciones biológicas de la condición (2) interferir con (a) uno o más puntos en la cascada biológica que conduce o es responsable de la condición o (b) una o más de las manifestaciones biológicas de la condición; (3) aliviar uno o más de los síntomas, efectos o efectos secundarios asociados con la condición o uno o más de los síntomas, efectos o efectos secundarios asociados con la condición o su tratamiento; o (4) ralentizar la progresión de la condición o una o más de las manifestaciones biológicas de la condición.

Como se usa en este documento, “prevención” significa la administración profiláctica de un fármaco para disminuir sustancialmente la probabilidad o severidad de una condición o su manifestación biológica, o para retrasar el inicio de dicha condición o su manifestación biológica. El experto en la técnica apreciará que “prevención” no es un término absoluto. La terapia profiláctica es apropiada, por ejemplo, cuando un sujeto es considerado en alto riesgo de desarrollar un

cáncer, tal como cuando un sujeto tiene una consistente historia familiar de cáncer o cuando un sujeto ha sido expuesto a un carcinógeno.

Como se usa en este documento, la expresión, "cantidad eficaz", significa que la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, la expresión, “cantidad terapéuticamente eficaz”, significa cualquier cantidad que, cuando se compara con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, resulta en un mejor tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o un trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces que potencian la función normal fisiológica.

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad eficaz" significa que la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa cualquier cantidad que, cuando se compara con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, resulta en un mejor tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o un trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces que potencian la función normal fisiológica.

Mediante el término “combinación” y sus variaciones gramaticales, como se usa en este documento, se entiende tanto la administración simultánea o cualquier manera de administración secuencial separada de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A (un ABP OX-40) y Compuesto B (un agonista de TLR4) o su sal farmacéuticamente aceptable. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma de administración, por ejemplo, un compuesto puede administrarse intravenosamente y el otro compuesto puede administrarse intratumoralmente.

La expresión “kit de combinación”, como se usa en este documento, significa la composición o composiciones farmacéuticas que se usan para administrar el Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, y el Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con la invención. Cuando ambos compuestos se administran simultáneamente, el kit de combinación puede contener el Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, y el Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, en una composición farmacéutica, tal como una comprimido, o en composiciones farmacéuticas separadas. Cuando los compuestos no se administran simultáneamente, el kit de combinación contendrá el Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, y el Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, en composiciones farmacéuticas separadas. El kit de combinación puede comprender el Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, y el Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, en composiciones farmacéuticas separadas en un paquete individual o en composiciones farmacéuticas separadas en paquetes separados.

En una realización, la invención proporciona un kit de combinación que comprende los componentes:

Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el kit de combinación comprende los siguientes componentes:

El Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

El Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en donde los componentes se proporcionan en una forma que sea adecuada para la administración secuencial, separada y/o simultánea.

En todavía otra realización, el kit de combinación comprende:

un primer recipiente que comprende el Compuesto A, o su sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

un segundo recipiente que comprende el Compuesto B, o su sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un medio del recipiente que contiene dicho primer y segundo recipientes.

El “kit de combinación” también puede proporcionarse con instrucciones, tales como instrucciones de dosificación y administración. Dichas instrucciones de dosificación y administración pueden ser del tipo que se proporciona a un doctor, por ejemplo mediante un prospecto de fármaco, o pueden ser del tipo que se proporciona por un doctor, tales como instrucciones para un paciente.

Como se usa en este documento, la expresión “Compuesto $A^2$” significa un anticuerpo monoclonal frente a OX-40 humano o su porción de unión al antígeno. De manera adecuada, el Compuesto $A^2$ significa un anticuerpo monoclonal humanizado que tiene una región variable de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO:5 y una región variable de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO:11.

Como se usa en este documento, la expresión “Compuesto $B^2$” significa un agonista de TLR4 de Fórmula I o Fórmula Ia. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ significa el agonista de TLR4 CRX-601.

De manera adecuada, las combinaciones de esta invención se administran dentro de un “periodo específico”.

La expresión “periodo específico” y sus variaciones gramaticales, como se usa en este documento, significa el intervalo de tiempo entre la administración de uno del

Compuesto $A^2$ y del Compuesto $B^2$ y el otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$. A menos que se defina de otra manera, el periodo específico puede incluir la administración simultánea. A menos que se defina de otra manera, el periodo específico se refiere a la administración del Compuesto $A^2$ y del Compuesto $B^2$ durante un solo día.

De manera adecuada, si los compuestos se administran dentro de un “periodo específico” y no se administran simultáneamente, ambos se administran entre aproximadamente 24 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será de aproximadamente 24 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 12 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 12 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 11 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 11 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 10 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 10 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 9 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 9 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 8 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 8 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 7 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 7 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 6 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 6 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 5 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 5 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 4 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 4 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre aproximadamente 3 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 3 horas; de manera adecuada se administrarán entre aproximadamente 2 horas entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 2 horas; de manera adecuada ambos se administrarán entre

aproximadamente 1 hora entre sí – en este caso, el periodo específico será aproximadamente 1 hora. Como se usa en este documento, la administración del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ en menos de aproximadamente 45 minutos separados es considerada una administración simultánea.

De manera adecuada, cuando la combinación de la invención se administra para un “periodo específico”, los compuestos serán co-administrados durante una “duración de tiempo”.

La expresión “duración de tiempo” y sus variaciones gramaticales, como se usa en este documento significan que ambos compuestos de la invención se administran durante un número indicado de días consecutivos. A menos que se defina de otra manera, el número de días consecutivos no tiene que comenzar con el inicio del tratamiento o terminar con el final del tratamiento, solo se requiere que el número de días consecutivos ocurran en algún punto durante el curso de tratamiento.

Respecto a la administración del “periodo específico”: de manera adecuada, ambos compuestos se administrarán dentro de un periodo específico durante al menos un día – en este caso, la duración de tiempo será al menos un día; de manera adecuada, durante el curso al tratamiento, ambos compuestos se administrarán dentro de un periodo específico durante al menos 3 días consecutivos – en este caso, la duración de tiempo será al menos 3 días; de manera adecuada, durante el curso al tratamiento, ambos compuestos se administrarán dentro de un periodo específico durante al menos 5 días consecutivos – en este caso, la duración de tiempo será al menos 5 días; de manera adecuada, durante el curso al tratamiento, ambos compuestos se administrarán dentro de un periodo específico durante al menos 7 días consecutivos – en este caso, la duración de tiempo será al menos 7 días; de manera adecuada, durante el curso al tratamiento, ambos compuestos se administrarán dentro de un periodo específico durante al menos 14 días consecutivos – en este caso, la duración de tiempo será al menos 14 días; de manera adecuada, durante el curso al tratamiento, ambos compuestos se

administrarán dentro de un periodo específico durante al menos 30 días consecutivos – en este caso, la duración de tiempo será al menos 30 días.

De manera adecuada, si los compuestos no se administran durante un “periodo específico”, se administran secuencialmente. Mediante la expresión “administración secuencial”, y sus derivados gramaticales, como se usa en este documento se entiende que uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ se administra una vez al día durante dos o más días consecutivos y el otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ se administra posteriormente una vez a día durante dos o más días consecutivos. También, se contempla en este documento un descanso del fármaco utilizado entre la administración secuencial de uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ y el otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$. Como se usa en este documento, un descanso del fármaco es un periodo de días después de la administración secuencial de uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ y antes de la administración del otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ donde ni el Compuesto $A^2$ ni el Compuesto $B^2$ se administra. De manera adecuada, el descanso del fármaco será un periodo de días seleccionado de: 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días y 14 días.

Con respecto a la administración secuencial, de manera adecuada, uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ se administra durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco opcional, seguido de la administración del otro del Compuesto $A^2$ y del Compuesto $B^2$ durante 1 a 30 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ se administra durante 1 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco opcional, seguido de la administración del otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ durante 1 a 21 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ se administra durante 1 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 1 a 14 días, seguido de la administración del otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ durante 1 a 14 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ se administra durante 1 a 7 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 1 a 10 días, seguido de la administración del otro del Compuesto $A^2$ y Compuesto $B^2$ durante 1 a 7 días consecutivos.

De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administrará primero en la secuencia, seguido de un descanso del fármaco opcional, seguido de la administración del Compuesto $A^2$. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 3 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco opcional, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 3 a 21 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 3 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 1 a 14 días, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 3 a 21 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 3 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 3 a 14 días, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 3 a 21 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 21 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco opcional, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 14 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 14 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 1 a 14 días, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 14 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 3 a 10 días, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 7 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 3 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 3 a 14 días, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 7 días consecutivos. De manera adecuada, el Compuesto $B^2$ se administra durante 3 días consecutivos, seguido de un descanso del fármaco de 3 a 10 días, seguido de la administración del Compuesto $A^2$ durante 3 días consecutivos.

Se entiende que una administración del “periodo específico” y una administración “secuencial” pueden seguirse de una administración repetida o puede seguirse de un protocolo de administración alterno, y un descanso del fármaco puede precederse a la administración de repetición o al protocolo de administración alterno.

Los métodos de la presente invención también pueden emplearse con los otros métodos terapéuticos del tratamiento del cáncer.

Mientras es posible que, para uso en terapia, las cantidades terapéuticamente eficaces de las combinaciones de la presente invención pueden administrarse como la materia prima química, es preferible presentar las combinaciones como una composición farmacéutica o composiciones farmacéuticas. De acuerdo con esto, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas, que incluyen el Compuesto $A^2$ y/o el Compuesto $B^2$, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las combinaciones de la presente invención son como se describen más arriba. El vehículo(s) debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la Formulación, capaces de ser la Formulación farmacéutica, y no deletéreos a su receptor. De acuerdo con otro aspecto de la invención también se proporciona un procedimiento para la preparación de una Formulación farmacéutica que incluye mezclar el Compuesto $A^2$ y/o el Compuesto $B^2$ con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se indica anteriormente, dichos elementos de la combinación farmacéutica utilizados pueden presentarse en composiciones farmacéuticas separadas o formularse juntas en una Formulación farmacéutica.

Las Formulaciones Farmacéuticas pueden presentarse en formas de dosificación unitaria que contienen una cantidad predeterminada del ingrediente activo por dosis unitaria. Como es conocido por los expertos en la técnica, la cantidad de ingrediente activo por dosis dependerá de la condición que se trate, la ruta de administración y la edad, el peso y la condición del paciente. Las Formulaciones de administración unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o una sub-dosis, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. Además, dichas Formulaciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

El Compuesto $A^2$ y el Compuesto $B^2$ pueden administrarse por cualquier ruta apropiada. Las rutas adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), intratumoral, vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Será apreciado que la ruta preferida puede variar, por ejemplo, con la condición del receptor de la combinación y el cáncer que se trate. También será apreciado que cada uno de

los agentes administrados puede administrarse por las mismas o diferentes rutas y que el Compuesto $A^2$ y el Compuesto $B^2$ pueden componerse juntos en una composición/formulación farmacéutica.

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las combinaciones de la invención (o cantidades terapéuticamente eficaces de cada uno de los componentes de la combinación) son ventajosas de los compuestos del componente individual en que las combinaciones proporcionan una o más de las siguientes propiedades mejoradas cuando se compara con la administración individual de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto del componente: i) un mayor efecto anti-cáncer que el agente individual más activo; ii) actividad anti-cáncer sinérgica o altamente sinérgica; iii) un protocolo de administración que proporcione una mejorada actividad anti-cáncer con un reducido perfil de efectos secundarios; iv) una reducción en el perfil del efecto tóxico, v) un incremento en la ventana terapéutica; o vi) un incremento en la biodisponibilidad de uno o ambos de los compuestos del componente.

La invención además proporciona composiciones farmacéuticas, que incluyen uno o más de los componentes en este documento, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes, o excipientes. La combinación de la invención puede comprender dos composiciones farmacéuticas, una que comprende un ABP o anticuerpo de la invención, y el otro que comprende un modulador de TLR4, cada uno de los cuales puede tener los mismos o diferentes vehículos, diluyentes o excipientes. El(los) vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la Formulación, capaces de ser la Formulación farmacéutica, y no deletéreos al receptor del mismo. En una realización de la invención, la Formulación puede ser acuosa o liposómica. En una realización, la Formulación liposómica puede ser una Formulación de liposomas DOPC/CHOL.

Los componentes de la combinación de la invención y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos componentes pueden administrarse en

cualquier orden y en diferentes rutas; los componentes y composiciones farmacéuticas que comprenden la misma pueden administrarse simultáneamente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención también se proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que incluye mezclar un componente de la combinación de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes o excipientes.

Los componentes de la invención pueden administrarse por cualquier ruta apropiada. Para algunos componentes, las rutas adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intraveneosa, intradérmica, intratecal y epidural). La ruta preferida puede variar, por ejemplo, con la condición del receptor de la combinación y el cáncer que se trate. Cada uno de los agentes administrados puede administrarse por las mismas rutas o diferentes, y los componentes pueden componerse juntos o en composiciones farmacéuticas separadas.

En una realización, uno o más componentes de una combinación de la invención se administran intravenosamente. En otra realización, uno o más componentes de una combinación de la invención se administran intratumoralmente. En otra realización, uno o más componentes de una combinación de la invención se administran sistémicamente, por ejemplo, intravenosamente, y uno o más componentes diferentes de una combinación de la invención se administran intratumoralmente. En otra realización, todos los componentes de una combinación de la invención se administran sistémicamente, por ejemplo, intravenosamente. En una realización alternativa, todos los componentes de la combinación de la invención se administran intratumoralmente. En cualquiera de las realizaciones, por ejemplo, en este párrafo, los componentes de la invención se administran como una o más composiciones farmacéuticas.

**Proteínas de unión a antígenos y anticuerpos que se unen a OX40**

“Proteína de Unión a Antígeno (ABP)” significa una proteína que se une a un antígeno, incluyendo anticuerpos o moléculas genéticamente modificadas que

funcionan de modo similar a los anticuerpos. Dichos formatos de anticuerpo alternativos incluyen trianticuerpos, tetraanticuerpos, minianticuerpos, y un minicuerpo. También se incluyen estructuras alternativas en las que una o más regiones CDR de cualquier molécula de acuerdo con la descripción pueden disponerse sobre una estructura o esqueleto proteico de no inmunoglobulina adecuado, tal como un Affibody, una estructura SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un Avimer (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. Nos. 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301) o un dominio EGF. Un ABP también incluye fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos u otras moléculas. Además, un ABP puede comprender las regiones VH de la invención formadas dentro de un anticuerpo de cadena completa, un fragmento (Fab')2, un fragmento Fab, una molécula bi-específica o biparatópica o su equivalente (tales como scFV, bi- tri- o tetra-cuerpos, Tandabs, etc.), cuando se empareja con una cadena ligera apropiada. El ABP puede comprender un anticuerpo que es un IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4; o IgM; IgA, IgE o IgD o a su variante modificada. El dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo puede seleccionarse de acuerdo con esto. El dominio constante de cadena ligera puede ser un dominio constante kappa o lambda. El ABP puede ser también un anticuerpo quimérico del tipo descrito en el documento WO86/01533, que comprende una región de unión a antígeno y una región no inmunoglobulina.

Por tanto, en este documento un ABP de la invención o una proteína de unión a antígeno anti-OX40 es una que se une a OX40, y en algunas realizaciones, que hace uno o más de lo siguiente: modula la señalización a través de OX40, modula la función de OX40, agoniza la señalización de OX40, estimula la función de OX40, o co-estimulan la señalización de OX40. El Ejemplo 1 de la Patente de EE.UU. 9.006.399 describe un ensayo de unión de OX40. Cualquier experto en la técnica reconocerá fácilmente una variedad de otros ensayos bien conocidos para establecer dichas funciones.

El término “anticuerpo” como se usa en este documento se refiere a moléculas con un dominio de unión a antígeno, y opcionalmente un dominio tipo inmunoglobulina o su fragmento e incluye anticuerpos monoclonales (por ejemplo

IgG, IgM, IgA, IgD o IgE y sus variantes modificadas), recombinantes, policlonales, quiméricos, humanizados, biparatópicos, biespecíficos y heteroconjugados, o un anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada. El “anticuerpo” incluye sus formas modificadas xenogeneicas, alogeneicas, singeneicas u otras de sus formas. El anticuerpo puede aislarse o purificarse. El anticuerpo también puede ser recombinante, es decir, producirse mediante medios recombinantes; por ejemplo, un anticuerpo que sea 90% idéntico a un anticuerpo de referencia puede generarse por mutagénesis de ciertos restos usando técnicas recombinantes de biología molecular conocidas en la técnica. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden comprender regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de la invención que pueden conformarse en la estructura de un anticuerpo natural o conformarse en un anticuerpo recombinante de cadena completa, un fragmento (Fab’)2, un fragmento Fab, una molécula bi-específica o biparatópica o su equivalente (tales como scFV, bi- tri- o tetra-cuerpos, Tandabs *etc.*), cuando se emparejan con una cadena ligera apropiada. El anticuerpo puede ser una IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 o su variante modificada. El dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo puede seleccionarse de acuerdo con esto. El dominio de cadena constante ligera puede ser un dominio constante kappa o lambda. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico del tipo descrito en el documento WO86/01533 que comprende una región de unión a antígeno y una región no inmunoglobulina.

Cualquier experto en la técnica reconocerá que los ABP y anticuerpos de la invención se unen a un epítopo de OX40. El epítopo de un ABP es la región de su antígeno al que el ABP se une. Dos ABP se unen al mismo epítopo o lo sobrelapan si cada uno inhibe la unión de forma competitiva (bloques) del otro al antígeno. Es decir, un exceso de 1x, 5x, 10x, 20x o 100x de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50%, 75%, 90% o incluso 99% como se mide en un ensayo de unión competitivo comparado con un control que carece del anticuerpo competidor (véase, por ejemplo, Junghans, *et al., Cancer Res*. 50:1495, 1990). De forma alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reduce o elimina la unión de un

anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Además, el mismo epítopo puede incluir “epítopos sobrelapantes”, por ejemplo, si algunas mutaciones de aminoácido que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

La fuerza de la unión puede ser importante en la dosificación y administración de un ABP o anticuerpo de la invención. En una realización, el ABP o anticuerpo de la invención se une a OX40, preferiblemente el OX40 humano, con alta afinidad. Por ejemplo, cuando se mide por Biacore®, el anticuerpo se une a OX40, preferiblemente el OX40 humano, con una afinidad de 1-1000 nM o 500 nM o menos o una afinidad de 200 nM o menos o una afinidad de 100 nM o menos o una afinidad de 50 nM o menos o una afinidad de 500 pM o menos o una afinidad de 400 pM o menos, o 300 pM o menos. En un aspecto más el anticuerpo se une a OX40, preferiblemente el OX40 humano, cuando se mide por BIACORE® de entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 200 nM o entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 150 nM. En un aspecto de la presente invención el anticuerpo se une a OX40. Preferiblemente el OX40 humano, con una afinidad de menos de 100nM.

En una realización más, la unión se mide mediante BIACORE®. La afinidad es la fuerza de unión de una molécula, por ejemplo, un anticuerpo de la invención, a otro, por ejemplo, su antígeno diana, en un sitio único de unión. La afinidad de unión de un anticuerpo a su diana puede determinarse mediante métodos en equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o análisis cinéticos (por ejemplo, el análisis BIACORE®). Por ejemplo, los métodos de BIACORE® conocidos en la técnica pueden usarse para medir la afinidad de unión.

La avidez es la suma total de la fuerza de unión de dos moléculas a otra en múltiples sitios, por ejemplo, tomando en cuenta la valencia de la interacción.

En un aspecto, la constante de disociación en el equilibrio (KD) del ABP o anticuerpo de la invención y la interacción de OX40, preferiblemente OX40 humano, es 100 nM o menos, 10 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos. De

forma alternativa, la KD puede estar entre 5 y 10 nM; o entre 1 y 2 nM. La KD puede estar entre 1 pM y 500 pM; o entre 500 pM y 1 nM. Cualquier experto en la técnica apreciará que cuanto más pequeño sea el valor numérico de KD, mayor será la fuerza de unión. La inversa de KD (es decir, 1/KD) es la constante de asociación en el equilibrio (KA) que tiene unidades M-1. Cualquier experto en la técnica apreciará que cuanto más grande sea el valor numérico de KA, más fuerte será la unión.

La constante de la velocidad de disociación (kd) o “constante de disociación” describe la estabilidad del complejo de ABP o anticuerpo por una parte y OX40, preferiblemente OX40 humano por otra parte, es decir, la fracción de complejos que se descompone por segundo. Por ejemplo, una kd de 0,01 s-1 es igual al 1% de los complejos que se descompone por segundo. En una realización, constante de la velocidad de disociación (kd) es 1x10-3 s-1 o menos, 1x10-4 s-1 o menos, 1x10-5 s-1 o menos, o 1x10-6 s-1 o menos. La kd puede estar entre 1x10-5 s-1 y 1x10-4 s-1; o entre 1x10-4 s-1 y 1x10-3 s-1.

La competición entre un ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención, y un anticuerpo de referencia, por ejemplo, para la unión de OX40, un epítopo de OX40, o un fragmento del OX40, puede determinarse mediante un ELISA de competición, FMAT o BIAcore®. En un aspecto, el ensayo de competición se lleva a cabo mediante el BIAcore®. Hay varias posibles razones para esta competición: las dos proteínas pueden unirse al mismo epítopo o sobrelaparse con éste, puede haber una inhibición de la unión estérica, o la unión de la primera proteína puede inducir un cambio conformacional en el antígeno que evite o reduzca la unión de la segunda proteína.

Los “fragmentos de unión”, como se usan en este documento, significan una porción o un fragmento de los ABP o anticuerpos de la invención que incluyen el sitio de unión de antígeno y son capaces de unirse a OX40 como se define en este documento, por ejemplo, pero sin limitación, para ser capaces de unirse al mismo epítopo del anticuerpo parenteral o de cadena completa.

Se contemplan en este documento fragmentos funcionales de los ABP y anticuerpos de la invención.

Por tanto, los “fragmentos de unión” y los “fragmentos funcionales” pueden ser fragmentos Fab y F(ab')2 que carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener una unión al tejido menos inespecífica que un anticuerpo intacto (Wahl, *et al., J. Nuc. Med*. 24:316-325 (1983)). También se incluyen los fragmentos Fv (Hochman, *et al., Biochemistry* 12:1130-1135 (1973); Sharon, et al, *Biochemistry* 15:1591-1594 (1976)). Estos diversos fragmentos se producen usando técnicas convencionales tal como división con proteasas o división química (véase, por ejemplo, Rousseaux, *et al., Meth. Enzymol*., 121:663-69 (1986)).

“Fragmentos funcionales”, como se usa en este documento, significa una porción o fragmento de los ABP o anticuerpos de la invención que incluyen el sitio de unión de antígeno y son capaces de unirse a la misma diana que el ABP parenteral o anticuerpo, por ejemplo, pero sin limitación a la unión con el mismo epítopo, y que también retienen una o más funciones moduladoras u otras descritas en este documento o conocidas en la técnica.

Como los ABP y anticuerpos de la presente invención pueden comprender regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de la invención que pueden conformarse en la estructura de un anticuerpo natural, un fragmento funcional es uno que retiene la unión o una o más funciones del ABP de cadena completa o anticuerpo como se describe en este documento. Un fragmento de unión de un ABP o anticuerpo de la invención puede comprender, por lo tanto, las regiones VL o VH, un fragmento (Fab’)2, un fragmento Fab, un fragmento de una molécula bi-específica o biparatópica o su equivalente (tal como, scFV, bi- tri- o tetra-cuerpos, Tandabs *etc.*), cuando se empareja con una cadena ligera apropiada.

El término “CDR”, como se usa en este documento, se refiere a la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de una unión a la proteína antigénica. Estas son las regiones hipervariables de las cadenas pesadas

y ligeras de inmunoglobulina. Existen tres regiones CDR de cadena pesadas y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la porción variable de una inmunoglobulina.

Será evidente para los expertos en la técnica que hay varias convenciones de numeración para las secuencias CDR; Chothia (Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883), Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (Universidad de Bath) y Contacto (University College London). La región sobrelapante mínima que usa al menos dos de los métodos de Kabat, Chothia, AbM y contacto pueden determinarse para proporcionar la “unidad de unión mínima”. La unidad de unión mínima puede ser una subporción de una CDR. El plegamiento de la estructura y de la proteína del anticuerpo puede significar que otros restos se consideran parte de la secuencia CDR y debería entenderse que son así por cualquier experto en la técnica. Es de señalar que algunas de las definiciones de CDR pueden variar dependiendo de la publicación individual usada.

A menos que se establezca otra cosa y/o en ausencia de una secuencia específicamente identificada, las referencias en este documento a “CDR”, “CDRL1”, “CDRL2”, “CDRL3”, “CDRH1”, “CDRH2”, “CDRH3” se refieren a la secuencia de aminoácidos enumerada de acuerdo con cualquiera de las convenciones conocidas; de forma alternativa, las regiones CDR se denominan “CDR1,” “CDR2,” “CDR3” de la cadena variable ligera y “CDR1,” “CDR2,” y “CDR3” de la cadena variable pesada. En algunas realizaciones, la convención de numeración es la convención de Kabat.

La expresión “variante CDR”, como se usa en este documento, se refiere a una CDR que se ha modificado por al menos una, por ejemplo, 1, 2 ó 3 sustitución o sustituciones, deleción o deleciones, o adición o adiciones de aminoácidos, en donde la proteína de unión a antígeno modificada que comprende la variante CDR sustancialmente retiene las características biológicas de la proteína de unión antigénica pre-modificada. Será apreciado que cada CDR que puede modificarse

puede ser modificada sola o en combinación con otra CDR. En un aspecto, la modificación es una sustitución, particularmente una substitución conservadora, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

| **Cadena lateral** | **Miembros** |
|---|---|
| Hidrófoba | Met, Ala, Val, Leu, Ile |
| Hidrófila neutra | Cys, Ser, Thr |
| Ácida | Asp, Glu |
| Básica | Asn, Gln, His, Lys, Arg |
| Restos que influyen en la orientación de la cadena | Gly, Pro |
| Aromática | Trp, Tyr, Phe |

Por ejemplo, en una variante CDR, los restos de aminoácidos de la unidad de unión mínima pueden quedar iguales, pero los restos complementarios que comprenden la CDR como parte de la definición o definiciones Kabat o Chothia pueden sustituirse con un resto de aminoácido conservador.

Dichas proteínas de unión a antígenos que comprenden las regiones CDR modificadas o las unidades de unión mínima como se describe anteriormente pueden denominarse en este documento “variantes CDR funcionales” o “variantes de unidad de unión funcional”.

El anticuerpo puede ser de cualquier especie, o estar modificado para ser adecuado para administrar a una especie cruzada. Por ejemplo, las regiones CDR de un anticuerpo de ratón pueden humanizarse para su administración en humanos. En cualquier realización, la proteína de unión antigénica es opcionalmente un anticuerpo humanizado.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo genéticamente modificado que tiene sus regiones CDR derivadas de una inmunoglobulina de un

donante no humano, siendo el resto de partes de la inmunoglobulina derivadas de la molécula a partir de una (o más) inmunoglobulina(s) humana. Además, los restos de apoyo de la estructura pueden alterarse para preservar la afinidad de unión (véase, por ejemplo, Queen, *et al., Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, *et al., Bio/Technology*, 9:421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado a partir de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, la base de datos de Los Álamos y la base de datos de la proteína Swiss, por homología a la secuencia de nucleótido y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con las regiones marco del anticuerpo donante (en una base de aminoácidos) puede ser adecuada para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región marco variable de cadena pesada para la inserción de las regiones CDR del donante. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones constantes de cadena ligera o de marco variable pueden seleccionarse de forma similar. Debe apreciarse que las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo aceptor no se requiere que se originen del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe varios modos para producir tales anticuerpos humanizados – véase, por ejemplo, los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.

En todavía una realización más, el anticuerpo humanizado tiene una región constante de anticuerpo humano que es una IgG. En otra realización, la IgG es una secuencia como las descritas en cualquiera de las anteriores referencias o publicaciones de patente.

Para la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, el término “idéntico" o “identidad” indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o dos secuencias de aminoácidos cuando se alinean de forma óptima y comparado con inserciones o deleciones apropiadas.

El tanto por ciento de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones multiplicado por

100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesita ser introducido para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del tanto por ciento de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

El tanto por ciento de identidad entre una secuencia de ácido nucleico problema y una secuencia de ácidos nucleicos objeto es el valor de “Identidades”, expresado como un porcentaje, que se calcula por el algoritmo BLASTN cuando una secuencia de ácidos nucleicos objeto tiene una cobertura problema del 100% con una secuencia de ácidos nucleicos problema después de que realiza un alineamiento BLASTN pareado. Dichos alineamientos BLASTN pareados entre una secuencia de ácidos nucleicos problema y un secuencia de ácidos nucleicos objeto se realizan usando los parámetros estándar del algoritmo BLASTN disponible en la página web del National Center for Biotechnology Institute con el filtro para regiones de baja complejidad desactivado. De forma destacada, una secuencia de ácidos nucleicos problema puede describirse por una secuencia de ácidos nucleicos identificada en una o más de las reivindicaciones en este documento.

El tanto por ciento de identidad entre una secuencia de aminoácidos problema y un secuencia de aminoácidos objeto es el valor de “Identidades”, expresado como un porcentaje, el cual se calcula por el algoritmo BLASTP cuando un secuencia de aminoácidos objeto tiene una cobertura problema del 100% con una secuencia de aminoácidos problema después de que se realiza un alineamiento BLASTP pareado. Dichos alineamientos BLASTP pareados entre una secuencia de aminoácidos problema y un secuencia de aminoácidos objeto se realizan usando los parámetros estándar del algoritmo BLASTP disponible en la página web del National Center for Biotechnology Institute con el filtro para regiones de baja complejidad desactivado. De forma destacada, una secuencia de aminoácidos problema puede describirse por una secuencia de aminoácidos identificada en una o más de las reivindicaciones en este documento.

En cualquier realización de la invención en este documento, el ABP o anticuerpo puede tener una cualquiera o todas las regiones CDR, VH, VL, con 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, o 90 por ciento de identidad respecto a la secuencia mostrada o mencionada, por ejemplo, como se define por las SEQ ID NO descritas en este documento.

Se proporcionan en este documento ABP y anticuerpos que se unen al receptor humano de OX40 (es decir, un ABP anti-OX40 y un anticuerpo anti-humano del receptor de OX40 (hOX40R), algunas veces denominado en este documento “ABP anti-OX40 o un anticuerpo anti-OX40” y/o otras variaciones del mismo). Estos anticuerpos son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades o condiciones agudas o crónicas cuya patología implica la señalización de OX40. En un aspecto, se describe una proteína de unión a antígeno, o un anticuerpo humano aislado o fragmento funcional de dicha proteína o anticuerpo, que se unen al OX40R humano y es eficaz como un tratamiento contra el cáncer o tratamiento contra una enfermedad, por ejemplo en combinación con otro compuesto tal como un modulador del agonista de TLR4 o TLR4. Cualquiera de las proteínas de unión a antígenos o anticuerpos anti-OX40 descritos en este documento pueden usare como medicamento. Una cualquiera o varias de las proteínas de unión a antígeno o anticuerpos anti-OX40 pueden usarse en los métodos o composiciones para tratar el cáncer, por ejemplo, aquellas descritas en este documento.

Los anticuerpos aislados, como se describen en este documento, se unen a OX40, y pueden unirse al OX40 codificado a partir de los siguientes genes: Número de Entrada NCBI NP_003317, Número de Entrada Genpept P23510, o genes que tienen un 90 por ciento de homología o 90 por ciento de identidad respecto a ésta. El anticuerpo aislado proporcionado en este documento puede unirse además al receptor de OX40 que tiene uno de los siguientes Números de Entrada GenBank: AAB39944, CAE11757 o AAI05071.

Se conocen en la técnica proteínas de unión a antígenos y anticuerpos que se unen y/o modulan el receptor de OX40. Se describen ABP ilustrativos y

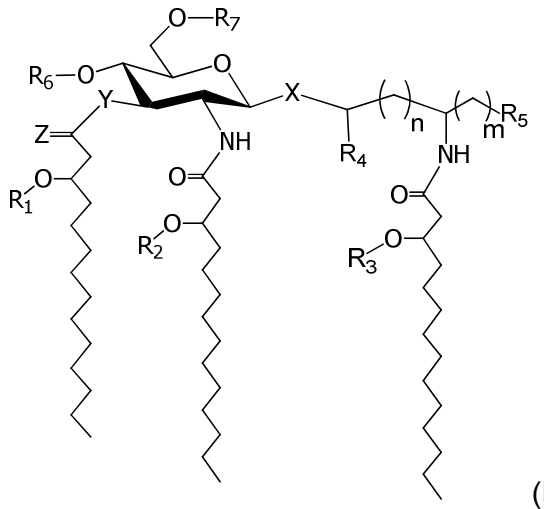
anticuerpos de la invención, por ejemplo en la Publicación Internacional No. WO2013/028231 (PCT/US2012/024570), fecha de presentación internacional 9 Feb. 2012, y el documento WO2012/027328 (PCT/US2011/048752), fecha de presentación internacional 23 de Agosto de 2011. (En la medida de que cualquiera de las definiciones entren en conflicto, la presente solicitud prevalece). En una realización, los anticuerpos OX40 de la presente invención se describen en la Patente de EE.UU. No. 9.163.085.

**Moduladores de TLR4**

Las combinaciones de la invención comprenden “moduladores” de TLR4, es decir, moléculas que modulan TLR4, por ejemplo, mediante la unión e iniciación de cambios conformacionales o de señalización en la unión de TLR4, moléculas que bloquean la unión con un ligando de TLR4.

En una realización, los moduladores de TLR4 son compuestos de glucosaminida fosfato de aminoalquilo (AGP). El TLR4 reconoce los LPS (lipopolisacáridos) bacterianos y cuando se activa inicia una respuesta inmune innata. Las AGP son un monosacárido mimético de la proteína A lipídica de LPS bacterianos y han sido desarrolladas con enlaces éter y éster en las “cadenas acilo” del compuesto. Los procesos para preparar estos compuestos se conocen y son descritos, por ejemplo, en el documento WO 2006/016997, las Patentes de EE.UU. Nos. 7.288.640 y 6.113.918, y el documento WO 01/90129. Otras AGP y procesos relacionados se describen en la Patente de EE.UU. No. 7.129.219, la Patente de EE.UU. No. 6.525,.028 y la Patente de EE.UU. No 6.911.434. Las AGP con enlaces éter sobre las cadenas de acilo empleadas en la composición de la invención se conocen y son descritas en el documento WO 2006/016997. Los compuestos AGP expuestos y descritos de acuerdo con la Fórmula (III) en los párrafos de [0019] a [0021] en el documento WO 2006/016997 pueden emplearse en los presentes métodos reivindicados y combinaciones.

Los compuestos AGP empleados en la presente invención tienen la estructura expuesta en la Fórmula 1 como sigue:



(Fórmula 1)

en donde

m es de 0 a 6

n es de 0 a 4;

X es O o S, preferiblemente O;

Y es O o NH;

Z es O o H;

cada uno de R1, R2, R3 se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en un acilo C1-20 y un alquilo C1-20;

R4 es H o Me;

R5 se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en -H, -OH, -(Cl-C4) alcoxi, - $PO_3R8R9$, -O $PO_3R8R9$, - $SO_3R8$, -$OSO_3R8$, -NR8R9, -SR8, -CN, -$NO_2$, -CHO, -$CO_2R8$, y –CONR8R9, en donde R8 y R9 son cada uno de forma independiente seleccionados a partir de H y alquilo (Cl-C4); y

cada uno de R6 y R7 es de forma independiente H o $PO_3H_2$.

En la Fórmula 1 la configuración de los centros 3’ estereogénicos, a los que los restos acilo normales grasos (es decir, los restos secundarios aciloxi o alcoxi, por ejemplo, R1O, R2O, y R3O) se unen, es R o S, preferiblemente R (como se designa por las reglas de prioridad de Cahn-Ingold-Prelog). La configuración de los centros estereogénicos de aglicón, a los que R4 y R5 se unen, pueden ser R o

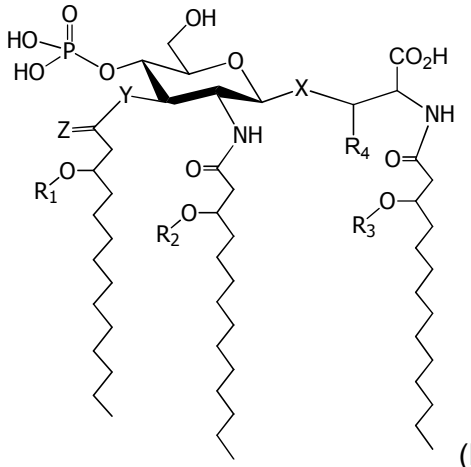
S. Todos lo estereoisómeros, tanto enantiómeros como diastereómeros y sus mezclas, se consideran que están dentro del alcance de la presente invención.

El número de átomos de carbono entre el heteroátomo X y el átomo de nitrógeno del aglicón se determina por la variable “n”, que puede ser un número entero de 0 a 4, o un número entero de 0 a 2.

La longitud de la cadena de los ácidos grasos normales R1, R2, y R3 puede tener de aproximadamente 6 a aproximadamente 16 carbonos, o de aproximadamente 9 a aproximadamente 14 carbonos. Las longitudes de cadena pueden ser iguales o diferentes. Algunas realizaciones incluyen longitudes de cadena donde R1, R2 y R3 son 6 ó 10 ó 12 ó 14.

La Fórmula 1 abarca los AGP lipídicos de éter y éster de L/D-serilo, -treonilo, -cisteinilo, ambos agonistas y antagonistas y sus homólogos (n=1-4), así como varios bioisoésteres de ácido carboxílico (es decir, R5 es un grupo ácido capaz de la formación de sales; el fosfato puede estar tanto en la posición 4 como 6 de la unidad de glucosamina, preferiblemente, está en la posición 4).

En una realización de la invención que emplea un compuesto AGP de Fórmula 1, n es 0, R5 es $CO_2H$, R6 es $PO_3H_2$, y R7 es H. Este compuesto AGP se establece como la estructura en la Fórmula 1a a continuación:



(Fórmula 1a)

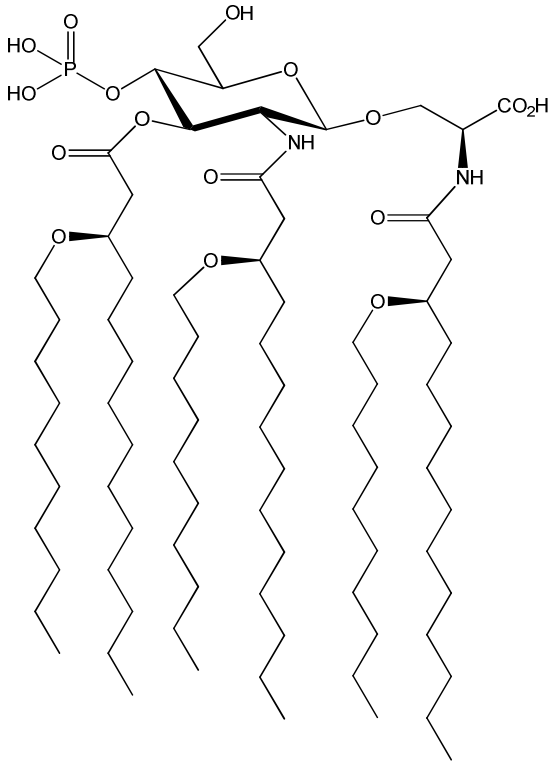
en donde X es O o S; Y es O o NH; Z es O o H; cada uno de R1, R2, R3 se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en un acilo C1-20 y un alquilo C1-20; y R4 es H o metilo.

En la Fórmula 1a la configuración de los centros estereogénicos 3' a los que los restos acilo grasos normales (es decir, los restos secundarios aciloxi o alcoxi, por ejemplo, R1O, R2O, y R3O) se unen como R o S, preferiblemente R (como se designa por las reglas de prioridad de Cahn-Ingold-Prelog). La configuración de los centros estereogénicos de aglicón a los que R4 y CO2H se unen pueden ser R o S. Todos los estereoisómeros, ambos enantiómeros como diastereómeros, y sus mezclas, se consideran que caen dentro del alcance de la presente invención.

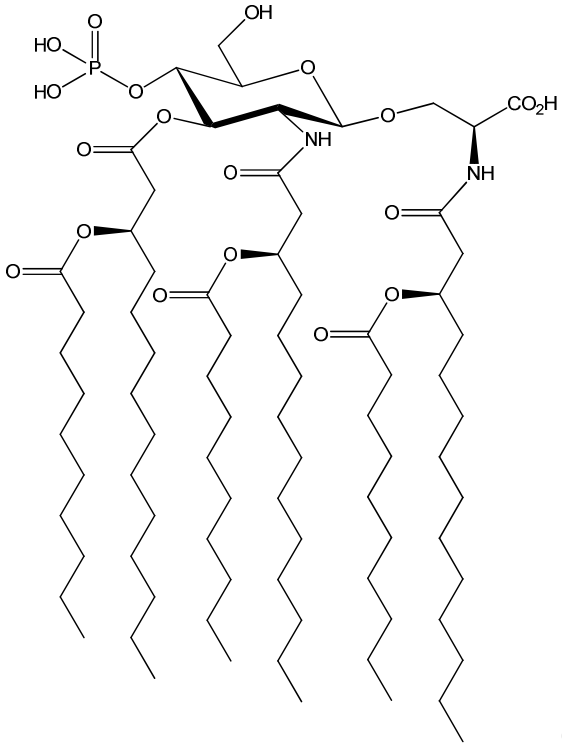
La Fórmula 1a abarca los AGP lipídicos del éter o del éster de L/D-serilo, -treonilo, -cisteinilo, ambos agonistas y antagonistas.

En ambas Fórmula 1 y Fórmula 1a, Z es O unido por un doble enlace o dos átomos de hidrógeno que están cada uno unidos por un enlace sencillo. Es decir, el compuesto está unido a éster cuando Z=Y=O; unido a amida cuando Z =O y Y=NH; y unido a éter cuando Z=H/H y Y=O.

Los compuestos de Fórmula 1 se denominan CRX-601 y CRX-527. Sus estructuras se establecen como sigue:

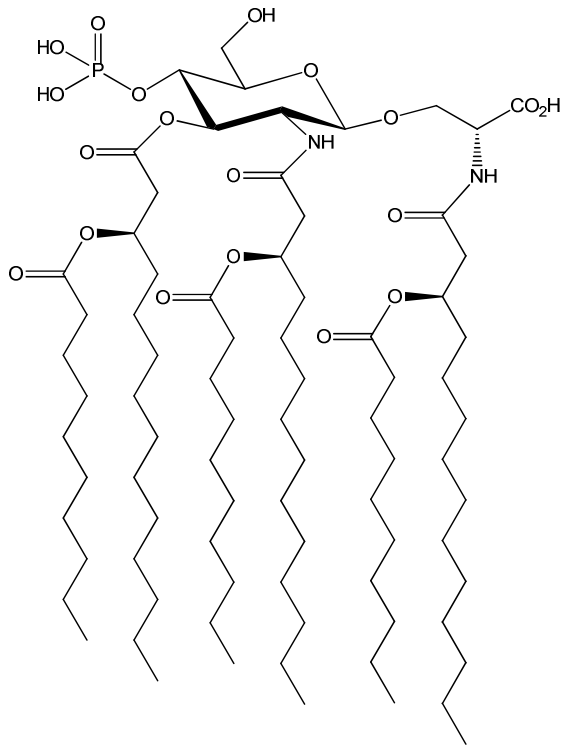


CRX-601



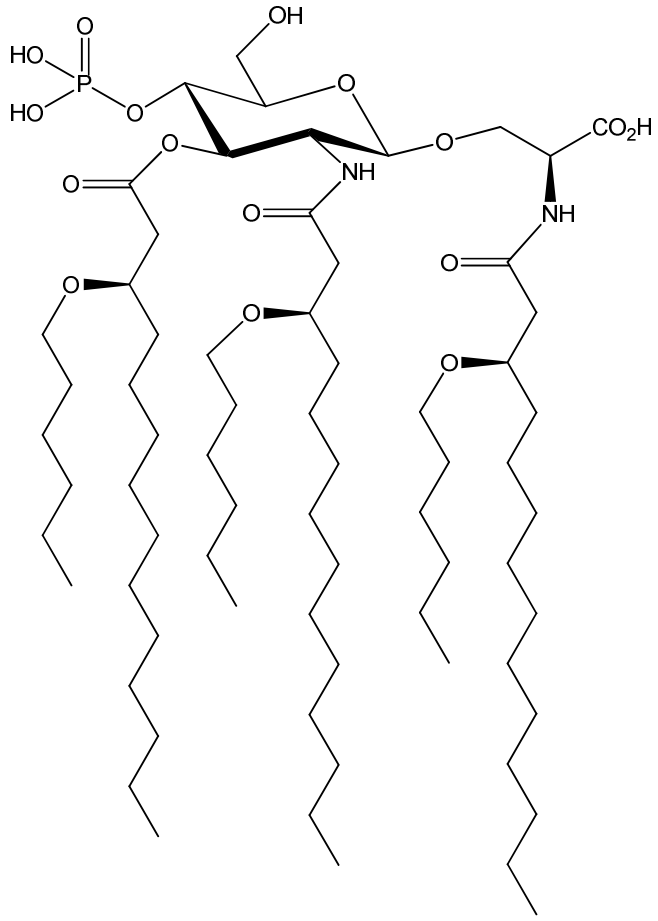
CRX-527

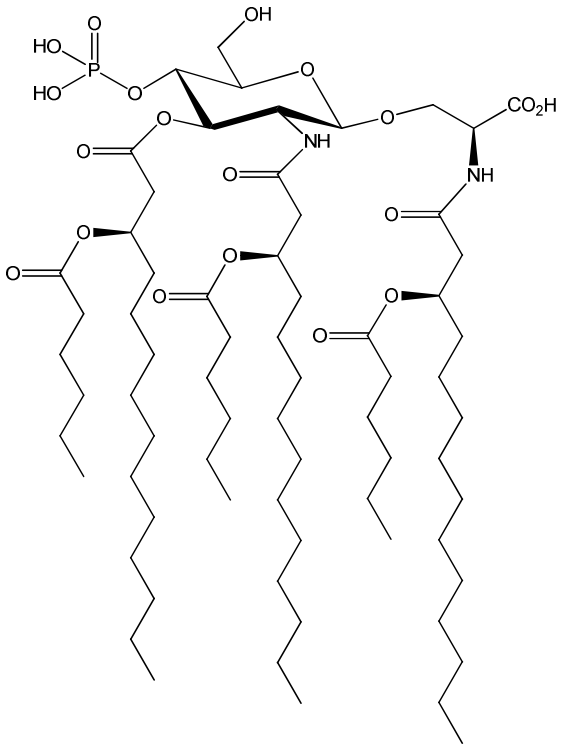
Además, otra realización preferida emplea CRX-547 que tiene la estructura mostrada. CRX-547



CRX-547

Todavía otras realizaciones incluyen los AGP, tales como CRX-602 o CRX-526 proporcionando una mayor estabilidad frente a los AGP que tienen cadenas de acilo o alquilo más cortas. CRX-602


OH
O
HO
P
HO
O
O
O
O
NH
O
O
CO2H
NH
O
O
O
O



CRX-526

En una realización más de la invención, el modulador de TLR4 es un agonista. En una realización más, el modulador de TLR4 que es un agonista se selecciona del grupo que consiste en: CRX-601, CRX-547, y CRX-527.

Tampones de AGP

En una realización de la presente invención, la composición que comprende un modulador de TLR4, tal como un AGP, se tampona usando un tampón anfótero. En una realización de la invención, el tampón anfótero es un ácido de aminoalcanosulfónico o una sal adecuada. Ejemplos de tampones de amninoalcanosulfónicos incluyen, pero sin limitación, HEPES, HEPPS/EPPS, MOPS, MOBS y PIPES. En una realización de la invención, el tampón es un tampón farmacéuticamente aceptable, adecuado para uso en seres humanos, tal como para uso en un producto de inyección comercial. En una realización de la invención, el tampón es HEPES.

**Métodos de tratamiento**

Se cree que las combinaciones de la invención tienen utilidad en los trastornos en donde la unión de OX40 y/o TLR4 es beneficiosa.

La presente invención también proporciona así una combinación de la invención, para uso en terapia, particularmente, en el tratamiento de trastornos en donde la unión de OX40 y/o TLR4, es beneficiosa, particularmente el cáncer.

En una realización, la presente invención proporciona métodos para tratar el cáncer en un paciente con la combinación de un agonista de TLR4, tal como CRX-601, con un anticuerpo monoclonal OX40 humanizado, en donde el anticuerpo OX40 humanizado se administra intravenosamente, y el agonista de TLR4 se administra intratumoralmente, dando como resultado un efecto abscopal en el tumor(es) en el paciente.

Como se usa en este documento, la expresión “efecto abscopal”, significa un fenómeno en el cual el tratamiento local causa la regresión tumoral no solo en el sitio tratado, sino que también en sitios tumorales alejados. Postow, *et al*., *N Engl J Med* 366 (10): 925–31 (2012).

Un aspecto más de la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno en donde la unión de OX40 y/o TLR4 es beneficiosa, que comprende administrar una combinación de la invención.

Un aspecto más de la presente invención proporciona el uso de una combinación de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno donde la unión de OX40 y/o TLR4 es beneficiosa. En algunas realizaciones, el trastorno es el cáncer. De manera adecuada, la presente invención proporciona el uso de las combinaciones de la presente invención para el tratamiento del cáncer.

Ejemplos de canceres que son adecuados para el tratamiento con combinación de la invención incluyen, pero sin limitación, ambas formas primarias y metastásicas de canceres de cabeza y cuello, mama, pulmón, colon, ovario y próstata. De

manera adecuada el cáncer se selecciona de: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, Síndrome de Bannayan-Zonana, Enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, cáncer de mama, de mama inflamatorio, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, ependimoma, meduloblastoma, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, hígado, melanoma, ovario, pancreático, próstata, sarcoma, osteosarcoma, tumor de huesos de células gigantes, tiroides, leucemia linfoblástica de células T, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de las células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, AML, leucemia neutrofílica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células T, plasmacitoma, leucemia inmunoblástica de células grandes, linfoma de células de manto, mieloma múltiple, leucemia megacarioblástica , mieloma múltiple, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de Hodgkins, linfoma no de Hodgkins, linfoma de células T linfoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, cáncer vulvar, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer renal, mesotelioma, cáncer de esófago, cáncer de glándulas salivares, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo, cáncer bucal, cáncer de la boca, GIST (tumor estromal gastrointestinal); y cáncer testicular.

Además, ejemplos de un cáncer que se trate incluyen adenocarcinoma de Barret; cáncer de vías biliares; cáncer de mama; cáncer cervical; colangiocarcinoma; tumores del sistema nervioso central incluyendo tumores del SNC primario tales como glioblastomas, astrocitomas (por ejemplo, glioblastoma multiforme) y ependimomas y tumores del SNC secundarios (es decir, metástasis al sistema nervioso central de tumores que se originan fuera del sistema nervioso central); cáncer colorectal incluyendo carcinoma de colon del intestino grueso; cáncer gástrico; carcinoma de la cabeza y el cuello incluyendo carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello; canceres hematológicos incluyendo leucemias y linfomas tales como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda (AML), síndromes mielodisplásicos, leucemia mielógena crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia megacarioblástica , mieloma múltiple y

eritroleucemia; carcinoma hepatocelular; cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovario; cáncer de endometrio; cáncer pancreático; adenoma pituitario; cáncer de próstata; cáncer renal; sarcoma; canceres de piel incluyendo melanomas; y canceres de tiroides.

De manera adecuada, la presente invención se refiere a un método para tratar o aliviar la gravedad de un cáncer seleccionado a partir de: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, mama, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, hígado, melanoma, ovario, pancreático, próstata, sarcoma y tiroides.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar o aliviar la gravedad de un cáncer seleccionado a partir de ovario, mama, pancreático y próstata.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar o aliviar la gravedad de síndromes pre-cancerígenos en un mamífero, incluyendo un ser humano, en donde el síndrome pre-cancerígeno se selecciona a partir de: neoplasia intraepitelial cervical, gammapatía monoclonal de significación indeterminada (GMSI), síndrome mielodisplásico, anemia aplásica, lesiones cervicales, nevos de la piel (pre-melanoma), neoplasia prostática intraepitelial (intraductal) (PIN), carcinoma ductal in situ (DCIS), pólipos de colon y hepatitis severa o cirrosis.

La combinación de la invención puede usarse sola, o en combinación con, uno o más agentes terapéuticos. La invención así proporciona en un aspecto más una combinación más que comprende una combinación de la invención con un agente terapéutico más o agentes, composiciones y medicamentos que comprenden la combinación y el uso de más combinación, composiciones y medicamentos en terapia, en particular, en el tratamiento de enfermedades susceptibles de la unión de OX40 y/o TLR4.

En la realización, la combinación de la invención puede emplearse con otros métodos terapéuticos del tratamiento del cáncer. En particular, en terapia anti-neoplásica, se contempla la terapia de combinación con otros agentes quimioterapéuticos, hormonales, de anticuerpos así como tratamientos quirúrgicos y/o de radiación diferentes a los mencionados anteriormente. Las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención incluyen por tanto la administración de un ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención y/o un modulador de TLR4 así como el uso opcional de otros agentes terapéuticos incluyendo otros agentes anti-neoplásicos. Dicha combinación de agentes puede administrarse juntos o separadamente y, cuando se administran separadamente esto puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden, ambos en tiempo cercanos y remotos. En una realización, la combinación farmacéutica incluye un ABP anti-OX40 o anticuerpo de la invención y un modulador de TLR4, y opcionalmente al menos un agente anti-neoplásico adicional.

En una realización, la otra terapia anti-cáncer es quirúrgica y/o radioterapia.

En una realización, la otra terapia anti-cáncer es al menos un agente anti-neoplásico adicional.

Cualquier agente anti-neoplásico que tenga actividad frente a un tumor susceptible de tratarse puede utilizarse en la combinación. Los agentes anti-neoplásicos típicos útiles incluyen, pero sin limitación, agentes anti-microtúbulo tales como diterpenoides y alcaloides de la vinca; complejos de coordinación de platino; agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, oxazafosforinas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, y triazenos; agentes antibióticos tales como antraciclinas, actinomicinas y bleomicinas; inhibidores de topoisomerasa II tales como epipodofilotoxinas; antimetabolitos, tales como análogos de purina y pirimidina y compuestos anti-folato; inhibidores de topoisomerasa I, tal como camptotecinas; hormonas y análogos hormonales; inhibidores de la ruta de transducción de señales; inhibidores de la angiogénesis de no receptor de tirosina; agentes inmunoterapéuticos; agentes proapoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.

Agentes anti-microtúbulo o anti-mitóticos: Los agentes anti-microtúbulo o anti-mitóticos son agentes específicos de fase activa frente a los microtúbulos de células tumorales durante la fase M o de mitosis del ciclo celular. Ejemplos de agentes anti-microtúbulo incluyen, pero sin limitación, diterpenoides y alcaloides de la vinca.

Los diterpenoides, que se derivan de fuentes naturales, son agentes anti-cancerígenos específicos de fase que operan en las fases $G_2$/M del ciclo celular. Se piensa que los diterpenoides estabilizan la subunidad de β-tubulina de los microtúbulos, mediante la unión con esta proteína. El desmontaje de la proteína aparece entonces inhibiendo siendo la mitosis detenida y siguiendo de la muerte celular. Ejemplos de diterpenoides incluyen, pero sin limitación, paclitaxel y su análogo, docetaxel.

El paclitaxel, 13-éster de 5β,20-epoxi-1,2α,4,7β,10β,13α-hexa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina; es un producto de diterpeno natural aislado del tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* y comercialmente disponible como una solución inyectable de TAXOL®. Es un miembro de la familia taxano de terpenos. El Paclitaxel se ha aprobado para uso clínico en el tratamiento del cáncer de ovario refractario en los Estados Unidos (Markman, *et al., Yale Journal of Biology and Medicine*, 64:583 (1991); McGuire, *et al., Ann. Intem, Med.,* 111:273 (989), y para el tratamiento del cáncer de mama (Holmes, *et al., J. Nat. Cancer Inst*., 83:1797 (1991)). El Paclitaxel es un candidato potencial para el tratamiento de neoplasmas en la piel (Einzig, *et. al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol*., 20:46 (2001) y carcinomas de cabeza y cuello (Forastire, *et. al., Sem. Oncol*., 20:56, (1990)). El compuesto también muestra potencial para el tratamiento de la enfermedad del riñón poliquístico (Woo, *et. al., Nature*, 368:750 (1994)), cáncer de pulmón y malaria. El tratamiento de pacientes con paclitaxel da como resultado la supresión de la médula ósea (múltiples linajes de células, Ignoff, *et. al, Cancer Chemotherapy Pocket Guide*, 1998) relacionada con la duración de la administración anterior a una concentración umbral (50nM) (Kearns, *et. al., Seminars in Oncology*, 3(6) p.16-23 (1995)).

El Docetaxel, éster de (2R,3S)- N-carboxi-3-fenilisoserina,N-*terc*-butilo, 13-éster con 5β-20-epoxi-1,2α,4,7β,10β,13α-hexahidroxitax-11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, trihidrato; está comercialmente disponible como una solución inyectable de TAXOTERE®. El Docetaxel está indicado para el tratamiento del cáncer de mama. El Docetaxel es un derivado semisintético del paclitaxel *q.v.*, preparado usando un precursor natural, 10-deacetil-baccatin III, extraído de las agujas del tejo europeo.

Los alcaloides de la vinca son agentes anti-neoplásicos específicos de fase derivados de la planta hierba doncella. Los alcaloides de la vinca actúan en la fase M (mitosis) del ciclo celular mediante la unión específica a la tubulina. Como consecuencia, la molécula de tubulina unida es incapaz de polimerizar dentro de los microtúbulos. La mitosis se cree que se detiene en la metafase siguiendo a la muerte celular. Los ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen, pero sin limitación, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

La Vinblastina, sulfato de vincaleucoblastina, está comercialmente disponible como VELBAN® como una solución inyectable. Aunque, tiene una posible indicación como una segunda línea de terapia de varios tumores sólidos, se indica primariamente en el tratamiento del cáncer testicular y varios linfomas incluyendo la enfermedad de Hodgkin; y linfomas linfocíticos y histiocíticos. La mielosupresión es el efecto secundario de vinblastina limitante de la dosis.

La Vincristina, vincaleucoblastina, 22-oxo-, sulfato, está comercialmente disponible como ONCOVIN® como una solución inyectable. La Vincristina está indicada para el tratamiento de leucemias agudas y se ha encontrado también el uso en regímenes de tratamiento para linfomas malignos de Hodgkin y no de Hodgkin. La alopecia y los efectos neurológicos son los efectos secundarios más comunes de la vincristina y en un menor grado aparecen efectos de mielosupresión y mucositis gastrointestinal.

La Vinorelbina, 3',4'-didehidro -4'-desoxi-C'-norvincaleucoblastina [R-(R*,R*)-2,3-dihidroxibutanodioato (1:2)(sal)], comercialmente disponible como una solución inyectable de tartrato de vinorelbina (NAVELBINE®), es un alcaloides de la vinca semi-sintético. La Vinorelbina está indicada como un agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, tal como cisplatina, en el tratamiento de varios tumores sólidos, tales como canceres de pulmón de células no pequeñas, de mama avanzado y de próstata de hormona refractario. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la dosis más común de vinorelbina.

Complejos de coordinación de platino: Los complejos de coordinación de platino son agentes anti-cancerígenos no específicos de fase, que son interactivos con el ADN. Los complejos de platino entran en las células tumorales, sufren acuación y forman reticulaciones intra- e inter-cadena con el DNA causando efectos biológicos adversos al tumor. Los ejemplos de complejos de coordinación de platino incluyen, pero sin limitación, oxaliplatina, cisplatina y carboplatina.

La Cisplatina, cis-diaminadicloroplatino, está comercialmente disponible como PLATINOL® como una solución inyectable. La Cisplatina se indica primariamente en el tratamiento de canceres testicular metastásico y de ovario y cáncer de vejiga avanzado.

Carboplatina, platino, diamina [1,1-ciclobutano-dicarboxilato(2-)-O,O'], está comercialmente disponible como PARAPLATIN® como una solución inyectable. Carboplatina se indica primariamente en la primera y segunda línea de tratamiento del carcinoma de ovario avanzado.

Agentes alquilantes: Los agentes alquilantes son agentes anti-cáncer específicos no fase y fuertes electrófilos. Típicamente, los agentes alquilantes forman enlaces covalentes, por alquilación, al ADN a través de restos nucleófilos de la molécula de ADN tal como grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo y imidazol. Dicha alquilación interrumpe la función del ácido nucleico que conduce a la muerte

celular. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero sin limitación, mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, melfalan y clorambucil; sulfonatos de alquilo tal como busulfan; nitrosoureas tal como carmustina; y triazenos tal como dacarbazina.

Ciclofosfamida, 2-óxido monohidrato de 2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina, está comercialmente disponible como una solución inyectable o comprimidos como CYTOXAN®. La Ciclofosfamida está indicada como un agente individual, o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, en el tratamiento de linfomas malignos, mieloma múltiple y leucemias.

Melfalán, 4-[bis(2-cloroetil)amino]-L-fenilalanina, está comercialmente disponible como una solución inyectable o comprimidos como ALKERAN®. El Melfalán está indicado para el tratamiento paliativo del mieloma múltiple y el carcinoma de ovario epitelial no desecable. La supresión de la médula ósea es el efecto secundario limitante de la dosis más común de melfalán.

Clorambucil, ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]bencenobutanóico, está comercialmente disponible como comprimidos LEUKERAN®. El clorambucil está indicado para el tratamiento paliativo de la leucemia linfática crónica, y linfomas malignos tales como linfosarcoma, linfoma folicular gigante y Enfermedad de Hodgkin.

Busulfán, 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, está comercialmente disponible como comprimidos MYLERAN®. El Busulfán está indicado para el tratamiento paliativo de la leucemia mielógena crónica.

Carmustina, 1,3-[bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea, está comercialmente disponible como viales individuales de material liofilizado como BiCNU®. La Carmustina está indicada para el tratamiento paliativo como un agente individual o en combinación con otros agentes para tumores de cerebro, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y linfoma no de Hodgkins.

Dacarbazina, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida, está comercialmente disponible como viales individuales de material como DTIC-Dome®. La Dacarbazina está indicada para el tratamiento de melanoma maligno metastásico y en combinación con otros agentes para la segunda línea de tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

Agentes antibióticos anti-neoplásicos: Los agentes antibióticos anti-neoplásicos son agentes específicos de no fase, que se unen o se intercalan con el ADN. Típicamente, dicha acción da como resultado complejos de ADN estables o roturas de cadena, lo que interrumpe la función ordinaria de los ácidos nucleicos conduciendo a la muerte celular. Los ejemplos de agentes antibióticos anti-neoplásicos incluyen, pero sin limitación, actinomicinas tales como dactinomicina, antrociclinas tales como daunorubicina y doxorubicina; y bleomicinas.

Dactinomicina, también conocida como Actinomicina D, está comercialmente disponible en formas inyectable como COSMEGEN®. La Dactinomicina está indicada para el tratamiento del tumor de Wilm y el rabdomiosarcoma.

Daunorubicina, hidrocloruro de (8S-cis-)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-α-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12 naftacenodiona, está comercialmente disponible como una forma liposómica inyectable como DAUNOXOME® o como una forma inyectable como CERUBIDINE®. La Daunorubicina está indicada para la inducción de la remisión en el tratamiento de la leucemia no linfocítica aguda y el sarcoma de Kaposi asociado al VIH avanzado.

Doxorubicina, hidrocloruro de (8S, 10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-α-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicoloilo, 7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12 naftacenodiona, está comercialmente disponible como una forma inyectable como RUBEX® o ADRIAMYCIN RDF®. La Doxorubicina se indica primariamente para el

tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloblástica aguda, pero también es un componente útil en el tratamiento de algunos tumores sólidos y linfomas.

Bleomicina, una mezcla de antibióticos glicopeptídicos citotóxicos aislados de una cepa de *Streptomyces verticillus*, está comercialmente disponible como BLENOXANE®. La Bleomicina está indicada como un tratamiento paliativo, como un agente individual o en combinación con otros agentes, de carcinoma de células escamosas, linfomas y carcinomas testiculares.

Inhibidores de Topoisomerasa II: Los inhibidores de Topoisomerasa II incluyen, pero sin limitación, epipodofilotoxinas.

Las Epipodofilotoxinas son derivados de agentes anti-neoplásicos específicos de fase de la planta de la mandrágora. Las Epipodofilotoxinas típicamente afectan a las células en las fases S y $G_2$ del ciclo celular formando un complejo ternario con topoisomerasa II y ADN causando roturas en la cadena de ADN. Las roturas en la cadena se acumulan y se produce la muerte celular. Los ejemplos de Epipodofilotoxinas incluyen, pero sin limitación, etopósido y tenipósido.

El Etopósido, 4'-demetil-epipodofilotoxina 9[4,6-0-(R )-etiliden-β-D-glucopiranósido], está comercialmente disponible como una solución inyectable o cápsulas como VePESID® y es comúnmente conocido como VP-16. El Etopósido está indicado como un agente individual, o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de canceres testicular y de pulmón de células no pequeñas .

Tenipósido, 4'-demetil-epipodofilotoxin 9[4,6-0-(R )-teniliden-β-D-glucopiranósido], está comercialmente disponible como una solución inyectable como VUMON® y es comúnmente conocido como VM-26. El Tenipósido está indicado como un agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda en niños.

Agentes antineoplásicos antimetabolito: Los Agentes antineoplásicos antimetabolito son agentes anti-neoplásicos específicos de fase que actúan como fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular inhibiendo la síntesis de ADN o inhibiendo la síntesis de las bases purina o pirimidina y con ello limitando la síntesis de ADN. Como consecuencia, la fase S no procede y sigue la muerte celular. Los ejemplos de Agentes antineoplásicos antimetabolito incluyen, pero sin limitación, fluorouracil, metotrexato, citarabina, mecaptopurina, tioguanina y gemcitabina.

5-Fluorouracilo, 5-fluoro-2,4- (1H,3H) pirimidinadiona, está comercialmente disponible como fluorouracilo. La administración de 5-Fluorouracilo conduce a la inhibición de la síntesis de timidilato y es también incorporado dentro de ambos ARN y ADN. El resultado típicamente es la muerte celular. El 5-Fluorouracilo está indicado como un agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de carcinomas de mama, colon, recto, estómago y páncreas. Otros análogos de fluoropirimidina incluyen 5-fluoro desoxiuridina (floxuridina) y monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina.

Citarabina, 4-amino-1-$\beta$-D-arabinofuranosil-2 (1H)-pirimidinona, está comercialmente disponible como CYTOSAR-U® y es comúnmente conocido como Ara-C. Se cree que la Citarabina exhibe especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la elongación de la cadena de ADN por la incorporación terminal de citarabina en el crecimiento de la cadena de ADN. La Citarabina está indicada como un agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda. Otros análogos de citidina incluyen 5-azacitidina y 2',2'-difluorodeoxicitidina (gemcitabina).

Mercaptopurina, monohidrato de 1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona, está comercialmente disponible como PURINETHOL®. La mercaptopurina exhibe especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la síntesis de ADN por un mecanismo todavía inespecificado. La Mercaptopurina está indicada como un

agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda. Un análogo de mercaptopurina útil es la azatioprina.

Tioguanina, 2-amino-1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona, está comercialmente disponible como TABLOID®. La Tioguanina exhibe especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la síntesis de DNA por un mecanismo todavía inespecificado. La Tioguanina está indicada como un agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda. Otros análogos de purina incluyen pentostatina, ertrohidroxinoniladenina, fosfato de fludarabina y cladribina.

Gemcitabina, monohidrocloruro de 2'-desoxi-2', 2'-difluorocitidina (β-isómero), está comercialmente disponible como GEMZAR®. La Gemcitabina exhibe especificidad de fase celular en la fase S bloqueando la progresión de células a través del enlace G1/S. La Gemcitabina está indicada en combinación con cisplatina en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado y solo en el tratamiento del cáncer pancreático localmente avanzado.

Metotrexato, ácido N-[4[[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil]metilamino] benzoil]-L-glutámico, está comercialmente disponible como metotrexato de sodio. El Metotrexato exhibe efectos de fase de las células específicamente en la fase S inhibiendo la síntesis de ADN, la reparación y/o la replicación a través de la inhibición de la ácido dihidrofólico reductasa que es requerida para la síntesis de nucleótidos de purina y timidilato. El Metotrexato está indicado como un agente individual o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de coriocarcinoma, leucemia meníngea, linfoma no de Hodgkin y carcinomas de mama, cabeza, cuello, ovario y vejiga.

Inhibidores de Topoisomerasa I: Las Camptotecinas, incluyendo, la camptotecina y los derivados de camptotecina están disponibles o bajo desarrollo como inhibidores de Topoisomerasa I. La actividad citotóxica de la Camptotecina se

piensa que está relacionada con su actividad inhibidora de la Topoisomerasa I. Los ejemplos de Camptotecinas incluyen, pero sin limitación, irinotecano, topotecano y las diversas formas ópticas de 7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilendioxi-20-camptotecina descrita más abajo.

Irinotecán HCl, hidrocloruro de (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidinopiperidino) carboniloxi]-1H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H,12H)-diona, está comercialmente disponible como la solución inyectable CAMPTOSAR®. El Irinotecán es un derivado de la camptotecina que se une, junto con su metabolito activo SN-38 al complejo topoisomerasa I – ADN. Se piensa que la citotoxicidad aparece como resultado de roturas irreparables de la doble cadena causadas por la interacción del complejo ternario topoisomerasa I : ADN : irintecán o SN-38 con enzimas de replicación. El Irinotecán está indicado para tratamiento del cáncer metastásico del colon o del recto.

Topotecán HCl, monohidrocloruro de (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14-(4H,12H)-diona, está comercialmente disponible como la solución inyectable HYCAMTIN®. El Topotecán es un derivado de la camptotecina que se une al complejo de topoisomerasa I – ADN y previene la religación de las roturas de cadenas simples causadas por la Topoisomerasa I en respuesta a la cadena torsional de la molécula de ADN. El Topotecán está indicado para la segunda línea de tratamiento del carcinoma metastásico de ovario y el cáncer de pulmón de células pequeñas.

Hormonas y análogos hormonales: Las Hormonas y los análogos hormonales son compuestos útiles para tratar los cánceres en los que hay una relación entre la(s) hormona(s) y el crecimiento y/o la carencia de crecimiento del cáncer. Los ejemplos de hormonas y análogos hormonales útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, adrenocorticosteroides tales como prednisona y prednisolona que son útiles en el tratamiento del linfoma maligno y leucemia

aguda en niños; aminoglutetimida y otros inhibidores de aromatasa tal como anastrozol, letrazol, vorazol, y exemestano útiles en el tratamiento de carcinoma adrenocortical y carcinoma de mama dependiente de hormonas que contienen receptores de estrógenos; progestrinas tal como acetato de megestrol útil en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas y carcinoma endometrial; estrógenos, andrógenos, y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona y 5$\alpha$-reductasas tal como finasterida y dutasterida, útiles en el tratamiento del carcinoma prostático e hipertrofia prostática benigna; anti-estrógenos tales como tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, así como moduladores del receptor estrógeno selectivo (SERMS) tales los descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.681.835, 5.877.219 y 6.207.716, útiles en el tratamiento del carcinoma de mama dependiente de hormonas y otros canceres susceptibles; y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y sus análogos que estimulan la liberación de la hormona leutinizante (LH) y/o hormona estimulante del folículo (FSH) para el tratamiento del carcinoma prostático, por ejemplo, agonistas de LHRH y antagonistas tales como acetato de goserelina y luprolida.

Inhibidores de la ruta de transducción de señales: Los Inhibidores de la ruta de transducción de señales son aquellos inhibidores que bloquean o inhiben un proceso químico que provoca un cambio intracelular. Como se usa en este documento, este cambio es la proliferación o diferenciación de células. Los inhibidores de transducción de señales útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, inhibidores de tirosina quinasas de receptor, tirosina quinasas no receptor, bloqueantes del dominio de SH2/SH3, serina/treonina quinasas, fosfotidil inositol-3 quinasas, señalización de mio-inositol y oncogenes de Ras.

Varias proteína tirosina quinasas cataliza la fosforilación de restos específicos de tirosilo en varias proteínas implicadas en la regulación del crecimiento de las células. Dichas proteína tirosina quinasas pueden ser ampliamente clasificados como quinasas de receptor o no receptor.

Las tirosina quinasas de receptor son proteínas de transmembrana que tiene un ligando extracelular del dominio de unión, un dominio transmembrana, y un dominio de tirosina quinasa. Las tirosina quinasas de receptor están implicadas en la regulación del crecimiento de células y se denominan generalmente receptores del factor de crecimiento. La inapropiada o incontrolada activación de muchas de esta quinasas, es decir, la actividad del receptor del factor del aberrante crecimiento de quinasas, por ejemplo por la sobre-expresión o mutación, se ha mostrado que conducen a un crecimiento celular incontrolado. De acuerdo con esto, la aberrante actividad de dichas quinasas se ha vinculado al crecimiento de tejido maligno. Como consecuencia, los inhibidores de dichas quinasas podrían proporcionar métodos de tratamiento para el cáncer. Los receptores del factor de crecimiento incluyen, por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr), erbB2, erbB4, ret, vascular receptor del factor de crecimiento endotelial (VEGFr), tirosina quinasa con dominios de identidad del factor de crecimiento tipo inmunoglobulina y epidérmico (TIE-2), receptor del factor –I de crecimiento de insulina (IGFI), factor estimulante de colonias de macrófagos (cfms), BTK, ckit, cmet, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), receptores de Trk (TrkA, TrkB, y TrkC), receptores de efrina (eph) y el protooncogen de RET. Varios receptores de inhibidores del crecimiento están bajo desarrollo e incluyen antagonistas de ligando, anticuerpos, inhibidores de tirosina quinasa y oligonucleótidos anti-sentido. Los receptores del factor de crecimiento y los agentes que inhiben la función del receptor del factor de crecimiento se describen, por ejemplo, en Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver, et al *DDT*, Vol 2, No. 2 (Febrero de 1997); y Lofts, F. J., *et al,* GROWTH FACTOR RECEPTORS AS TARGETS", NEW MOLECULAR TARGETS FOR CANCER CHEMOTERAPIA (Workman, Paul y Kerr, David, CRC press 1994, London).

Las tirosina quinasas, que no son receptores del factor de crecimiento de quinasas se denominan tirosina quinasas de no receptor. Las tirosina quinasas de no receptor útiles en la presente invención, que son dianas o potenciales dianas de fármacos anti-cancerígenos, incluyen cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK

(quinasa de adhesión focal), tirosina quinasa de Brutons, y Bcr-Abl. Dichas quinasas de no receptor y agentes que inhiben la función de tirosina quinasas de no receptor se describen en Sinh, *et al., Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 8 (5): 465–80 (1999); y Bolen, *et al., Annual review of Immunology*, 15: 371-404 (1997).

Los bloqueantes del dominio SH2/SH3 son agentes que rompen el dominio SH2 o SH3 uniéndose en una variedad de enzimas o proteínas adaptadoras incluyendo, subunidad PI3-K p85, familia quinasas Src, moléculas adaptadoras (Shc, Crk, Nck, Grb2) y Ras-GAP. Los dominios SH2/SH3 como dianas para fármacos anti-cancerígenos se discuten en Smithgall, T.E., *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,* 34(3) 125-32 (1995).

Los inhibidores de Serina/Treonina Quinasas, incluyendo los bloqueantes de la cascada de MAP quinasa que incluyen a los bloqueantes de Raf quinasas (rafk), Quinasas reguladas por mitógeno o extracelular (MEK) y Quinasas Reguladas Extracelulares (ERK); y bloqueantes del miembro de la familia de proteína quinasa C incluyendo bloqueantes de PKC (alfa, beta, gamma, épsilon, mu, lambda, iota, zeta). La familia IkB quinasa (IKKa, IKKb), quinasas de la familia PKB, miembros de la familia de akt quinasa y quinasas del receptor TGF beta. Dichas Serina/Treonina quinasas y sus inhibidores se describen en Yamamoto, *et al., Journal of Biochemistry,* 126 (5) 799-803 (1999); Brodt, *et al., Biochemical Pharmacology*, 60, 1101-1107 (2000); Massague, *et al., Cancer Surveys,* 27:41-64 (1996); Philip, *et al., Cancer Treatment and Research,* 78: 3-27 (1995), Lackey, *et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (10) 223-226 (2000); Patente de EE.UU. No. 6,268,391; y Martinez-Iacaci, *et al, Int. J. Cancer*, 88(1), 44-52 (2000).

Inhibidores de los miembros de la familia de Fosfotidil inositol-3 quinasa incluyendo bloqueantes de PI3-quinasa, ATM, DNA-PK, y Ku son también útiles en la presente invención. Dichas quinasas se discuten en Abraham, R.T. (1996), *Current Opinion in Immunology.* 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), *Oncogene* 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), *International Journal of*

*Biochemistry and Cell Biology*. 29 (7):935-8; y Zhong, H., *et al, Cancer Res*., (2000) 60(6), 1541-1545.

También son útiles en la presente invención los inhibidores de la señalización de mio-inositol, tales como bloqueantes de fosfolipasa C y análogos de Mioinositol. Dichos inhibidores de señal se describen en Powis, G., y Kozikowski A., (1994) NEW MOLECULAR TARGETS FOR CANCER CHEMOTHERAPY ED. (Paul Workman y David Kerr, CRC press 1994, London).

Otro grupo de inhibidores de la ruta de transducción de señales son los inhibidores del Oncogén de Ras. Dichos inhibidores incluyen inhibidores de farnesiltransferasa, geranil-geranil transferasa, y proteasas CAAX así como oligonucleótidos anti-sentido, ribozimas e inmunoterapia. Dichos inhibidores se ha mostrado que bloquean la activación ras en células que contienen mutantes ras tipo salvaje, actuando mediante esto como agentes antiproliferación. La inhibición del oncogén de Ras se discute en Scharovsky, *et al.* (2000), *Journal of Biomedical Science.* 7(4) 292-8; Ashby, M.N. (1998), *Current Opinion in Lipidology*. 9 (2) 99 – 102; y *BioChim. Biophys. Acta*, (1989) 1423(3):19-30.

Como se menciona anteriormente, la unión de los antagonistas de anticuerpo al ligando de la quinasa de receptor también puede servir como inhibidores de la transducción de la señal. Este grupo de inhibidores de la ruta de transducción de señales incluye el uso de anticuerpos humanizados al dominio de unión del ligando extracelular de las tirosina quinasas de receptor. Por ejemplo, el anticuerpo específico de Imclone C225 EGFR (véase Green, *et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev*., (2000), 26(4), 269-286); anticuerpo de erbB2 Herceptin® (véase " Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases", *Breast Cancer Res*., 2000, 2(3), 176-183); y anticuerpo específico de 2CB VEGFR2 (véase Brekken, et al., "Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice", *Cancer Res.* (2000) 60, 5117-5124).

Agentes anti-angiogénicos: Los Agentes anti-angiogénicos incluyendo los inhibidores de la angiogénesis no receptor también pueden ser útiles. Los agentes

anti-angiogénicos, tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo el anticuerpo del factor de crecimiento celular endotelial anti-vascular bevacizumab [Avastin™], y los compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de integrina αvβ3, endostatina y angioestatina);

Agentes inmunoterapéuticos: Los agentes usados en regímenes inmunoterapéuticos también pueden ser útiles en combinación con los compuestos de Fórmula (I). Los enfoques de inmunoterapia, incluyendo por ejemplo los enfoques ex-vivo e in-vivo incrementan la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tal como la transfección con citoquinas tales como interleuquina 2, interleuquina 4 o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, enfoques para la disminución de la anergia en células T, enfoques que usan células inmunes transfectadas tales como células dendríticas transfectadas de citoquina, enfoques que usan líneas celulares tumorales transfectadas de citoquina y enfoques usando anticuerpos anti-idiotípicos.

Agentes Proapoptóticos: Agentes usados en regímenes proapoptóticos (por ejemplo, oligonucleótidos bcl-2 antisentido) también pueden usarse en la combinación de la presente invención.

Inhibidores de la señalización del ciclo celular: Los inhibidores de la señalización del ciclo celular inhiben las moléculas implicadas en el control del ciclo celular. Una familia de proteína quinasas denominada quinasas dependientes de ciclina (CDK) y su interacción con una familia de proteínas denominadas ciclinas controla la progresión a través del ciclo celular eucariótico. La activación e inactivación coordinada de diferentes complejos de ciclina/CDK es necesaria para la progresión normal de todo el ciclo celular. Varios inhibidores de la señalización del ciclo celular están bajo desarrollo. Por ejemplo, ejemplos de quinasas dependientes de ciclina, incluyendo CDK2, CDK4, y CDK6 y los inhibidores para los mismos se describen, por ejemplo, en Rosania, et al., *Exp. Opin. Ther. Patents* (2000) 10(2):215-230.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un ABP anti-OX40 o anticuerpo y un modulador de TLR4 y al menos un agente anti-neoplásico seleccionado de agentes anti-microtúbulo, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa I, hormonas y análogos hormonales, inhibidores de la ruta de transducción de señales, inhibidores de la angiogénesis de tirosina no receptor, agentes inmunoterapéuticos, agentes proapoptóticos e inhibidores de la señalización del ciclo celular.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un ABP anti-OX40 o anticuerpo y un modulador de TLR4 y al menos un agente anti-neoplásico que sea un agente anti-microtúbulo seleccionado de diterpenoides y alcaloides de la vinca.

En una realización más, el agente anti-neoplásico es un diterpenoide.

En una realización más, el agente anti-neoplásico es un alcaloide de la vinca.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un ABP anti-OX40 o anticuerpo y un modulador de TLR4 y al menos un agente anti-neoplásico, que es un complejo de coordinación de platino.

En una realización más, el agente anti-neoplásico es paclitaxel, carboplatina, o vinorelbina.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un ABP anti-OX40 o anticuerpo y un modulador de TLR4 y al menos un agente anti-neoplásico que es un inhibidor de la ruta de transducción de la señal.

En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor de un receptor del factor de crecimiento quinasa, VEGFR2, TIE2, PDGFR, BTK, erbB2, EGFr, IGFR-1, TrkA, TrkB, TrkC, o c-fms.

En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor de una serina/treonina quinasa rafk, akt, o PKC-zeta.

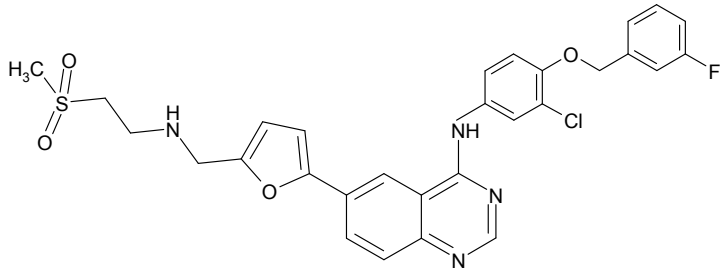
En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor de una tirosina quinasa no receptora seleccionada de la familia src de quinasas.

En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor de c-src.

En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor de oncogén de Ras seleccionado de inhibidores de farnesil transferasa y geranilgeranil transferasa.

En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor de una serina/treonina quinasa seleccionada del grupo que consiste en PI3K.

En una realización más, el inhibidor de la ruta de transducción de la señal es un inhibidor dual de EGFr/erbB2, por ejemplo N-{3-cloro-4-[(3-fluorobencil) oxi]fenil}-6-[5-({[2-(metanosulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-quinazolinamina (estructura de abajo):




En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de Fórmula I o una sal o solvato del mismo y al menos un agente anti-neoplásico que es un inhibidor de la señalización del ciclo celular.

En una realización más, el inhibidor de la señalización del ciclo celular es un inhibidor de CDK2, CDK4 o CDK6.

En una realización, el mamífero en los métodos y los usos de la presente invención es un ser humano.

Como se indica, las cantidades terapéuticamente eficaces de las combinaciones de la invención (un ABP anti-OX40 o anticuerpo y un modulador de TLR4) se administran a un ser humano. Típicamente, la cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes administrados de la presente invención dependerá de un número de factores incluyendo, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto, la condición precisa que requiera el tratamiento, la gravedad de la condición, la naturaleza de la Formulación y la ruta de administración. En última instancia, la cantidad terapéuticamente eficaz estará a discreción del médico particular.

Los siguientes ejemplos pretenden ser solo para ilustración y no se pretende limitar el alcance de la invención de ningún modo.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Tratamiento de Monoterapia de OX86 en un modelo de ratón singénico de CT-26 para cáncer de colon

La línea celular del carcinoma de colón de ratón CT26 (CT26.WT; ATCC Nº CRL-2638) se obtuvo a partir de ATCC. Es una línea celular de carcinoma de colon indiferenciada inducida por N-nitroso-N-metiluretano (NNMU), conocida en la técnica. Por ejemplo, se describe en: Wang M, et al. “Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen”. J. Inmunol. 154: 4685-4692, 1995 (PubMed: 7722321). La IgG1 de rata se obtuvo a partir de Bioxcell. Se obtuvieron células de OX86 (Hibridoma 134) a partir de la Colección de Cultivos Celulares Europea y de fabricación por Harlan; OX86 es el nombre para un anticuerpo monoclonal anti-OX40 de herramienta usado en roedores; es un anticuerpo de roedores que se une a OX40 en roedores, por ejemplo, el OX40 de ratón (receptor).

OX86 e IgG1 de rata fueron diluidos en DPBS diluido.

Para la preparación de células tumorales, un vial congelado (-140$^{o}$C) de CT-26 (células de carcinoma de colon de ratón), de ATCC (Nº de cat. CRL-2638, Nº de lote 59227052) fueron congelados y cultivados en medio RPMI básico (con FBS al 10%) a la siguiente semana.

Se recolectaron células CT-26 (paso 12) del matraz en medio completo. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en RPMI (sin FBS); esta etapa se repitió 3 veces. La densidad y la viabilidad celular se comprobaron por medio de exclusión de azul de tripano. Las células entonces se diluyeron a la densidad deseada ($5x10^5$ células por mL) y se mantuvieron en hielo.

Se evaluaron dosis crecientes del anticuerpo monoclonal de OX40 (mAb) OX86 para analizar su eficacia en la reducción del crecimiento tumoral. Los animales se pesaron y se les inoculó en la extremidad trasera derecha $0,5x10^5$ de células CT26 tumorales por ratón el día 0. Un total de 130 ratones fueron inoculados con células tumorales - asumiendo un índice de fracaso del 30% (tanto demasiado grande como demasiado pequeño en el tiempo de inocio del estudio), el objetivo fue disponer n=10 para cada grupo. Después de la inoculación de las células tumorales, el crecimiento tumoral y el peso corporal total se midieron 3 veces por semana durante la duración del estudio. La randomización ocurrió el día 10 ó 11 cuando el volumen promedio del tumor fue de aproximadamente 100 $mm^3$. Comenzando el día de la randomización, a los animales les fue administrado mAb de OX86 o el isotipo de IgG1 de rata i.p. bisemanalmente, para un total de 6 dosis. Los ratones permanecieron en el estudio hasta que los tumores alcanzaron >2000 $mm^3$ para dos medidas consecutivas, fueron retirados del estudio por otras razones (es decir, pérdida de peso > 20%, ulceración sobre el tumor, etc.) o hasta el final del estudio. Después de la eutanización, los tumores fueron retirados y se sometieron a disociación para el análisis de flujo y/o FFPE para el análisis IHC.

| **Tratamiento** | **Dosis** | **No. de ratones** |
|---|---|---|
| **Grupo 1**: $0,5x10^5$ células por, IgG1 de rata | 400 μg por ratón | 10-13 |
| **Grupo 2**: $0,5x10^5$ células por, OX86 | 400 μg por ratón | 10-13 |

**Grupo 3**: 0,5x$10^5$ células por, OX86 200 μg por ratón 10-13

**Grupo 4**: 0,5x$10^5$ células por, OX86 100 μg por ratón 10-13

**Grupo 5:** 0,5x$10^5$ células por, OX86 50 μg por ratón 10-13

Día 0: inoculación sc con células tumorales

Días 1, 4, 6, 8: Los animales se pesaron y se controlaron los tumores y si estaban presentes, los tumores se midieron.

Día de randomización (aprox. día 10): Los animales se randomizaron y se colocaron en jaulas representando los grupos apropiados

Administración, bisemanalmente hasta el final del estudio: A los animales se les administró ip con OX86 o anti IgG1 de rata, cuando las cantidades mostradas anteriores estaban en una base por ratón.

Medidas, trisemanalmente hasta el final del estudio: Los animales se pesaron y los tumores se midieron

Los pesos de los tumores promedios de aproximadamente 10 animales fueron promediados. Las barras de error muestran el análisis SEM. Los valores P fueron calculados según lo siguiente: el valor P analizaba la hipótesis nula de que las curvas de supervivencia eran idénticas en todas las poblaciones. En otras palabras, la hipótesis nula es que el tratamiento no cambiaba la supervivencia. Los valores P brutos se ajustaron para múltiples comparaciones por medio del método de Stepdown Bonferroni.

El protocolo anterior se usó para generar los resultados en la Figura 1B, y los resultados de los ratones individuales pueden ser encontrados en la Figura 4. Estas Figuras muestran que los ratones inoculados con células CT-26 y tratados con IgG1 de rata desarrollaron tumores que crecieron de forma incesante como se esperaba, mientras que la administración con anticuerpo monoclonal OX40 (mAb) OX86 condujo a una clara inhibición del crecimiento tumoral y aumentó la capacidad de supervivencia cuando se comparaba con la IgG1 de rata del grupo de control.

**Ejemplo 2: Resultados del estudio CT-26 con tratamiento con TLR4 (CRX-527)**

La adición de moduladores de TLR4, tales como CRX-527 al protocolo del tratamiento anterior de monoterapia de OX40 se usó para estudiar la monoterapia de TLR4 y la combinación de inmunoterapia anti-mOX40 con moduladores de TLR4.

| | Tratamiento | Dosis (por ratón) | No. de ratones |
|---|---|---|---|
| **Grupo 0**: | $0,5x10^5$ células por, | vehículo | 10-13 |
| **Grupo a:** | $0,5x10^5$ células por, | CRX-527; 4 μg | 10-13 |
| **Grupo b:** | $0,5x10^5$ células por, | CRX-527; 20 μg | 10-13 |
| **Grupo c**: | $0,5x10^5$ células por, | CRX-527; 100 μg | 10-13 |

Día 0: inoculación sc con células tumorales

Días 1, 4, 6, 8: Los animales se pesaron, se controlaron los tumores y se midieron.

Día de randomización (aprox. día 10): Los animales se randomizaron y se colocaron en jaulas representando los grupos apropiados

Administración, bisemanalmente hasta el final del estudio: A los animales se les administró ip con compuesto de TLR CRX-527 en las cantidades mostradas anteriormente (por ratón), o vehículo.

Medidas, trisemanalmente hasta el final del estudio: Los animales se pesaron y los tumores se midieron.

El protocolo anterior se usó para generar los resultados en la Figura 1A y en las Figuras 2-6 a las dosis indicadas. En casi cada caso, los ratones Balb/c que fueron inoculados con $0,5x10^5$ células tumorales CT-26 colorectales en la

extremidad trasera derecha desarrollaron tumores que, cuando se trataban i.p. con vehículo (2% Glicerol) solo progresaban como se esperaba. Los agonistas de TLR 4 CRX-527 (Figuras 2-5) y CRX-601 (Figura 6) inhibieron el crecimiento tumoral de una forma dependiente de la dosis cuando se comparaba con los animales tratados con vehículo. La dependencia de la dosis también fue observada en la capacidad de supervivencia del modelo.

**Ejemplo 3: Tratamiento de combinación con OX40 (es decir, OX-86, un anticuerpo generado frente a un receptor de roedor de OX40) y CRX-527**

El siguiente programa de tratamiento fue realizado:

| **Administración** | **tratamiento 1** | **tratamiento 2** | **número de ratones** |
|---|---|---|---|
| **Grupo 1:** | 0,5x105 células por, IgG1 de rata | vehículo farmacéutico | 10-13 |
| **Grupo 2:** | 0,5x105 células por, OX86 50 μg | vehículo farmacéutico | 10-13 |
| **Grupo 3:** | 0,5x105 células por, RatIgG1 | CRX-527 5 μg | 10-13 |
| **Grupo 4:** | 0,5x105 células por, RatIgG1 | CRX-527 25 μg | 10-13 |
| **Grupo 5:** | 0,5x105 células por, OX86 50 μg | CRX-527 5 μg | 10-13 |
| **Grupo 6:** | 0,5x105 células por, OX86 50 μg | CRX-527 25 μg | 10-13 |

Día 0: inoculación sc con células tumorales

Días 1, 4, 6, 8: Se controlaron los tumores de los animales y si estaban presentes, los tumores se midieron.

Día de registro del estudio (aprox. día 10): Los animales se randomizaron y recibieron el tratamiento 1.

Bisemanalmente después del registro: comenzando con el día de registro, los ratones recibieron dosis i.p. bisemanalmente para un total de 6 dosis.

Trisemanalmente hasta el final del estudio: Los animales se pesaron y los tumores se midieron

Cuando el tratamiento de OX86 fue combinado con el tratamiento del modulador de TLR4 (CRX-527), los ratones mostraron una mayor reducción en la carga tumoral y sobrevivieron durante más tiempo que en cada tratamiento solo.

**Ejemplo 4: Tratamiento de Monoterapia y Combinación con el anticuerpo anti-mOX40R y moléculas de reconocimiento TLR4 de la Fórmula I**

A los ratones les fue administrado el anticuerpo OX40; un compuesto de Fórmula 1 (incluyendo un compuesto de Fórmula Ia, CRX-527, CRX-547, y CRX-601 (agonistas de TLR4), o una combinación de ambos. Cada tratamiento tiene una actividad anti-tumoral significativa.

Hay al menos dos hallazgos significativos. Primero, en ratones, el anti-OX40R o la combinación del anticuerpo anti-OX40 y la combinación del agonista de TLR4 cada uno retrasaron el crecimiento de tumores CT-26 establecidos respecto a un grupo control no tratado. Segundo, en ratones se observó un efecto anti-tumoral significativo en combinaciones del agonista de TLR4 y el anticuerpo anti-OX40R cuando se comparaba con el tratamiento monoterapia.

**Ejemplo 5: Tratamiento de combinación con un ABS OX40R (es decir, clon OX-86 del anticuerpo de receptor anti-mOX40, un anticuerpo generado frente un receptor de OX40 de roedor) y CRX-601**

**Materiales y Métodos**

**Estudios de la eficacia anti-tumoral *in vivo***

La eficacia anti-tumoral *in vivo* del agonista de TLR4 (CRX601) se evaluó en el modelo de tumor sólido singeneico de carcinoma de colon murino CT-26 como una monoterapia y en combinación con un clon del anticuerpo OX40 anti-ratón de rata OX86. Se usaron ratones hembra Balb/c (BALB/cAnNCrl, Charles River) de siete a ocho semanas en estos estudios. Se cultivaron células de carcinoma de colon murinas CT-26 (Número de catálogo ATCC CRL-2638 Nº de lote 59227052) en medio de crecimiento RPMI suplementado con suero de bovino fetal al 10% (FBS) en una incubadora a 37°C humidificada con $CO_2$ al 5%. Se recolectaron las

células CT-26 cultivadas en crecimiento logarítmico de matraces de cultivo de tejido y se centrifugaron durante 5 minutos a 450xg a 4°C durante diez minutos a células en peletes. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron en solución salina de fosfato (PBS) tamponado en hielo frío sin calcio ni magnesio y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 450xg a 4°C durante diez minutos a células en peletes. Las células se resuspendieron en medio RPMI estéril sin FBS y se ajustó a una concentración celular de 500.000 células/ml. 100 µl de la reserva de células se implantó por medio de la inyección subcutánea en la extremidad derecha de cada ratón Balb/c. Después de diez u once días cuando el tamaño de tumor promedio alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$, los ratones se randomizaron en cohortes de estudio de acuerdo con el tamaño de tumor y se les dio la primera dosis de tratamiento. El agonista de TLR4 (CRX601) o el vehículo se administró por medio de una inyección intravenosa sistémica o intratumoral directa como se indica. El vehículo de CRX-601 usado para la administración intravenosa e intratumoral fue 0,5% cuando se indicaba. Para la administración intratumoral liposómica de CRX-601, se usó un liposoma de DOPC/CHOL preparado por GSK Nº de lote 1783-157-B. El anticuerpo de receptor anti-ratón de rata OX40 (clon OX86) (expresado y purificado como producción propia a partir del hibridoma Grits ID 50776, BP232 2013 de rata) o el anticuerpo de control de isotipo de IgG1 de rata (BioXCell Nº de catálogo BE0088) se administró por medio de una inyección intraperitoneal dada dos veces por semana para un total de seis dosis. Se tomaron medidas de calibre tres veces por semana para evaluar el crecimiento tumoral, y los ratones con tumores <2.000 $mm^3$ se mantuvieron en el estudio entre 30 y hasta aproximadamente 115 días. Los ratones con tumores >2.000 $mm^3$ para 2 medidas consecutivas o los ratones con tumores que se formaron bajo úlceras fueron retirados del estudio. El volumen del tumor fue calculado usando la Fórmula (0,52) x (Longitud) x ($Anchura^2$). En los estudios 6 y 7, los ratones sin tumor fueron re-expuestos a las células de tumor CT-26 como se describe anteriormente, en la extremidad opuesta al sitio de inoculación original y el crecimiento tumoral fue monitorizado, como se describe anteriormente. Todos los estudios se llevaron de acuerdo con la Política de Cuidados GSK, Welfare and

Treatment of Laboratory Animals y se revisaron mediante el Institutional Animal Care and Use Committee en GSK.

**Inmunofenotipado y análisis de citoquinas**

Se recogieron los tumores, la sangre y los tejidos de ratones CT-26 el día 0, día 1 y día 8 después de la primera administración de CRX-601. Las células sanguíneas de ratón blanco y las células individuales de tumor disociadas se tiñeron nuevamente con anticuerpos de tinción de superficie o intracelulares para el análisis de citometría de flujo multicolor para observar el inmunofenotipado. El análisis de citoquinas múltiplex fue realizado usando muestras de plasma de ratón del mismo estudio.

**Análisis estadístico**

Para los estudios 1-4, con el fin de determinar la significancia de la inhibición del crecimiento tumoral, fueron comparados los volúmenes de los tumores a los 11 (estudio 1), 15 (estudios 2 y 3) o 19 (estudio 4) días después de la primera dosis entre los diferentes grupos de tratamiento. Antes del análisis, los volúmenes de los tumores fueron transformados a log natural debido a la desigualdad de la varianza en los diferentes grupos de tratamiento. El ANOVA seguido de la comparación de pares fue entonces llevado a cabo en los datos transformados a log. Se usó el software de análisis SAS 9.3 y R 3.0.2. Se llevó a cabo el método de Kaplan-Meier (KM) para estimar la probabilidad de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento a un tiempo dado. El evento para el análisis de supervivencia fue un volumen de tumor de 2000 $mm^3$ o la ulceración del tumor, cualquiera que fuera el que apareciera primero. El tiempo exacto para el volumen de recorte fue estimado ajustando una línea lineal entre el log volumen del tumor y el día de dos observaciones, excediendo la primera observación el volumen de recorte y la observación que inmediatamente precedía el volumen de recorte. Fue calculado el tiempo medio al punto final y su correspondiente intervalo de confianza al 95%. Tanto si las curvas de supervivencia de KM eran o no estadísticamente diferentes entre cualquiera de los dos grupos se analizó después por la prueba de rango logarítmico. El valor p bruto, así como los valores P

ajustados de la tasa de descubrimientos falsos (FDR), a partir de las comparaciones de días a eventos por análisis de supervivencia y las comparaciones del volumen del tumor transformado en log en los días indicados entre los grupos de tratamiento fueron determinadas. Aquellas con valores P ≤ 0,05 ajustados a FDR fueron declaradas como estadísticamente significativas.

Para los estudios 6 y 7, para determinar la significancia de la inhibición del crecimiento tumoral, los volúmenes de los tumores 12 días después de la primera dosis fueron comparados entre los diferentes grupos de tratamiento. Los tratamientos fueron comparados por métodos ANOVA estándar seguido de ajuste FDR para la multiplicidad. La respuesta es la raíz cuadrada del volumen, por razones de homocedasticidad (igual varianza). El método de Kaplan-Meier (KM) se llevó a cabo para estimar la probabilidad de supervivencia de diferentes grupos de tratamiento a un tiempo dado. Para estos análisis de supervivencia, “Muerte” significa traspasar el recorte de volumen de tumor (2000 $mm^3$). “Supervivencia” significa la proporción de ratones no “Muertos”, y el “Tiempo de supervivencia” significa los días hasta la “Muerte”. Si un ratón traspasaba el recorte de volumen entre dos días medidos, entonces el día de la “muerte” fue estimado por interpolación lineal. Si un ratón traspasaba el recorte de volumen más de una vez, se usaba el primer traspaso. Los tratamientos fueron comparados mediante la prueba de rango logarítmico estándar para dos tratamientos. Los valores P en escala log fueron ajustados para la multiplicidad usando el método FDR (tasa de descubrimientos falsos). La significancia fue definida como FDR <= 0,05. Todos los cálculos y gráficas fueron hechos usando el software R, versión 3.2.3.

**Resultados**

Se realizaron seis estudios (Estudios 1 a 4 y Estudios 6 a 7) para evaluar el tamaño del tumor y el tiempo de supervivencia en ratones tratados con CRX601 y el clon del anticuerpo OX40 de receptor anti-ratón de rata OX86, ambos solos y en combinación con cada otro. Se realizó un estudio adicional (Estudio 5 más abajo) para evaluar la liberación de citoquina y la activación de células T en ratones tratados con CRX601 y el clon del anticuerpo OX40 de receptor anti-ratón de rata OX86, ambos solos y en combinación con cada otro.

Estudio 1

Con el fin de determinar La actividad de la monoterapia de CRX-601 con administración intratumoral, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ células CT-26 y fueron randomizados en los grupos de 10 enumerados más abajo cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ como se describe en Materiales y Métodos.

Grupo 1: Vehículo administrado de forma intratumoral dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 2: CRX-601 0,1 μg/ratón administrado de forma intratumoral dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 3: CRX-601 1 μg/ratón administrado de forma intratumoral dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 10 μg/ratón administrado de forma intratumoral dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 5: CRX-601 50 μg/ratón, dosis individual

Con la administración intratumoral, se observó la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) para el agonista de TLR4 CRX-601 en el modelo de tumor de ratón CT-26 singeneico. Los ratones administrados con 10 μg y 50 μg mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *$p \leq 0,05$) 11 días después de la dosis inicial comparado con el vehículo. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Los ratones tratados con el agonista de TLR4 CRX-601 en este estudio también mostraron un incremento estadísticamente significativo en el tiempo de supervivencia. Los ratones dosificados con 50 μg mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores *$p \leq 0,05$) en la supervivencia comparado con el vehículo el día 42 después de La inoculación de células tumorales CT26 cuando el estudio fue acabado. En ese día, solo los ratones de los grupos de

CRX-601 de 50 μg y 10 μg quedaron en el estudio. Tres de los cuatro ratones en el grupo 50 μg no tuvieron tumores, mostrando el cuarto ratón un volumen de tumor de 854,19 $mm^3$. El único ratón que permanecía en el grupo de 10 μg no tuvo ningún tumor. (véase la Figura 19).

Estudio 2

Con el fin de determinar la actividad de la monoterapia de CRX-601 con administración intravenosa, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ células CT-26 y fueron randomizados en los 10 grupos siguientes cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ como se describe en Materiales y Métodos.

Grupo 1: Vehículo administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 2: CRX-601 1 μg/ratón administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 3: CRX-601 10 μg/ratón administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 100 μg/ratón, dosis individual

Con la administración intravenosa, se observó la actividad anti-tumoral dependiente de la dosis (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) para el agonista de TLR4 CRX-601 en este modelo de tumor de ratón CT-26 singeneico. Los ratones administrados con 10 μg y 100 μg mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores $*p \leq 0,05$) 15 días después de la dosis inicial comparado con el vehículo (véase la Figura 20).

Los ratones tratados con el agonista de TLR4 CRX-601 en este modelo de tumor de ratón CT-26 singeneico también mostraron un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia comparado con el vehículo. Los ratones administrados con 100 μg mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores $*p \leq 0,05$) en la supervivencia comparado con el vehículo cuando el

estudio fue acabado el día 32 después de La inoculación de células tumorales CT-26. Uno de los tres ratones que permanecía en este grupo no tuvo ningún tumor, mientras que los otros ratones mostraron volúmenes de tumores de 1500,49 y 962,61 $mm^3$. El único ratón que permaneció en el grupo de dosis de 10 µg tuvo un volumen del tumor de 188,0 $mm^3$. (véase la Figura 21)

Estudio 3

Con el fin de determinar la actividad de CRX-601 solo y en combinación con anti-OX40, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ células CT-26 y fueron randomizados en los 10 grupos siguientes cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ como se describe en Materiales y Métodos.

Grupo 1: Vehículo administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total

Grupo 2: IgG1 de rata 10 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 3: OX86 25 µg/ratón administrado dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 10 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total

Grupo 5: CRX-601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total

Grupo 6: CRX-601 10 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 7: CRX-601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Se evaluó la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) para 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata de OX40 (clon OX-86), administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total, 10 μg o 25 μg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en este modelo de ratón singeneico CT-26. Las dosis de monoterapia CRX-601 sub-óptima de 10 μg/ratón o 25 μg/ratón administrados una vez a la semana no mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa cuando se administraba solo comparado con el vehículo, ni cuando se administraba una dosis de OX86 de 25 μg/ratón comparado con IgG1 de rata. Sin embargo, el CRX601 administrado de forma intravenosa una vez a la semana a 10 μg o 25 μg/ratón para 3 dosis en total en combinación con 25 μg/ratón OX86 administrado dos veces por semana para 6 dosis en total mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) 15 días después de la dosis inicial comparado con el vehículo y Controles de IgG1 de rata, y comparado con las monoterapias de CRX601 y OX86 (véase la Figura 22).

En este estudio de modelo de ratón singeneico CT-26, la ventaja de supervivencia también se determinó para ratones tratados con 25 μg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata de OX40 (clon OX-86), administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total, 10 μg o 25 μg del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos. El día 106 después de la inoculación de las células tumorales CT-26 cuando el estudio fue acabado, CRX-601 10 μg y 25 μg/ratón administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total en combinación con 25 μg/ratón OX86 administrado 2x/semana para 6 dosis en total mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores *p ≤ 0,05) en la supervivencia comparado con ambos vehículo y controles de IgG1 de rata, y comparado con las monoterapias de OX86 y CRX-601. Los tres ratones que permanecieron en el grupo CRX-601 25 μg/ratón + OX86 estaban sin tumores, y

el único ratón en el grupo CRX-601 10 µg/ratón + OX86 no tuvo ningún tumor. (véase la Figura 23).

Estudio 4

El estudio 3 fue repetido con 25 µg/ratón de CRX-601 solo y en combinación con anti-OX40, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ células CT-26 y fueron randomizados en los 10 grupos siguientes cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ como se describe en Materiales y Métodos.

Grupo 1: Vehículo administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 2: CRX-601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total

Grupo 3: Vehículo administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 5: CRX-601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Se observó la actividad anti-tumoral (como se mide por el volumen del tumor con el tiempo) para 25 µg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata de OX40 (clon OX-86), administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 µg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. El CRX601 administrado de forma intravenosa una vez a la semana a 25 µg/ratón para 3 dosis en total en

combinación con 25 µg/ratón OX86 administrado dos veces por semana para 6 dosis en total mostraron una inhibición estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) del crecimiento tumoral comparado con las monoterapias de CRX601 y OX86 (véase la Figura 24).

Se midieron las curvas de supervivencia para ratones tratados con 25 µg/ratón de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata de OX40 (clon OX-86), administrado de forma intravenosa dos veces por semana para 6 dosis en total, o 25 µg/ratón del agonista de TLR4 CRX-601 administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total, y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26. El CRX601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa 1x/semana para 3 dosis en total en combinación con 25 µg/ratón OX86 administrado 2x/semana para 6 dosis en total mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores P ≤ 0,05) en la supervivencia comparado con las monoterapias. Este análisis estadístico se realizó el día 64 después de la inoculación del tumor de células cuando todos los ratones que permanecían estaban sin tumores. Estos ratones fueron monitorizados hasta el final del estudio el día 111. En ese día, siete ratones en el Grupo 5 CRX-601 25 µg/ratón + OX86 quedaban sin tumores, dos ratones en el Grupo 3 CRX-601 25 µg/ratón + IgG1 de rata quedaban sin tumores, y un ratón en el Grupo 4 Vehículo + OX86 quedaban sin tumores. (véase la Figura 25).

Estudio 5

Los resultados son la media de cinco animales por cohorte.

Se evaluaron los leucocitos y la activación inmune en ratones tratados con 10 µg del agonista de TLR4 CRX-601, 25 µg de un anticuerpo de receptor anti-ratón de rata de OX40 (clon OX-86), y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon medido a 8 días después de la administración. Un incremento significativo de leucocitos que se infiltraban en el tumor se observó en ratones tratados con CRX-601 y anti-OX86 en combinación. Un incremento sinérgico de la expresión del marcador CD25 de la activación de células T en células T CD4 en circulación se observó en los ratones tratados con

CRX-601 y anti-OX86 en combinación. Un incremento sinérgico de la activación de los marcadores asociados a células T CTLA4, PD1 e ICOS en células T CD4 en circulación se observó en los ratones tratados con CRX-601 y anti-OX86 en combinación. Los resultados se muestran en la Figura 26 A-C.

Un incremento de la activación inmune de citoquinas TNF alfa y IL-12p70 se observó en ratones tratados con 10 µg del agonista de TLR4 CRX-601, un anticuerpo anti-mOX40R de rata (OX-86), y la combinación de ambos en un modelo de ratón singénico de CT-26 de cáncer de colon medido 1 y 8 días después de la administración. El IL-12p70 fue solo detectable 8 días después de la administración como se muestra en la Figura 27B. Los resultados se muestran en las Figuras 27 A-B.

Estudio 6

Para comparar la actividad de CRX-601 solo y en combinación con anti-OX40 cuando se administraba CRX-601 tanto (IV) como intratumoralmente (IT) en un vehículo de 0,5% Glicerol/4% Dextrosa, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ células CT-26 y fueron randomizados en los 10 grupos siguientes cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ como se describe en Materiales y Métodos.

Grupo 1: Vehículo administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 2: CRX-601 25 µg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 3: OX86 25 µg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 25 μg/ratón administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 5: Vehículo administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 6: CRX-601 25 μg/ratón administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 7: CRX-601 25 μg/ratón administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Se evaluó la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) para grupos de tratamiento. La monoterapia de dosis de CRX-601 sub-óptima de 25 μg/ratón no mostró una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa cuando se administró de forma intravenosa (Grupo 2) o intratumoral (Grupo 6) comparado con los grupos de control correspondientes (Grupo 1 y Grupo 5, respectivamente). La monoterapia de la dosis de OX86 25 μg/ratón no mostró ninguna inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa comparado con los Grupos de control 1 y 5. Sin embargo, la dosis de CRX601 25 μg/ratón dada de forma intravenosa en combinación con la dosis de OX86 25 μg/ratón IP (Grupo 4) mostró una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) 12 días después de la dosis inicial comparado con el Grupo 1 control y el Grupo 3 de monoterapia de OX86. La dosis de CRX601 25 μg/ratón dada intratumoralmente en combinación con la dosis IP de OX86 25 μg/ratón (Grupo 7) también mostró una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) 12 días después de la dosis inicial comparado con el Grupo 5 control y el Grupo 3 de monoterapia de OX86. La combinación de CRX601 25 μg/ratón

administrado de forma intravenosa (Grupo 4) o intratumoral (Grupo7) con OX86 25 μg/ratón IP no fue estadísticamente significativa comparado con el Grupo 2 de monoterapia de CRX601 o el Grupo 6 para la inhibición del crecimiento tumoral en este estudio (véanse las Figuras 28 y 29).

En este modelo de ratón singeneico CT-26, también se determinó el estudio de la ventaja de supervivencia. 68 días después de la primera dosis, la combinación de CRX601 25 μg/ratón administrado de forma intravenosa (Grupo 4) o intratumoral (Grupo 7) con OX86 25 μg/ratón IP mostró un incremento estadísticamente significativo (valores *p ≤ 0,05) en la supervivencia comparado con su Grupo 1 control o Grupo 5, respectivamente. La dosis intravenosa de CRX-601 en combinación con OX86 IP (Grupo 4) dio como resultado 6 de 10 ratones sin tumor, y la dosis intratumoral de CRX-601 en combinación con OX86 IP (Grupo 7) dio como resultado 3 de 10 ratones sin tumor. Los grupos de monoterapia no mostraron un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia comparado con los grupos de control (véanse las Figuras 30 y 31). Los ratones control sin tratamiento y los ratones sin tumor totalmente reabsorbidos el día 68 fueron re-expuestos a células tumorales CT26. Los tumores CT26 crecieron como se esperaba en ratones control sin tratamiento, pero fueron rechazados sin crecimiento tumoral en los ratones del grupo de tratamiento. Esto indica una inmunidad de memoria anti-tumoral persistente debido al tratamiento de CRX-601 o CRX-601 en combinación con OX86 (véase la Figura 32). Los dos ratones en el Grupo 3 de monoterapia de OX86 el día 68 tuvieron volúmenes de tumores de 27,86 y 1576,27 $mm^3$, y no fueron re-expuestos.

Estudio 7

Para comparar la actividad de CRX-601 solo y en combinación con anti-OX40 cuando CRX-601 se administraba tanto intravenosa (IV) usando un vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa, como intratumoralmente (IT) usando una Formulación liposómica de DOPC/CHOL, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ Células CT-26 y fueron randomizados en los 10 grupos siguientes cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ como se describe en Materiales y Métodos

Grupo 1: Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 2: CRX-601 25 μg/ratón (in 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 3: Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 25 μg/ratón (in 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 5: Vehículo (Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 6: Vehículo (Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 7: CRX-601 25 μg/ratón (in Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 8: CRX-601 25 μg/ratón (in Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Se evaluó la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) para grupos de tratamiento12 días después de la dosis inicial. La dosis de monoterapia de CRX-601 sub-óptima de 25 μg/ratón mostró una inhibición estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) del crecimiento tumoral cuando se administraba de forma intravenosa (Grupo 2) o intratumoralmente (Grupo 7, Formulación liposómica) comparado con los grupos control correspondientes (Grupo 1 y Grupo 5, respectivamente). El grupo IP de monoterapia de OX86 25 μg/ratón de dosis 3 y el Grupo 7 también mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) comparado con los Grupos 1 y 5 control. La dosis de CRX601 25 μg/ratón dada intravenosamente en combinación con la dosis IP de OX86 25 μg/ratón (Grupo 4) mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) comparado con el Grupo 1 control y el Grupo 3 de la monoterapia de OX86. La dosis de CRX601 25 μg/ratón dada intratumoralmente con la Formulación liposómica de DOPC/CHOL en combinación con la dosis IP de OX86 25 μg/ratón (Grupo 8) también mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (valores *p ≤ 0,05) comparado con el Grupo 5 control. La combinación de CRX601 25 μg/ratón administrado de forma intravenosa (Grupo 4) o intratumoralmente (Grupo 8) con OX86 25 μg/ratón IP no fue estadísticamente significativa comparado con el Grupo 2 de la monoterapia de CRX601 o el Grupo 7 para la inhibición del crecimiento tumoral en este estudio el día 12 (véanse las Figuras 33 y 34).

En este estudio de modelo de ratón singeneico CT-26, la ventaja de supervivencia también se determinó 80 días después de la primera dosis. El CRX601 administrado como una monoterapia IV (Grupo 2), o IV administrado en combinación con OX86 IP (Grupo 4) mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores *p ≤ 0,05) en la supervivencia comparado con control Grupo 1. Los Grupos 2 y 4 tuvieron 5 de cada 10 ratones cada uno que mostraban regresiones tumorales completas (véase La Figura 35). Ambos CRX601 administrados como monoterapia intratumoral con la Formulación de liposomas DOPC/CHOL (Grupo 7), y la Monoterapia de OX86 con el control liposómico

intratumoral (Grupo 6) mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores *p ≤ 0,05) en la supervivencia comparado con el Grupo 5 control. La dosis de la Formulación liposómica DOPC/CHOL de CRX601 intratumoral en combinación con OX86 IP (Grupo 8) mostraron un incremento estadísticamente significativo (valores *p ≤ 0,05) en la supervivencia comparado con el Grupo 5 control, así como comparado con los grupos CRX601 intratumoral (Grupo 7) y OX86 (Grupo 6) de control de monoterapia. 9 de cada 10 ratones tenían totalmente reabsorbidos el tumor y sin tumor en la dosis liposómica DOPC/CHOL de CRX601 intratumoral en combinación con OX86 IP, comparado con 3 y 2 ratones en los Grupos 6 y 7 de control de monoterapia intratumoral. Por lo tanto, se observó sinergia con la dosis de la Formulación liposómica de CRX601 intratumoral en combinación con OX86 comparado con los Grupos 6 y 7 de monoterapia de control intratumoral (véase la Figura 36). Los ratones control sin tratamiento y los ratones con tumor totalmente reabsorbidos el día 80 fueron re-expuestos a células tumorales CT26. Los tumores de CT26 crecieron como se esperaba en ratones control sin tratamiento, pero fueron rechazados sin crecimiento tumoral en los ratones del grupo de tratamiento. Este resultado indica una memoria anti-tumoral persistente debida a CRX-601 o CRX-601 en combinación con el tratamiento de OX86 (véase la Figura 37). Esta carencia de crecimiento tumoral indica una memoria anti-tumoral persistente debida a CRX-601 o CRX-601 en combinación con el tratamiento OX86 (véase la Figura 37).

Estudio 8

El efecto abscopal se describe como una regresión del tumor a distancia después de un tratamiento tumoral local. Con el fin de evaluar los efectos abscopales, fueron inoculados ratones con $5x10^4$ células CT-26 en la extremidad izquierda, y $5x10^4$ células CT-26 en la extremidad derecha como se describe en Materiales y Métodos para la inoculación del tumor individual. Por lo tanto, en este estudio, cada ratón poseía dos tumores, uno en la extremidad derecha, y uno en la extremidad izquierda. Los ratones se randomizaron en grupos de 10 como se muestra en lo siguiente cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100 $mm^3$ para la extremidad derecha, y el tamaño de tumor de la extremidad

izquierda fue similar. Para determinar el efecto abscopal de la actividad de CRX-601 solo y en combinación con anti-OX40, fue administrado CRX-601 de forma intratumoral (IT) en el tumor de la extremidad izquierda sola usando una Formulación liposómica de DOPC/CHOL o una Formulación de 0,5% Glicerol/4% Dextrosa. El tamaño de tumor fue monitorizado para amabas extremidades de los tumores izquierdo y derecho. Además, se administró CRX-601 de forma intravenosa (IV) usando un vehículo 0,5% Glicerol/4% Dextrosa, solo y en combinación con anti-OX40 como un control para la actividad sistémica (Grupo 7).

Grupo 1: Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 2: Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 3: CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 4: CRX-601 25 μg/ratón (in 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 5: Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 6: Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 7: CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 8: CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 9: Vehículo (Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 10: Vehículo (Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 11: CRX-601 25 μg/ratón (en Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + IgG1 de rata 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Grupo 12: CRX-601 25 μg/ratón (en Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total

Se evaluó la actividad anti-tumoral (como se mide por la inhibición del crecimiento tumoral con el tiempo) para grupos de tratamiento. Los ratones fueron retirados del estudio si uno o ambos tumores alcanzaban 2.000 $mm^3$. El día de estudio 60 después de la primera dosis, todos los ratones que permanecieron en el estudio estaban completamente libres de tumor, y el efecto abscopal y la ventaja de supervivencia fueron determinadas. Para el Grupo 7 de combinación de administración sistémica, CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intravenosa una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana

para 6 dosis en total, 7 de cada 10 ratones permanecieron sin tumor para ambos tumores de las extremidades derecha e izquierda (Figura 38). Para el Grupo 8 de combinación, CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, 3 de cada 10 ratones mostraron total regresión tumoral para ambos tumores, incluso aunque solo el tumor de la extremidad izquierda recibía inyección intratumoral (Figura 39). Para el Grupo 12 de combinación, CRX-601 25 μg/ratón (en Liposomas DOPC/CHOL) administrado de forma intratumoral una vez a la semana para 3 dosis en total + OX86 25 μg/ratón administrado de forma intraperitoneal dos veces por semana para 6 dosis en total, 5 de cada 10 ratones mostraron total regresión tumoral para ambos tumores, incluso aunque solo el tumor de la extremidad izquierda recibía la inyección intratumoral (Figura 40). Por lo tanto, las Formulaciones de CRX-601 administradas de forma intratumoral en combinación con OX86 administrado de forma intraperitoneal mostraron un efecto abscopal (Grupos 8 y 12). La inyección local IT del tumor de la extremidad izquierda dio como resultado una regresión tumoral distante de la extremidad derecha. No hubo diferencia estadística en la ventaja de supervivencia entre los tres grupos 7, 8, y 12 de combinación. El Grupo 7 mostró un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia comparado con todos los controles de vehículo e isotipo, y también comparado con todos los grupos de CRX-601 y monoterapia de OX86 (**valores *p ≤ 0,006). La combinación del Grupo 12 mostró un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia comparado con el Grupo 10 Liposoma Vehículo IT + OX86 (*valores *p = 0,006), aunque no fue estadísticamente significativa versus el Grupo 11 CRX-601 25 μg/ratón Formulación de Liposoma + IgG1 de rata (valores P = 0,119). La combinación del Grupo 8 mostró un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia comparado con el Grupo 4 CRX-601 25 μg/ratón (en 0,5% Glicerol/4% Dextrosa) IT + IgG1 de rata (valores *p = 0,013), aunque no fue estadísticamente significativa versus el Grupo 6 Vehículo (0,5% Glicerol/4% Dextrosa) IT + OX86 (valores P = 0,5). La Figura 41 muestra las curvas de supervivencia para todos los grupos.

**Ejemplo 6: Expresión de OX40 inducida por tratamiento con una gama de concentraciones de CRX601 (0,01 a 1000 ng/ml) sobre células T humanas CD4+ (A), células dendríticas (B), y monocitos (C) a las 24 horas en cultivo celular *in vitro*.**

**Descripción del experimento:**

En células mononucleares de sangre periférica humana in vitro (PBMC) se realizó un ensayo para evaluar el efecto de CRX601 sobre la expresión de OX40. Se comprobó la viabilidad de PBMCs humanos recién aislados y se cultivaron en medio libre de suero AIM-V a una densidad de dos millones de células por pocillo en una placa de 24 pocillos no tratada con cultivo de tejidos. PBMCs se estimularon con una concentración de la dosis (0,01µg/ml - 1.000 g / ml, que incluye un blanco como vehículo) de CRX-601 durante 24 horas. Al final de la incubación, se recogieron las células para la evaluación de la expresión de OX40 por citometría de flujo. La rápida regulación al alza de la expresión del receptor OX40 por CRX601 en células T, células dendríticas y monocitos demostró que CRX601 regula al alza la diana de anticuerpo anti-OX40, que puede potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo anti-OX40 y dar lugar a la actividad anti-tumor sinérgica de la combinación TLR4 + OX40 in vivo.

Listado de Secuencias del Anticuerpo OX40

<110> GlaxoSmithKline Intellectual
Property Developed Limited
<120> Combinaciones y Usos y
sus Tratamientos
<130> PU65949
<160> 47
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 1
Asp Tyr Ser Met His
1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 2
Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 3
Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 4
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 6
<211> 458

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
<400> 6
actagtacca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt 60
atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca 120
gtcaaggttt cctgcaaggc ttctggttat accttcacag actattcaat gcactgggtg 180
cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taaacactga gactggtgag 240
ccaacatatg cagatgactt caagggacgg tttgtcttct ctttggacac ctctgtcagc 300
actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct 360
aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actggggtca gggaaccacg 420
gtcaccgtct cctcaggtaa gaatggcctc tcaagctt 458
<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 7
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 8
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 9
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5
<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 12
<211> 416
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
<400> 12
gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct 60
ggtgttgacg gagacattca gatgacccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtggga 120
gacagggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctggtat 180
caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact 240
ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc 300
agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattatag tactcctcgg 360
acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416
<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 13
Ser His Asp Met Ser
1 5
<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 14
Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15
Arg

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 15
His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

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

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

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

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

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

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 451
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
<400> 18
actagtacca ccatggactt cgggctcagc ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt 60
gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggagggtcc 120
ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggtc 180
cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tggtggtagc 240
acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300
tcactgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca 360
agacactatg atgattacta cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tatggtcact 420
gtctcttcag gtgagtccta acttcaagct t 451
<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 19
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 20
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 21
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5
<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1  5  10  15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
  20  25  30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
  35  40  45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
  50  55  60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65  70  75  80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
  85  90  95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
  100  105  110
<210> 23
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 23
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1  5  10  15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
  20  25  30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
  35  40  45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
  50  55  60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65  70  75  80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
  85  90  95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
  100  105  110
<210> 24
<211> 428
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 24

gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctgggttcca 60

ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta ccttatcttt gtctccaggg 120

gaaagggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 180

atgcactggt accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcatcc 240

aacctagaat ctggggtccc tgccaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc 300

ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg 360

gagcttccgc tcacgttcgg cggagggacc aaggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt 420

ctgaattc 428

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp

1 5

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 26

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Asn Gly

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 27

Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 28

<211> 414

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 28
atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctct taaatggtgt ccagagtgaa 60
gtgaagcttg aggagtctgg aggaggcttg gtgcaacctg gaggatccat gaaactctct 120
tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca 180
gagaaggggc ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacatac 240
tatgctgagt ctgtgaatgg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc 300
tacctgcaaa tgaacagctt aagagctgaa gacactggca tttattactg tacgtggggg 360
gaagtgttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 414
<210> 29
<211> 138
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 29
Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95
Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135
<210> 30
<211> 448
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido intético
<400> 30
actagtacca ccatgtactt gggactgaac tatgtattca tagtttttct cttaaatggt 60

gtccagagtg aagtgaagct ggaggagtct ggaggaggct tggtgcaacc tggaggatcc 120
atgaaactct cttgtgctgc ctctggattc acttttagtg acgcctggat ggactgggtc 180
cgccagtctc cagagaaggg gcttgagtgg gttgctgaaa ttagaagcaa agctaataat 240
catgcaacat actatgctga gtctgtgaat gggaggttca ccatctcaag agatgattcc 300
aaaagtagtg tctacctgca aatgaacagc ttaagagctg aagacactgg catttattac 360
tgtacgtggg gggaagtgtt ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 420
tcctcaggtg agtccttaaa acaagctt 448

<210> 31
<211> 138
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 31

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95
Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 32

Lys Ser Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 33
Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
1 5
<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 34
Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Thr
1 5
<210> 35
<211> 378
<212> DNA
<213> Mus sp.
<400> 35
atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgctcagtgt 60
gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120
atcacttgca agtcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 180
ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca 240
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgataatc ttctcacgtt cggtgctggg 360
accaagctgg agctgaaa 378
<210> 36
<211> 126
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 36
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15
Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95
Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110
Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 37
<211> 413
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
<400> 37
gctagcacca ccatgagacc gtctattcag ttcctggggc tcttgttgtt ctggcttcat 60
ggtgctcagt gtgacatcca gatgacacag tctccatcct cactgtctgc atctctggga 120
ggcaaagtca ccatcacttg caagtcaagc caagacatta acaagtatat agcttggtac 180
caacacaagc ctggaaaagg tcctaggctg ctcatacatt acacatctac attacagcca 240
ggcatcccat caaggttcag tggaagtggg tctgggagag attattcctt cagcatcagc 300
aacctggagc ctgaagatat tgcaacttat tattgtctac agtatgataa tcttctcacg 360
ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa cgtaagtaca cttttctgaa ttc 413
<210> 38
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 38
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15
Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95
Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110
Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 39
cgctgttttg acctccatag 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 40
tgaaagatga gctggaggac 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 41
ctttcttgtc caccttggtg 20

<210> 42
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 42
gctgtcctac agtcctcag 19

<210> 43

<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 43
acgtgccaag catcctcg 18
<210> 44
<211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
<400> 44
atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctct taaatggtgt ccagagtgaa 60
gtgaagctgg aggagtctgg aggaggcttg gtgcaacctg gaggatccat gaaactctct 120
tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca 180
gagaaggggc ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacatac 240
tatgctgagt ctgtgaatgg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc 300
tacctgcaaa tgaacagctt aagagctgaa gacactggca tttattactg tacgtggggg 360
gaagtgttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1407
<210> 45

<211> 469
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 45
Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95
Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Thr Cys Asn Val
210 215 220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
225 230 235 240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 46
<211> 702
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético
<400> 46

atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgctcagtgt 60
gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120
atcacttgca agtcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 180
ggaaaaggtc ctaggctgct catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca 240
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300

gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgataatc ttctcacgtt cggtgctggg 360
accaagctgg agctgaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 47
<211> 233
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 47

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

```
    195         200         205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
  210         215         220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
   225             230
```

Reivindicaciones

1. Una combinación de una proteína de unión a antígeno (ABP) que se une a OX40 y un modulador de TLR4, y en donde el ABP modula OX40.
2. La combinación como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el ABP que se une a OX40 es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 13; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 14; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 15; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 19; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 20; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 21.
3. Una combinación como se reivindica en las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el ABP que se une a OX40 es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; (c) una región

variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7; (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 8; y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9.

4. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el ABP que se une a OX40 es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, en donde el anticuerpo comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

5. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ABP que se une a OX40 es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 5; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11.

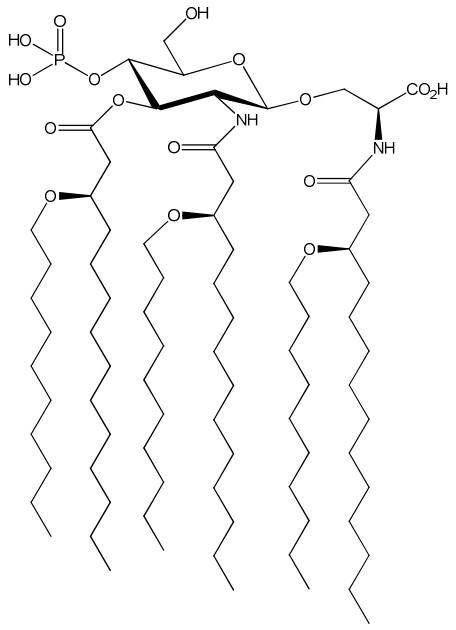
6. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el modulador de TLR4 es un agonista de TLR4.

7. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el modulador de TLR4 es una glucosaminida fosfato de aminoalquilo (AGP).

8. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el modulador de TLR4 es un compuesto elegido a partir de: la Fórmula I y la Fórmula Ia.

9. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el modulador de TLR4 es elegido a partir de: CRX-601; CRX-547; CRX-602; y CRX-527.

10. Una combinación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el modulador de TLR4 tiene la Fórmula CRX-601 mostrada siguiente:



CRX-601

11. Un método para tratar el cáncer en un paciente ser humano en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con al menos uno de: un vehículo farmacéuticamente aceptable y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de OX40 que se une al OX40 de ser humano y una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de TLR4.

13. La composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 12, en donde el anticuerpo que se une al OX40 de ser humano comprende una región VH, región que tiene una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia

de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:4; una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:5, y VL que tiene una secuencia de aminoácidos elegida a partir de: una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:10; y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:11, y en donde el agonista de TLR4 es CRX-601.

14. Un método para tratar el cáncer en un paciente humano en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13.

15. El método de tratamiento como se reivindica en la reivindicación 14, en donde el anticuerpo y el agonista de TLR4 se administran al paciente en una ruta elegida a partir de: simultáneamente; secuencialmente, en cualquier orden; sistémicamente; intravenosamente; e intratumoralmente.

16. Un método de tratamiento como se reivindica en la reivindicación 14 ó 15, en donde el anticuerpo de OX40 se administra intravenosamente, y el agonista de TLR4 se administra intratumoralmente.

17. Un método de tratamiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el cáncer es elegido a partir de: melanoma; cáncer de pulmón; cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC); cáncer de riñón; carcinoma de células renales (RCC); cáncer de mama; cáncer metastásico de mama; cáncer de mama triple-negativo (TNBC); cáncer de cabeza y cuello; cáncer de colon; cáncer colorectal (CRC); cáncer de ovario; cáncer pancreático; cáncer de hígado; carcinoma hepatocelular (HCC); cáncer de próstata; cáncer de vejiga; cáncer gástrico; tumores líquidos; tumores sólidos; tumores hematopoyéticos; leucemia; linfoma no de Hodgkins (NHL); linfoma; y leucemia linfocítica crónica (CLL).

18. El método de tratamiento como se reivindica en la reivindicación 17, en donde el ser humano tiene más de un tumor sólido, y en donde el agonista de TLR4 se administra intratumoralmente a un solo tumor de dicho ser

humano, y en donde el tamaño del tumor de al menos un tumor sólido, dentro del cual el TLR4 no fue administrado, se reduce.

19. El uso de una combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de un medicamento.

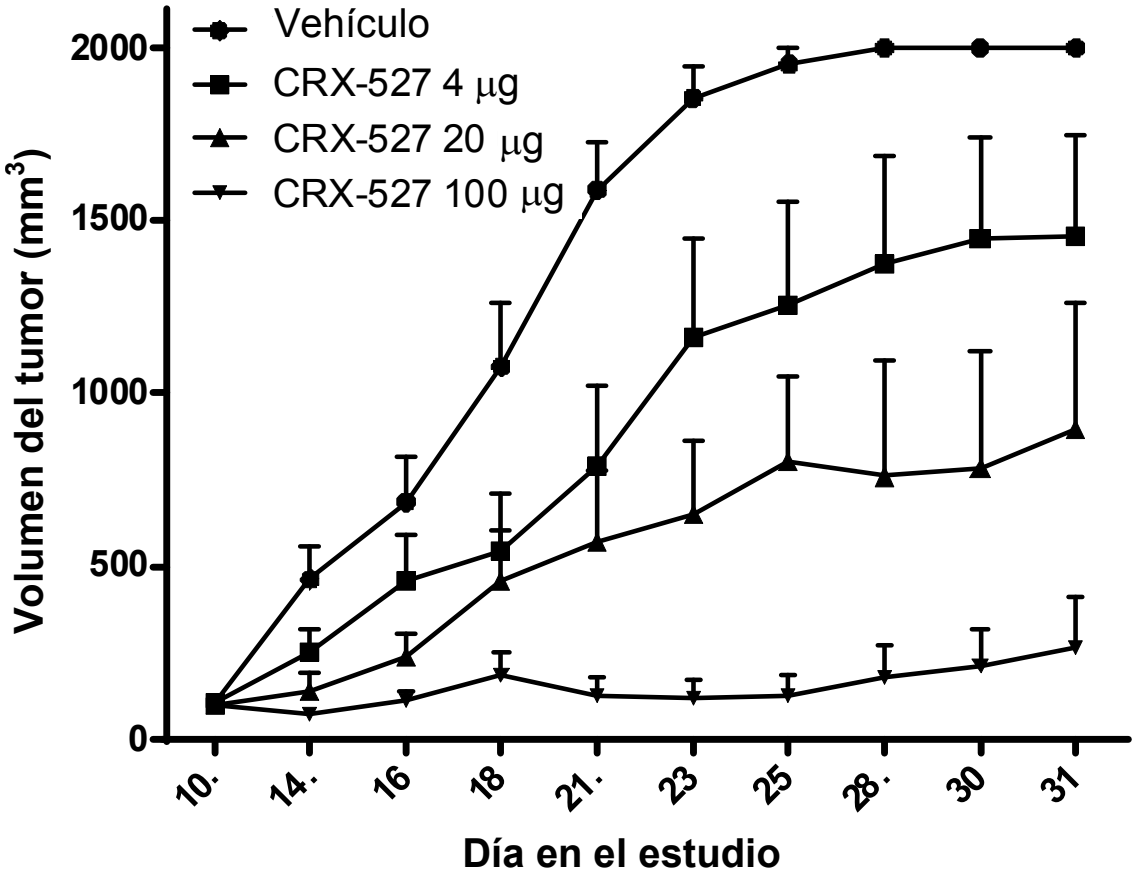
20. El uso de una combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el tratamiento del cáncer.

## RESUMEN

Se describen en este documento combinaciones de un modulador de OX40 y un modulador de TLR4, sus composiciones farmacéuticas, sus usos y métodos de tratamiento que comprenden administrar dicha combinación, incluyendo sus usos en el cáncer.

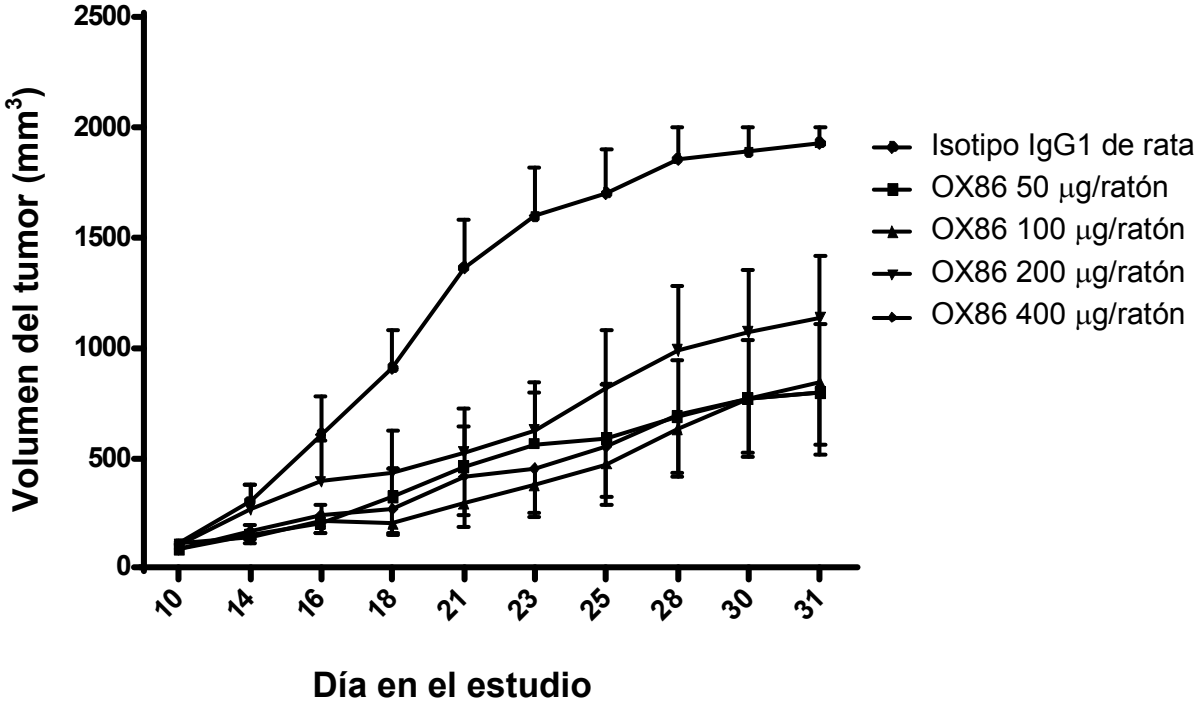
**Figura 1A**

**Efectos de CRX-527 (TLR 4) en el crecimiento tumoral en el modelo de ratón singeneico CT-26**



## Figura 1B

**Efectos de OX86 en el crecimiento tumoral en el modelo de ratón CT-26 singénico**



## Figura 2

**Combinación de OX40 y TLR4 en el modelo de ratón CT-26 singénico**

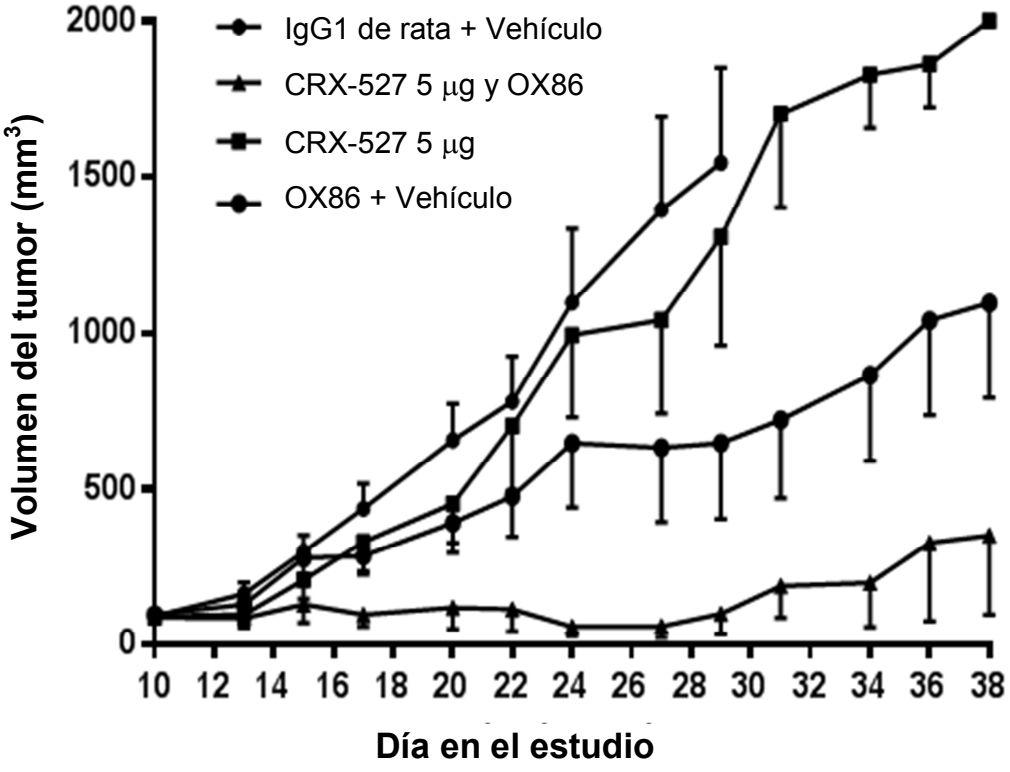
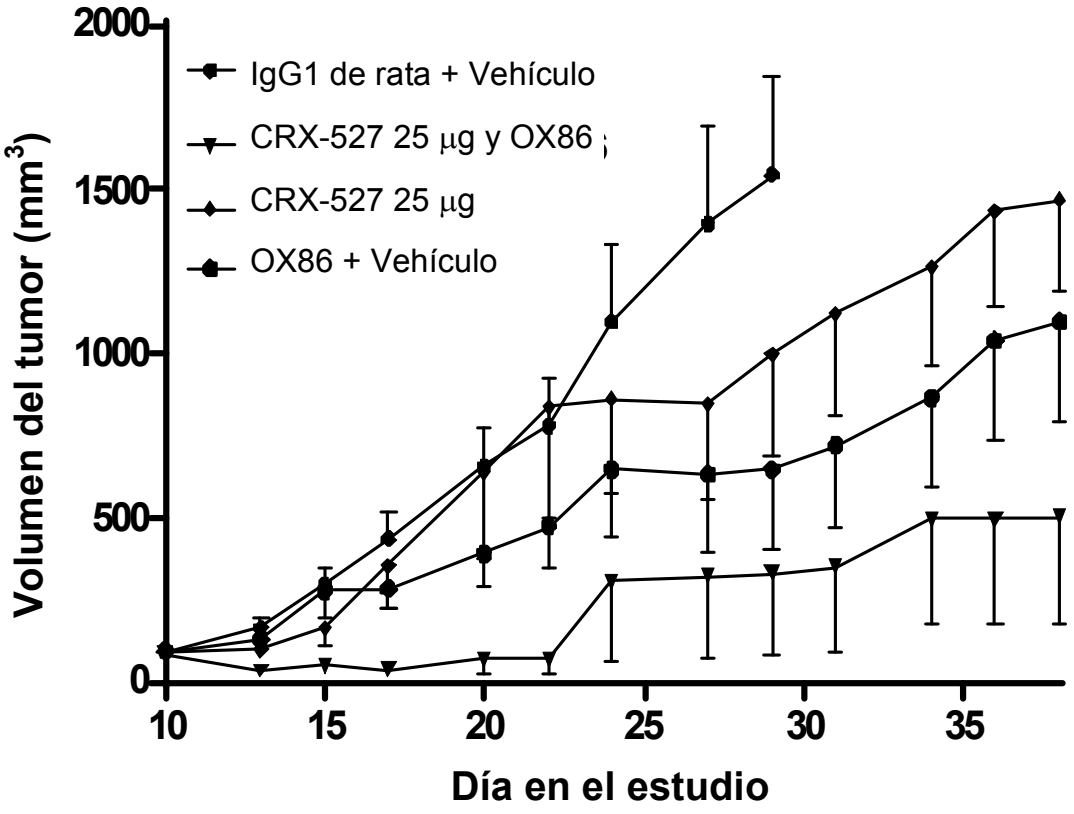


**Figura 3**

**Combinación de OX40 y TLR4 el modelo de tumor singénico**

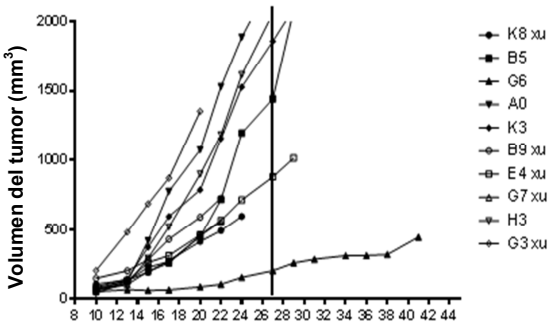


# Figura 4

## Datos en bruto del crecimiento tumoral (OX86, TLR4 y combo)

**Fig. 4A**

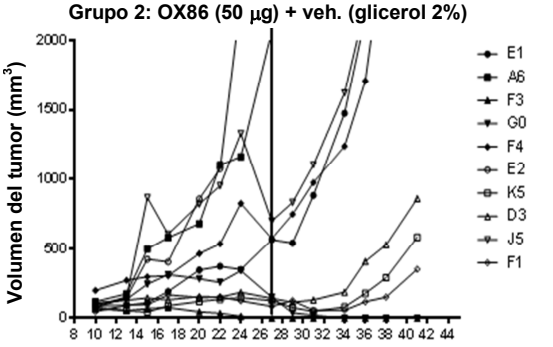
**Grupo 1: IgG1 de rata (50 μg) + veh. (glicerol 2%)**




x = retirada del estudio debido a criterios diferentes que el tamaño del tumor
u = ulceración
la línea el día 27 indica el último día de tratamiento

**Fig. 4B**

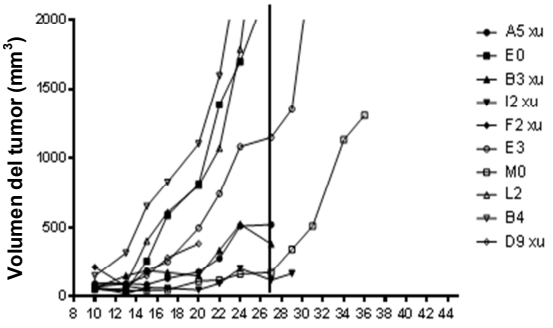
**Grupo 2: OX86 (50 μg) + veh. (glicerol 2%)**




x = retirada del estudio debido a criterios diferentes que el tamaño del tumor
u = ulceración
la línea el día 27 indica el último día de tratamiento

**Fig. 4C**

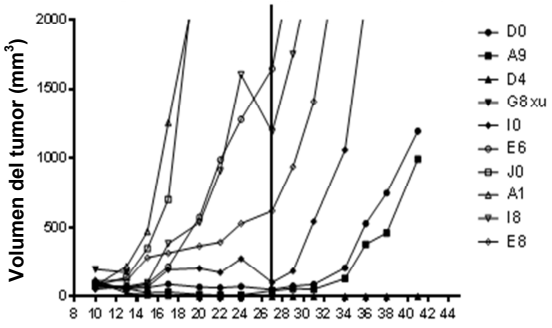
**Grupo 3: IgG1 de rata (50 μg) + CRX-527 (5 μg)**




x = retirada del estudio debido a criterios diferentes que el tamaño del tumor
u = ulceración
la línea el día 27 indica el último día de tratamiento

**Fig. 4D**

**Grupo 4: IgG1 de rata (50 μg) + CRX-527 (25 μg)**

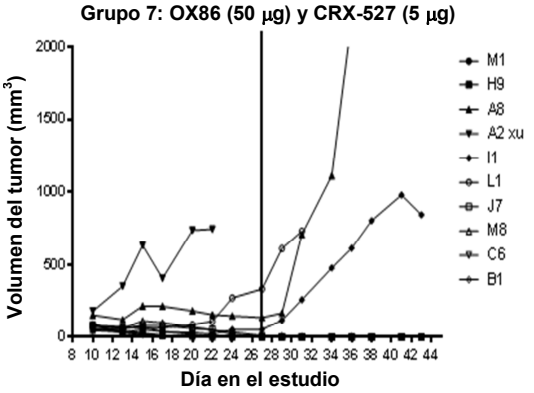



x = retirada del estudio debido a criterios diferentes que el tamaño del tumor
u = ulceración
la línea el día 27 indica el último día de tratamiento

## Figura 4

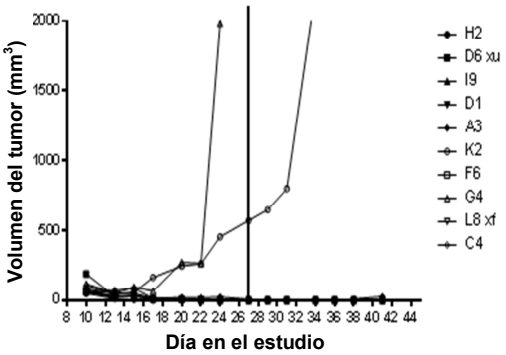
### Datos en bruto del crecimiento tumoral (OX86, TLR4 y combo)

Fig. 4E




x = retirada del estudio debido a criterios diferentes que el tamaño del tumor
u = ulceración
la línea el día 27 indica el último día de tratamiento

Fig. 4F




x = retirada del estudio debido a criterios diferentes que el tamaño del tumor
u = ulceración
f = encontrado muerto por el personal de plantilla
la línea el día 27 indica el último día de tratamiento

## Figura 5

**Efecto de CRX601 sobre el crecimiento tumoral de CT-26 en ratones BALB/c**

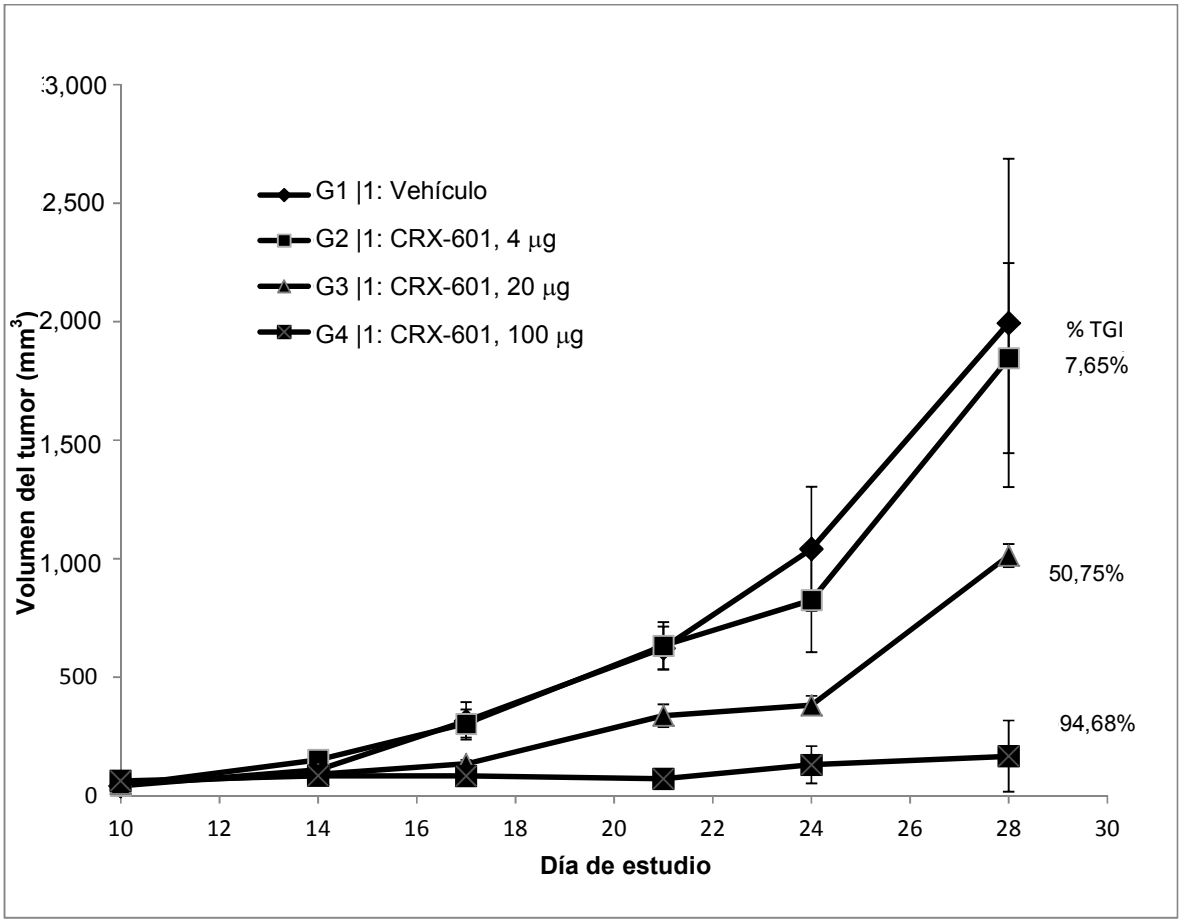


**Figura 6**

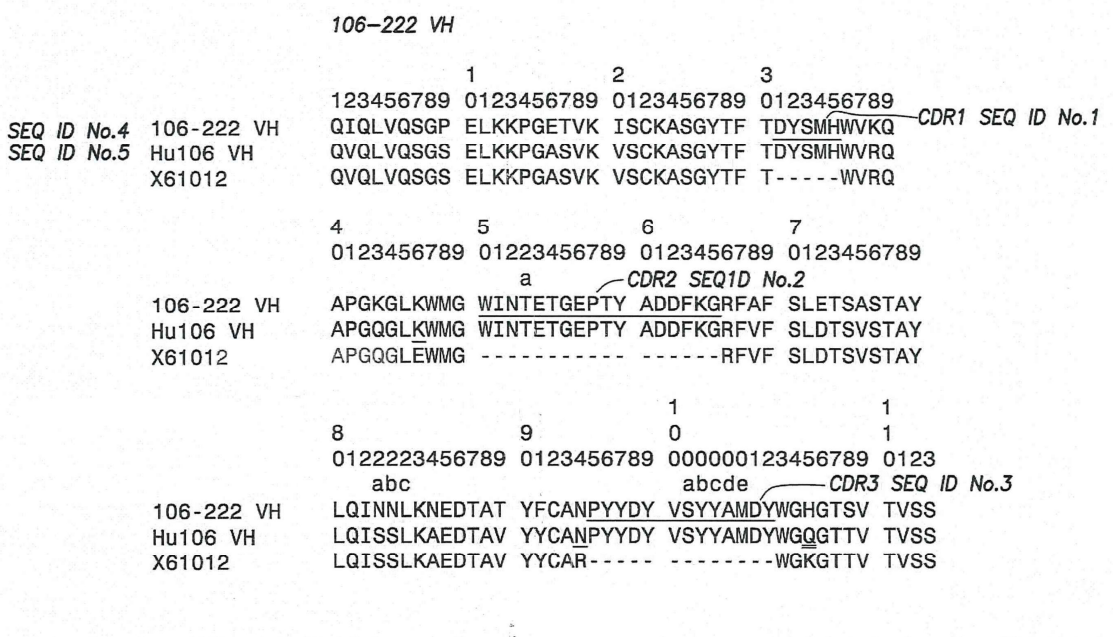

106-222 VH
1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
SEQ ID No.4 106-222 VH QIQLVQSGP ELKKPGETVK ISCKASGYTF TDYSMHWVKQ
CDR1 SEQ ID No.1
SEQ ID No.5 Hu106 VH QVQLVQSGS ELKKPGASVK VSCKASGYTF TDYSMHWVRQ
X61012 QVQLVQSGS ELKKPGASVK VSCKASGYTF T-----WVRQ
4 5 6 7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
a
CDR2 SEQ1D No.2
106-222 VH APGKGLKWMG WINTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY
Hu106 VH APGQGLKWMG WINTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY
X61012 APGQGLEWMG ---------- ------RFVF SLDTSVSTAY
1 1
8 9 0 1
0122223456789 0123456789 000000123456789 0123
abc abcde
CDR3 SEQ ID No.3
106-222 VH LQINNLKNEDTAT YFCANPYYDY VSYYAMDYWGHGTSV TVSS
Hu106 VH LQISSLKAEDTAV YYCANPYYDY VSYYAMDYWGQGTTV TVSS
X61012 LQISSLKAEDTAV YYCAR----- --------WGKGTTV TVSS

**Figura 7**

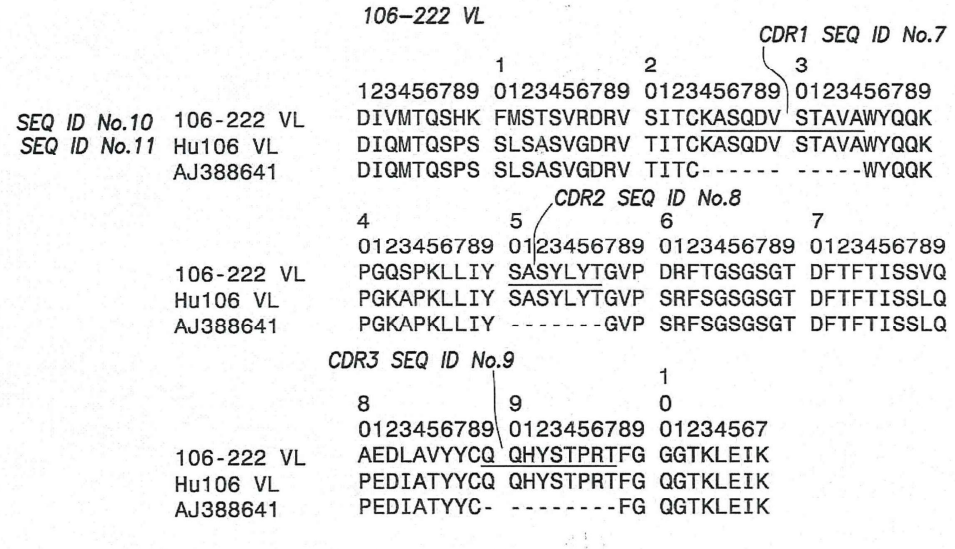

106-222 VL
CDR1 SEQ ID No.7
CDR2 SEQ ID No.8
CDR3 SEQ ID No.9
SEQ ID No.10
SEQ ID No.11
106-222 VL DIVMTQSHK FMSTSVRDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK
Hu106 VL DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQDV STAVAWYQQK
AJ388641 DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITC------ -----WYQQK
106-222 VL PGQSPKLLIY SASYLYTGVP DRFTGSGSGT DFTFTISSVQ
Hu106 VL PGKAPKLLIY SASYLYTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
AJ388641 PGKAPKLLIY -------GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
106-222 VL AEDLAVYYCQ QHYSTPRTFG GGTKLEIK
Hu106 VL PEDIATYYCQ QHYSTPRTFG QGTKLEIK
AJ388641 PEDIATYYC- --------FG QGTKLEIK

**Figura 8**

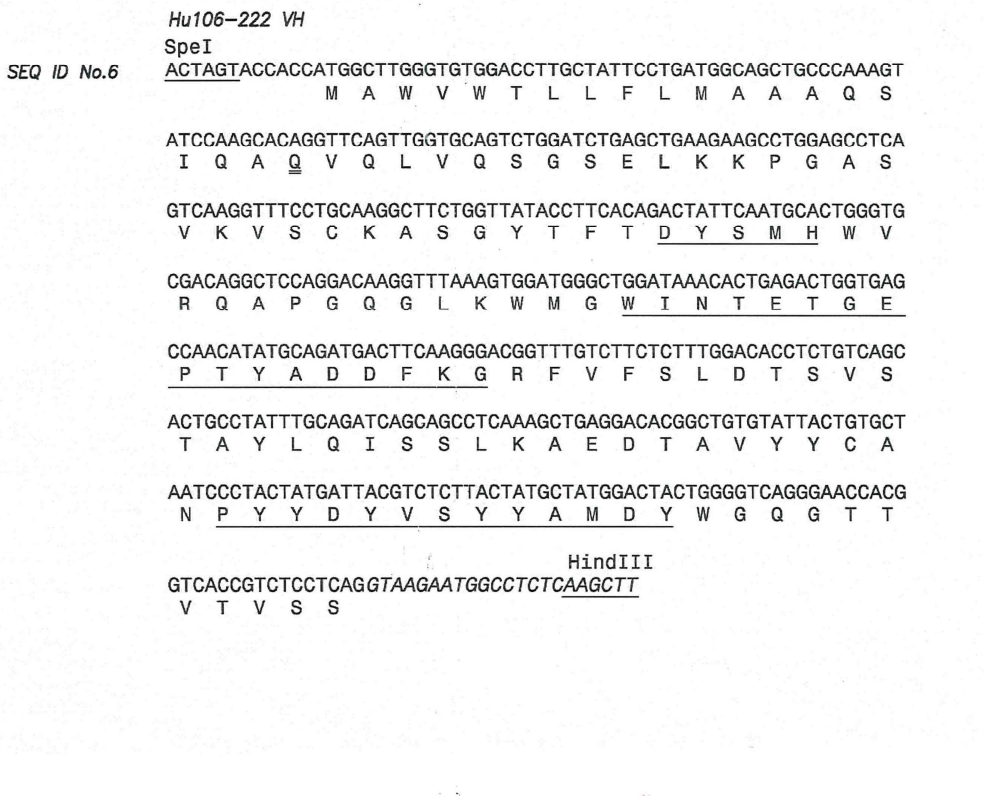

Hu106–222 VH
SpeI
SEQ ID No.6
ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGT
M A W V W T L L F L M A A A Q S
ATCCAAGCACAGGTTCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA
I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S
GTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V
CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG
R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E
CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCTTTGGACACCTCTGTCAGC
P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S
ACTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT
T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A
AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCACG
N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T
HindIII
GTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT
V T V S S

**Figura 9**

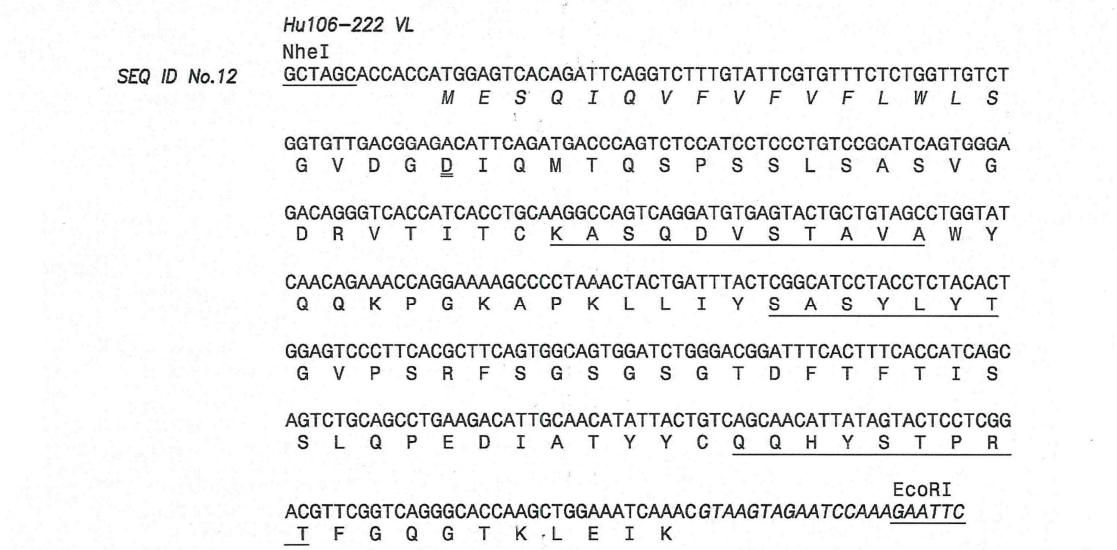

Hu106–222 VL
NheI
SEQ ID No.12
GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCT
M E S Q I Q V F V F V F L W L S
GGTGTTGACGGAGACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTGGGA
G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTAT
D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y
CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCTCTACACT
Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T
GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGC
G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S
AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCTCGG
S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y S T P R
EcoRI
ACGTTCGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC
T F G Q G T K L E I K

**Figura 10**

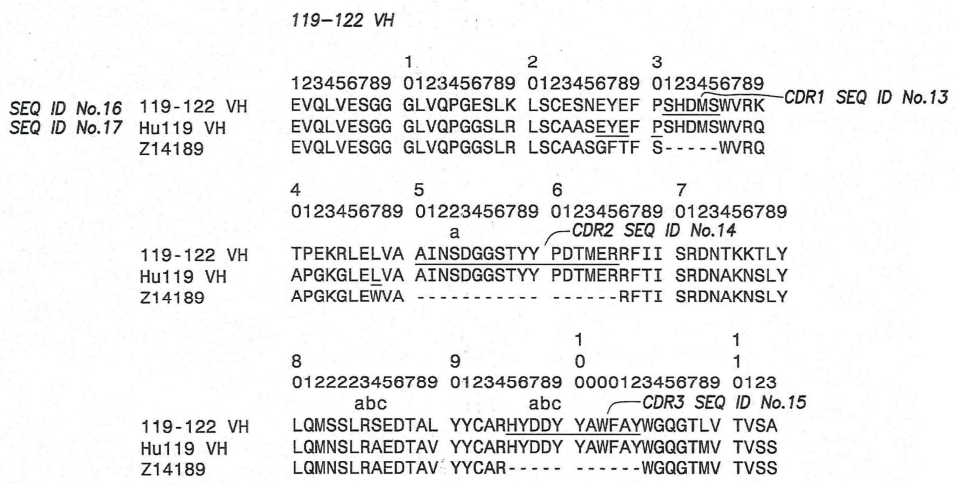

119–122 VH
1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
SEQ ID No.16 119-122 VH EVQLVESGG GLVQPGESLK LSCESNEYEF PSHDMSWVRK
CDR1 SEQ ID No.13
SEQ ID No.17 Hu119 VH EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASEYEF PSHDMSWVRQ
Z14189 EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S-----WVRQ
4 5 6 7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
a
CDR2 SEQ ID No.14
119-122 VH TPEKRLELVA AINSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY
Hu119 VH APGKGLELVA AINSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY
Z14189 APGKGLEWVA ----------- ------RFTI SRDNAKNSLY
1 1
8 9 0 1
0122223456789 0123456789 0000123456789 0123
abc abc
CDR3 SEQ ID No.15
119-122 VH LQMSSLRSEDTAL YYCARHYDDY YAWFAYWGQGTLV TVSA
Hu119 VH LQMNSLRAEDTAV YYCARHYDDY YAWFAYWGQGTMV TVSS
Z14189 LQMNSLRAEDTAV YYCAR----- ------WGQGTMV TVSS

**Figura 11**

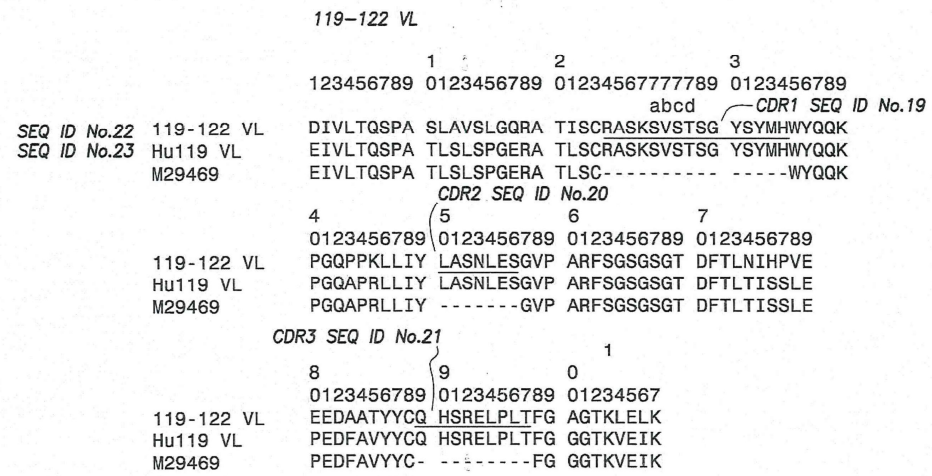

119-122 VL
1 2 3
123456789 0123456789 01234567777789 0123456789
abcd
CDR1 SEQ ID No.19
SEQ ID No.22 119-122 VL DIVLTQSPA SLAVSLGQRA TISCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
SEQ ID No.23 Hu119 VL EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
M29469 EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSC---------- -----WYQQK
CDR2 SEQ ID No.20
4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
119-122 VL PGQPPKLLIY LASNLESGVP ARFSGSGSGT DFTLNIHPVE
Hu119 VL PGQAPRLLIY LASNLESGVP ARFSGSGSGT DFTLTISSLE
M29469 PGQAPRLLIY -------GVP ARFSGSGSGT DFTLTISSLE
CDR3 SEQ ID No.21
1
8 9 0
0123456789 0123456789 01234567
119-122 VL EEDAATYYCQ HSRELPLTFG AGTKLELK
Hu119 VL PEDFAVYYCQ HSRELPLTFG GGTKVEIK
M29469 PEDFAVYYC- --------FG GGTKVEIK

**Figura 12**


Hu119-122 VH
SpeI
SEQ ID No.18
ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGCTCAGCTTGGTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAAAAGT
M D F G L S L V F L V L I L K S
GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTC
L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V
CGCCAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGC
R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S
ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N
TCACTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGACACTATGATGATTACTACGCCTGGTTTGCTTACTG
CAAGGGACTATGGTCACT
R H Y D D Y Y A W F A Y W
Q G T M V T
HindIII
GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT
V S S

**Figura 13**

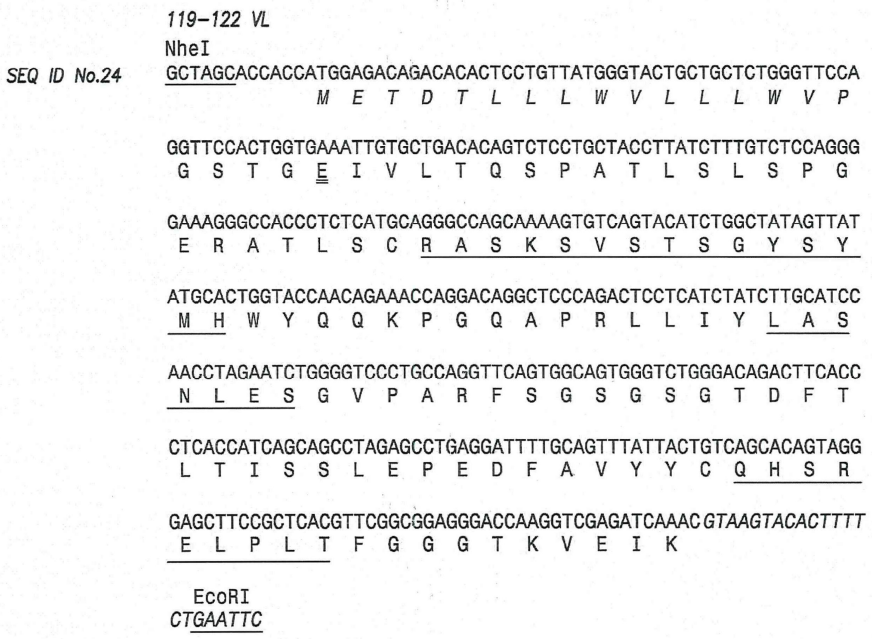

119–122 VL
NheI
SEQ ID No.24
GCTAGCACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCA
M E T D T L L L W V L L L W V P
GGTTCCACTGGTGAAATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTTTGTCTCCAGGG
G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G
GAAAGGGCCACCCTCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTAT
E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y
ATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATCTTGCATCC
M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S
AACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTAGG
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R
GAGCTTCCGCTCACGTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCGAGATCAAAC GTAAGTACACTTTT
E L P L T F G G G T K V E I K
EcoRI
CTGAATTC

**Figura 14**

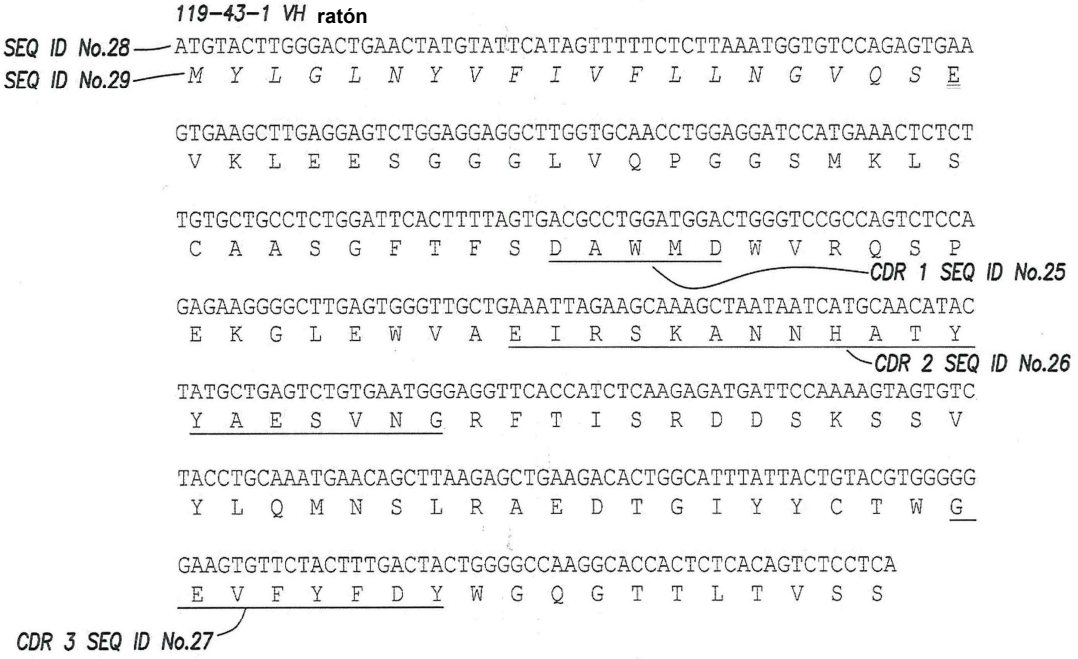

119-43-1 VH ratón
SEQ ID No.28
SEQ ID No.29
ATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTCATAGTTTTTCTCTTAAATGGTGTCCAGAGTGAA
M Y L G L N Y V F I V F L L N G V Q S E
GTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCT
V K L E E S G G G L V Q P G G S M K L S
TGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCA
C A A S G F T F S D A W M D W V R Q S P
CDR 1 SEQ ID No.25
GAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATAC
E K G L E W V A E I R S K A N N H A T Y
CDR 2 SEQ ID No.26
TATGCTGAGTCTGTGAATGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTC
Y A E S V N G R F T I S R D D S K S S V
TACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTACTGTACGTGGGGG
Y L Q M N S L R A E D T G I Y Y C T W G
GAAGTGTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
E V F Y F D Y W G Q G T T L T V S S
CDR 3 SEQ ID No.27

**Figura 15**

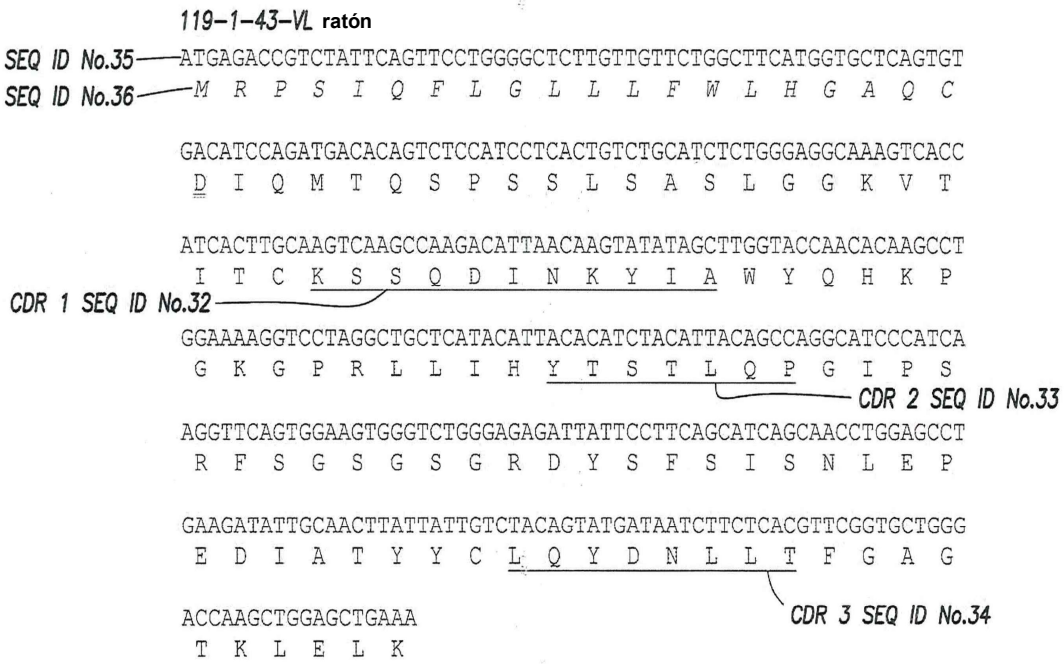

119-1-43-VL ratón
SEQ ID No.35
ATGAGACCGTCTATTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTTGTTCTGGCTTCATGGTGCTCAGTGT
SEQ ID No.36
M R P S I Q F L G L L L F W L H G A Q C
GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTCTGGGAGGCAAAGTCACC
D I Q M T Q S P S S L S A S L G G K V T
ATCACTTGCAAGTCAAGCCAAGACATTAACAAGTATATAGCTTGGTACCAACACAAGCCT
I T C K S S Q D I N K Y I A W Y Q H K P
CDR 1 SEQ ID No.32
GGAAAAGGTCCTAGGCTGCTCATACATTACACATCTACATTACAGCCAGGCATCCCATCA
G K G P R L L I H Y T S T L Q P G I P S
CDR 2 SEQ ID No.33
AGGTTCAGTGGAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTTCAGCATCAGCAACCTGGAGCCT
R F S G S G S G R D Y S F S I S N L E P
GAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTATGATAATCTTCTCACGTTCGGTGCTGGG
E D I A T Y Y C L Q Y D N L L T F G A G
CDR 3 SEQ ID No.34
ACCAAGCTGGAGCTGAAA
T K L E L K

**Figura 16**

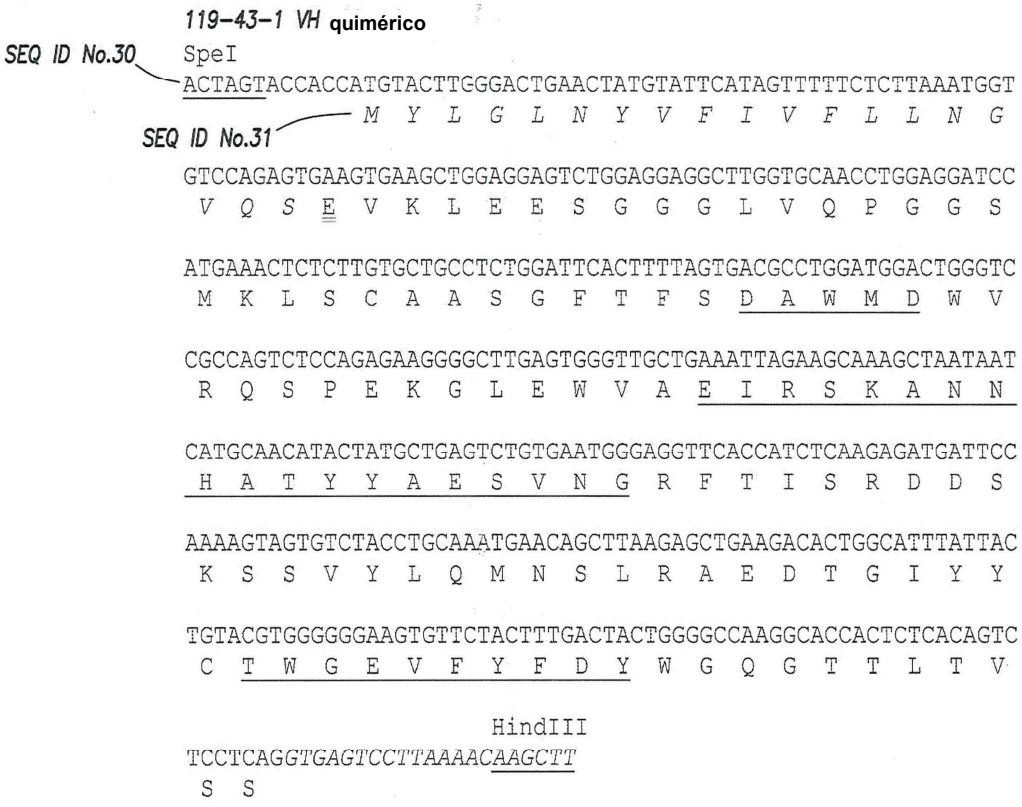

119-43-1 VH quimérico
SEQ ID No.30
SpeI
ACTAGTACCACCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTCATAGTTTTTCTCTTAAATGGT
M Y L G L N Y V F I V F L L N G
SEQ ID No.31
GTCCAGAGTGAAGTGAAGCTGGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCC
V Q S E V K L E E S G G G L V Q P G G S
ATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTC
M K L S C A A S G F T F S D A W M D W V
CGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAAT
R Q S P E K G L E W V A E I R S K A N N
CATGCAACATACTATGCTGAGTCTGTGAATGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCC
H A T Y Y A E S V N G R F T I S R D D S
AAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTAC
K S S V Y L Q M N S L R A E D T G I Y Y
TGTACGTGGGGGGAAGTGTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC
C T W G E V F Y F D Y W G Q G T T L T V
HindIII
TCCTCAGGTGAGTCCTTAAAACAAGCTT
S S

**Figura 17**

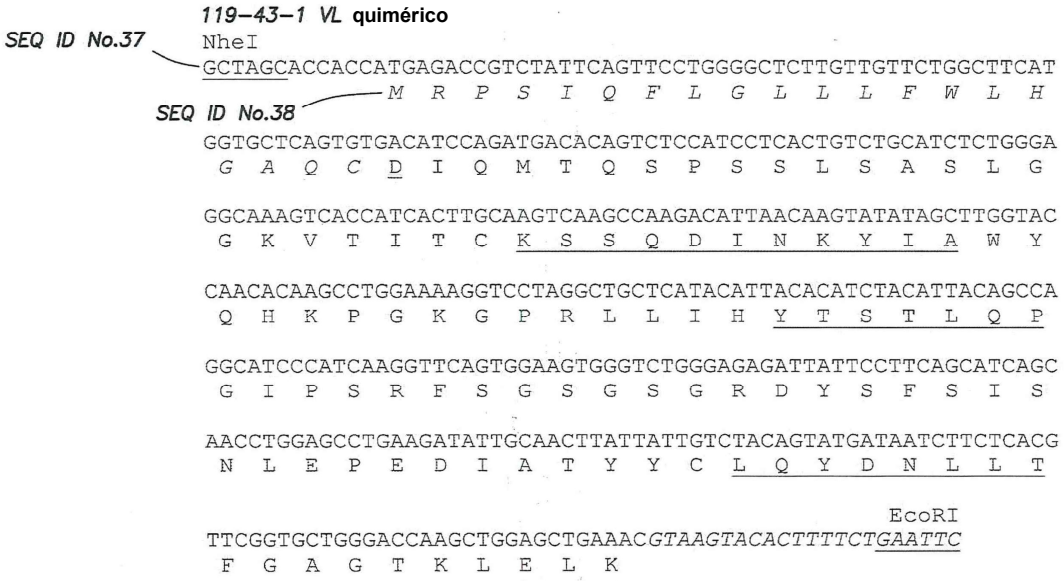

119-43-1 VL quimérico
SEQ ID No.37
NheI
GCTAGCACCACCATGAGACCGTCTATTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTTGTTCTGGCTTCAT
M R P S I Q F L G L L L F W L H
SEQ ID No.38
GGTGCTCAGTGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTCTGGGA
G A Q C D I Q M T Q S P S S L S A S L G
GGCAAAGTCACCATCACTTGCAAGTCAAGCCAAGACATTAACAAGTATATAGCTTGGTAC
G K V T I T C K S S Q D I N K Y I A W Y
CAACACAAGCCTGGAAAAGGTCCTAGGCTGCTCATACATTACACATCTACATTACAGCCA
Q H K P G K G P R L L I H Y T S T L Q P
GGCATCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTTCAGCATCAGC
G I P S R F S G S G S G R D Y S F S I S
AACCTGGAGCCTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTATGATAATCTTCTCACG
N L E P E D I A T Y Y C L Q Y D N L L T
EcoRI
TTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTAAGTACACTTTTCTGAATTC
F G A G T K L E L K

**Figura 18**

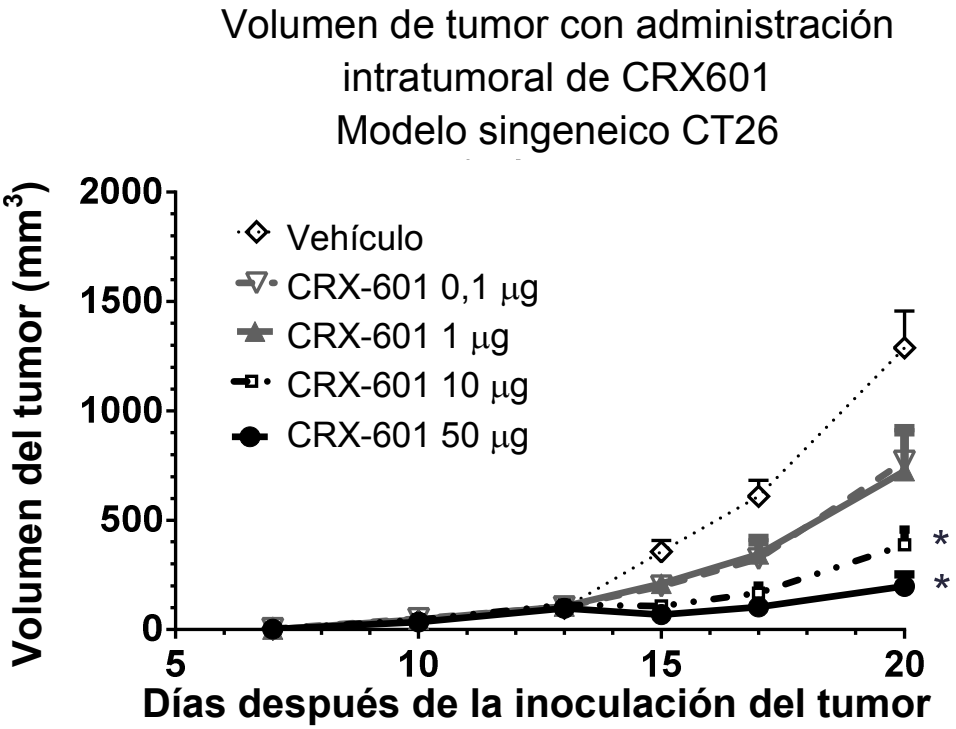

Volumen de tumor con administración intratumoral de CRX601
Modelo singeneico CT26
Volumen del tumor (mm3)
2000
1500
1000
500
0
Vehículo
CRX-601 0,1 μg
CRX-601 1 μg
CRX-601 10 μg
CRX-601 50 μg
*
*
5
10
15
20
Días después de la inoculación del tumor

**Figura 19**

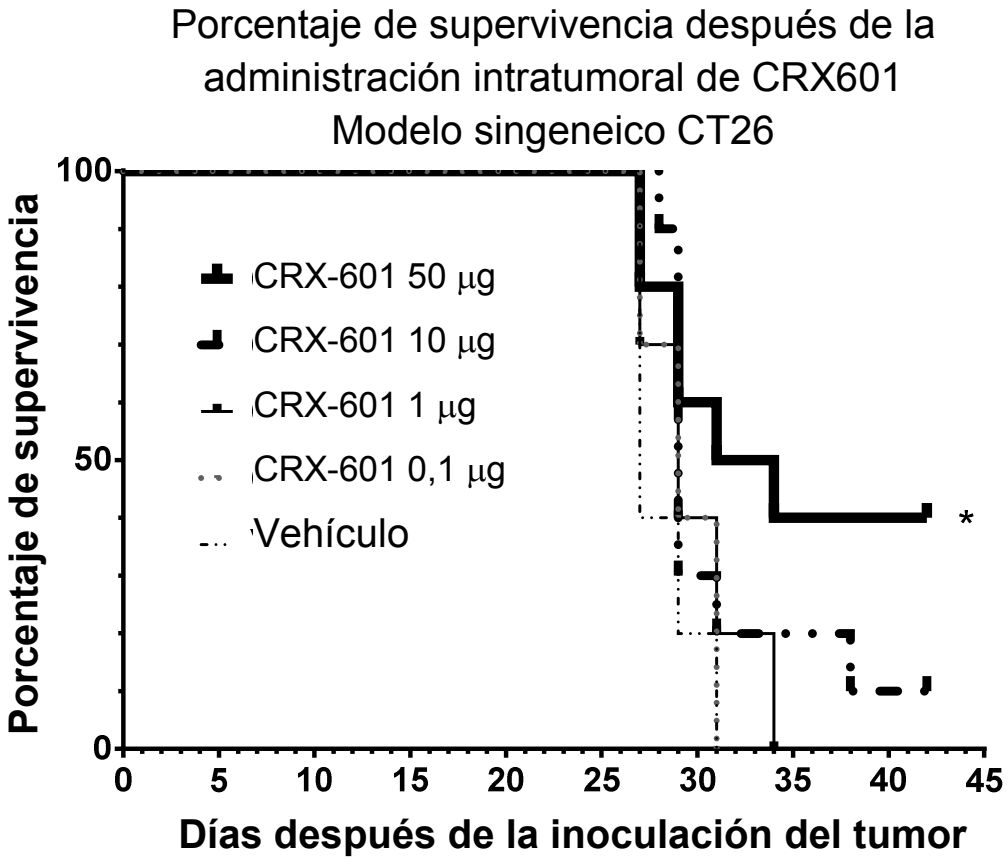

Porcentaje de supervivencia después de la administración intratumoral de CRX601
Modelo singeneico CT26
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
CRX-601 50 μg
CRX-601 10 μg
CRX-601 1 μg
CRX-601 0,1 μg
Vehículo
*
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Días después de la inoculación del tumor

**Figura 20**

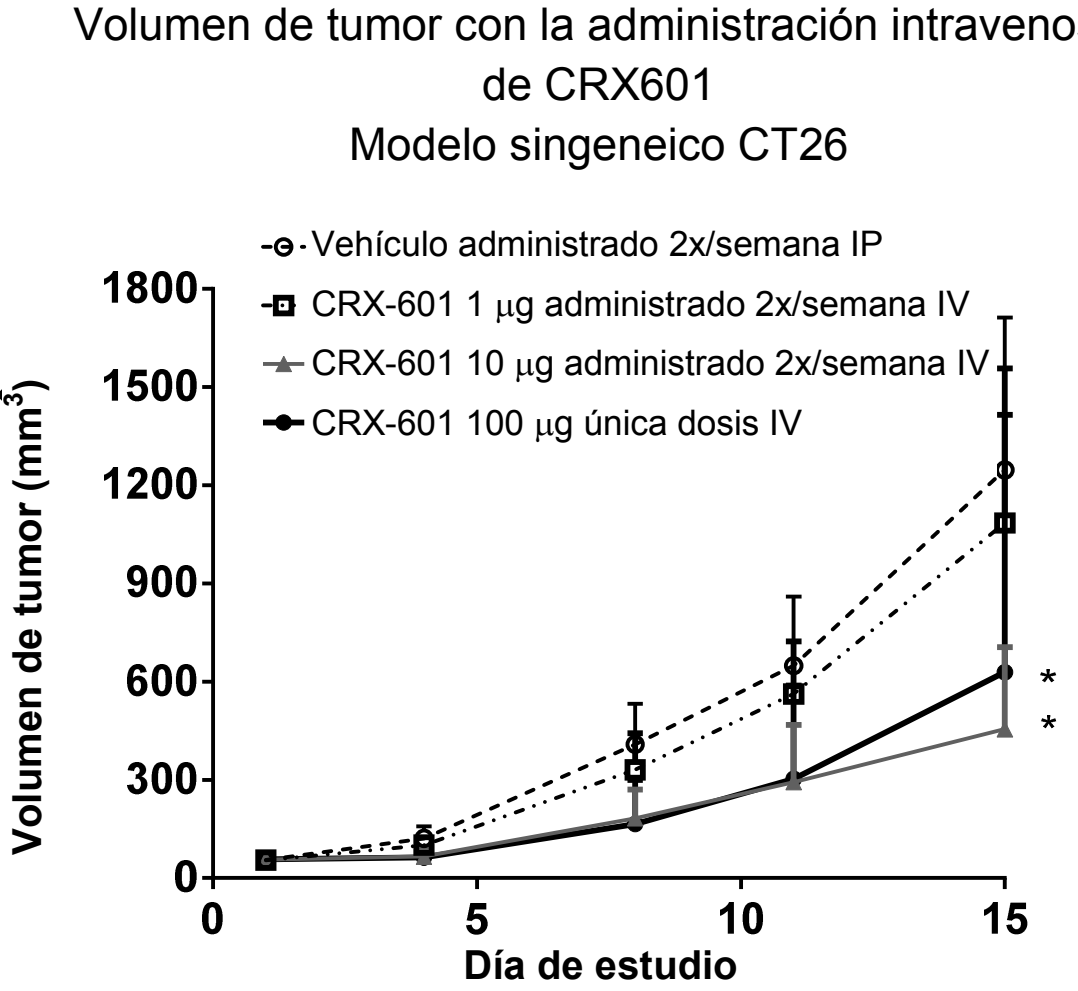

Volumen de tumor con la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26
Vehículo administrado 2x/semana IP
CRX-601 1 μg administrado 2x/semana IV
CRX-601 10 μg administrado 2x/semana IV
CRX-601 100 μg única dosis IV
Volumen de tumor (mm3)
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
Día de estudio
*
*

**Figura 21**

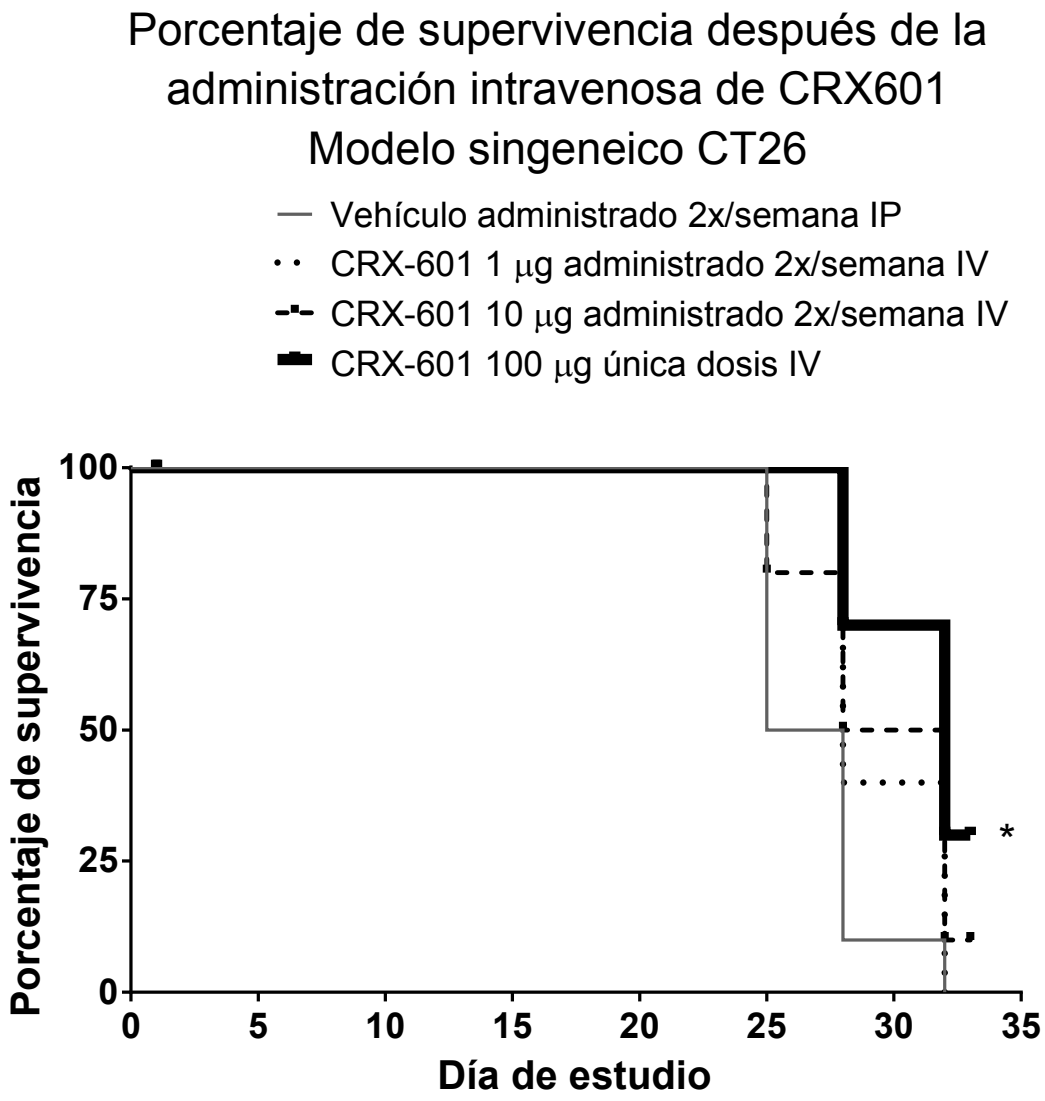

Porcentaje de supervivencia después de la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26
Vehículo administrado 2x/semana IP
CRX-601 1 μg administrado 2x/semana IV
CRX-601 10 μg administrado 2x/semana IV
CRX-601 100 μg única dosis IV
Porcentaje de supervivencia
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Día de estudio
*

**Figura 22**

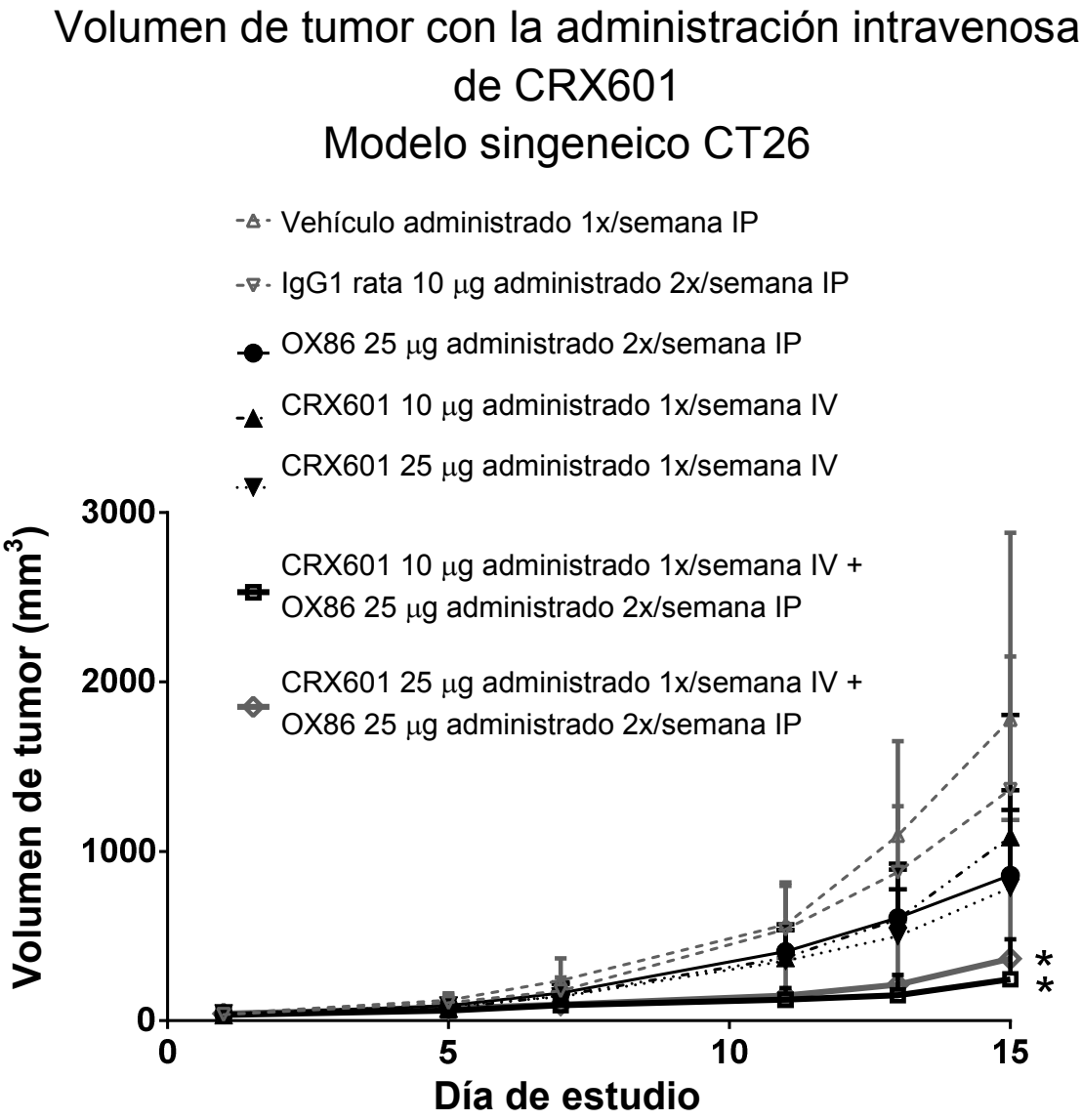
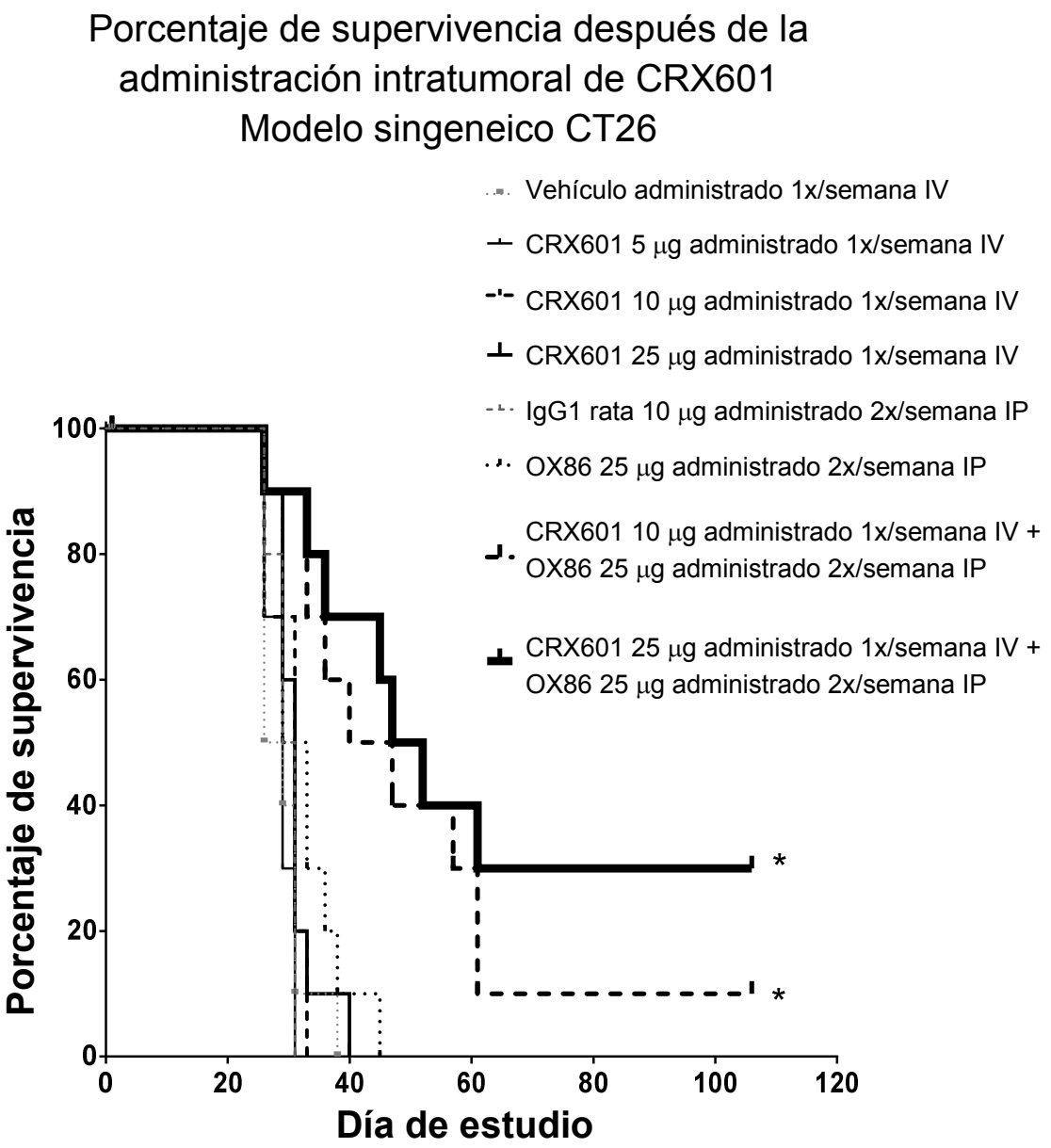

Volumen de tumor con la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26
Vehículo administrado 1x/semana IP
IgG1 rata 10 μg administrado 2x/semana IP
OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
CRX601 10 μg administrado 1x/semana IV
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV
CRX601 10 μg administrado 1x/semana IV + OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV + OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
Volumen de tumor (mm3)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
Día de estudio
*
*

**Figura 23**


Porcentaje de supervivencia después de la administración intratumoral de CRX601
Modelo singeneico CT26
Vehículo administrado 1x/semana IV
CRX601 5 μg administrado 1x/semana IV
CRX601 10 μg administrado 1x/semana IV
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV
IgG1 rata 10 μg administrado 2x/semana IP
OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
CRX601 10 μg administrado 1x/semana IV + OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV + OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
Porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
Día de estudio
*
*

La **Figura 24**

Volumen de tumor con la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26

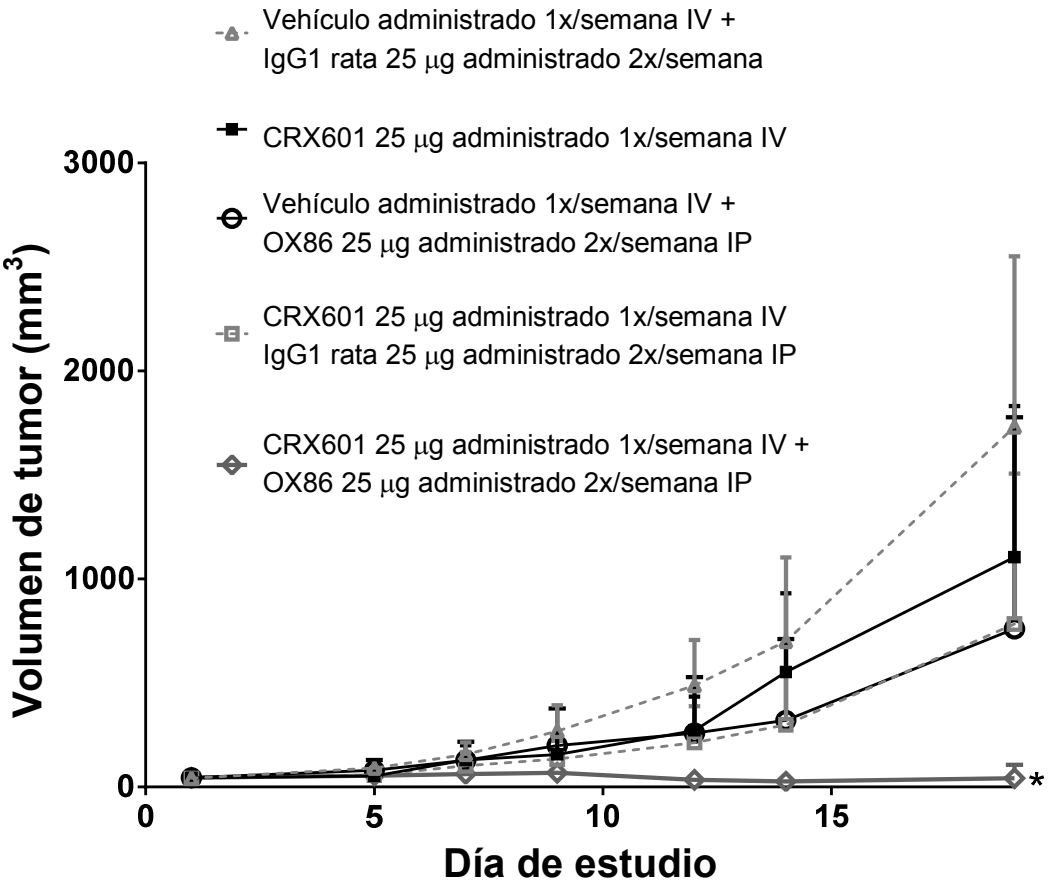
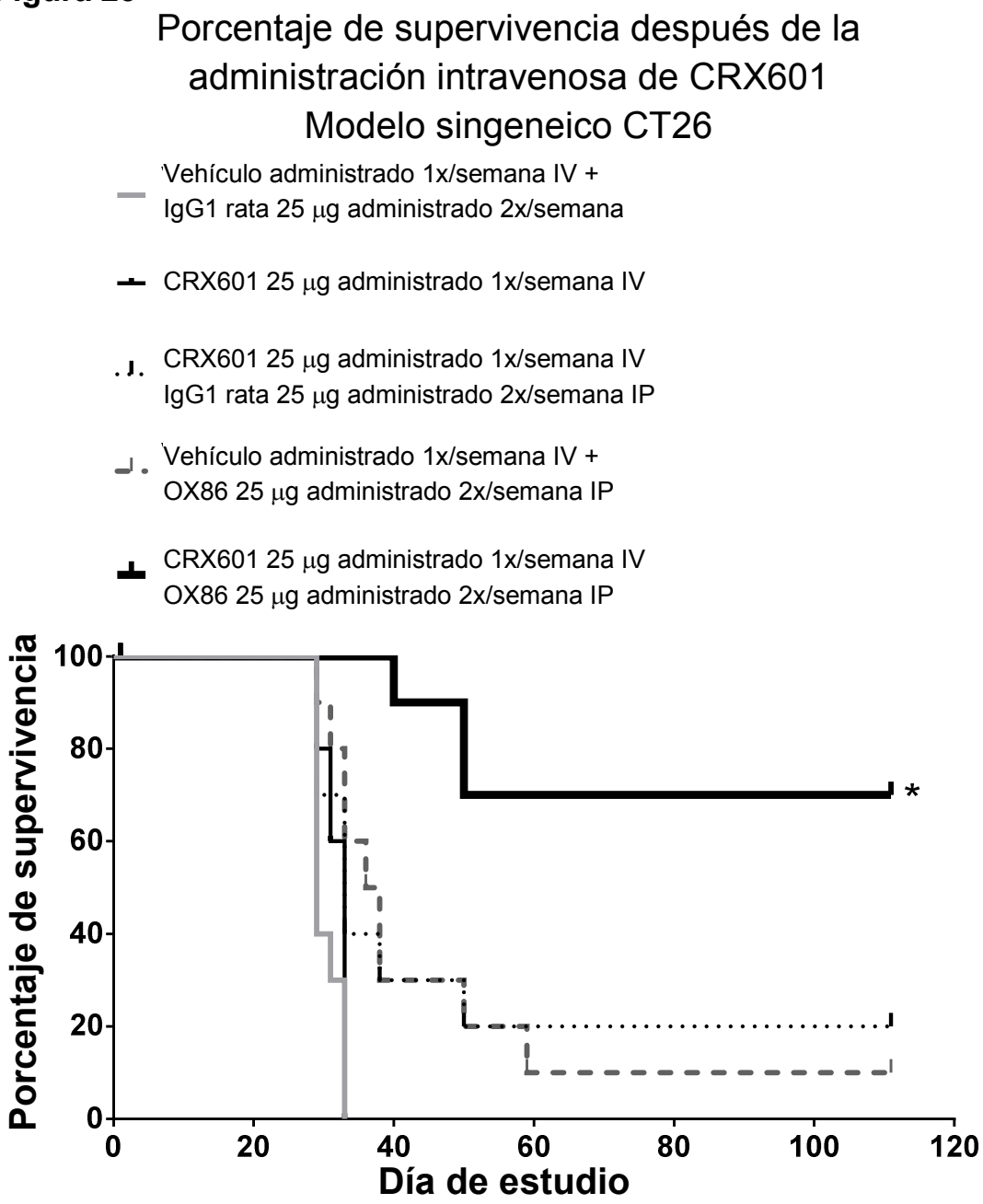
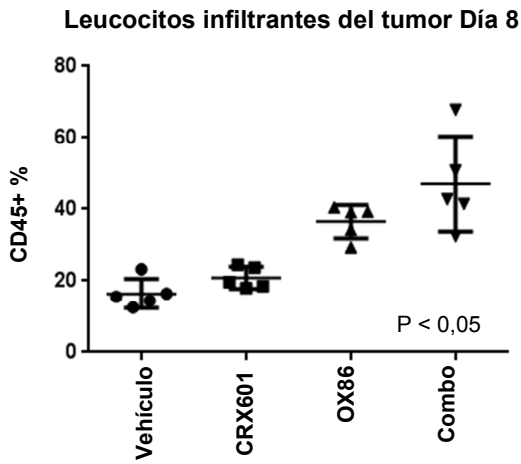


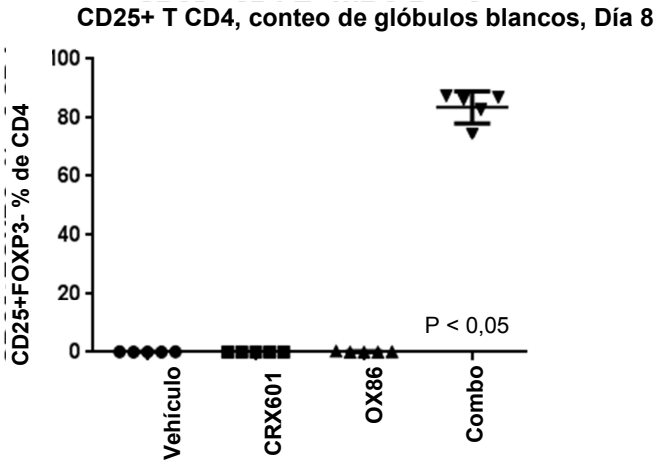
**Figura 25**


Porcentaje de supervivencia después de la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26
Vehículo administrado 1x/semana IV + IgG1 rata 25 μg administrado 2x/semana
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV IgG1 rata 25 μg administrado 2x/semana IP
Vehículo administrado 1x/semana IV + OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
CRX601 25 μg administrado 1x/semana IV OX86 25 μg administrado 2x/semana IP
Porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
Día de estudio
*

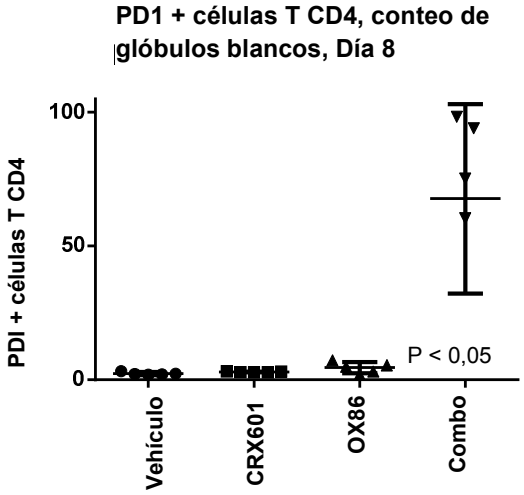
## Figura 26A

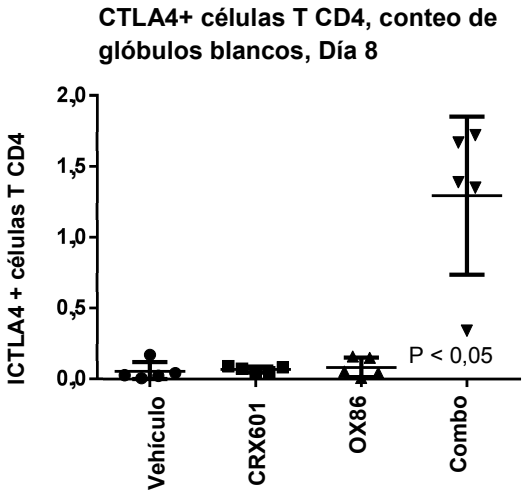



## Figura 26B




## Figura 26 C



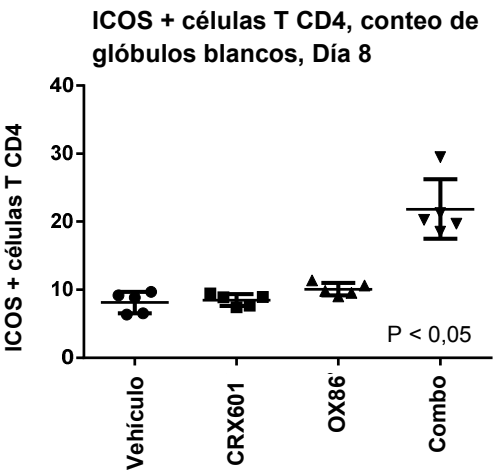



**Figura 27A**

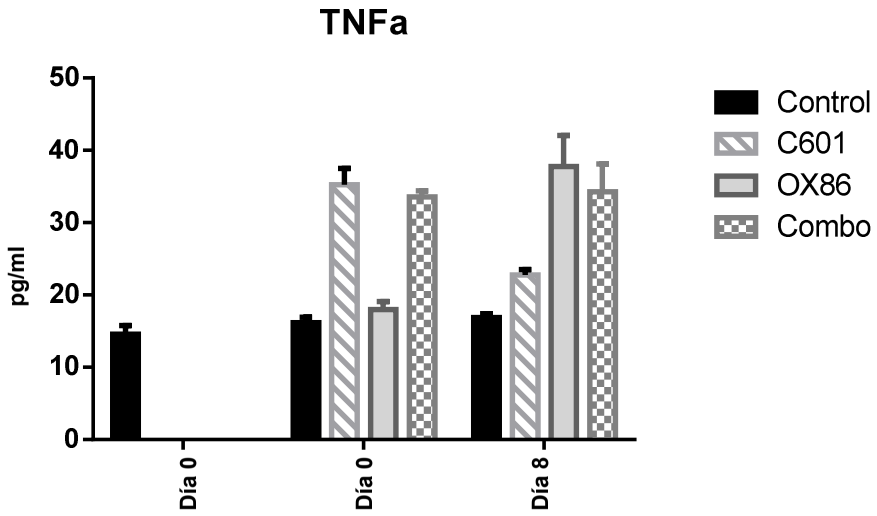



**Figura 27B**

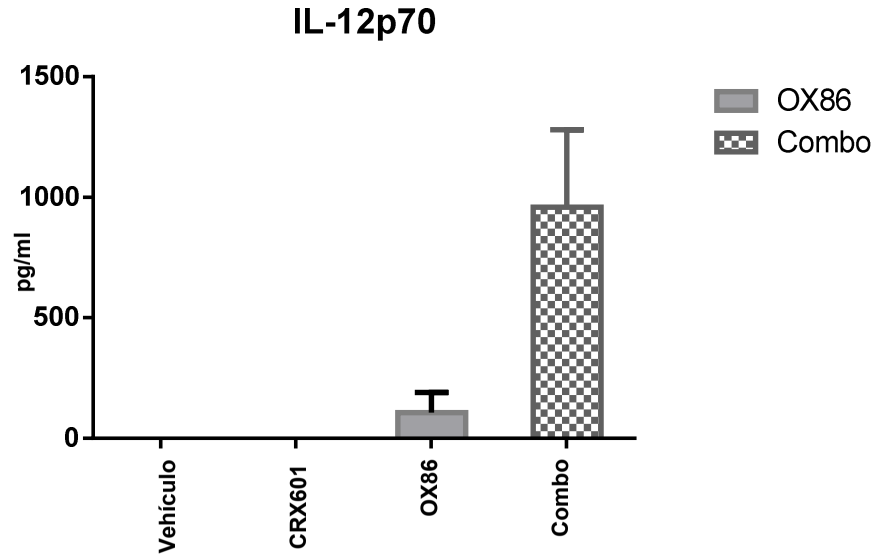
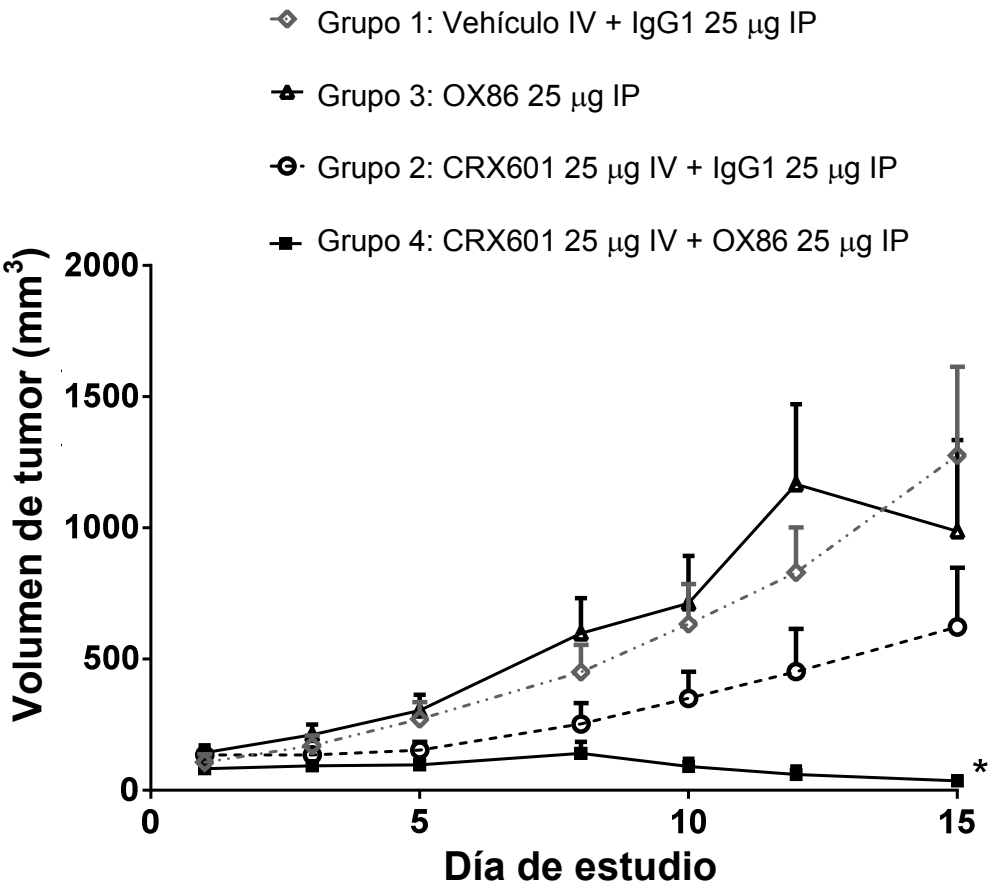


**Figura 28**

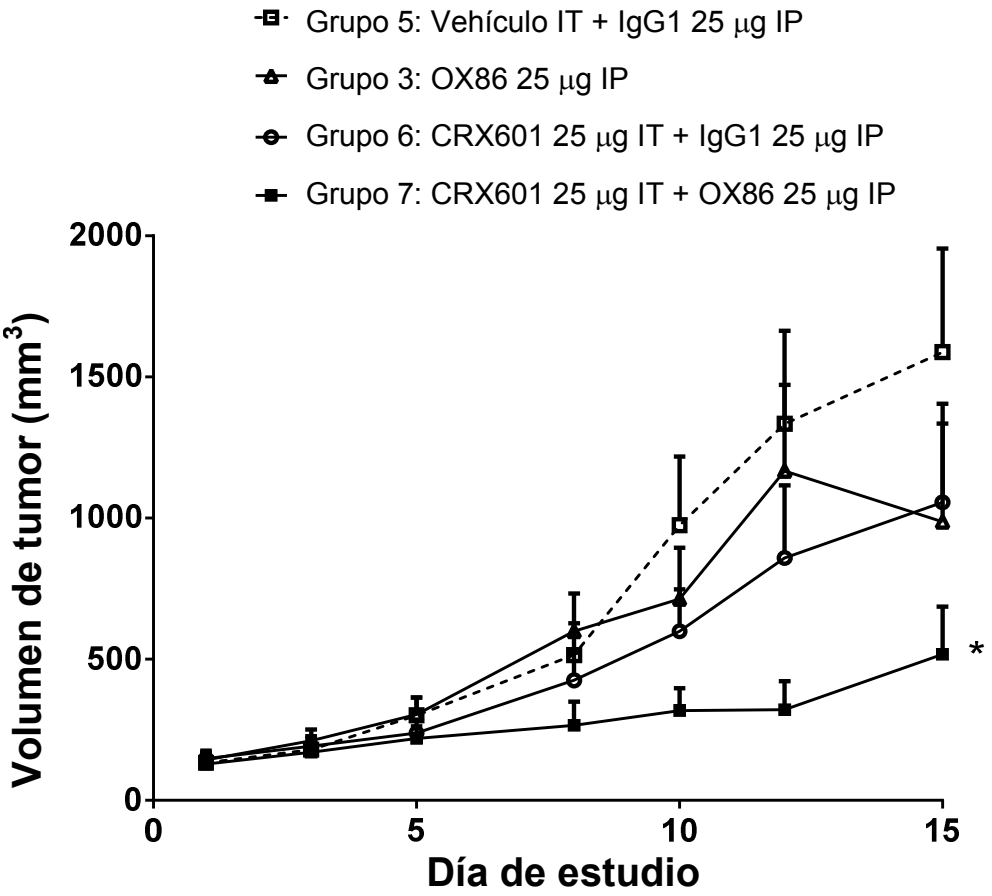
Volumen de tumor con la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26




Valor *p del Grupo 4 < 0,05 versus Grupo 1 y Grupo 3.
Grupos 2 y 3 de monoterapia no significativos versus vehículo control del Grupo 1

**Figura 29**

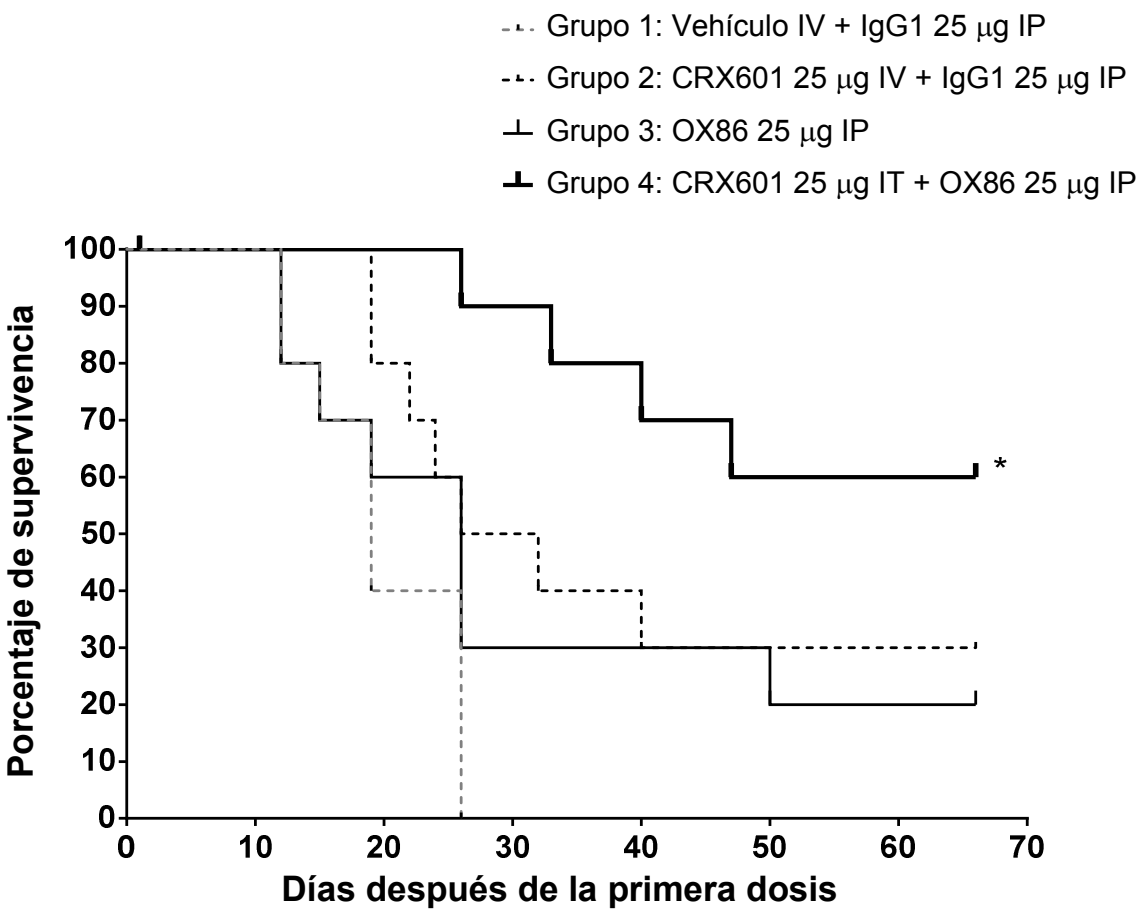
Volumen de tumor con la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26




Valor *p del Grupo 7 < 0,05 versus Grupo 5 y Grupo 3.
Grupos 3 y 6 de monoterapia no significativos versus vehículo control del Grupo 5

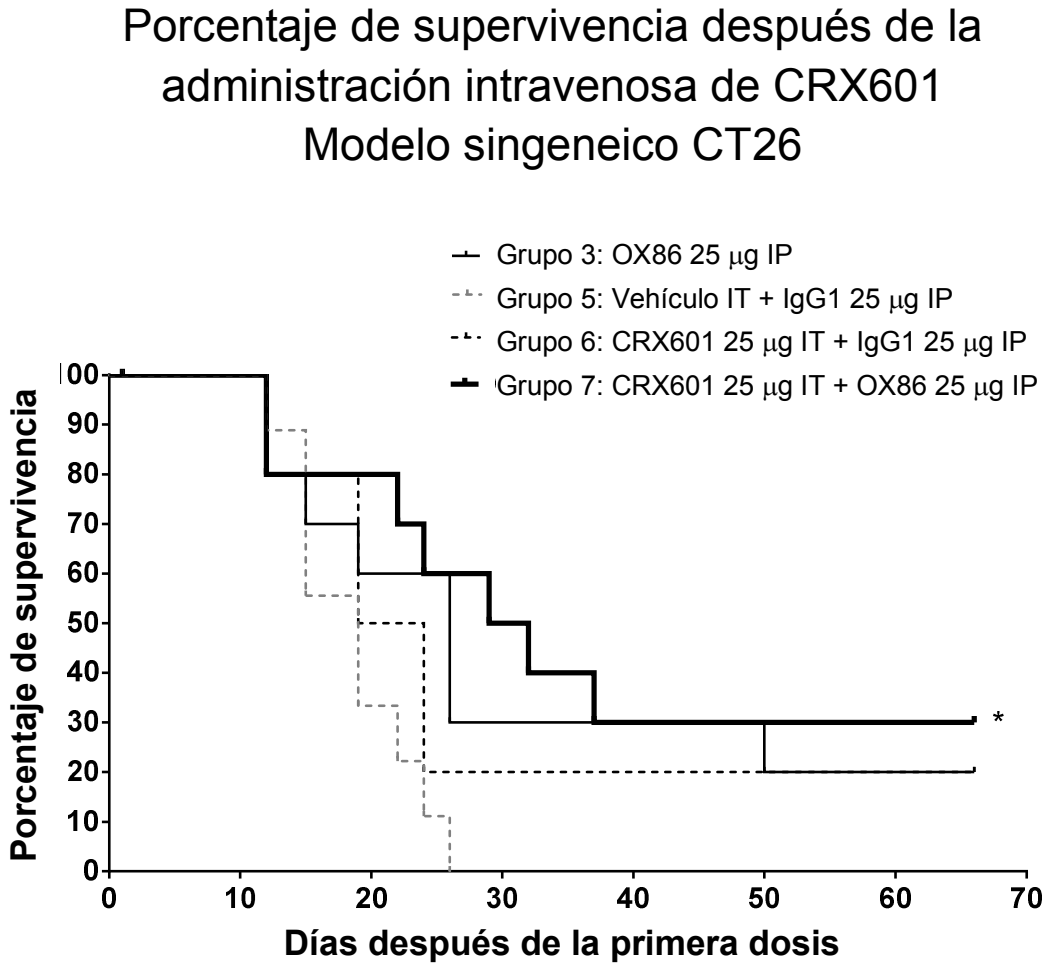
**Figura 30**

Porcentaje de supervivencia después de la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26




Valor *p del Grupo 4 < 0,05 versus Grupo 1 y Grupo 3.
Grupos 2 y 3 de monoterapia no significativos versus vehículo control del Grupo 1

**Figura 31**




Valor *p del Grupo 7 < 0,05 versus Grupo 5.
Grupos 3 y 6 de monoterapia no significativos versus vehículo control del Grupo 5

**Figura 32**

Administración de CRX601 intravenosa o intratumoral:
Re-exposición del tumor
Modelo singeneico CT26

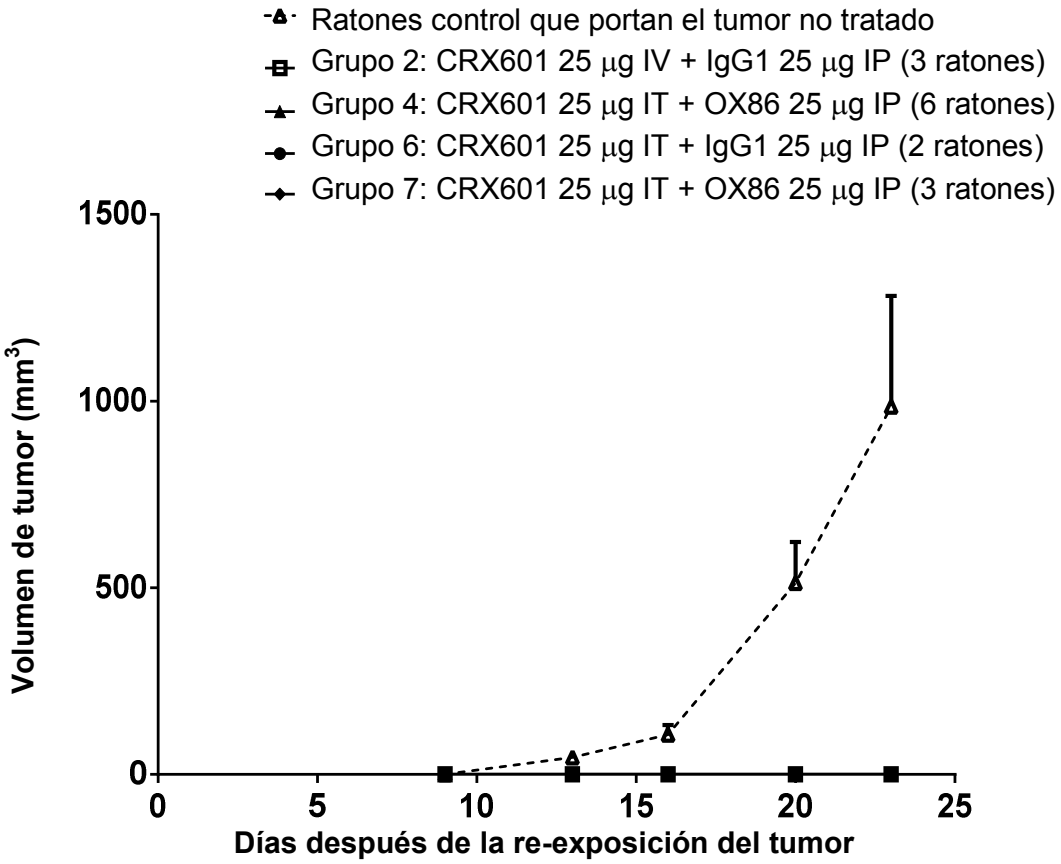
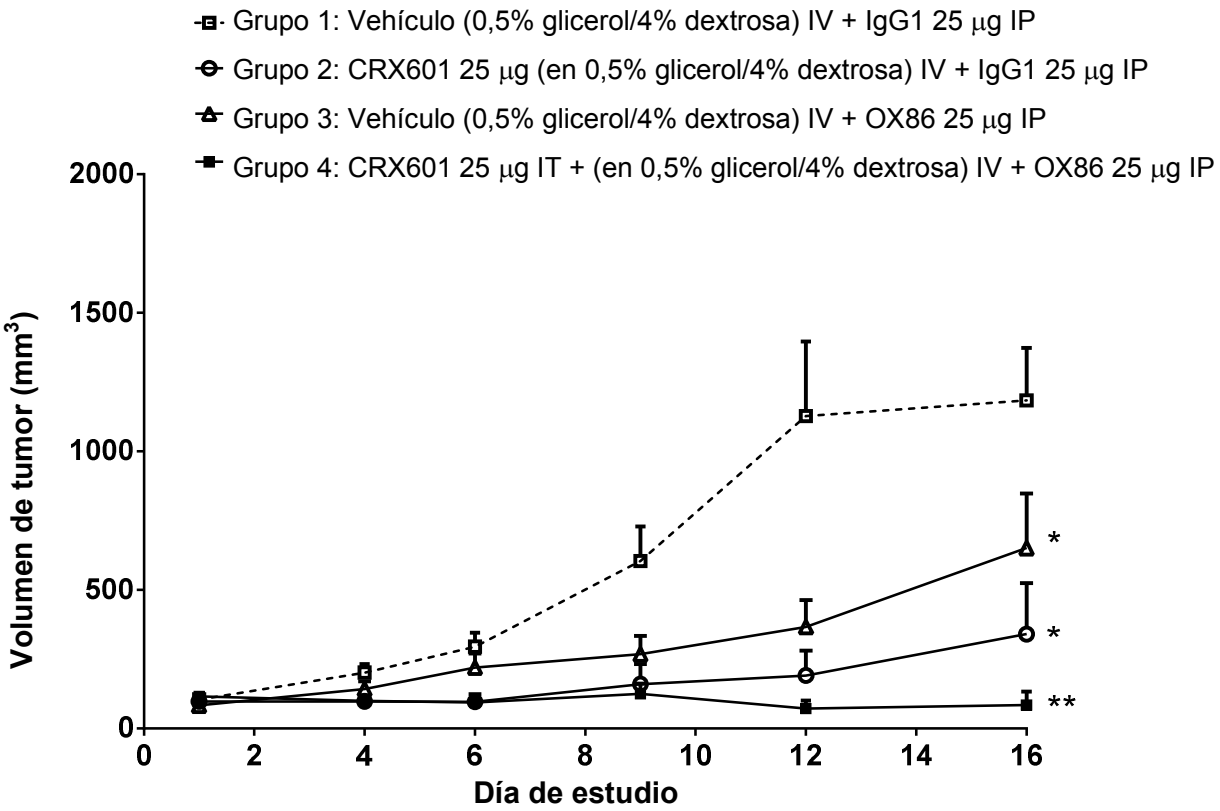


**Figura 33**

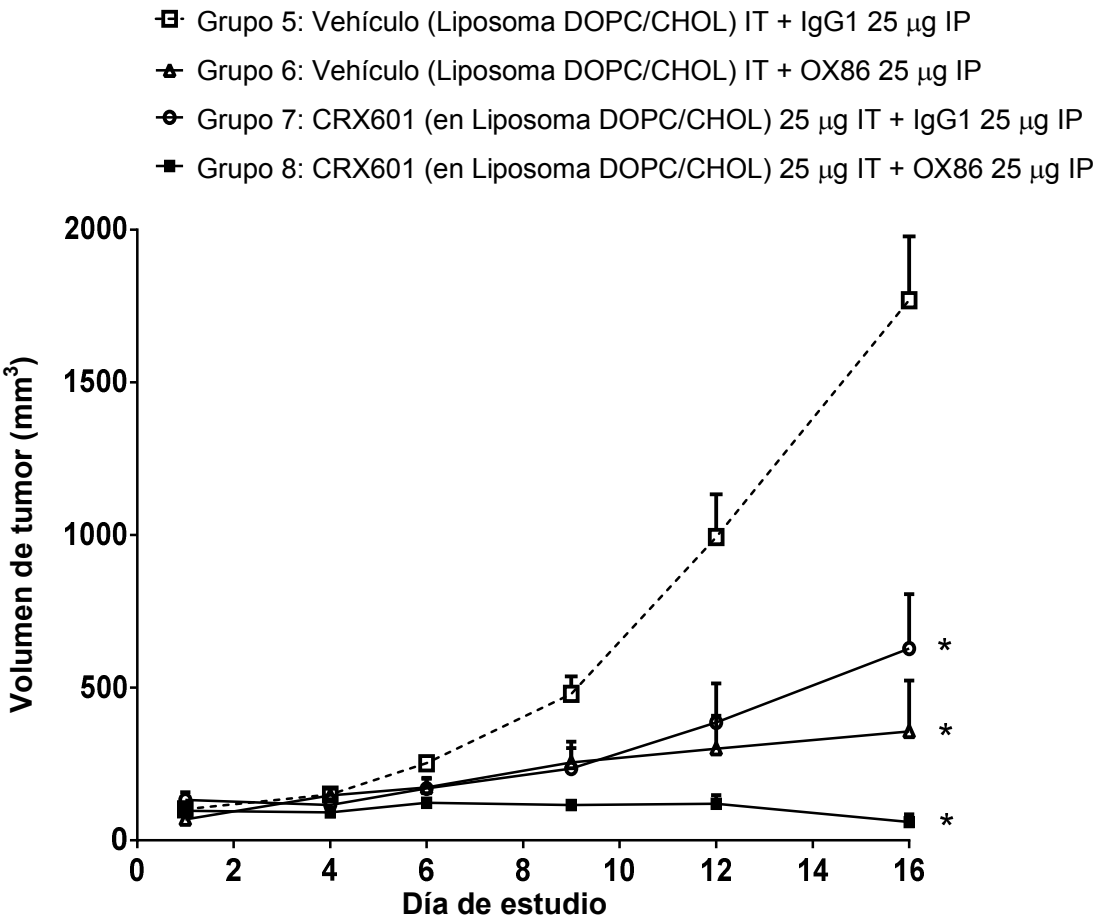
Estudio 7: Volumen del tumor con la administración de CRX601 intravenosa
Modelo singeneico CT26




Valor *p del Grupo 4 < 0,05 versus Grupo 1 y Grupo 3.
Valor *p < 0,05 de los Grupos 2 y 3 de monoterapia versus Grupo 1

**Figura 34**

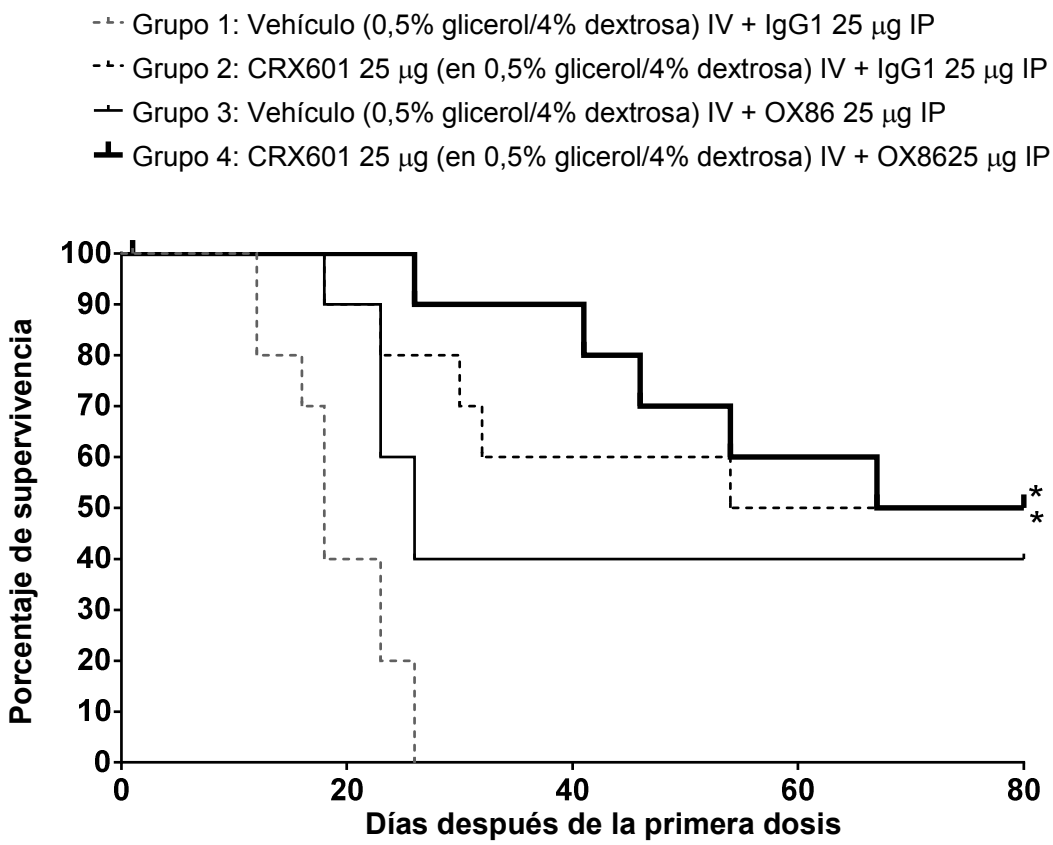
Estudio 7: Volumen del tumor con la administración de CRX601 intratumoral
Modelo singeneico CT26




Valor *p < 0,05 versus Grupo 5

**Figura 35**

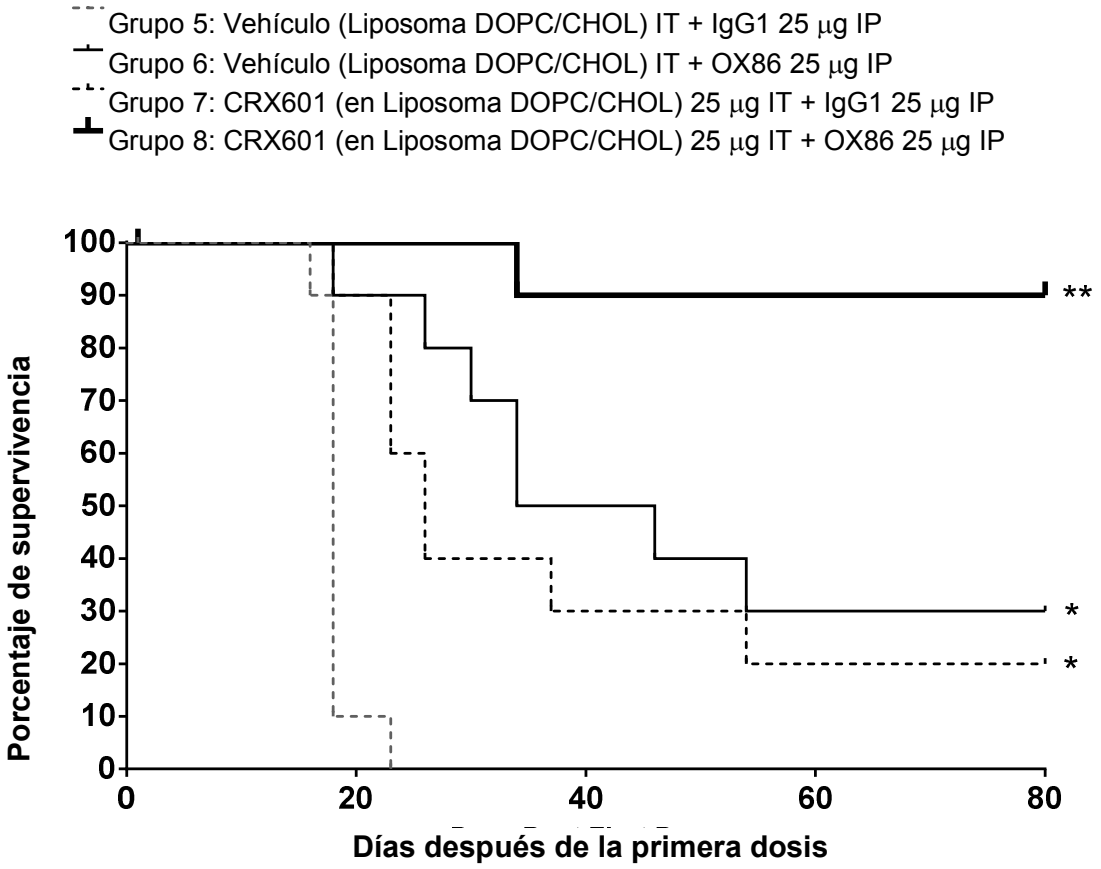
Estudio 7: Porcentaje de supervivencia después de la administración intravenosa de CRX601
Modelo singeneico CT26




Valor *p < 0,05 de Grupo 4 y Grupo 2 versus Grupo 5

**Figura 36**

Estudio 7: Porcentaje de supervivencia después de la administración intratumoral de CRX601
Modelo singeneico CT26

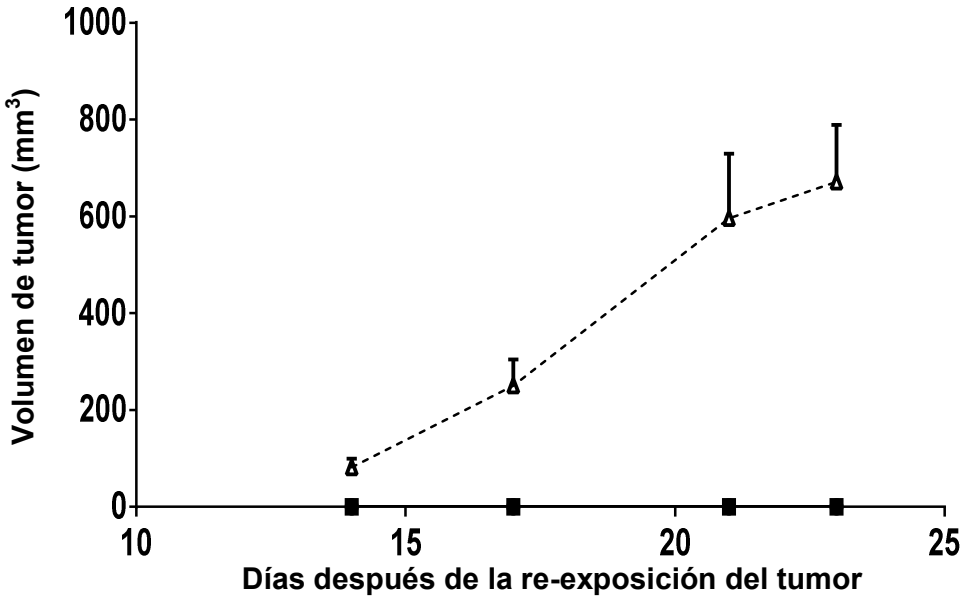



Valor **p < 0,05 de Grupo 8 versus Grupo 5, Grupo 6, Grupo 7
Valor **p < 0,05 de Grupo 6 y Grupo7 versus Grupo 5

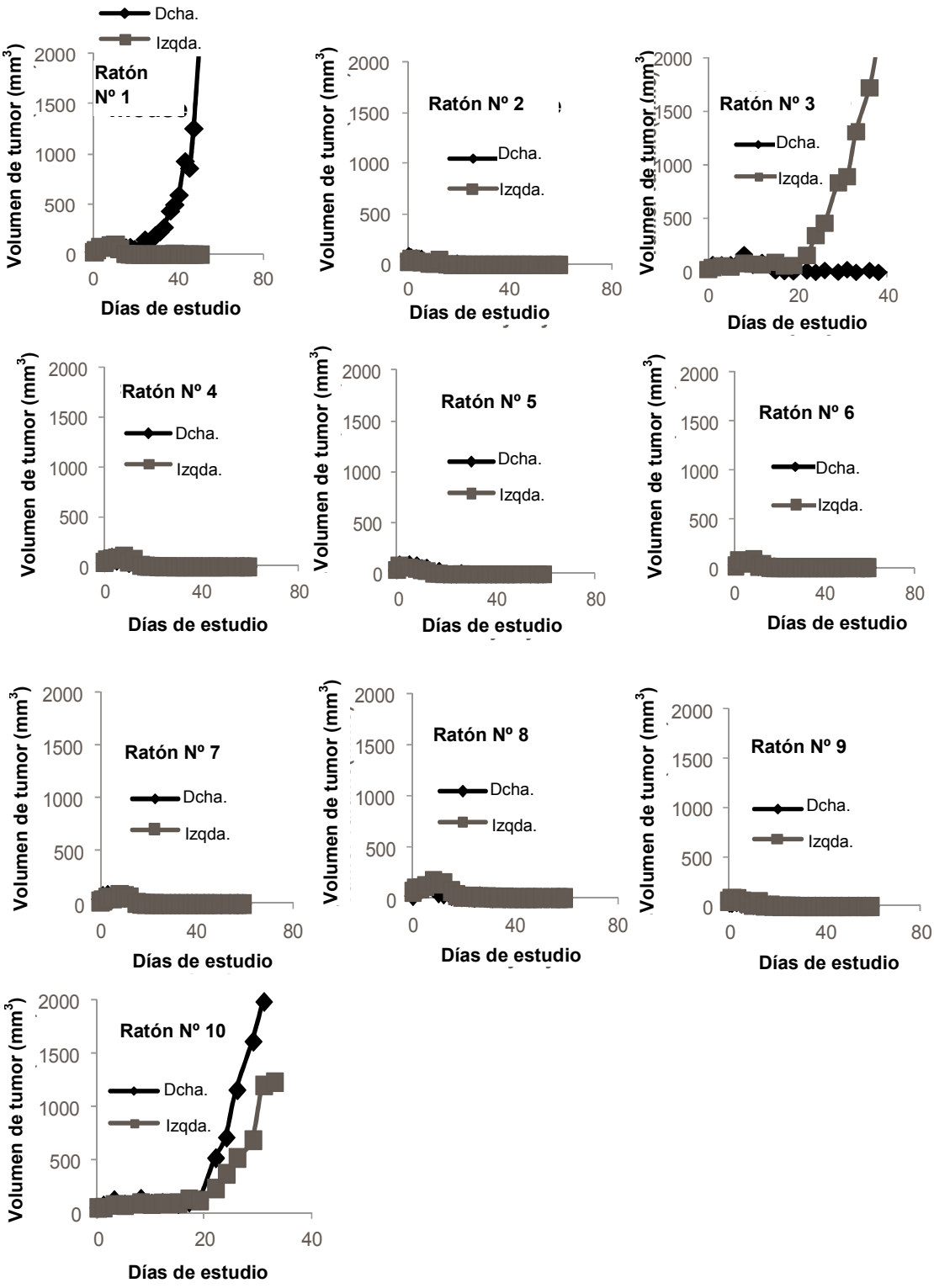
**Figura 37**

Estudio 7: Administración de CRX601 intravenosa o intratumoral:
Re-exposición del tumor
Modelo singeneico CT26

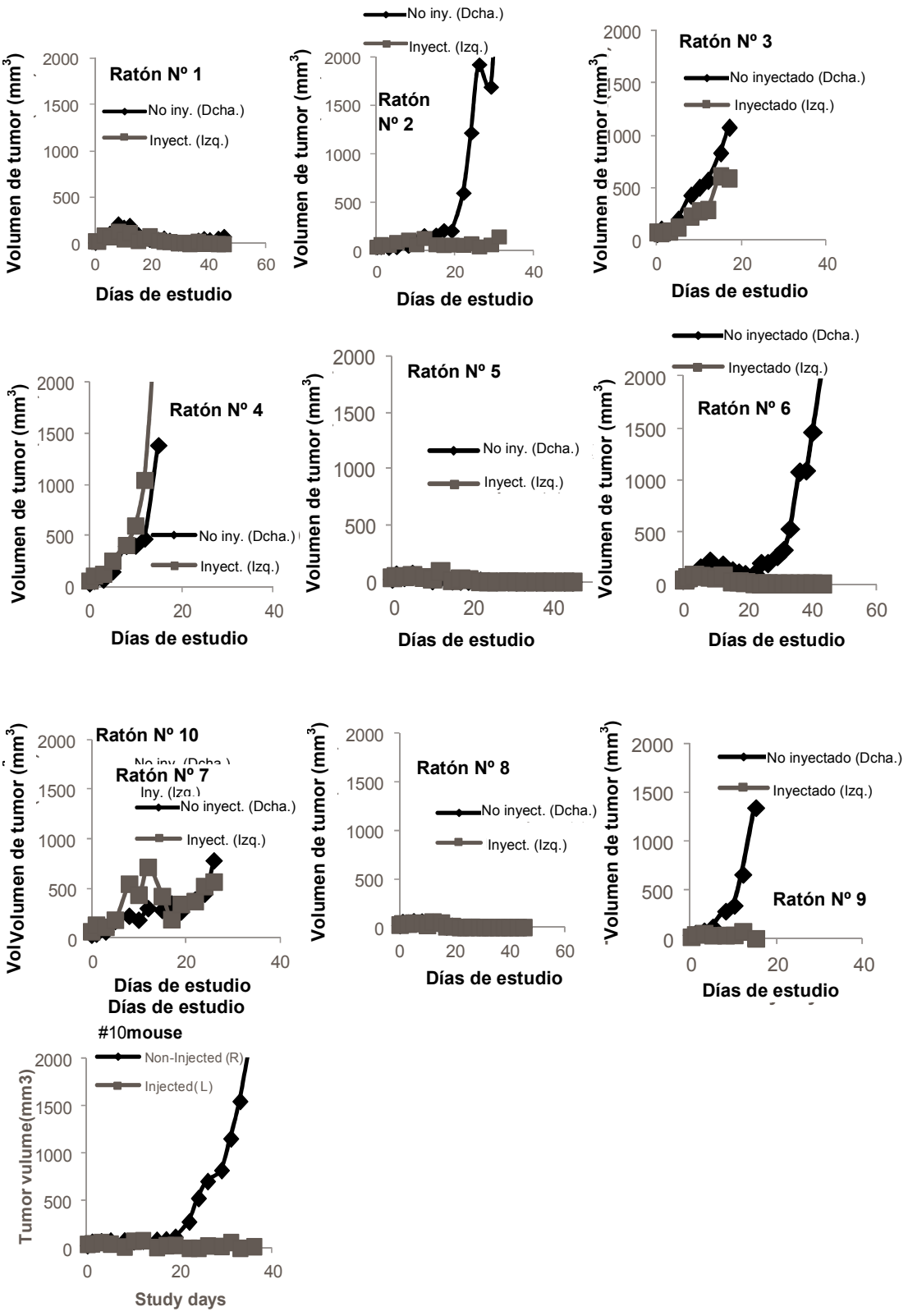
- Ratones control que portan el tumor no tratado (10 ratones)
- Grupo 2: CRX601 25 μg (0,5% glicerol/4% dextrosa) IV + IgG1 25 μg IP (5 ratones)
- Grupo 3: Vehículo (0,5% glicerol/4% dextrosa) IV + OX86 25 μg IP (4 ratones)
- Grupo 4: CRX601 25 μg (0,5% glicerol/4% dextrosa) IV + OX86 25 μg IP (5 ratones)
- Grupo 6: Vehículo (Liposoma DOPC/CHOL) IT + OX86 25 μg IP (3 ratones)
- Grupo 7: CRX601 (en Liposoma DOPC/CHOL) IT 25 μg IT + IgG1 25 μg IP (2 ratones)
- Grupo 8: CRX601 (en Liposoma DOPC/CHOL) 25 μg IT + OX86 25 μg IP (9 ratones)



## Figura 38


Dcha.
Izqda.
Ratón Nº 1
Ratón Nº 2
Ratón Nº 3
Ratón Nº 4
Ratón Nº 5
Ratón Nº 6
Ratón Nº 7
Ratón Nº 8
Ratón Nº 9
Ratón Nº 10
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
0
500
1000
1500
2000
0
20
40
80

## Figura 39


Ratón Nº 1
No iny. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 2
No iny. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 3
No inyectado (Dcha.)
Inyectado (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 4
No iny. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 5
No iny. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 6
No inyectado (Dcha.)
Inyectado (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 10
Ratón Nº 7
No inyect. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Días de estudio
Días de estudio
Ratón Nº 8
No inyect. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Días de estudio
Ratón Nº 9
No inyectado (Dcha.)
Inyectado (Izq.)
Días de estudio
#10mouse
Non-Injected (R)
Injected( L)
Tumor vulume(mm3)
Study days

## Figura 40

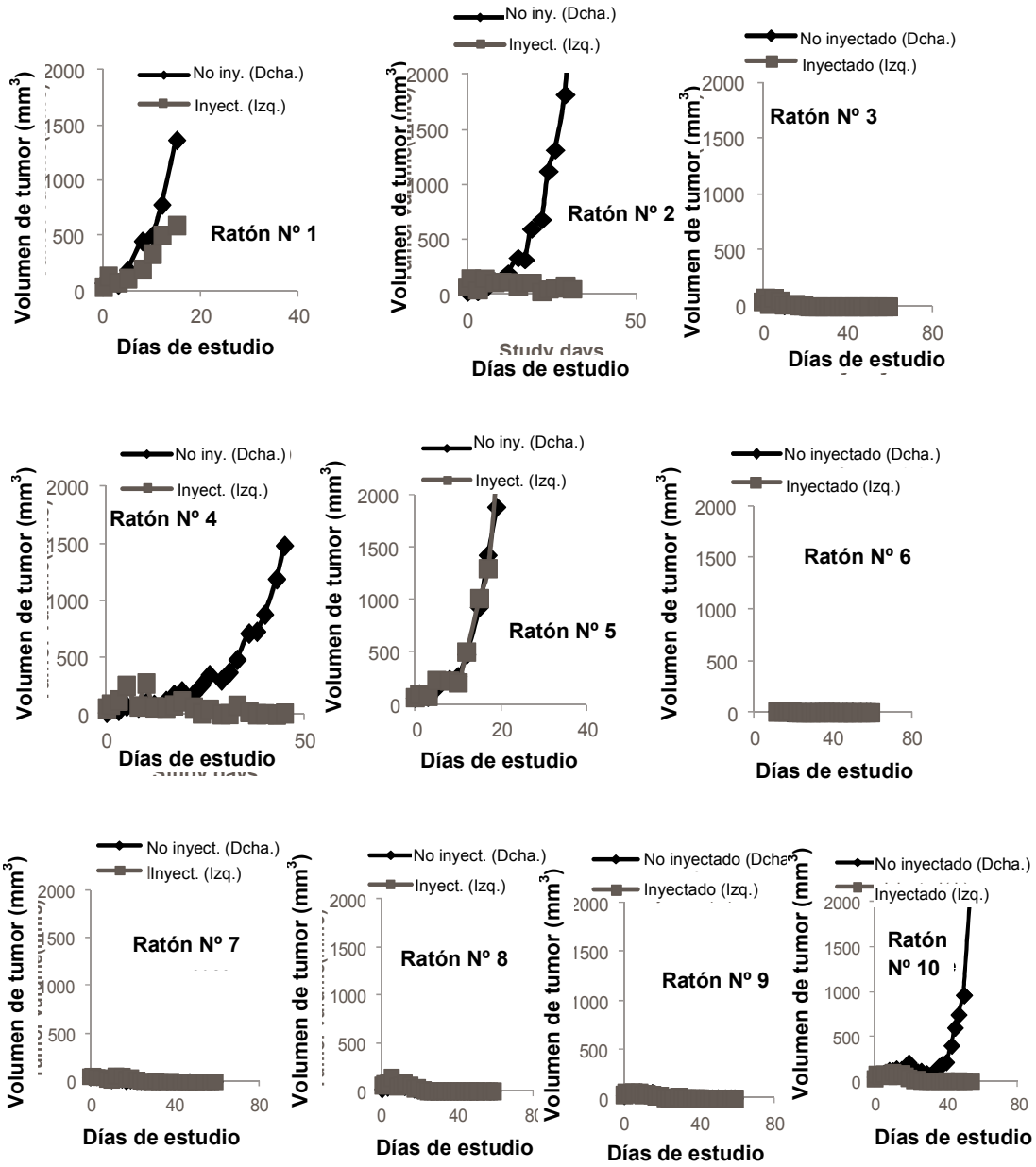

No iny. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Volumen de tumor (mm3)
Días de estudio
Ratón Nº 1
Ratón Nº 2
Study days
No inyectado (Dcha.)
Inyectado (Izq.)
Ratón Nº 3
Ratón Nº 4
Ratón Nº 5
Ratón Nº 6
No inyect. (Dcha.)
Inyect. (Izq.)
Ratón Nº 7
Ratón Nº 8
Ratón Nº 9
Ratón Nº 10

**Figura 41A**

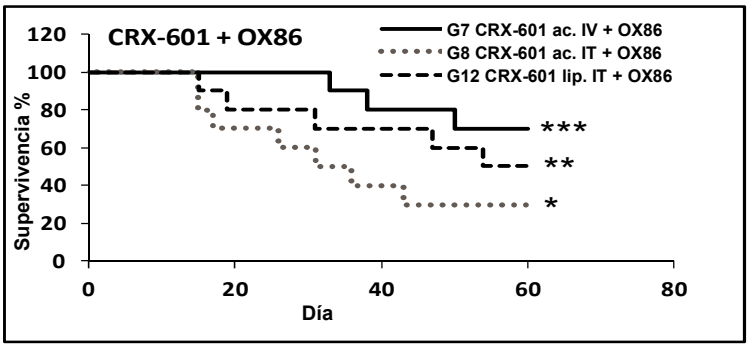



**Figura 41B**

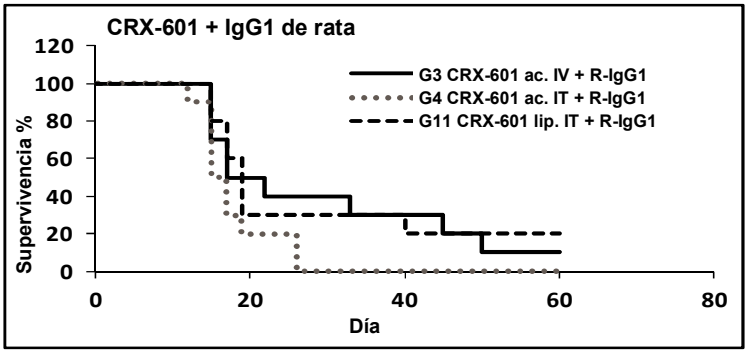



**Figura 41C**

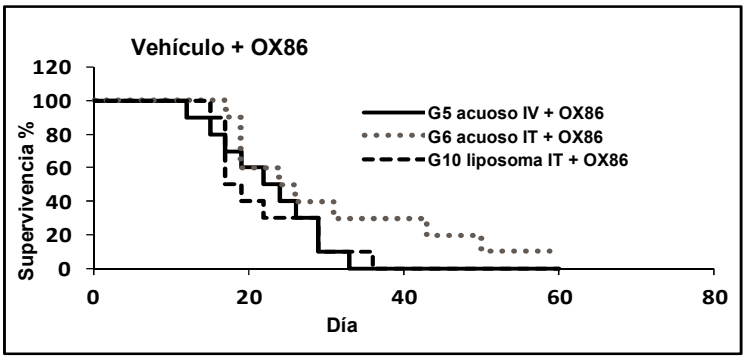



**Figura 41D**

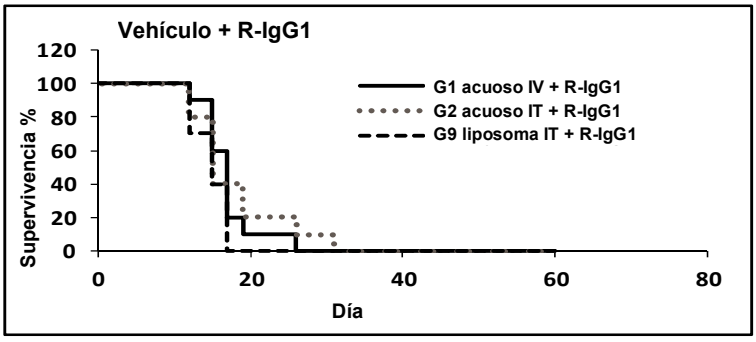


**Figura 42A**

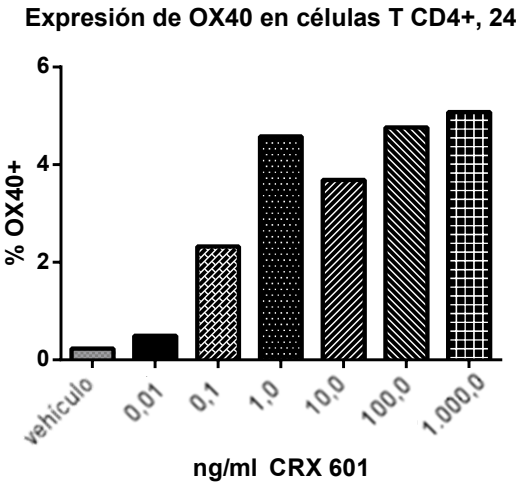



**Figure 42B**

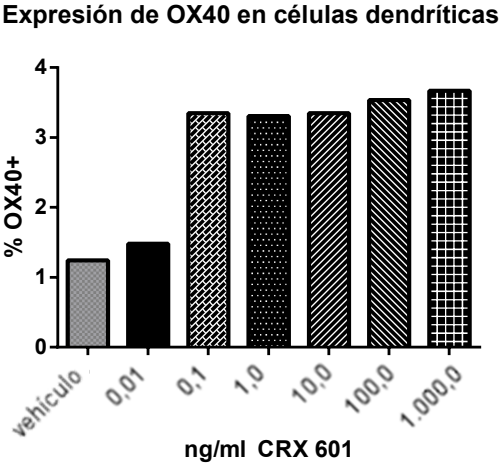



**Figure 42C**

