

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 208**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 17186093 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** **EP 3305812**

54 Título: **Combinación de un agonista de DR5 y un antagonista de anti-PD-1 y métodos de uso**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783184 P

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

16.03.2021

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**BARNHART, BRYAN y
JURE-KUNKEL, MARIA N.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 812 208 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de un agonista de DR5 y un antagonista de anti-PD-1 y métodos de uso

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad y beneficio sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número 61/783.184, presentada el 14 de marzo de 2013.

10 **Listado de secuencias**

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 3 de marzo de 2014, se denomina MXI-529PC_SL.txt y tiene un tamaño de 24.778 bytes.

15 **Antecedentes**

El National Cancer Institute ha estimado que solo en Estados Unidos, 1 de cada 3 personas se verá afectado con cáncer durante su vida. Además, aproximadamente del 50 % al 60 % de las personas que contraen cáncer terminarán sucumbiendo a la enfermedad. La presencia generalizada de esta enfermedad subraya la necesidad de mejorar los regímenes antineoplásicos para el tratamiento de las neoplasias malignas.

La muerte celular programada 1 (PD-1) es un receptor de señalización de la superficie celular que desempeña un papel crucial en la regulación de la activación de las células T y la tolerancia (Keir ME, et al., *Annu Rev Immunol* 2008; 26:677-704). Es un tipo I proteína transmembrana y, junto con BTLA, CTLA-4, ICOS y CD28, comprenden la familia CD28 de receptores coestimuladoras de células T. PD-1 se expresa principalmente en células T, células B y células mieloides activadas (Dong H, et al., *Nat Med* 1999; 5:1365-1369). También se expresa en las células asesinas naturales (NK) (Terme M, et al., *Cancer Res* 2011; 71:5393-5399). PD-1 se expresa a niveles muy altos en los linfocitos infiltrantes de tumores y sus ligandos están regulados por aumento en la superficie celular de muchos tumores diferentes (Dong H, et al., *Nat Med* 2002; 8:793-800). Múltiples modelos de cáncer murino han demostrado que la unión del ligando a PD-1 da como resultado la evasión inmunitaria. Además, el bloqueo de esta interacción da como resultado actividad anti-tumoral.

Se han identificado dos ligandos de glicoproteína de la superficie celular para PD-1, PD-L1 y PD-L2, y se ha demostrado que regulan por disminución la activación de células T y la secreción de citocinas tras la unión a PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43; Ohigashi et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). Tanto PD-L1 (B7-H1) como PD-L2 (B7-DC) son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia de CD28 (Blank et al. (2004). La expresión de PD- L1 en la superficie celular también se ha demostrado que está regulada por aumento mediante la estimulación de IFN-gamma.

Se ha descubierto expresión de PD-L1 en varios cánceres murinos y humanos, incluyendo de pulmón humano, carcinoma de ovarios y de colon y varios mielomas (Iwai et al. (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). Se ha sugerido que PD-L1 desempeña un papel en la inmunidad tumoral aumentando la apoptosis de clones células T específicas de antígeno (Dong et al. (2002) *Nat Med* 8:793-800). También se ha sugerido que PD-L1 podría estar implicado en la inflamación de la mucosa intestinal y la inhibición de PD-L1 suprime la enfermedad de emaciación asociada con la colitis (Kanai et al. (2003) *J Immunol* 171:4156-63).

TRAIL (el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF)) es un miembro de la superfamilia de los TNF con la capacidad de inducir apoptosis de las células tumorales. Se han identificado al menos cinco receptores para TRAIL. DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) son receptores inductores de la apoptosis, que contienen cada uno un dominio de muerte intracelular (véase, por ejemplo, Pan G, et al., *Science*. 1997;276:111-113, Pan G, et al., *Science*. 1997;277:815-818, Sheridan JP, et al., *Science*. 1997;277:818-821, y Walczak H, et al., *EMBO J*. 1997;16:5386-5397). Tras la activación del receptor, DR4 y DR5 reclutan la proteína asociada a FAS con un dominio de muerte (FADD) y la caspasa-8 para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que activa la caspasa-8, que posteriormente conduce a la activación de las caspasas ejecutoras, tal como la caspasa-3, que inducen la apoptosis (véase, por ejemplo, Kischkel FC, et al., *Immunity*. 2000;12:611-620, Thomas LR, et al., *J Biol Chem*. 2004;279:32780-32785, Thomas LR, et al., *J Biol Chem*. 2004;279:52479-52486, Varfolomeev E, et al., *J Biol Chem*. 2005;280:40599-40608, Ashkenazi A., *Nat Rev Cancer*. 2002;2:420-430 y Thorburn A. *Cell Signal*. 2004, 16, 139-144).

TRAIL y los anticuerpos agonistas que reconocen los receptores de TRAIL preferentemente matan las células tumorales e inducen una actividad anti-tumoral potente en diversos modelos experimentales (véase, Griffith TS, et al., *Curr Opin Immunol*. 1998;10:559-563, Ashkenazi A, et al., *J Clin Invest*. 1999;104:155-162, Walczak H, et al, *Nat Med*. 1999;5:157-163, Chuntharapai A, et al., *J Immunol*. 2001;166:4891-4898 y Ichikawa K, et al., *Nat Med*. 2001, 7, 954-960). La administración de TRAIL a ratones portadores e tumores humanos suprimió de forma activa la progresión tumoral y mejoró de la supervivencia del animal (Walczak H, et al, *Nat Med*. 1999, 5, 157-163). Por consiguiente, los agonistas contra DR4 o DR5 mediante la activación de la apoptosis son cada vez más importantes como candidatos

para el tratamiento del cáncer.

Una terapia de combinación antitumoral que comprende un anticuerpo monoclonal anti-DR5 inductor de muerte de células tumorales (mAb) y los mAb inmunes activadores anti-CD40 y anti-CD 137 se describe en Uno et al. (Nature Medicine 12(6):693-698, 2006).

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto por primera vez que la administración conjunta de un agonista de DR5 (por ejemplo, un anticuerpo) y un antagonista anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo) inhibe eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*, incluso sinérgicamente. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos mejorados para tratar a sujetos con cáncer. Específicamente, es un objetivo de la invención proporcionar regímenes de tratamiento de combinación eficaces, en los que se combina un agonista de DR5 con un antagonista anti-PD-1 para el tratamiento de cáncer.

La presente invención proporciona un antagonista de PD-1 y/o un agonista de DR5 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto, en el que el agonista de DR es un anticuerpo anti-DR5 y el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende

- (i) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15; o
- (ii) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente; o
- (iii) las regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 13 y 15, respectivamente; o
- (iv) las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente,

en donde el anticuerpo anti-DR5 y el anticuerpo anti-PD-1 se van a administrar en una cantidad que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. El agonista de DR5 se acopla al receptor de DR5 y es un agente que induce la apoptosis en las células cancerosas.

Los agonistas anti-DR5 para su uso en los métodos de tratamiento de cáncer desvelados en el presente documento son anticuerpos anti-DR5 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos biespecíficos). En una realización, el agonista de DR5 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en lexatumumab (también conocido como ETR2-ST01), tigatuzumab (también conocido como CS-1008), conatumumab (también conocido como AMG 655), drozitumab, HGSTR2J/KMTRS y LBY-135. En otra realización, el agonista de DR5 es, por ejemplo, TAS266. Además, en el presente documento se describen ligandos agonistas de DR5 (por ejemplo, un ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), por ejemplo dulanermin (también conocido como AMG951).

Un anticuerpo anti-PD-1 de ejemplo de la invención es 5C4 (denominado 5C4 en el documento WO 2006/121168; también conocido como MDX-1106, ONO-4538 y Nivolumab) que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende las CDR o VR de las cadenas pesada y ligera de 5C4. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 5C4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 5C4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 15. En otra realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 17, 18, y 19, respectivamente y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 20, 21, y 22, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácido expuestas en la SEQ ID NO: 13 y/o la SEQ ID NO: 15, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 14 y/o la SEQ ID NO: 16, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra realización, el anticuerpo tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable de al menos aproximadamente un 90 % con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, una identidad de la región variable de al menos un 90 %, 95 % o 99 % con la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15).

Además, en el presente documento se describe un antagonista de PD-1 que es un anticuerpo anti-PD-L1, tal como MEDI4736 (también conocido como anti-B7-H1) o MPDL3280A (también conocido como RG7446). Un anticuerpo anti-PD-L1 de ejemplo es 12A4 (denominado 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743). El anticuerpo comprende las CDR o VR de las cadenas pesada y ligera de 12A4. El anticuerpo puede

comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 12A4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 12A4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. El anticuerpo puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente. El anticuerpo puede comprender las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácido expuestas en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente. El anticuerpo puede comprender las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 4, respectivamente. El anticuerpo puede competir por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. El anticuerpo puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable de al menos aproximadamente un 90 % con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, una identidad de la región variable de al menos un 90 %, 95 % o 99 % con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3).

En una realización, la invención proporciona un antagonista de PD-1 y/o un agonista de DR5 para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*, en el que

- (a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15; y
- (b) el agonista de DR5 es un anticuerpo.

También se desvela en el presente documento un antagonista de PD-1 y/o un agonista de DR5 para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del antagonista de PD-1 y el agonista de DR5, en el que

- (a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 y
- (b) el agonista de DR5 es un anticuerpo.

La eficacia de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento puede evaluarse utilizando cualquier medio adecuado. En una realización, el tratamiento produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en reducción del tamaño de un tumor, reducción del número de lesiones metastásicas a lo largo del tiempo, respuesta completa, respuesta parcial y enfermedad estable. En otra realización, la administración de un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 da por resultado una reducción de al menos 1, 1,25, 1,50, 1,75, 2, 2,25, 2,50, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75 o 4 veces el volumen del tumor, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el agonista de DR5 solo, o con respecto al volumen del tumor antes del inicio del tratamiento. En otra realización, la administración de un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 da por resultado una reducción de al menos 1, 2 o, más preferentemente, 3 veces el volumen del tumor, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el agonista de DR5 solo, o con respecto al volumen del tumor antes del inicio del tratamiento. En una realización adicional, la administración de un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 da por resultado una inhibición del crecimiento tumoral de al menos un 50 %, 60 %, 70 % u 80 %, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el agonista de DR5 solo, o con respecto al volumen del tumor antes del inicio del tratamiento. En determinadas realizaciones, el volumen tumoral se reduce en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, un 90 % o más, por ejemplo, con respecto al tamaño del tumor antes del inicio del tratamiento.

El antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 se pueden administrar de acuerdo con una dosis adecuada, vía (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal o subcutánea). El antagonista y el agonista también se pueden administrar de acuerdo con cualquier programa adecuado. Por ejemplo, el antagonista y el agonista se pueden administrar simultáneamente en una sola formulación. De manera alternativa, el antagonista y el agonista se pueden administrar para administración separada, en el que se administran de forma concurrente o secuencial. En una realización, el antagonista de PD-1 se administra antes de la administración del agonista de DR5. En otra realización, el agonista de DR5 se administra antes de la administración del antagonista de PD-1. En una realización adicional, el antagonista de DR5 y el antagonista de PD-1 se administran simultáneamente.

En una realización, el cáncer es un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. En otra realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph +), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfoma nasal de células T, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

Se pueden administrar agentes y terapias adicionales en combinación con los agonistas y antagonistas descritos en

el presente documento. En una realización, los métodos comprenden la administración de un agente terapéutico adicional (por ejemplo, una citotoxina o un agente quimioterapéutico).

5 En el presente documento también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal o anticuerpo biespecífico). El agonista de DR5 es un anticuerpo anti-DR5 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal o anticuerpo biespecífico). En una realización, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende las CDR o VR de las cadenas pesada y ligera de 5C4.

10 La invención se refiere a kits para su uso en un método de tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el kit:

- (a) una dosis de un antagonista de PD-1;
- (b) una dosis de un agonista de DR5;

15 en donde el método comprende administrar el antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 en una cantidad terapéuticamente eficaz en los métodos desvelados en el presente documento. El agonista de DR5 es un anticuerpo anti-DR5. El antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, 5C4). En una realización en particular, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15.

Breve descripción de los dibujos

25 La **Figura 1** es un gráfico que representa la mediana del volumen del tumor en ratones (mm^3) después de la administración de un control, un anticuerpo anti-DR5, un anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de un anticuerpo anti-DR5, un anticuerpo anti-PD-1, hasta 23 días después del implante.

30 La **Figura 2** representa el volumen tumoral en ratones individuales a los que se ha administrado un control (**Figura 2A**), un anticuerpo anti-PD-1 el día 6 después del implante (**Figura 2B**), un anticuerpo anti-PD-1 el día 8 después del implante (**Figura 2C**), un anticuerpo anti-PD-1 el día 9 después del implante (**Figura 2D**), un anticuerpo anti-DR5 el día 8 después del implante (**Figura 2E**), un anticuerpo anti-DR5 el día 8 después del implante en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 el día 6 después del implante (**Figura 2F**), un anticuerpo anti-DR5 el día 8 después del implante en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 el día 8 después del implante (**Figura 2G**), y un anticuerpo anti-DR5 el día 8 después del implante en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 el día 9 después del implante (**Figura 2H**).

35 La **Figura 3** es un gráfico que representa el porcentaje de cambio de peso corporal después de la administración de un control, un anticuerpo monoclonal anti-DR5, un anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-DR5 y un anticuerpo anti-PD-1, hasta 24 días después del implante.

Descripción detallada de la invención

45 Tal como se desvela en el presente documento, la invención se basa en el descubrimiento de que la coadministración de un agonista de DR5 (por ejemplo, un anticuerpo) y un antagonista de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo) inhibe eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*, incluso sinérgicamente. Por consiguiente, la presente invención proporciona un antagonista de PD-1 y/o un agonista de DR5 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) una cantidad eficaz del antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*, en el que el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 y el agonista de DR5 es un anticuerpo anti-DR5.

I. Definiciones

55 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la invención descrita también se pueden usar cualquier método y composición similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferentes.

60 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" es un paciente humano (por ejemplo, un paciente que tiene cáncer).

Un "tumor sólido" incluye, por ejemplo, sarcoma, melanoma, carcinoma, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmón, carcinoma de colon u otro cáncer de tumor sólido.

65 Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen leucemia

mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph +), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, 5
cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfoma nasal de células T, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento eficaz" se refiere a un tratamiento que produce un efecto 10
beneficioso, por ejemplo, la mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno. Un efecto beneficioso puede tomar la forma de una mejora sobre el valor basal, es decir, una mejora sobre una medición u observación realizada antes del inicio de la terapia de acuerdo con el método. Un efecto beneficioso también puede tomar la forma de detener, ralentizar, retardar o estabilizar una progresión perjudicial de un marcador de cáncer. El tratamiento eficaz puede referirse al alivio de al menos un síntoma de cáncer. Dicho tratamiento eficaz puede, por ejemplo, reducir el dolor del paciente, reducir el tamaño y/o el número de lesiones, puede reducir o prevenir la metástasis de un tumor, 15
y/o puede ralentizar el crecimiento del tumor.

El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente que proporciona el resultado biológico, terapéutico y/o profiláctico deseado. Ese resultado puede ser reducción, mejoría, paliación, disminución, retraso y/o alivio de uno 20
o más de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En referencia a los tumores sólidos, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para hacer que un tumor se contraiga y/o disminuya la velocidad de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo del tumor. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una 25
cantidad suficiente para prevenir o retrasar la recurrencia del tumor. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. La cantidad eficaz del fármaco o composición puede: (i) reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retardar, ralentizar en cierta medida y puede detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y puede detener la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento del tumor; (vi) prevenir o retrasar la aparición y/o recurrencia del tumor; y/o (vii) aliviar hasta cierto punto una o más de los síntomas asociados con el cáncer. En un ejemplo, una "cantidad eficaz" es la cantidad de un antagonista de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo) y un anticuerpo agonista de DR5 (por ejemplo, un anticuerpo), en combinación, para efectuar una disminución significativa del cáncer o ralentizar la progresión del cáncer, tal como un tumor sólido avanzado.

Como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a una molécula que bloquea (por ejemplo, reduce o previene) una actividad biológica. 35

Como se usa en el presente documento, el término "agonista" se refiere a una molécula que desencadena (por ejemplo, inicia o promueve), mejora parcial o totalmente, estimula o activa una o más actividades biológicas. Los agonistas a menudo imitan la acción de una sustancia de origen natural. Mientras que un agonista provoca una acción, un antagonista bloquea la acción del agonista. 40

Como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a una molécula que forma un complejo con una biomolécula (por ejemplo, un receptor) para servir a un propósito biológico. En un sentido menos amplio, es una 45
molécula que desencadena señales, uniéndose a un sitio en una proteína diana. La unión se produce por fuerzas intermoleculares, tales como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. El acoplamiento (asociación) suele ser reversible (disociación). La unión covalente irreversible real entre un ligando y su molécula diana es rara en los sistemas biológicos. La unión del ligando a un receptor (proteína receptora) altera su conformación química (forma tridimensional). El estado conformacional de una proteína receptora determina su estado funcional. 50

Como se usa en el presente documento, los términos "sinergia", "sinergia terapéutica" y "efecto sinérgico" se refieren a un fenómeno en el que el tratamiento de pacientes con una combinación de agentes terapéuticos (por ejemplo, antagonista de PD-1 en combinación con agonista de DR5) manifiesta un resultado terapéuticamente superior al resultado alcanzado por cada componente individual de la combinación utilizada en su dosis óptima (véase, por ejemplo, T. H. Corbett et al., 1982, Cancer Treatment Reports, 66, 1187). En este contexto, un resultado terapéuticamente superior es aquel en el que los pacientes a) presentan menos incidencias de acontecimientos adversos mientras reciben un beneficio terapéutico que es igual o mayor que cuando los componentes individuales de la combinación se administran como monoterapia a la misma dosis que en la combinación, o b) no muestran toxicidad limitante de la dosis mientras reciben un beneficio terapéutico que es mayor que el del tratamiento con cada componente individual de la combinación cuando cada constituyente se administra en las mismas dosis en la combinación o combinaciones, como se administra como componentes individuales. En modelos de xenoinjerto, una combinación, utilizada en su dosis máxima tolerada, en la que cada uno de los constituyentes estará presente a una dosis que generalmente no excede su dosis tolerada máxima individual, manifiesta una sinergia terapéutica cuando disminuye el crecimiento del tumor obtenido mediante la administración de la combinación es mayor que el valor de la 60
disminución del crecimiento tumoral del mejor constituyente cuando el constituyente se administra solo. 65

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "fragmentos de unión al antígeno" (también conocidos como "porciones de unión al antígeno")) o cadenas individuales de los mismos. Los anticuerpos enteros son glicoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (en la presente memoria descriptiva abreviada como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (en la presente memoria descriptiva abreviada como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de armazón (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, así como formas multiméricas de anticuerpos, tales como minicuerpos, bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y multímeros de Fab' conjugados químicamente.

El término "fragmento de anticuerpo" (también denominado "fragmento de unión al antígeno" o "porción de unión al antígeno"), como se usan en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3ª ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_{H1} y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo (también conocido como un anticuerpo de dominio único (sdAb)), que es una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Los anticuerpos de dominio único incluyen fragmentos V_HH (anticuerpos de un solo dominio modificados a partir de anticuerpos de cadena pesada encontrados en camélidos, así como fragmentos de VNAR (anticuerpos de un solo dominio obtenidos de anticuerpos de cadena pesada (IgNAR, "receptor de antígeno nuevo de inmunoglobulina") de peces cartilaginosos).

Los "armazones de unión al antígeno" son proteínas que se unen específicamente a una diana (o antígeno) o epítipo, tales como proteínas que comprenden un pliegue Ig o un pliegue similar a Ig, por ejemplo, las proteínas de unión a DR5 descritas en los documentos WO2009/058379 y WO2011/130328. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son también armazones de unión al antígeno. Los armazones de unión al antígeno pueden ser monovalentes, multivalentes, por ejemplo, bivalentes, trivalentes, tetravalentes o se unen a 5, 6 o más epítopos. Los armazones de unión a antígeno multivalentes pueden ser mono-específicos o multi-específicos, es decir, unirse a múltiples (al menos 2, 3, 4 o 5) epítopos que son diferentes entre sí. Por ejemplo, un armazón de unión a antígeno mono-específico multivalente es una proteína que se une a por lo menos 2, 3, 4 o 5 epítopos idénticos, y puede ser una proteína que comprende al menos 2, 3, 4 o 5 porciones idénticas de unión a antígeno. Por ejemplo, los armazones de unión a DR5 pueden comprender 2-10, por ejemplo, 2-6, 2-5, 2-4 o 2-3 porciones de unión a DR5, que pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Un anticuerpo multivalente incluye anticuerpos que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más porciones de unión a antígeno de anticuerpos, en los que las porciones de unión a antígeno pueden comprender una porción de una cadena pesada y una porción de una cadena ligera. Una porción de unión a antígeno puede estar en un único polipéptido o comprender más de un polipéptido. Por ejemplo, un anticuerpo multivalente puede comprender 2-10 porciones de unión a antígeno, que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Un anticuerpo multivalente puede ser mono-específico o multi-específico. Un anticuerpo multi-específico puede ser bio-específico, tri-específico, tetra-específico o unirse a 5 o más epítopos diferentes.

Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes diferentes, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite ser fabricados como una única cadena de proteínas en la que las regiones V_L y V_H se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Estos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que entren dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica y los fragmentos se seleccionan según su utilidad del mismo modo que son anticuerpos intactos.

Como se usa en el presente documento, un armazón de unión al antígeno que "se une específicamente" a un antígeno

o epítopo del mismo es un armazón de unión al antígeno que se une al antígeno o epítopo del mismo con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M o menos. Por ejemplo, un armazón de unión a antígeno que se une específicamente a DR5 es un armazón de unión a antígeno que se une a DR5 con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M o menos. Por ejemplo, con un anticuerpo que "se une específicamente a PD-1 humano" o "se une específicamente a PD-L1 humano" se pretende hacer referencia a un anticuerpo que se une a PD-1 o a PD-L1 humanos, respectivamente, con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M o menos. Un armazón de unión a antígeno que comprende 2 o más regiones que se unen a un antígeno o epítopo puede unirse específicamente al antígeno o epítopo incluso si tiene una menor afinidad de unión al antígeno o epítopo que los intervalos proporcionados anteriormente, ya que se unirá al antígeno o epítopo con mayor avidez.

Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos procedimientos, incluidos fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o una composición de anticuerpos que muestra una única especificidad y afinidad de unión por un epítopo concreto. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" o "composición de anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo o una composición de anticuerpos que muestra una única especificidad de unión y que tiene regiones constantes variables y opcionales derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

El término "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítopos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen normalmente por exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen técnicas en la materia y aquéllas descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Volumen 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

El término "cartografía de epítopos" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento de anticuerpo-antígeno.

El término "se une al mismo epítopo", con referencia a dos o más anticuerpos, significa que los anticuerpos compiten por la unión a un antígeno y se unen a los mismos segmentos continuos o discontinuos de aminoácidos, que se superponen o abarcan. Los expertos en la materia entienden que la frase "se une al mismo epítopo" no significa necesariamente que los anticuerpos se unen exactamente a los mismos aminoácidos. Los aminoácidos precisos a los que se unen los anticuerpos pueden diferir. Por ejemplo, un primer anticuerpo puede unirse a un segmento de aminoácidos que está completamente abarcado por el segmento de aminoácidos unido por un segundo anticuerpo. En otro ejemplo, un primer anticuerpo se une a uno o más segmentos de aminoácidos que superponen significativamente el uno o más segmentos unidos por el segundo anticuerpo. Para los fines del presente documento, se considera que tales anticuerpos "se unen al mismo epítopo."

Por consiguiente, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención también abarcan anticuerpos que se unen a un epítopo que comprende la totalidad o una parte de un epítopo reconocido por los anticuerpos particulares desvelados en el presente documento (por ejemplo, la misma o una región superpuesta o una región entre o que abarca la región).

Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención también abarcan anticuerpos que se unen al mismo epítopo y/o anticuerpos que compiten por la unión con los anticuerpos desvelados en el presente documento. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo o compiten por la unión se pueden identificar usando técnicas rutinarias. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se está analizando inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición en sándwich (véase Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); EIA de fase sólida directa de biotina-avidina (véase, Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase

sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988)); RIA de marcaje directo de fase sólida usando un marcaje de-125 (véase Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de fase sólida directa de biotina-avidina (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); y RIA marcado directo. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Normalmente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcaje unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, presentará unión de un anticuerpo de referencia frente a un antígeno de referencia a un antígeno común en al menos un 50 % -55 %, 55-60 %, 60-65%, 65-70 % 70-75 % o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítomos, tales como, análisis de rayos X de cristales de complejos antígeno: anticuerpo que proporcionan la resolución atómica del epítipo. Otros métodos controlan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno en las que la pérdida de unión debida a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de antígeno se considera a menudo una indicación de un componente de epítipo. Además, también se pueden utilizar métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítomos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas combinadas de péptidos de presentación de fagos. Por tanto, los péptidos se consideran conductores para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para cribar la biblioteca de péptidos. Para el mapeo de epítomos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que ha demostrado que mapean epítomos conformacionales discontinuos.

Además, en el presente documento se describen moléculas quiméricas (o moléculas de fusión) que comprenden un dominio de unión al antígeno, o equivalente, fusionado a otro polipéptido o molécula. Por ejemplo, los polipéptidos pueden fusionarse o conjugarse con una región Fc del anticuerpo, o a parte de la misma (por ejemplo, una proteína de fusión Fc). La porción de anticuerpo fusionada a un polipéptido puede comprender la región constante, la región bisagra, el dominio CH1, el dominio CH2 y el dominio CH3 o cualquier combinación de dominios enteros o porciones de los mismos. Los polipéptidos también pueden estar fusionados o conjugados a las porciones de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones Fc fusionadas a los polipéptidos descritos en el presente documento pueden formar dímeros a través de enlaces disulfuro entre las porciones Fc. Pueden prepararse formas multiméricas superiores fusionando los polipéptidos a porciones de IgA e IgM. Los métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos descritos en el presente documento a porciones de anticuerpos se conocen en la materia. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las publicaciones PCT n.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10535-10539 (1991); Zheng et al., *J. Immunol.*, 154:5590-5600 (1995); y Vil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:11337-11341 (1992).

Como se usa en el presente documento, El término "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo unido a un resto terapéutico, tal como citotoxina, un fármaco o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las mata). Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a los mismos, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los anticuerpos para el uso de acuerdo con la presente invención pueden conjugarse con un radioisótopo, *por ejemplo*, yodo radiactivo, para generar radiofármacos citotóxicos para el tratamiento del cáncer.

Los inmunoconjugados se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery",

en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Como se usa en el presente documento, el término "multivalente" se refiere a una molécula recombinante que incorpora más de dos segmentos biológicamente activos. Los fragmentos de proteína que forman la molécula multivalente opcionalmente pueden estar enlazados a través de un enlace polipeptídico que une las partes constituyentes y permite que cada una funcione independientemente.

Se entiende que "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento, cuando hace referencia a un valor mensurable, tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, abarca variaciones de + - 20 % o + - 10 %, más preferentemente +-.5 %, incluso más preferentemente + - 1 %, y aún más preferentemente + - 0,1 % del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede realizar de varias formas dentro de la experiencia en la técnica usando, por ejemplo, software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Para los fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A a, o con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de aminoácidos dada A o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del siguiente modo: 100 veces la fracción X/Y, en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por un programa de alineación de secuencia, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR), en la alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

II. Antagonistas de PD-1

Como se usa en el presente documento, los términos "Muerte programada 1", "Muerte celular programada 1", "Proteína PD-1", "PD-1," PD1," "PDCD1," "hPD-1" y "hPD-I" se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PD-1 humano y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD-1 humano. La secuencia de PD-1 humana completa puede encontrarse con el número de acceso GenBank U64863 (SEQ ID NO: 23).

Como se usa en el presente documento, los términos "ligando 1 de la muerte celular programada 1", "PD-L1", "PDL1", "PDCD1L1", "PDCD1LG1", "CD274", "homólogo 1 de B7", "B7-H1", "B7-H" y "B7H1" se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PDL-1 humana, y análogos que tienen al menos un epítipo común con el PDL-1 humano. La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humana completa, precursor de la isoforma a, puede encontrarse con el número de acceso NP_054862.1 (SEQ ID NO:24). La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humana completa, precursor de la isoforma b, puede encontrarse con el número de acceso NP_001254635.1 (SEQ ID NO:25).

La proteína Muerte programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células B, células T y células mieloides activadas (Agata et al., citado anteriormente; Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol. 170:711-8). Los miembros iniciales de la familia, CD28 e ICOS, se descubrieron por sus efectos funcionales sobre el aumento de la proliferación de células T después de la adición de anticuerpos monoclonales (Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260). PD-1 se descubrió a través de la detección selectiva de la expresión diferencial en las células apoptóticas (Ishida et al. (1992) EMBO J 11:3887-95). Los otros miembros de la familia, CTLA-4 y BTLA, se descubrieron mediante la detección selectiva para la expresión diferencial en linfocitos T citotóxicos y células TH1, respectivamente. CD28, ICOS y CTLA-4 tienen todos un residuo de cisteína no emparejado que permite la homodimerización. Por el contrario, se sugiere que PD-1 existe como un monómero, careciendo del resto de cisteína no apareado característico de otros miembros de la familia de CD28.

El gen de PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I de 55 kDa que forma parte de la superfamilia del gen de Ig (Agata et al. (1996) *Int Immunol* 8:765-72). PD-1 contiene un motivo inhibidor de la inmunorreceptor de tirosina proximal de la membrana (ITIM) y un motivo de conmutación basado en la tirosina distal de la membrana (ITSM) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E y Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Aunque estructuralmente similar a CTLA-4, PD-1 carece del motivo MYPPTY (SEQ ID NO: 27) que es crucial para la unión de B7-1 y B7-2.

Consistente con que PD-1 es un miembro inhibidor de la familia de CD28, los animales deficientes en PD-1 desarrollan varios fenotipos autoinmunes, incluyendo miocardiopatía autoinmune y un síndrome de tipo lupus con artritis y nefritis, (Nishimura et al. (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura et al. (2001) *Science* 291:319-22). Adicionalmente, se ha descubierto que la PD-1 desempeña un papel en la encefalomiелitis autoinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), la diabetes tipo I y la artritis reumatoide (Salama et al. (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina y Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen et al. (2004) *Lupus* 13:510). En una línea tumoral de células B murinas, se demostró que el ITSM de PD-1 es esencial para bloquear el flujo de Ca²⁺ mediado por BCR y la fosforilación de tirosina de moléculas efectoras aguas abajo (Okazaki et al. (2001) *PNAS* 98:13866-71).

Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, que se ha demostrado que regulan por disminución la activación de células T tras la unión a PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Tanto PD-L1 como PD-L2 son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia de CD28. PD-L1 es abundante en diversos cánceres humanos (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución de linfocitos infiltrantes de tumores, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T y una evasión inmune por las células cancerosas (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La supresión inmunitaria puede invertirse inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 también se bloquea (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol* 170:1257-66).

Los métodos de tratamiento del cáncer desvelados en el presente documento implican el uso de un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD-1 en combinación con un agonista de DR5 que es un anticuerpo anti-DR5), para tratar el cáncer. Por consiguiente, los antagonistas de PD-1 utilizados de acuerdo con la invención se unen directamente al receptor de PD-1, sin comprometer la transducción de señales a través del receptor PD-1. En una realización, el antagonista de PD-1 se une directamente a PD-1 y bloquea la transducción de la señal inhibidora de PD-1. Además, en el presente documento se desvelan antagonistas de PD-1 que se unen a uno o más ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y PD-L2) y reducen o inhiben que el ligando o ligandos desencadenen la transducción de la señal inhibitoria a través de la PD-1, por ejemplo, antagonistas de PD-1 que se une directamente a PD-L1, inhibiendo o impidiendo que PD-L1 se una a PD-1, bloqueando de este modo la transducción de señales inhibitorias de PD-1.

Los antagonistas de PD-1 utilizados de acuerdo con la presente invención o en las composiciones farmacéuticas de la presente invención son anticuerpos anti-PD-1 ("anticuerpos PD-1") (por ejemplo, 5C4). Además, en el presente documento se describen antagonistas de PD-1 que son proteínas de soporte de la unión a PD-1, ligandos PD-1 o agentes multivalentes, por ejemplo proteínas de fusión, tales como AMP-224. Los anticuerpos anti-PD-1 humano (o dominios VH y/o VL derivados de los mismos) desvelados en el presente documento pueden generarse usando métodos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, pueden usarse anticuerpos anti-PD-1 reconocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse los anticuerpos MK-3475 o CT-011. Adicionalmente, se pueden usar los anticuerpos monoclonales 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, descritos en el documento WO 2006/121168. También pueden usarse anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en la técnica para unirse a PD-1.

Un anticuerpo anti-PD-1 de ejemplo de la invención es 5C4, que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende las CDR o regiones variables de las cadenas pesada y ligera de 5C4. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 5C4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 5C4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 15. En otra realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17, 18, y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 20, 21, y 22, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácido expuestas en la SEQ ID NO: 13 y/o la SEQ ID NO: 15, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 14 y/o la SEQ ID NO: 16, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra realización, el anticuerpo tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable de al menos aproximadamente un 90 % con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, una identidad de la región variable de al menos un 90 %, 95 % o 99 % con la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 15).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de PD1 exhiben una o más propiedades funcionales deseables, tales como unión de alta afinidad a PD-1, por ejemplo, unión a PD-1 humano con una K_D de 10^{-7} M o menos; falta de reactividad cruzada significativa con otros miembros de la familia de CD28, por ejemplo, CD28, CTLA-4 e ICOS; la capacidad de estimular la proliferación de células T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (RLM); la capacidad para aumentar la secreción de IFN- γ y/o IL-2 en una RLM; la capacidad para inhibir la unión de uno o más ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2) a PD-1; la capacidad de estimular respuestas de memoria específicas de antígeno; la capacidad para estimular respuestas de anticuerpos y/o la capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*.

Además, en el presente documento se desvelan antagonistas de PD-1 que son anticuerpos anti-PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-L1 humano (o dominios VH y/o VL derivados de los mismos) pueden generarse usando métodos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, se pueden usar anticuerpos anti-PD-L1 reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar MEDI4736 (también conocido como Anti-B7-H1) o MPDL3280A (también conocido como RG7446). Adicionalmente, se pueden usar los anticuerpos monoclonales 12A4, 3G10, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, descritos en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743. También pueden usarse anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en la técnica para unirse a PD-L1.

Un anticuerpo anti-PD-L1 de ejemplo es 12A4 (documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743). El anticuerpo comprende las CDR o VR de las cadenas pesada y ligera de 12A4. El anticuerpo puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de 12A4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de 12A4 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. El anticuerpo puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente. El anticuerpo puede comprender las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácido expuestas en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente. El anticuerpo puede comprender las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o de cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 4, respectivamente. El anticuerpo puede competir por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente. El anticuerpo puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable de al menos aproximadamente un 90 % con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, una identidad de la región variable de al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o 99 % con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3).

Los anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1 pueden unirse a PD-1 o PD-L1, respectivamente, con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M o menos.

III. Agonistas de DR5

En el presente documento se proporciona un agonista de DR5 (un anticuerpo anti-DR5) y/o un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD-1) para su uso en un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer), una cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de DR5 (que es un agente que induce apoptosis en una célula cancerosa) y el antagonista de PD-1 que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. Otros agentes inductores de la apoptosis incluyen las proteínas DR, tales como DR4 y DR5.

Como se usa en el presente documento, los términos "DR5" y "receptor 5 de muerte", también conocido como "miembro 10b de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral", "TNFRSF10B", "CD262", "KILLER", "TRICK2", "TRICKB", "ZTNFR9", "TRAILR", "TRAILR2", "Apo-2", "TRICK2A", "TRICK2B", "TRAIL-R2", "KILLER", "KILLER/DR5", "TR6", "Tango-63", "hAPO8" y TRICK2 (véase, por ejemplo, Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997); Pan et al., Science, 277:815-818 (1997), el documento WO98/51793; el documento WO98/41629; Sreaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997); el documento WO98/35986; el documento EP870,827; el documento WO98/46643; el documento WO99/02653; el documento WO99/09165; el documento WO99/11791; el documento US 2002/0072091; el documento US 2002/0098550; la patente de Estados Unidos n.º 6.313.269; el documento US 2001/0010924; el documento US 2003/0125554; el documento US 2002/0160446, el documento US 2002/0048785; la patente de Estados Unidos n.º 6.342.369; la patente de Estados Unidos n.º 6.569.642, la patente de Estados Unidos n.º 6.072.047, la patente de Estados Unidos n.º 6.642.358; el documento US 6.743.625 se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de DR5 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con DR5. La secuencia completa de DR5 humana puede encontrarse con el número de acceso GenBank AAC01565.1 (SEQ ID NO: 26).

DR5 es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). Se sabe que los ligandos de TNF están entre las citocinas más pleiotrópicas, induciendo un gran número de respuestas celulares, incluyendo citotoxicidad, actividad antiviral, actividades inmunorreguladoras y la regulación de la transcripción de varios genes. Las respuestas celulares a los ligandos de la familia del TNF incluyen no solo respuestas fisiológicas normales, sino también enfermedades asociadas con un aumento de la apoptosis o la inhibición de la apoptosis. La apoptosis (es

decir, muerte celular programada) es un mecanismo fisiológico implicado en la delección de linfocitos T periféricos del sistema inmunitario y una regulación alterada del mismo puede conducir a una serie de procesos patogénicos diferentes. Las enfermedades asociadas con el aumento de la supervivencia celular o la inhibición de la apoptosis incluyen cánceres, trastornos autoinmunes, infecciones víricas, inflamación, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo agudo de injerto y rechazo crónico de injerto. Las enfermedades asociadas con el aumento de la apoptosis incluyen SIDA, trastornos neurodegenerativos, síndromes mielodisplásicos, lesión isquémica, enfermedad hepática inducida por toxina, choque séptico, caquexia y anorexia.

Los receptores de muerte se caracterizan por sus dominios ricos en cisteína en la región extracelular y los dominios de muerte (DD) en la región intracelular. El dominio de muerte proporciona al receptor de muerte la función de inducir la muerte celular por apoptosis, pero en algún momento también media en otras señales. El ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral, TRAIL (Wiley S R, Schooley K, Smolak P, et al., *Immunity*, 1995, 3:673-682) en combinación con sus dominios de muerte desencadena dos vías de señalización de muerte celular, es decir, la vía del receptor de muerte y la vía de la mitocondria, para matar varias células tumorales, pero no es tóxica para la mayoría de las células humanas normales.

Se han identificado cinco receptores TRAIL, es decir, DR4 (receptor 4 de muerte o denominado TRAIL-R1), DR5, DcR1 (receptor señuelo 1 o denominado TRID/TRAIL-R3/LIT), DcR2 (TRAIL-R4 o denominado TRUNDD) y osteoprotegerina (OPG). Al igual que DR4, DR5 contiene tres dominios ricos en cisteína en su porción extracelular y un único dominio de muerte citoplasmática y es capaz de señalar la apoptosis tras la unión del ligando (o al unirse a una molécula, tal como un agonista (por ejemplo, anticuerpo), que imita la actividad del ligando).

El término "agonista", tal como se utiliza con referencia a DR5, se refiere a cualquier molécula que aumenta, estimula o activa parcial o totalmente una o más actividades biológicas de DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Ejemplos de tales actividades biológicas de unión de Apo2L/TRAIL a DR5, incluyen apoptosis, así como las que se indican adicionalmente en la bibliografía. Los agonistas de DR5 pueden funcionar de manera directa o indirecta. Por ejemplo, el agonista de DR5 puede funcionar para mejorar, estimular o activar parcial o totalmente una o más actividades biológicas de DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado de su unión directa a DR5, lo que provoca la activación del receptor o la transducción de la señal. El agonista de DR5 también puede funcionar indirectamente para mejorar, estimular o activar indirectamente o parcial o totalmente una o más actividades biológicas de DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, como resultado de, por ejemplo, la estimulación de otra molécula efectora que, a continuación, produce la activación de DR5 o transducción de señal. Se contempla que un agonista puede actuar como una molécula potenciadora que funciona indirectamente para aumentar o incrementar la activación o actividad de DR5.

Un agonista de DR5 puede ser cualquier molécula que aumente directa o indirectamente la actividad de DR5 y reduzca el crecimiento tumoral, ya sea por sí solo o en combinación con otro tratamiento, tal como un antagonista de PD-1. Ejemplos de agonistas de DR5 incluyen armazones de unión a DR5, tales como anticuerpos anti-DR5 ("anticuerpos de DR5"), por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados o totalmente humanos, una porción de unión a antígeno de los mismos o moléculas basadas en o derivadas de cualquiera de estos. Los agonistas de DR5 pueden ser también proteínas que no sean anticuerpos. Los agonistas de DR5 también incluye ligandos de DR5, por ejemplo, TRAIL y moléculas que derivan o se basan en TRAIL.

Un agonista de DR5 puede ser monovalente o multivalente. En determinadas realizaciones, un agonista de DR5 es bivalente, trivalente, tetravalente o se une a 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más epítopos de DR5, que pueden ser epítopos de DR5 iguales o diferentes. Por ejemplo, un agonista de DR5 puede ser un armazón de unión a DR5 mono-específico multivalente, por ejemplo, una proteína que comprende un armazón de unión a DR5 que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más regiones que específicamente se unen al mismo epítipo de DR5, regiones de unión que pueden estar compuestas por la misma secuencia de aminoácidos o una diferente. Por ejemplo, un agonista de DR5 puede ser un armazón de unión de DR5 que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más repeticiones de la misma región de unión a DR5. Los armazones de unión de a DR5 multiméricos se describen, por ejemplo, en los documentos WO2009/058379, WO2011/130328, WO2010/042890 y WO2011/098520.

En determinadas realizaciones, un agonista de DR5 se une específicamente a DR5, pero no se une significativamente o específicamente a otros miembros de la superfamilia del receptor de TNF, tal como DR4. En otras realizaciones, un agonista de DR5 se une específicamente a DR5 y DR4.

Un ejemplo de un agonista de DR5 es un TRAIL humano recombinante (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF), por ejemplo, dulanermin (también conocido como AMG -951; disponible en Amgen/Genentech).

De acuerdo con la invención, el agonista de DR5 es un anticuerpo anti-DR5, por ejemplo, un anticuerpo que se une a DR5 humano con una K_D de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M o menos, en el que el anticuerpo inhibe el crecimiento del tumor y/o induce la apoptosis de las células tumorales. En la técnica se conocen numerosos anticuerpos que se unen a DR5 humano y algunos de ellos se han usado en ensayos clínicos. Cualquiera de estos anticuerpos puede usarse en combinación con un antagonista de PD-1, con la condición de que su combinación de como resultado la inhibición del crecimiento del tumor o la reducción del tamaño del tumor, por ejemplo, en un sujeto que tiene cáncer. Ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente al DR5 humano

incluyen conatumumab (un anticuerpo específico de hTRAILR2 conocido también como AMG655; disponible en Amgen), drozitumab (un anticuerpo específico de hTRAILR2 también conocido como Apomab, DAB4 y PRO95780; disponible en Genentech), lexatumumab (un anticuerpo específico de hTRAILR2, también conocido como HGS-ETR2; disponible en HGS/Kirin), tigatuzumab (un anticuerpo específico de TRAILR2 humanizado también conocido como CS-1008 y TRA-8; disponible en Daiichi Sankyo), HGSTR2J (un anticuerpo específico de hTRAILR2 también conocido como KMTRS) o LBY-135 (un Ab específico de TRAILR2; disponible en Novartis) (véase, por ejemplo, Ashkenazi et al., Journal of Clinical Investigation 2008; 118:1979-90). En una realización, el agonista de DR5 es un anticuerpo agonista del receptor de muerte biespecífico, véase, por ejemplo, el documento WO2011/039126; disponible en Roche Glycart). En otra realización, el agonista de DR5 es un anticuerpo conjugado a péptidos dirigidos o una citotoxina, Fc-TRAIL humano, (véase, por ejemplo, el documento WO2011/039126; disponible en Roche Glycart). Además, en el presente documento se describe un agonista de DR5 que es un polipéptido-Fc de alta afinidad (véase, por ejemplo, el documento WO2011/143614; disponible en Amgen).

Los agonistas de DR5 pueden ser agentes multivalentes, tales como TAS266 (un agonista de nanocuerpo tetramérico dirigido a DR5, véase, por ejemplo, el documento WO2011/098520 y Cancer Research 2012;72:Supplement 1; Resumen 3852; disponible en Novartis y Ablynx), la proteína Tn3 multimérica (véanse, por ejemplo, los documentos WO2009/058379, WO2011/130328 y Cancer Research 2012;72:Supplement 1; Resumen 239; disponible en Medimmune), un multímero (por ejemplo, una construcción polipeptídica con un dominio trimerizante y un polipéptido que se una a DR5; véase el documento WO2010/042890; disponible en Anaphore).

También pueden usarse agentes que compiten por la unión a DR5 con cualquiera de los agentes de ejemplo enumerados en el presente documento y que inhiben el crecimiento del tumor o reducen el tamaño del tumor. También se pueden usar anticuerpos que tienen cadenas VH y VL que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95 %, 98 % o 99 % con la de cualquiera de los anticuerpos anti-FR5 enumerados en el presente documento. En determinados métodos descritos en el presente documento, un agonista de DR5 puede reemplazarse con un agonista de DR4. Por lo tanto, un sujeto que tiene cáncer puede tratarse con una combinación de un agonista de DR4 y un antagonista de PD-1. Generalmente, cualquier agente que induce apoptosis en células tumorales puede combinarse con un antagonista de PD-1 para tratar el cáncer. En determinados casos, un agente inductor de apoptosis es un agente que se une específicamente a DR5 y DR4, tal como TRAIL o un agente que imita a TRAIL. Un ejemplo de agonista de DR4 es mapatumumab (HGS-ETR1), que se ha usado en ensayos clínicos de fase 2.

IV. Composiciones

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de PD-1 que es un anticuerpo anti-PD-1 y un agonista de DR5 que es un anticuerpo anti-DR5 (por ejemplo, formulados juntos en una composición farmacéutica única o formulados por separado) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15. Además, en el presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en las que (a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 y (b) el agonista de DR5 es un anticuerpo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a pacientes humanos se formulan normalmente para administración parenteral, por ejemplo, en un portador líquido, o son adecuadas para la reconstitución en una solución o suspensión líquida para administración intravenosa.

En general, dichas composiciones normalmente comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, particularmente seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, de origen vegetal o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, ricinoleato de glicerol polietilenglicol y similares. Como portadores se pueden usar agua o soluciones salinas acuosas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones líquidas para administración parenteral pueden formularse para administración por inyección o infusión continua. Las vías de administración mediante inyección o infusión incluyen las vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal y subcutánea.

Para uso oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden administrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables, u obleas o como soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores de uso habitual incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar, y normalmente se añaden agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, los portadores útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de

magnesio, talco y azúcar. Cuando se usan suspensiones acuosas para administración oral, habitualmente se añaden agentes emulsionantes y/o de suspensión.

5 Además, a las composiciones orales se pueden añadir agentes edulcorantes y/o aromatizantes. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, normalmente se usan soluciones estériles del o los ingrediente(s) activo(S) y el pH de las soluciones deberá ajustarse y tamponarse de forma adecuada. Para uso intravenoso, se controlará la concentración total del o los solutos con el fin de convertir en isotónica la preparación.

10 Para preparar supositorios de acuerdo con la invención, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el ingrediente activo se dispersa homogéneamente en la cera, por ejemplo, mediante agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes de tamaño conveniente y se dejan enfriar y, de este modo, solidificar.

15 Las preparaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Dichas preparaciones tienen como ejemplo soluciones de agua o agua/propilenglicol para inyección parenteral. Las preparaciones líquidas pueden incluir también soluciones para administración intranasal.

20 Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte.

También se incluyen preparaciones sólidas que están destinadas a convertirse, poco antes de usar, en preparaciones en forma líquida para administración oral o parenteral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

25 V. Poblaciones de pacientes

En el presente documento se proporcionan métodos eficaces para tratar el cáncer en un paciente, por ejemplo, usando una combinación de un agonista de DR5 y un antagonista de PD-1. En una realización, el paciente sufre un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. En otra realización, el paciente sufre un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph +), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfoma nasal de células T, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).

40 VI. Terapias/agentes adicionales

Las combinaciones de la presente invención (por ejemplo, antagonista de PD-1 combinado con agonista de DR5) también se pueden usar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad concreta contra el cáncer que se está tratando. Como alternativa, las combinaciones de la presente invención pueden usarse secuencialmente con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocidos(s) cuando sea adecuado.

45 Por ejemplo, los antagonistas de PD-1 y los agonistas de DR5 desvelados en el presente documento pueden usarse adicionalmente en combinación (por ejemplo, simultánea o separadamente) con un tratamiento adicional, tal como irradiación, quimioterapia (por ejemplo, usando camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracilo (5- FU), cisplatino, doxorubicina, irinotecán, paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, paclitaxel, doxorubicina, 5-fu o camptotecina + apo21/TRAIL (un combo 6X)), uno o más inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib o MG132), uno o más inhibidores de Bcl-2 (por ejemplo, BH31-2 '(inhibidor de bcl-xl), AT-101 (derivado de R-(-)-gossipol), ABT-263 (molécula pequeña), GX-15-070 (obatoclox) o MCL-1 (antagonistas de la proteína 1 de diferenciación de células de leucemia mieloide), antagonistas de iAP (inhibidor de la proteína de apoptosis) (por ejemplo, smac7, smac4, mimético smac de molécula pequeña, péptidos smac sintéticos (véase Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) o AEG-35156 (GEM-640)), HDAC (inhibidores de la histona desacetilasa), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, rituximab), inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, bevacizumab), agentes antiangiogénicos dirigidos a VEGF, y VEGFR, triterpenoides sintéticos (véase Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), moduladores de c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE celular) (por ejemplo, ligandos naturales y sintéticos de PPARγ (receptor y activado por proliferador de peroxisoma), 5809354 o 5569100), inhibidores de cinasa (por ejemplo, sorafenib) y/o fármacos genotóxicos.

65 Los antagonistas de PD-1 y los agonistas de DR5 desvelados en el presente documento pueden usarse adicionalmente en combinación con uno o más agentes citotóxicos antiproliferativos. Las clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos antiproliferativos incluyen, pero no se limitan a los mismos, los siguientes: agentes alquilantes (incluyendo, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CYTOXAN™) fosfamida, melfalán,

clorambucilo, pipobromano, trietilenomelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida.

5 Antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

10 Los agentes antiproliferativos adecuados para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, taxanos, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL.RTM.), docetaxel, discodermolida (DDM), dictiostatina (DCT), pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona BI, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]-deshidrodesoxiepotilona B, C12,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A C6-C8 en puente, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discoderomolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (tasidotina clorhidrato), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hemiasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, 15 inmunoconjugados de maitansinoide (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didemetil-(+)-discodermolidas y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizadores de la microtubulina conocidos en la técnica.

20 En los casos en que es deseable hacer que las células proliferativas de forma aberrante permanezcan quiescentes junto con o antes del tratamiento con los métodos quimioterapéuticos descritos en el presente documento, las hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos), tales como 17a-etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, megestrolacetato, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clortrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, medroxiprogesteronaacetato, leuprolida, flutamida, toremifeno, ZOLADEx™, también se pueden administrar al paciente. Al emplear los usos médicos o composiciones farmacéuticas de la presente invención, también se pueden administrar, según se desee, otros agentes usados en la modulación del crecimiento o la metástasis tumoral en un contexto clínico, tales como antimiméticos.

30 Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Además, su administración se describe en la bibliografía estándar. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en "Physicians' Desk Reference" (PDR), por ejemplo, 1996 edición (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, EE.UU.).

35 El o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia se pueden administrar de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Será evidente para los expertos en la técnica que la administración del o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia se puede variar en función de la enfermedad que se esté tratando y los efectos conocidos del o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia sobre dicha enfermedad. Asimismo, de acuerdo con los conocimientos del clínico experto, los protocolos terapéuticos (p. ej., cantidades de las dosis y tiempos de administración) se pueden modificar a la luz de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados sobre el paciente y a la luz de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

45 VII. Protocolos terapéuticos

Los protocolos terapéuticos adecuados para tratar el cáncer en un paciente incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo) y un agonista de DR5 (por ejemplo, anticuerpo).

50 Como se usa en el presente documento, la administración adyuvante o combinado (administración conjunta) incluye la administración simultánea del antagonista y agonista en la misma forma de dosificación o una diferente o la administración por separado del antagonista y agonista (por ejemplo, administración secuencial). Por lo tanto, el antagonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo) y el agonista de DR5 (por ejemplo, anticuerpo) se pueden administrar simultáneamente en una sola formulación. De manera alternativa, el antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 pueden formularse para administración separada y se administran de forma concurrente o secuencialmente.

60 Por ejemplo, el antagonista de PD-1 puede administrarse primero seguido de (por ejemplo, seguido inmediatamente de) la administración del agonista de DR5, o viceversa. En una realización, el antagonista de PD-1 se administra antes de la administración del agonista de DR5. En una realización, el agonista de DR5 se administra antes de la administración del antagonista de PD-1. Dicha administración concurrente o secuencial da como resultado, preferentemente, que tanto el agonista como el antagonista estén simultáneamente presentes en los pacientes tratados. En otra realización, el agonista de DR5 y el antagonista de PD-1 se administran simultáneamente.

65 En un tratamiento de ejemplo, se administra a un sujeto una dosis única de un agonista de DR5 y al menos 2 dosis de un antagonista de PD-1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1. En cierta realización, un sujeto recibe una

dosis única de un agonista de DR5 y al menos 2, 3, 4, 5 o más dosis de un antagonista de PD-1. Las dosis múltiples de antagonista de PD-1 pueden proporcionarse como una dosis al día, una dosis cada 2 días, una dosis cada 3 días, una dosis cada 4 días, una dosis cada 5 días o menos frecuentemente. En determinadas realizaciones, en las que se proporciona un antagonista de PD-1 como 1 dosis cada 1, 2, 3, 4, 5 o más días, puede proporcionarse la dosis única de agonista de DR5 en un día en el que el antagonista de PD-1 se proporciona o en un día en que no se proporciona. El número total de dosis de antagonista de PD-1 puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

En determinadas realizaciones, se administran dosis múltiples (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) de un agonista de DR5 y múltiples (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) dosis de un antagonista de PD-1 a un sujeto que necesita tratamiento. La administración del agonista de DR5 y del antagonista de PD-1 puede ser el mismo día o, como alternativa, el antagonista de DR5 se puede administrar 1 o más días antes o después del antagonista de PD-1.

Las administraciones de un agonista de DR5 y un antagonista de PD-1 pueden realizarse también semanal o mensualmente, en cuyo régimen se pueden administrar el mismo día (por ejemplo, simultáneamente) o uno tras otro (por ejemplo, uno o más días antes o después uno de otro).

En una realización, la dosis del antagonista de PD-1 y/o agonista de DR5 se varía con el tiempo. Por ejemplo, el antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR5 se pueden administrar inicialmente a una dosis alta y se pueden reducir con el tiempo. En otra realización, el antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR5 se administran inicialmente a una dosis baja y se incrementa con el tiempo.

En otra realización, la cantidad de antagonista de PD-1 y/o agonista de DR5 administrada es constante para cada dosis. En otra realización, la cantidad de antagonista de PD-1 y/o agonista de DR5 varía con cada dosis. Por ejemplo, la dosis de mantenimiento (o seguimiento) del antagonista y/o agonista puede ser mayor o igual que la dosis de carga que se administra primero. En otra realización, la dosis de mantenimiento del antagonista y/o agonista puede ser menor o igual que la dosis de carga. Un médico clínico puede utilizar dosificaciones preferidas según se justifique por el estado del paciente que está tratando. La dosis puede depender de una serie de factores, incluyendo el estadio de la enfermedad, etc. La dosis específica que debe administrarse basándose en la presencia de uno o más de tales factores está dentro de la experiencia del experto. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas por debajo de la dosis óptima del compuesto. A continuación, la dosis se aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. Por comodidad, la dosificación diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día, si se desea. También se puede usar terapia intermitente (por ejemplo, una semana de cada tres semanas o tres de cada cuatro semanas).

En una realización, el agonista de DR5 (por ejemplo, anticuerpo) se administra a una dosis de 0,1, 0,3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el antagonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo) se administra a una dosis de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg de peso corporal. Generalmente, 200 µg/ratón es aproximadamente 10 mg/kg y 100 µg/ratón es aproximadamente 5 mg/kg. Por lo tanto, basándose en los experimentos desvelados en el presente documento, se pueden administrar a un sujeto una o más dosis de 1-20 mg/kg de peso corporal, 1-10 mg/kg de peso corporal, 5-20 mg/kg de peso corporal o 5-10 mg/kg de peso corporal de un agonista de DR5 y un antagonista de PD-1. En determinadas realizaciones, se utiliza una dosis de 0,3 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal de un agonista de DR5 y una dosis de al menos 1 mg/kg, por ejemplo, 1-100 mg/kg de peso corporal de un antagonista de PD-1.

VIII. Resultados

Los pacientes, por ejemplo, seres humanos, tratados de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento experimentan, preferentemente, mejoría en al menos un signo de cáncer. En una realización, la mejora se mide mediante una reducción de la cantidad y/o tamaño de las lesiones tumorales mensurables. En otra realización, las lesiones pueden medirse en radiografías de tórax o en las películas de TAC o RMN. En otra realización, puede usarse citología o histología para evaluar la respuesta a una terapia.

En una realización, el paciente tratado exhibe una reducción en el tamaño de un tumor, reducción del número de lesiones metastásicas a lo largo del tiempo, respuesta completa, respuesta parcial y enfermedad estable. En otra realización, el paciente tratado experimenta retracción del tumor y/o disminución de la velocidad de crecimiento, es decir, Supresión del crecimiento tumoral. En otra realización, la proliferación celular no deseada se reduce o se inhibe. En aún otra realización, se puede producir uno o más de los siguientes: se puede reducir el número de células cancerosas; se puede reducir el tamaño del tumor; la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos puede inhibirse, retrasarse, ralentizarse o detenerse; la metástasis tumoral puede ralentizarse o inhibirse; el crecimiento tumoral puede inhibirse; la recurrencia del tumor puede prevenirse o retrasarse; uno o más de los síntomas asociados con el cáncer pueden aliviarse en cierta medida.

En otra realización, los métodos de tratamiento producen una tasa de beneficio clínico comparable (BCC = RC (respuesta completa), RP (respuesta parcial) o EE (enfermedad estable) \geq 6 meses) mejor que la alcanzada por un agonista de PD-1 (por ejemplo, anticuerpo) o agonista de DR5 (por ejemplo, anticuerpo) solo. En otras realizaciones,

la mejora de la tasa de beneficio clínico es de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más, por ejemplo, en comparación con el tratamiento con un antagonista de PD-1 o un agonista de DR5 solo o con respecto al crecimiento del tumor el primer día de tratamiento o inmediatamente antes del inicio del tratamiento.

5 En otra realización, la administración de un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 da por resultado una reducción de al menos tres veces (por ejemplo, una reducción de 3,5 veces) el volumen del tumor, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el agonista de DR5 solo o con respecto al crecimiento del tumor el primer día de tratamiento o inmediatamente antes del inicio del tratamiento.

10 En una realización adicional, la administración de un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 da por resultado una inhibición del crecimiento tumoral de al menos un 80%, por ejemplo, en relación con el tratamiento con el antagonista de PD-1 o el agonista de DR5 solo o con respecto al crecimiento del tumor el primer día de tratamiento o inmediatamente antes del inicio del tratamiento.

15 En determinadas realizaciones, la administración de un antagonista de PD-1 y un agonista de DR5 reduce la masa tumoral al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90%, 95%, 99 % con respecto a la masa tumoral antes del inicio del tratamiento o el primer día de tratamiento. En alguna realización, la masa tumoral ya no es detectable después del tratamiento como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, un sujeto está en remisión parcial o completa.

20

IX. Kits y formas de dosificación unitarias

En el presente documento también se proporcionan kits que incluyen una composición farmacéutica que contiene (a) un antagonista de PD-1 y (b) un agonista de DR5 y un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad terapéuticamente eficaz adaptada para su uso en los métodos precedentes. El antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, 5C4). El agonista de DR5 es un anticuerpo anti- DR5. Los kits opcionalmente también pueden incluir instrucciones, por ejemplo, que comprenden programas de administración, para permitir que un médico practicante (por ejemplo, un médico, enfermera o paciente) administre la composición contenida en el mismo a un paciente que tiene cáncer. El kit también puede incluir una jeringa.

30

Opcionalmente, los kits incluyen múltiples envases de las composiciones farmacéuticas de dosis única que contienen cada una cantidad eficaz del antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 para una administración única de acuerdo con los métodos proporcionados anteriormente. También pueden incluirse en los kits instrumentos o dispositivos necesarios para administrar la(s) composición(es) farmacéutica(s). Por ejemplo, un kit puede proporcionar una o más jeringas precargadas que contienen una cantidad del antagonista de PD-1 y el agonista de DR5.

35

En una realización, la presente invención proporciona un kit para su uso en un método para tratar el cáncer en un paciente, comprendiendo el kit:

40

- (a) una dosis de un antagonista de PD-1;
- (b) una dosis de un agonista de DR5;

en donde el método comprende administrar el antagonista de PD-1 y el agonista de DR5 en una cantidad terapéuticamente eficaz en los métodos desvelados en el presente documento. El agonista de DR5 es un anticuerpo anti- DR5. El antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, 5C4). En una realización

45

en particular, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15.

50

Los ejemplos siguientes son simplemente ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

55

1. Materiales y métodos

Animales

60

En los estudios se utilizaron ratones C57/BL6 hembra de diez a once semanas de edad (Harlan). Los ratones recibieron comida y agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ambiente controlado según las regulaciones internacionales de la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Laboratorio de Cuidado de Animales (AAALAC). Todos los estudios en animales han sido aprobados por el comité de ética correspondiente y, por lo tanto, se han realizado de conformidad con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores.

65

Anticuerpos

El clon 4H2 de mAb anti-PD-1 de ratón (mAb anti-mPD-1), isotipo IgG1 de ratón lo produjo y purificó Bristol-Myers Squibb (Biologics Discovery, CA). El mAb anti-ratón agonista DR5, el clon MD5-1, isotipo IgG de hámster, se adquirió en BioXCell (West Lebanon, NH). Se certificó que ambos anticuerpos tenían <0,5 UE/mg de endotoxina, pureza > 95 % y <5 % de especies de alto peso molecular. Las soluciones madre del mAb anti-mPD-1 y el anticuerpo anti-mDR5 se mantuvieron a 4 °C antes de su uso. Se prepararon soluciones de dosificación de mAb anti-mPD-1 y mAb anti-mDR5 en solución salina tamponada con fosfato estéril (pH 7,0) y se mantuvieron a 4 °C.

El mAb anti-mPD-1 se administró por vía intraperitoneal a su dosis óptima de 10 mg/kg; mAb anti-DR5 a 5 mg/kg.

Modelo de tumor

La línea tumoral de carcinoma de colon MC38 usada en este estudio se mantuvo *in vitro*. Se implantaron suspensiones celulares en el espacio subcutáneo del flanco de ratones de ratones C57/BL6 hembra (2,0 x10⁶ células MC-38 en 0,2 ml de solución salina equilibrada de Hanks).

El tamaño del tumor y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. El tamaño del tumor (medido en mm³) se calculó multiplicando la longitud del tumor por el cuadrado de la anchura del tumor dividido por 2. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores subcutáneos alcanzaron una mediana del tamaño de 200 mm³ (modelo establecido). La actividad antitumoral, definida como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral, se calculó con la fórmula % de inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI)= 100-[(Tt/To)/(Ct/Co)]/100-(Ct/Co), en la que Tt = mediana del tamaño del tumor del grupo tratado al final del tratamiento, To = mediana del tamaño del tumor del grupo tratado al inicio del tratamiento, Ct = mediana del tamaño tumoral del grupo al final del tratamiento y Co = mediana del tamaño del tumor al principio del tratamiento (véase la Tabla 3). Las regresiones completas se definieron como ausencia de masa tumoral mensurable durante al menos 2 tiempos de duplicación del volumen tumoral.

El criterio de valoración de respuesta tumoral se expresó como el retraso de crecimiento tumoral (valor T-C), calculado como la diferencia en tiempo (días) entre los grupos tratado (T) y control (C) para que el tumor alcance un tamaño objetivo predeterminado. Se consideró un resultado activo un retraso en el alcance del tamaño objetivo por los grupos tratados de > 1 veces el tiempo de duplicación del volumen tumoral. La sinergia terapéutica se definió como un efecto antitumoral en el que la combinación de agentes demostró una superioridad significativa (p <0,05) con relación a la actividad mostrada por cada agente solo.

Se evaluó el efecto antitumoral de una dosis única de mAb anti-DR5 de ratón en combinación con un mAb anti-PD-1 administrado en diversos esquemas de dosis en ratones portadores de tumor que MC-38 (colon murino). Seis días después del implante del tumor, los ratones se clasificaron en ocho grupos de 7 ratones con un volumen tumoral medio de ~ 200 mm³. Los anticuerpos se administraron de acuerdo con los calendarios de dosificación descritos en la Tabla 1.

Tabla 1: Calendario de dosificación

Grupo de tratamiento		n.º de ratones
1: Control		7
2: Control + mAb anti-PD-1; 200 ug/ratón; C4DX3 dosificación iniciada día 6		7
3: Control + mAb anti-PD-1; 200 ug/ratón; C4DX3 dosificación iniciada día 8		7
4: Control + mAb anti-PD-1; 200 ug/ratón; C4DX3 dosificación iniciada día 9		7
5: mAb anti-DR5; 100 ug/ratón; CD + Dosificación de control iniciada el día 8		7
6: mAb anti-DR5; 100 ug/ratón administrados el día 8; CD + mAb anti-PD-1; 200 ug/ratón; Q4Dx3 administrados el día 6		7
7: mAb anti-DR5	100 ug/ratón administrados el día 8; CD + mAb anti-PD-1; 200 ug/ratón; Q4Dx3 administrados el día 8	7
8: mAb anti-DR5	100 ug/ratón administrados el día 8; CD + mAb anti-PD-1; 200 ug/ratón; Q4Dx3 administrados el día 9	7
QD: Una dosis administrada solo un día.		
Q4Dx3: Una dosis administrada cada cuatro días para un total de 3 dosis.		

La combinación del mAb de DR5 y el mAb de PD-1 se analizó de acuerdo con los tres calendarios expuestos en la Tabla 2.

Tabla 2: Calendarios de administración

N.º de grupo:	Calendario de administración
Grupo 6	El mAb de DR5 se administró 2 días después de la terapia con mAb de PD-1.
Grupo 7	El mAb de DR5 y el mAb de PD-1 se administraron el mismo día.
Grupo 8	El mAb de DR5 se administró 1 día antes de la terapia con el mAb de PD-1.

Se planteó la hipótesis de que dado que el mAb de PD-1 induce IFN-gamma, que en los tumores regula por aumento la expresión de DR5 en células tumorales, podría ser ventajoso administrar el mAb de DR5 después de la administración de la terapia con el mAb de PD-1 (Grupo 6). De manera alternativa, se planteó la hipótesis del mAb de DR5 induce la muerte de células tumorales, lo que a su vez dará lugar a respuestas inmunitarias antitumorales y, posteriormente, el mAb PD-1 expandirá la inmunidad antitumoral inducida. Para comprobar esta hipótesis, se administró mAb de DR5 antes del tratamiento con el mAb de PD-1 (Grupo 8).

10 2. Resultados

Tal como se muestra en la Tabla 3, se consiguió al menos un 80 % de inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con una combinación tanto del mAb de DR5 como del mAb de PD1.

15

Tabla 3: Respuestas tumorales

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Calendario (días después del implante)	% de TGI	% Regresiones completas (n.º de ratones totales)
mAb anti-PD-1	10	Días 6, 10, 14	31	0 (0/7)
mAb anti-PD-1	10	Días 8, 12, 16	14	0 (0/7)
mAb anti-PD-1	10	Días 9, 13, 17	-8	0 (0/7)
mAb anti-DR5	5	Día 8	-4	0 (0/7)
mAb anti-PD-1 + mAb anti-DR5	10 5	Días 6, 10, 14 Día 8	96	43 (3/7)
mAb anti-PD-1 + mAb anti-DR5	10 5	Días 8, 12, 16 Día 8	82	14 (1/7)
mAb anti-PD-1 + mAb anti-DR5	10 5	Días 9, 13, 17 Día 8	87	43 (3/7)

Además, tal como se muestra en la figura 1, el volumen tumoral medio (medido en mm³) en ratones tratados con una combinación del mAb de DR5 y el mAb de PD-1 se redujo significativamente, en comparación con los ratones tratados con un control o cualquiera de los agentes solos. Específicamente, se produjo una reducción de aproximadamente 3,5 veces (por ejemplo, una reducción de al menos 3 veces) en el volumen tumoral en ratones tratados con el mAb de DR5 y el mAb de PD-1, en comparación con los ratones tratados con un control o cualquiera de los agentes solos. El volumen tumoral en ratones individuales se muestra en la Figura 2.

20

En resumen, la combinación del mAb DE DR5 y el mAb DE PD-1 da como resultado una actividad aumentada en comparación con la actividad provocada por agentes individuales solos, independientemente del calendario utilizado. Esta sinergia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$, Wilcoxon). De los 3 calendarios de administración probados, se observó una tendencia a una mejor actividad en los grupos que se trataron primero con anti-mDR5 o con anti-mPD-1. Como se muestra en la figura 3, la terapia de combinación fue bien tolerada (sin pérdida significativa de peso corporal). En estudios previos, se observó una pérdida significativa de peso corporal (> 20 %) con dosis múltiples del mAb de DR5 solo o en combinación.

25

30

Por lo tanto, los resultados de este estudio demuestran que un régimen de combinación que incluye una sola dosis de mAb anti-mDR5 y múltiples dosis de mAb PD-1 es bien tolerado y da lugar a una marcada actividad antitumoral.

35

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSKTSGDTFSTYAIISWVRQAPGQGLEWMGGII PIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVS GSPFGMDVWGQGTITVTVSS
2	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc acc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ata ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc
3	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSDTFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPTFG QGTVKVEIK
4	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa
5	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) TYAIS
6	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) GIIPFGKAHYAQKFQ
7	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) KFHFVSGSPFGMDV
8	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) RASQSVSSYLA
9	Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) DASNRAT
10	Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera de mAb anti-PD-L1 (12A4; 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la patente de Estados Unidos n.º 7.943.743) QQRSNWPT

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA
11	<p>Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (región variable subrayada; región constante en negrita)</p> <p><u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGL</u> <u>EWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDT</u> AVYYCATNDDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPPKPDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
12	<p>Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (región variable subrayada; región constante en negrita)</p> <p><u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>YDASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQSSNWPR</u></p>
	<p><u>TFGQGTKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</p> <p>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
13	<p>Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:4 del documento WO 2006/121168)</p> <p><u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV</u> <u>IWYD GSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND</u> <u>DYWGQGLVTVSS</u></p>
14	<p>Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH) de mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:60 del documento WO 2006/121168)</p> <p>cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt aac tct ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca</p>
15	<p>Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:11 del documento WO 2006/121168)</p> <p><u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD</u> <u>ASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQSSNWPR</u><u>TFGQ</u> <u>GTKVEIK</u></p>

ES 2 812 208 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA
16	<p>Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (VL) de mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:67 del documento WO 2006/121168)</p> <p>gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag</p>
	<p>gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac</p> <p>gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa</p>
17	<p>Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada del mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:18 del documento WO 2006/121168)</p> <p>NSGMH</p>
18	<p>Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada del mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:25 del documento WO 2006/121168)</p> <p>VIWYDGSKRYYADSVKG</p>
19	<p>Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada del mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:32 del documento WO 2006/121168)</p> <p>NDDY</p>
20	<p>Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera del mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:39 del documento WO 2006/121168)</p> <p>RASQSVSSYLA</p>
21	<p>Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera del mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:46 del documento WO 2006/121168)</p> <p>DASNRAT</p>
22	<p>Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera del mAb anti-PD-1 (5C4 en el documento WO 2006/121168) (SEQ ID NO:53 del documento WO 2006/121168)</p> <p>QQSSNWPRT</p>
23	<p>Secuencia completa de PD-1 (n.º de acceso en GenBank: U64863)</p> <p>agtttccctt ccgctcacct ccgcctgagc agtggagaag gcggcactct ggtgggggctg ctccaggeat gcagatccca caggcgcctt ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg gctggcggcc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccaccttct tcccagcctt gctcgtggtg</p>

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA
	<p>accgaagggg acaacgccac cttcacctgc agcttctcca acacatcggg gagcttcgtg ctaaactggt accgcatgag ccccagcaac cagacggaca agctggccgc cttccccgag gaccgcagcc agcccggcca ggactgccgc ttccgtgtca cacaactgcc caacgggctg gacttccaca tgagcgtggt cagggccccg cgcaatgaca gcggcaccta cctctgtggg gccatctccc tggcccccaa ggcgcagatc aaagagagcc tgcgggcaga gctcagggtg acagagagaa gggcagaagt gccacagcc caccccagcc cctcacccag gccagccggc cagttccaaa ccctggtggt tgggtgtcgtg ggcggcctgc tgggcagcct ggtgctgcta gtctgggtcc tggccgtcat ctgctcccgg gccgcacgag ggacaatagg agccagggc accggccagc ccctgaagga ggaccctca gccgtgctg tgttctctgt ggactatggg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagcccc ccgtgccctg tgtccctgag cagacggagt atgccacat tgtctttcct agcggaatgg gcacctcatc ccccgccgc aggggctcag ccgacggccc tgggagtgcc cagccactga ggcctgagga tggacactgc tcttggcccc tetgaccggc ttctttggcc accagtgttc tgcagaccct ccacatgag cccgggtcag cgcatttctt caggagaagc aggcagggtg caggccattg caggccgtcc aggggctgag ctgctgggg gcgaccgggg ctccagcctg cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgccac agtgagccca ggcagcaggt gtcaccgtcc cctacagggg gggccagatg cagtactctg ttcaggctct gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc tgetgctgce tgcggccccg ggctgaagge gccgtggccc tgcctgacgc cccggagcct cctgcctgaa cttgggggct ggttggagat ggccttggag cagccaaggt gccctggca gtggcatccc gaaacgcctt ggacgcaggg cccaagactg ggcacaggag tgggaggtac atggggctgg ggactccca ggagttatct gctccctgca ggcctagaga agtttcaggg aaggtcagaa gagctcctgg ctgtggtggg cagggcagga aaccctccc acctttacac atgccagge agcacctcag gccctttgtg gggcagggaa gctgaggcag taagcgggca ggcagagctg gaggcctttc aggccagcca gcaactctggc ctctgcccgc cgcattccac cccagcccct cacaccactc gggagagggg catcctacgg tccaaggtc aggagggcag ggtgggggtt gactcaggcc cctcccagct gtggccacct ggggtgttggg agggcagaag tgcaggcacc tagggcccc catgtgcca ccctgggagc tctccttggg accattcct gaaattattt aaaggggttg gccgggctcc caccagggcc tgggtgggaa ggtacaggcg tccccggg gcctagtacc cccgcgtggc ctatccactc ctacatcca cacactgcac cccactcct ggggcagggc caccagcatc cagggggcca gcaggcacct gagtggctgg gacaaggat ccccctccc tgtggttcta ttatattata attataatta aatatgagag catgct</p>
24	Secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano - precursor de la isoforma a (n.º de acceso en GenBank

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA
	<p>NP_054862.1) MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VVTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDVPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPPEL LAHPPNERH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET</p>
25	<p>Secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano - precursor de la isoforma b (n.º de acceso en GenBank NP_001254635.1) MRIFAVFIFM TYWHLLNAPY NKINQRILVV DPVTSEHELT CQAEGYPKAE VIWTSSDHQV LSGKTTTTNS KREEKLFNVT STLRLNTTTN EIFYCTFRRL DPEENHTAEL VIPPELPLAHP PNERHTLVIL GAILLCLGVA LTFIFRLRKG RMMDVKKCGI QDTNSKKQSD THLEET</p>
26	<p>Secuencia de aminoácidos de DR5 humano (n.º de acceso en GenBank AAC01565.1) MEQRGQNAPA ASGARKRHGP GPREARGARP GLRVPKTLVL VVAAVLLLVLS AESALITQQD LAPQQRVAPQ QKRSSPSEGL CPPGGHISED GRDCISCKYG QDYSTHWNDL LFCLRCTRCD SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRTGC PRGMVKVGDC TPWSDIECVH KESGIIIGVT VAAVVLIVAV FVCKSLLWKK VLPYLKIGCS GGGGDPERVD RSSQRPGAED NVLNEIVSIL QPTQVPEQEM EVQEPAEPTG VNMLSPGESE HLLPEAEER SQRRRLVPA NEGDPTECLR QCFDDFADLV PFDSWEPLMR KLGLMDNEIK VAKAEAAGHR DTLYTMLIKW VNKTGRDASV HTLLDALETL GERLAKQKIE DHLLSSGKFM YLEGNADSAM S</p>

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de Muerte Celular Programada (PD-1) y un agonista de Receptor de Muerte (DR) para su uso en un método de tratamiento de cáncer, en donde el agonista de DR es un anticuerpo anti-DR5 y el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende
- 5
- (i) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15; o
- 10
- (ii) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente; o
- 15
- (iii) las regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 13 y 15, respectivamente; o
- (iv) las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente,
- 20
- en donde el anticuerpo anti-DR5 y el anticuerpo anti-PD-1 se van a administrar en una cantidad que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.
2. Un antagonista de PD-1 para su uso en un método de tratamiento de cáncer, en donde el método comprende además la administración de un agonista de DR, en donde el agonista de DR es un anticuerpo anti-DR5 y el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende
- 25
- (i) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15; o
- 30
- (ii) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente; o
- 35
- (iii) las regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 13 y 15, respectivamente; o
- (iv) las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente,
- 40
- en donde el anticuerpo anti-DR5 u el anticuerpo anti-PD-1 se van a administrar en una cantidad que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.
3. Un agonista de DR para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende además la administración de un antagonista de PD-1, en donde el agonista de DR es un anticuerpo anti-DR5 y el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende
- 45
- (i) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15; o
- 50
- (ii) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 17, 18 y 19, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente; o
- 55
- (iii) las regiones variables de las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 13 y 15, respectivamente; o
- (iv) las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente,
- en donde el anticuerpo anti-DR5 y el anticuerpo anti-PD-1 se van a administrar en una cantidad que inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.
- 60
4. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo anti-DR5 se selecciona de Lexatumumab, Tigatuzumab, Conatumumab, Drozitumab, HGSTR2J/KMTRS y LBY-135.
- 65
5. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo anti-PD1 es nivolumab.

6. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde
- 5 (i) la administración del antagonista de PD-1 y el agonista de DR reduce la masa tumoral al menos un 50 %, en particular, en al menos el 80 %; o
- (ii) la administración del antagonista de PD-1 y el agonista de DR da por resultado una inhibición del crecimiento tumoral de al menos un 80 %; o
- 10 (iii) el tratamiento produce al menos un efecto terapéutico seleccionado de una reducción del tamaño de un tumor, una reducción del número de lesiones metastásicas a lo largo del tiempo, respuesta completa, respuesta parcial y enfermedad estable.
7. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el antagonista de PD-1 y el agonista de DR se formulan para la administración intravenosa.
- 15 8. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde
- 20 (i) el antagonista de PD-1 se va a administrar antes de la administración del agonista de DR; o
- (ii) el agonista de DR se va a administrar antes de la administración del antagonista de PD-1; o
- (iii) el agonista de DR y el antagonista de PD-1 se van a administrar de forma simultánea.
9. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cáncer es un cáncer seleccionado de entre leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma.
- 25 10. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cáncer se selecciona de entre leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph +), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfoma nasal de células T, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC).
- 30 35 11. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el método para tratar el cáncer comprende además la administración de un agente terapéutico adicional, en particular un agente terapéutico adicional seleccionado de una citotoxina y un agente quimioterapéutico.
- 40 12. El antagonista de PD-1 y/o el agonista de DR para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sujeto que se va a tratar es un ser humano.
- 45 13. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de PD-1 y un agonista de DR tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso en un método de tratamiento del cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
15. Un kit para su uso en un método de tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el kit:
- (a) una dosis de un antagonista de PD-1;
- (b) una dosis de un agonista de DR;
- 55 en donde el antagonista de PD-1 y el agonista de DR son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz adaptada para su uso en un método de tratamiento del cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

Mediana del volumen tumoral

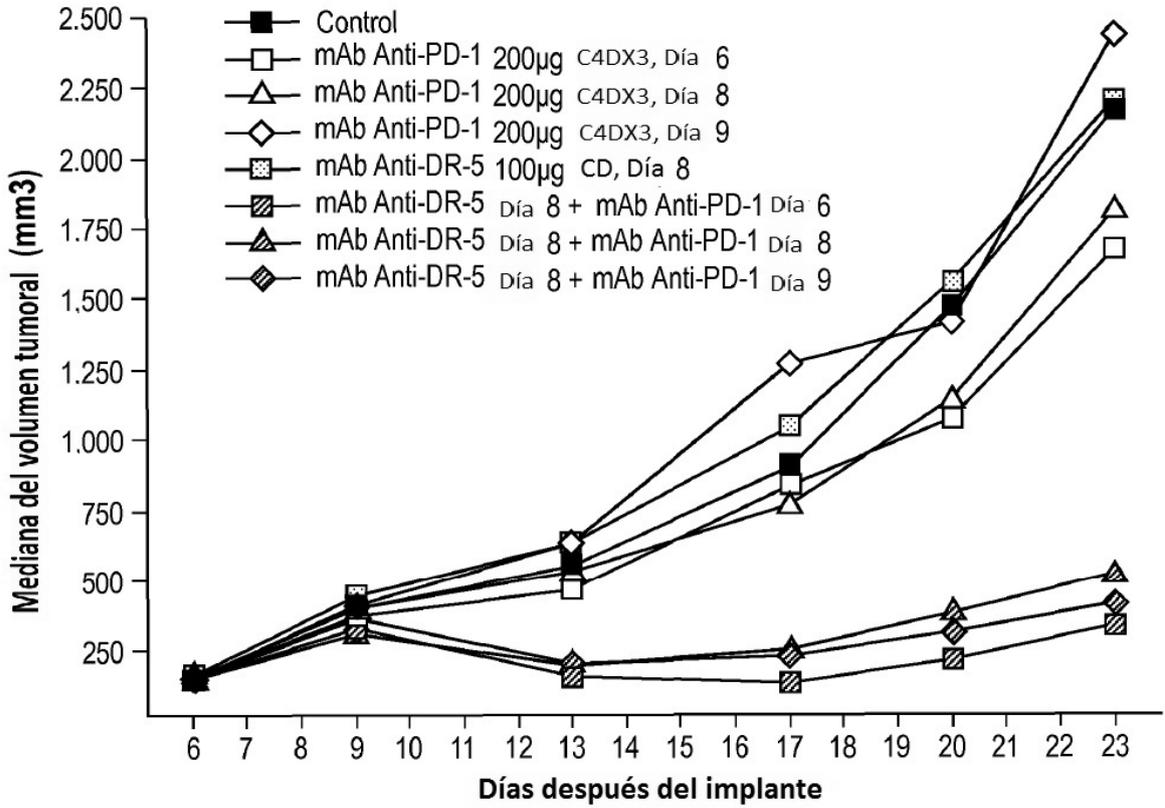


Fig. 1

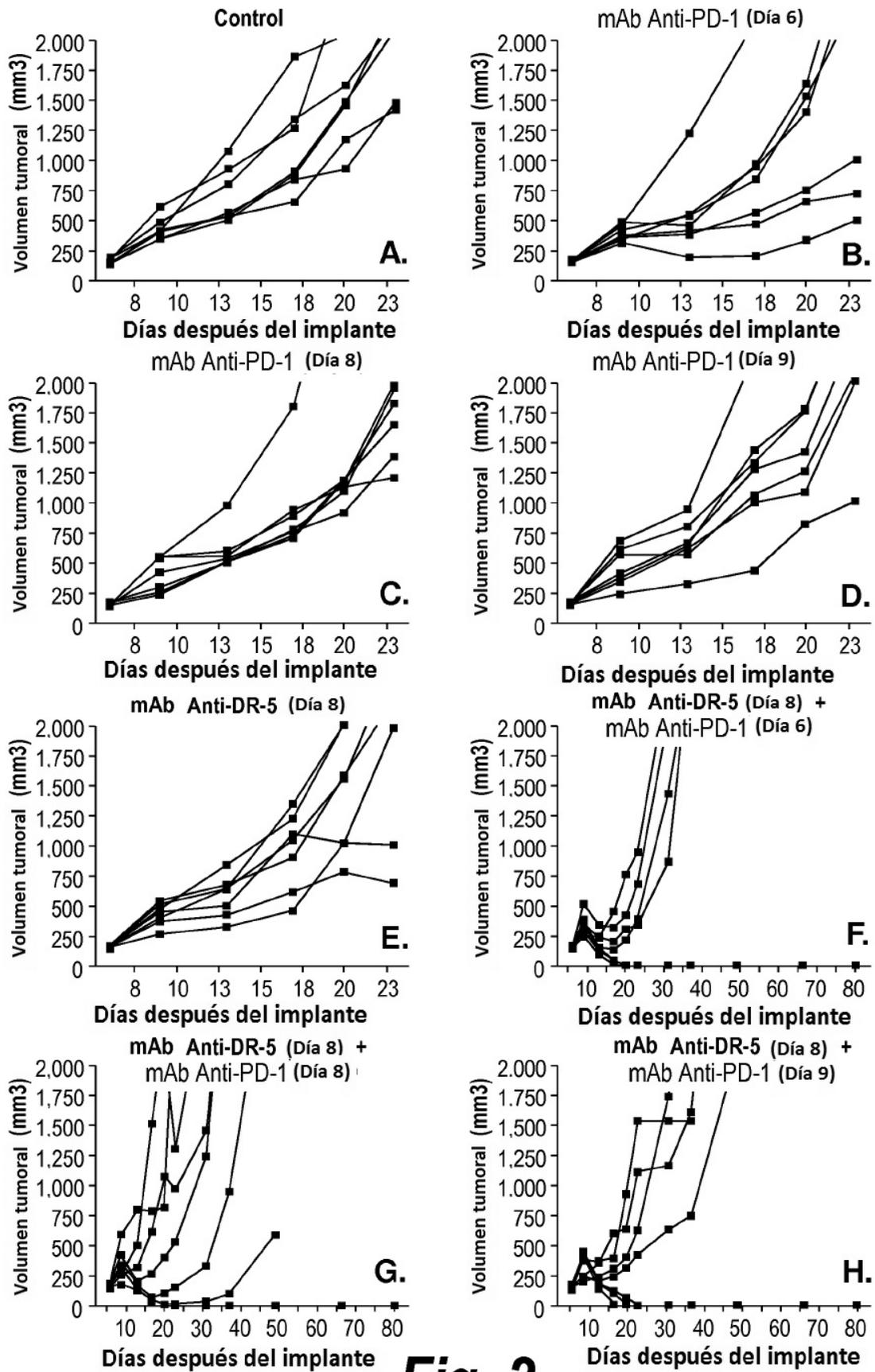


Fig. 2

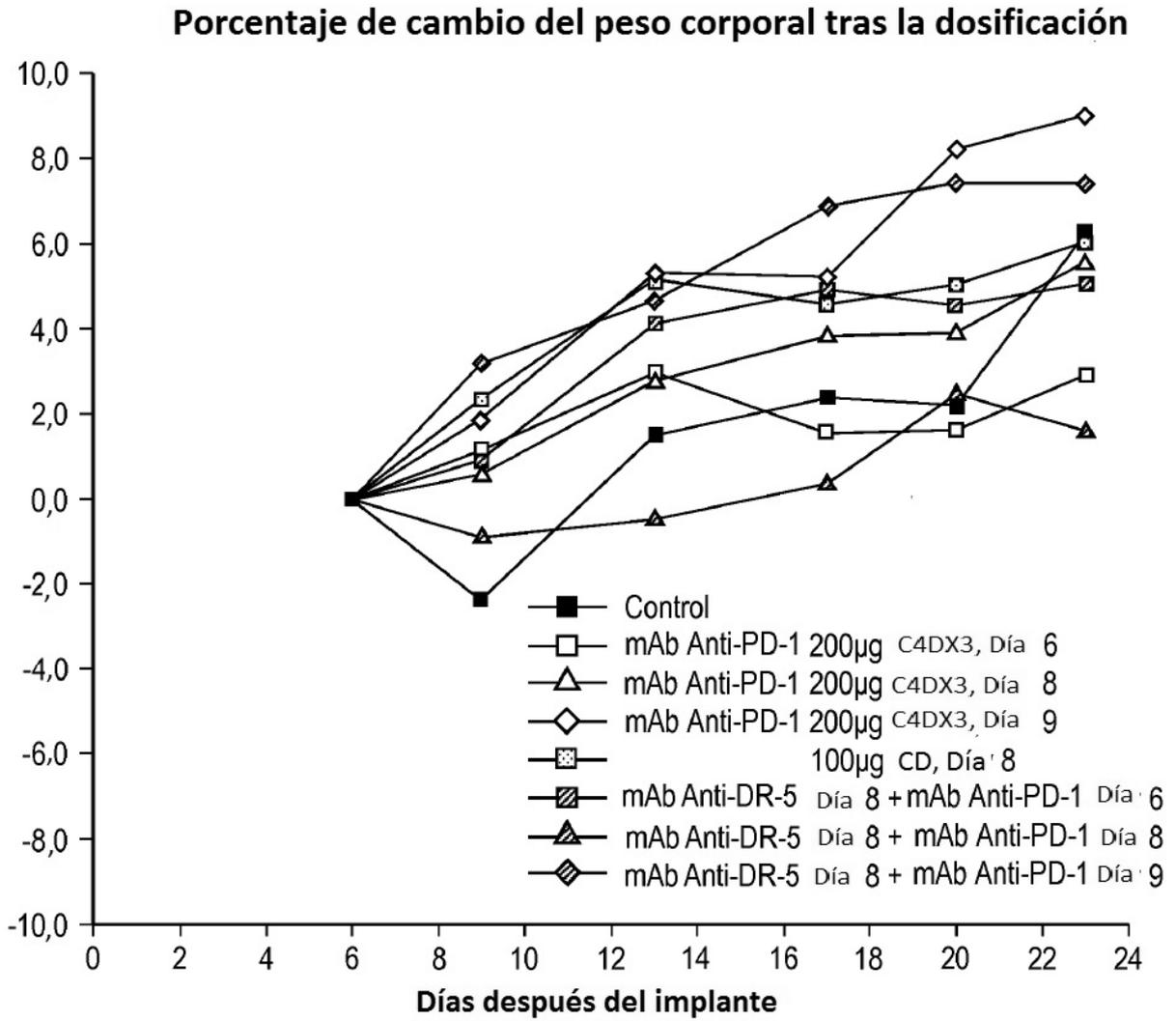


Fig. 3