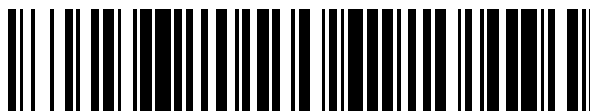


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 568**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/385** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2009 E 09701364 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2227296**

54 Título: **Combinación de anticuerpo anti-CTLA4 con agentes moduladores de la tubulina para el tratamiento de enfermedades proliferativas**

30 Prioridad:

**08.01.2008 US 19778 P**

**29.05.2008 US 56957 P**

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

**05.02.2016**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)  
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD  
PRINCETON, NJ 05843-4000, US**

72 Inventor/es:

**JURE-KUNKEL, MARIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 558 568 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 anticuerpo anti-CTLA4 con agentes moduladores de la tubulina para el tratamiento de enfermedades proliferativas

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la oncología y de regímenes terapéuticos mejorados.

**10 Antecedentes de la invención**

El Instituto Nacional del Cáncer ha estimado que en Estados Unidos, 1 de cada 3 personas padecerá 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.

15

Debido a la amplia variedad de cánceres que se observan en la actualidad se han desarrollado numerosos agentes antineoplásicos para destruir el cáncer dentro del cuerpo. Estos compuestos se administran a pacientes de cáncer con el objetivo de destruir o, de otro modo, inhibir el crecimiento de células malignas sin alterar las células sanas normales. Los agentes antineoplásicos se han clasificado en función de su mecanismo de acción.

20

Un tipo de agente quimioterapéutico se denomina complejo de coordinación metálico. Se cree que este tipo de agente quimioterapéutico forma, principalmente, reticulaciones intercatenarias de ADN en los núcleos de las células, de modo que se evita la replicación celular. Como resultado, inicialmente se reprime el crecimiento tumoral y después se invierte. Otro tipo de agente quimioterapéutico se denomina agente alquilante. Estos compuestos funcionan insertando composiciones o moléculas extrañas en el ADN de las células cancerosas en división. Como resultado de estos restos extraños se alteran las funciones normales de las células cancerosas y se evita la proliferación. Otro tipo de agente quimioterapéutico se denomina agente antineoplásico. Este tipo de agente evita, mata o bloquea el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas. Otros tipos más de agentes anticancerosos incluyen inhibidores no esteroideos de la aromataasa, agentes alquilantes bifuncionales etc.

25

30

La quimioinmunoterapia, la combinación de agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, es un nuevo abordaje para el tratamiento del cáncer que combina los efectos de agentes que atacan directamente a las células tumorales que eroticen necrosis o apoptosis de las células tumorales, y agentes que modulan las respuestas inmunitarias del huésped al tumor. Los agentes quimioterapéuticos podrían potenciar el efecto de la inmunoterapia generando antígenos tumorales para su presentación por las células presentadoras de antígeno de modo que se crea una vacuna de células tumorales "polivalente" y distorsionando la arquitectura tumoral, de modo que se facilita la penetración de los agentes inmunoterapéuticos, así como la población inmunitaria expandida.

35

40

Ipilimumab es un anticuerpo humano anti-CTLA-4 humano que bloquea la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86 expresados sobre las células presentadoras de antígeno, bloqueando de este modo la regulación por disminución negativa de las respuestas inmunitarias provocadas por la interacción de estas moléculas. Dado que ipilimumab no reconoce los anticuerpos CTLA-4 de ratón y CTLA-4 anti-ratón (clon UC10-4F10) se usó en los estudios presentados en el presente documento para investigar el efecto del bloqueo de CTLA-4 con agentes quimioterapéuticos.

45

Los agentes estabilizantes de microtúbulos, tales como ixabepilona (IXEMPRA™) y paclitaxel (TAXOL®), habitualmente se usan para el tratamiento de muchos tipos de cáncer y representan una atractiva clase de agentes para combinar con el bloqueo de CTLA-4.

50

El documento WO 2007/113648 A describe el uso de un anticuerpo anti-CTLA4 para el tratamiento del cáncer en un paciente que recibe un agente quimioterapéutico. No describe específicamente la combinación de ipilimumab e ixabepilona.

55

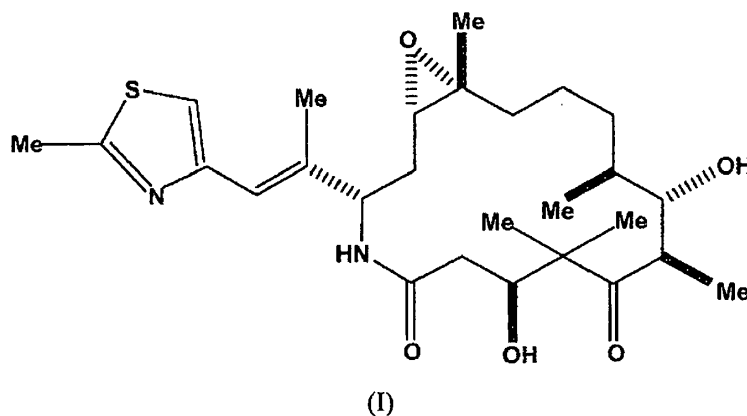
En los estudios descritos en el presente documento se investigó la combinación de agentes estabilizantes de microtúbulos y bloqueo de CTLA-4 en varios modelos de tumores murinos con diferente sensibilidad a cada agente.

60

Los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un agente modulador de microtúbulos con un inhibidor anti-CTLA-4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas. Es un objeto de la invención proporcionar regímenes de tratamiento quimioterapéutico combinados eficaces, en los que uno o más agentes moduladores de microtúbulos se combinan con uno o más agentes anti-CTLA4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un agente antiproliferativo y al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, incluyendo el cáncer, que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad sinérgicamente, terapéuticamente, eficaz de 1) al menos un agente anti-CTLA-4 y 2) un agente antiproliferativo, en el que el agente antiproliferativo es un compuesto de fórmula I:



10 y en el que el o los agentes anti-CTLA-4 es ipilimumab. De este modo, la presente invención proporciona un método sinérgico para el tratamiento de enfermedades antiproliferativas, incluido el cáncer.

Como se sabe en la técnica, ixabepilona se refiere al compuesto que tiene la estructura de fórmula (I).

15 El compuesto (1) también puede denominarse (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona de conformidad con la nomenclatura IUPAC. El uso del término "(1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona" engloba (a menos que se indique lo contrario) solvatos (incluidos hidratos) y formas polimórficas del compuesto (I) o sus sales, tales como las formas de (I) descritas en la patente de Estados Unidos n.º 6.605.599, expedida el 12 de agosto de 2003. Las composiciones farmacéuticas de (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona es IXEMPRA™ (Bristol-Myers Squibb Company). IXEMPRA™ comprende (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona como el ingrediente activo, también denominado ixabepilona, para la infusión IV que incluye ingredientes inactivos en forma de un diluyente que consiste en un aceite de ricino polioxoetilado estéril apirógeno al 52,8 % (p/v) y alcohol deshidratado al 30,8 % (p/v) USP.

Se entiende que la frase "agente modulador de la microtubulina" se refiere a los agentes que estabilizan la microtubulina o desestabilizan la síntesis y/o polimerización de microtubulina.

35 El agente antagonista anti-CTLA4 es MDX-010 (ipilimumab). MDX-010 es una anticuerpo monoclonal humano 10D1 (también denominado MDX-010e ipilimumab y disponible de Medarex, Inc., Bloomsbury, NJ) y se divulga en el documento WO 01/14424.

40 El agente antagonista anti-CTLA4 se puede administrar solo o en combinación con un antígeno peptídico (por ejemplo, gp100) además del agente antiproliferativo.

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica para el tratamiento sinérgico del cáncer, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un (1) agente antiproliferativo y (2) el antagonista anti-CTLA4.

45 En una forma de realización preferida de la invención, el agente anti-CTLA4 se administra simultáneamente con o antes o después de la administración de un compuesto de Fórmulas I, II, III, IIIa, y/o IV o análogos de los mismos.

## Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 muestra la actividad antitumoral del AcMo CTLA-4 en combinación con ixabepilona en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón de tumor murino M109. Como se muestra, se observó sinergia con la

combinación del anticuerpo anti-CTLA-4 e ixabepilona.

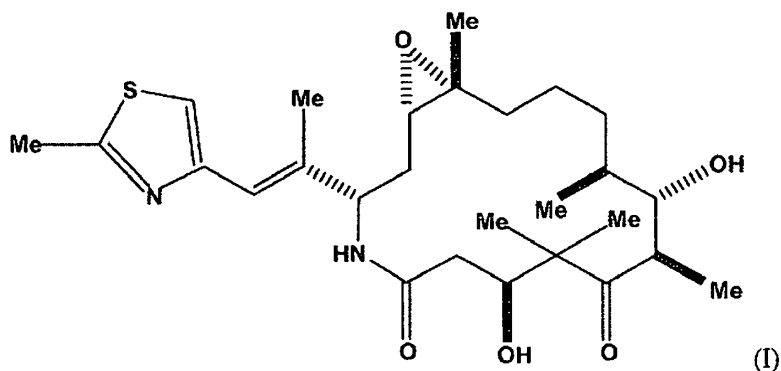
La Figura 2 muestra la actividad antitumoral del AcMo CTLA-4 en combinación con paclitaxel e ixabepilona en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de colon CT-26 murino. Como se muestra, se observó la sinergia tanto con la combinación de anticuerpos anti-CTLA-4 e ixabepilona, así como con la combinación de anticuerpos anti CTLA-4-anticuerpo y paclitaxel.

La Figura 3 muestra que el tratamiento con anticuerpos CTLA-4 y anticuerpos CTLA-4 más ixabepilona daba como resultado un aumento del número de células T  $CD8^+CD107^+$  2 días después del tratamiento, así como un efecto más persistente 7 días después del tratamiento en relación con los anticuerpos CTLA-4 o ixabepilona de forma individual.

La figura 4 muestra que el tratamiento con el AcMo CTLA-4 daba como resultado un aumento del número de células T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  activadas ( $CD4^+CD69^+$ ;  $CD8^+CD69^+$ ) y que la adición de ixabepilona o paclitaxel al tratamiento con AcMo CTLA-4 no alteraba la expansión de las células T activadas producidas por el tratamiento con el AcMo CTLA-4 2 días después del tratamiento.

## 15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un agente antiproliferativo y al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, incluyendo el cáncer, que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad sinérgicamente, terapéuticamente, eficaz de 1) al menos un agente anti-CTLA-4 y 2) un agente antiproliferativo, en el que el agente antiproliferativo es un compuesto de fórmula I:



y en el que el o los agentes anti-CTLA-4 es ipilimumab.

La activación óptima de las células T requiere la interacción entre el receptor de las células T y el antígeno específico Bretscher, P. et al., Science, 169:1042 – 1049 (1970)) (la primera señal) y el acoplamiento de los receptores co-estimuladores sobre la superficie de las células T con los ligandos coestimuladores expresados por la célula presentadora de antígeno (CPA) (APC) (la segunda señal)- El fracaso de la célula T para recibir una segunda señal puede conducir a anergia clonal (Schwartz, RH, Science, 248: 1349 hasta 1356 (1990)). Dos importantes receptores coestimuladoras de células T son CD28 y el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, CD152) cuyos ligandos sobre la CPA son B7-1 y B7-2 (Linsley, P.S. et al., J. Exp. Med., 173:721 – 730 (1991); Linsley, P.S. et al., J. Exp. Med., 174:561 – 569 (1991)). Aunque CD28 y CTLA-4 son miembros estrechamente relacionados de la superfamilia de Ig (Brunet, J.F. et al., Nature, 328:267 – 270 (1987)), funcionan de forma antagónica. El CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T (Gross, J.A. et al., J. Immunol., 149:380 – 388 (1992)) y, tras el acoplamiento con B7-1 o B7-2, mejora la señal receptor de células T-péptido-Sígnal de MHC para estimular la activación de células T, la proliferación y la producción de IL-2 (Linsley, P.S. et al., J. Exp. Med., 173:721 – 730 (1991); Alegre, M.L. et al., Nat. Rev. Immunol (2002)). CTLA-4 no se encuentra en las células T en reposo, pero se regula por aumento durante 2 - 3 días después de la activación de las células T (Lindsten, T. et al., J. Immunol, 151:3489 – 3499 (1993), Walunas, T. L. et al., Immunity, 1:405 – 413 (1994)). CTLA-4 también se une a B7-1 y B7-2, pero con mayor afinidad que CD28 (Linsley, P.S. et al., Immunity, 1:793 – 801 (1994)) y antagoniza la activación de células T, interfiere con la producción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 e interrumpe la progresión del ciclo celular de las células T activadas (Walunas, T. L. et al., J. Exp. Med., 183:2541 – 2550 (1996); Krummel, M. F. et al., J. Exp. Med., 183:2533 – 2540 (1996); Brunner, M. C. et al., J. Immunol., 162:5813 – 5820 (1999); Greenwald, R. J. et al., Eur. J. Immunol., 32:366 – 373 (2002)). La respuesta global de las células T se determina mediante la integración de todas las señales, estimuladoras e inhibitoras.

Debido a que CTLA-4 parece socavar la activación de las células T, se han hecho intentos para bloquear la actividad de CTLA-4 en modelos murinos de la inmunoterapia del cáncer. En ratones a los que se ha implantado tumores inmunogénicos, la administración de Ac anti-CTLA-4 mejora el rechazo del tumor (Leach, D. R. et al., Science, 271:1734 – 1736 (1996)), aunque se ha observado poco efecto con los tumores poco inmunogénicos, tales como el carcinoma mamario SM1 o el melanoma B16. Se observó una inmunidad antitumoral potenciada cuando se administró él Ac anti-CTLA4 con la vacuna de células B16 transducida con el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y se asoció con despigmentación, lo que sugiere al menos parte de la respuesta antitumoral

era específica de antígeno contra antígenos "propios" de diferenciación de melanocitos (van Elsas, A. et al., J. Exp. Med., 190:355 – 366 (1999); van Elsas, A. et al., J. Exp. Med., 194:481 – 489 (2001)). En un modelo murino transgénico de cáncer de próstata primario, la administración de células de cáncer de próstata que expresan Ac anti-CTLA-4 y GM-CSF redujo la incidencia y la gravedad histológica del cáncer de próstata y condujo a prostatitis en ratones normales, lo que de nuevo sugiere una respuesta inmunitaria específica de antígenos contra antígenos propios en el rechazo del tumor (Hurwitz, A. A. et al., Cancer Res., 60:2444 – 2448 (2000)). Adicionalmente, debido a que muchos antígenos tumorales humanos son autoantígenos normales, romper la tolerancia contra lo propio puede ser fundamental para el éxito de la inmunoterapia del cáncer. Las respuestas tumorales favorables del bloqueo de CTLA-4 junto con vacunas tumorales en modelos murinos llevaron al interés en el uso de bloqueo de CTLA-4 en la inmunoterapia del cáncer humano.

La quimioinmunoterapia, la combinación de agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, es un nuevo abordaje para el tratamiento del cáncer que combina los efectos de agentes que atacan directamente a las células tumorales que eroticen necrosis o apoptosis de las células tumorales, y agentes que modulan las respuestas inmunitarias del huésped al tumor. Los agentes quimioterapéuticos podrían potenciar el efecto de la inmunoterapia generando antígenos tumorales para su presentación por las células presentadoras de antígeno de modo que se crea una vacuna de células tumorales "polivalente" y distorsionando la arquitectura tumoral, de modo que se facilita la penetración de los agentes inmunoterapéuticos, así como la población inmunitaria expandida.

Los agentes moduladores de microtubulina agonizan o inhiben la capacidad de las células para mantener los acoplamientos adecuados de la microtubulina. En el caso de paclitaxel (comercializado como TAXOL®) provoca anomalías en la mitosis y su detención, y estimula el ensamblaje de los microtúbulos en estructuras agregadas estables con calcio estable que dan lugar a la replicación celular.

Los epotilonas imitan los efectos biológicos de TAXOL®, (Bollag et al., Cancer Res., 55:2325 – 2333 (1995), y en los estudios de competición actúan como inhibidores competitivos de la unión de TAXOL® a los microtúbulos. No obstante, las epotilonas disfrutaban de una ventaja significativa sobre el TAXOL® en cuanto a que las epotilonas exhiben una disminución mucho menor de la potencia en comparación con TAXOL® frente a una línea celular resistente a múltiples fármacos (Bollag y col. (1995)). Además, las epotilonas son exportadas desde las células por la P-glicoproteína con considerablemente menos eficiencia que el TAXOL® (Gerth y col. (1996)).

La ixabepilona es un análogo de lactama semisintético de patupilona que se une a la tubulina y estimula la polimerización de la tubulina y la estabilización de los microtúbulos, deteniendo de ese modo las células en la fase G2/M del ciclo celular e induciendo la apoptosis de las células tumorales.

Por lo tanto, el compuesto de Fórmula I se administra en combinación con el uno o más agentes anti-CTLA4 en un método terapéutico. El agente antiproliferativo, cuando se utiliza en combinación con el al menos un agente anti-CTLA4, demuestra actividad antitumoral/citotóxica superior.

Se contemplan todos los estereoisómeros de los compuestos de fórmula I de la presente invención, bien en mezcla o en forma pura o sustancialmente pura. La definición de los compuestos de fórmula I abarca todos los estereoisómeros posibles y sus mezclas. Las definiciones de Fórmula I abarcan muy particularmente las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados que tienen la actividad especificada.

La combinación del al menos compuesto antiproliferativo con el al menos un agente anti-CTLA4, también puede incluir la adición de un agente citotóxico antiproliferativo. Las clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos antiproliferativos incluyen los siguientes:

agentes alquilantes (incluyendo, sin limitaciones, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CYTOXAN®), ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromán, trietileno - melamina, trietilentiófosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina, y temozolomida.

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

Productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfoquinas y epipodofilotoxinas): vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, Ara-C, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL®), mitramicina, desoxico-formicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- $\alpha$ ), etopósido, y tenipósido.

Otros agentes citotóxicos antiproliferativos son navelbena, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

La combinación del al menos compuesto antiproliferativo con el al menos un agente anti-CTLA4, también puede incluir la adición de un agente citotóxico antiproliferativo solo o en combinación con radioterapia.

5 La combinación de la presente invención también se puede usar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad concreta contra la afección que se está tratando.

La frase "radioterapia" incluye los rayos X o los rayos gamma que se liberan desde una fuente aplicada externamente, tal como un haz, o mediante la implantación de pequeñas fuentes radiactivas.

10 Un agente que afecta a los microtúbulos interfiere con la mitosis celular y son bien conocidos en la técnica por su actividad citotóxica antiproliferativa. Los agentes que afectan a los microtúbulos incluyen alocolchicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolastatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, NSC 125973), derivados de TAXOL<sup>®</sup> (por ejemplo, derivados (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina NSC 361792), tritilo cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas, que incluyen epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, desoxiepotilona A, desoxiepotilona B, [1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]]-7-11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentarnetil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17 oxabicyclo [14.1.0]heptadecano-5,9-diona (divulgado en la patente de Estados Unidos 6.262.094, expedida el 17 de julio de 2001), [1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*11R\*,12R\*,16S\*]]-3-[2-[2-(aminometil)-4-tiazolil]-1-metiletetil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4-17-dioxabicyclo[14.1.0]-heptadecano-5,9-diona (divulgado en la el documento USSN 09/506.481 presentada el 17 de febrero de 2000, y los ejemplos 7 y 8 del presente documento), y derivados de los mismos; y otros agentes que alteran los microtúbulos. Agentes antineoplásicos adicionales incluyen, discodermolida (véase Service, Science, 274:2009 (1996)) estramustina, nocodazol, MAP4, y similares. Ejemplos de tales agentes también se describen en la literatura científica y de patentes, véase, por ejemplo, Bulinski, J. Cell-Sci., 110:3055 – 3064 (1997); Panda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:10560 – 10564 (1997); Muhrad, Cancer Res., 57:3344 – 3346 (1997); Nicolaou, Nature, 387:268 – 272 (1997); Vasquez, Mol. Biol. Cell., 8:973 – 985 (1997); Panda, J. Biol Chem., 271:29807 – 29812 (1996).

30 En los casos en los que es deseable hacer que las células de proliferación aberrante estén en reposo junto con o antes del tratamiento con los métodos descritos en el presente documento, también se pueden administrar al paciente hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17a-etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, zoladex.

35 También son adecuados para su uso en métodos quimioterapéuticos de combinación descritos en el presente documento antiangiogénicos, tales como inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, y también se incluyen otros inhibidores de VEGF, tales como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU6668. También se pueden usar anticuerpos anti-Her2 de Genentech. Un inhibidor de EGFR adecuado es EKB-569 (un inhibidor irreversible). También se incluye el anticuerpo Imclone C225 anticuerpo inmunoespecífico para el EGFR, y los inhibidores de src.

45 Un ejemplo de un agente citostático antiproliferativo es CASODEX<sup>®</sup>, que hace que los carcinomas dependientes de andrógenos sean proliferativos. Otro ejemplo más de un agente citostático es el antiestrógeno Tamoxifeno, que inhibe la proliferación o el crecimiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos. Los inhibidores de la transducción de señales proliferativas celulares son agentes citostáticos. Son ejemplos los inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de la Meek-1 quinasa, inhibidores de la MAPK quinasa, inhibidores de PI3, inhibidores de la Src quinasa e inhibidores de PDGF.

50 Como se ha mencionado, ciertos agentes antiproliferativos son agentes antiangiogénicos y anti vasculares e, interrumpiendo el flujo de sangre a los tumores sólidos, convierte a las células cancerosas en quiescentes al privarlas de nutrición. También se puede usar la castración, que también hace que los carcinomas dependientes de andrógenos sean no proliferativos. La inanición por medios distintos de la interrupción quirúrgica del flujo sanguíneo es otro ejemplo de un agente citostático. Una clase de agentes citostáticos anti vasculares son las combretastatinas. 55 Otros agentes citostáticos de ejemplos incluyen inhibidores de la MET quinasa, inhibidores de la MAP quinasa, inhibidores de las tirosina quinasa receptoras y no receptoras, inhibidores de la señalización de integrinas e inhibidores de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina.

60 Por tanto, la combinación de la presente invención proporciona el tratamiento sinérgico de diversos cánceres, incluidos los siguientes: carcinoma, incluido el de vejiga urinaria (incluido el cáncer de vejiga urinaria acelerado y metastático), de mama, de colon (incluido el cáncer colorrectal), renal, hepático, pulmonar (incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y el adenocarcinoma pulmonar), de ovarios, de próstata, de testículos, del tracto genitourinario, del sistema linfático, de recto, de laringe, de páncreas (incluido el carcinoma pancreático exocrino), de esófago, de estómago, de vesícula biliar, de cuello uterino, de tiroides y de piel (incluido el carcinoma de células escamosas) ; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin,

linfoma de células peludas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielóide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso periférico y central, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluidos melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma; melanoma, melanoma maligno irresecable en estadio III o IV, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, 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, cáncer de huesos, tumores óseos, histiocitoma fibroso maligno del adulto óseo; histiocitoma fibroso maligno de la infancia óseo, sarcoma, pediátrico, asesino natural nasosinusal, neoplasias, neoplasia de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neuroblastoma; tumor de células germinales testiculares, melanoma intraocular, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mieloproliferativas/mielodisplásicas, sarcoma sinovial, leucemia mielóide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph +), mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado a mastocitosis, y cualquier metástasis de los mismos. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en seres humanos, así como mastocitoma de perro y algunos subtipos raros como mastocitosis ampollosa, eritrodérmica y telangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado a mastocitosis, leucemia de mastocitos, además de otros tipos de cáncer. Otros tipos de cáncer también se incluyen dentro del alcance de los trastornos que incluyen los siguientes: carcinoma, incluido el de vejiga urinaria, carcinoma urotelial, de mama, de colon, renal, hepático, pulmonar, de ovarios, de páncreas, de estómago, de cuello uterino, de tiroides, de testículos, en particular seminomas testiculares, y de piel; incluido carcinoma de células escamosas; tumores estromales gastrointestinales ("GIST"); tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, incluida leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células peludas, y linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluidos melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosos resistentes a quimioterapia y sarcoma de Kaposi, y cualquier metástasis de los mismos.

Lo más preferentemente, la combinación de invención se usa para tratar los cánceres acelerados y metastásicos de la vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y cáncer de mama.

En una realización preferida de la presente invención, se proporciona la combinación para el tratamiento sinérgico de tumores cancerosos. Ventajosamente, la combinación sinérgica de la presente invención reduce el desarrollo de tumores, reduce la carga tumoral, o produce la regresión del tumor en un huésped mamífero.

Los expertos en la técnica conocen los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos. Además, la administración se describe en la literatura estándar.

Por ejemplo, la administración de muchos agentes quimioterapéuticos se describe en Physicians' Desk Reference (PDR), por ejemplo edición de 1996 (Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645 – 1742, EE.UU.).

El compuesto de la Fórmula I es útil en diversas formas de sal farmacéuticamente aceptables. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las formas de sal que serían evidentes para el químico farmacéutico, es decir, aquellas que son sustancialmente no tóxicas y que proporcionan las propiedades farmacocinéticas, de palatabilidad, absorción, distribución, metabolismo o excreción deseadas. Otros factores, más prácticos en la naturaleza, que también son importantes en la selección, son los costes de las materias primas, la facilidad de cristalización, el rendimiento, la estabilidad, la higroscopicidad y fluidez del fármaco a granel resultante. Convenientemente, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse a partir de los ingredientes activos o sus sales farmacéuticamente aceptables en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I que son adecuados para su uso en la combinación y las composiciones de la presente invención incluyen sales formadas con varios ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como cloruro de hidrógeno, ácido hidroximetano sulfónico, bromuro de hidrógeno, ácido metanosulfónico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfámico, ácido glicólico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido málico, ácido pámico, ácido sulfanílico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido fumárico, ácido toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido oxálico, ácido isetónico, e incluyen diversas otras sales farmacéuticamente aceptables, tales

como, por ejemplo, nitratos, fosfatos, boratos, tartratos, citratos, succinatos, benzoatos, ascorbatos, salicilatos, y similares. Los cationes, tales como iones de amonio cuaternario, se contemplan como contraiones farmacéuticamente aceptables para restos aniónicos.

5 Las sales preferidas de los compuestos de fórmula I incluyen sales de clorhidrato, sales de ácido metanosulfónico y sales de ácido trifluoroacético. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula I pueden formarse con metales alcalinos, tales como sodio, potasio y litio; metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; bases orgánicas tales como diciclohexilamina, tributilamina, y piridina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar por métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales se preparan haciendo reaccionar la base o ácido libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido o base inorgánico u orgánico formador de la sal deseada, en un disolvente adecuado o combinación de disolventes.

15 Como se sabe en la técnica, ipilimumab se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4, y es un anticuerpo IgG<sub>1k</sub> completamente humano derivado de ratones transgénicos que tienen genes humanos que codifican cadenas pesadas y ligeras para generar un repertorio humano funcional. También se puede hacer referencia a ipilimumab por su número de registro CAS 477202-00 - 9, y se divulga como anticuerpo 10DI en la publicación PCT n.º WO01/14424. Específicamente, ipilimumab describe un anticuerpo monoclonal humano o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CTLA4, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N.º de unión al antígeno, y que comprende una región de cadena pesada compuesta por la SEC ID N.º 6. Las composiciones farmacéuticas de ipilimumab incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden ipilimumab y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Ejemplos de una composición farmacéutica que comprende ipilimumab se proporcionan en la publicación PCT n.º WO2007/67959. Impilimumab se puede administrar por vía I.V.

**Región variable de la cadena ligera para impilimumab:**

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS  
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK  
(SEC ID N.º : 1)

30 **Región variable de la cadena pesada para impilimumab:**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS  
YDGNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLG  
PFDYWGQGLTVTVSS (SEC ID N.º : 2)

35 Como se ha señalado en otra parte en el presente documento, la administración del uno o más antagonistas anti-CTLA4 se puede administrar solo o en combinación con un antígeno peptídico (por ejemplo, gyp100), además del agente antiproliferativo divulgado en el presente documento. Un ejemplo de un antígeno peptídico sería un péptido gp100 que comprende, o, como alternativa que consiste en, la secuencia seleccionada del grupo que consiste en: IMDQVPFSV (SEC ID N.º 3) y YLEPGPVTV (SEC ID N.º 4). Tal péptido puede administrarse por vía oral, o preferiblemente mediante inyección s.c., a 1 mg emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) inyectado s.c. en una extremidad, y 1 mg del mismo péptido o uno diferente emulsionado en IFA puede inyectarse en otra extremidad.

45 La presente invención también abarca una composición farmacéutica útil en el tratamiento del cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las combinaciones de la presente invención, con o sin vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones se pueden administrar por vía oral o parenteral, incluidas las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

50 Para uso oral, las composiciones de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables o sellos, o en forma de soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar, y normalmente se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los vehículos útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar. Cuando se usan suspensiones acuosas para administración oral,



normalmente se añaden agentes emulsionantes y/o de suspensión.

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.

Para preparar supositorios, 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 mediante, por ejemplo, agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes de tamaño conveniente y se dejan enfriar y, de este modo, solidificar.

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.

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

Las preparaciones sólidas 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.

El compuesto de Fórmula I, así como el agente anti-CTLA4 también se pueden administrar por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tomar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones, y se pueden incluir en un parche transdérmico de la matriz o un tipo reservorio como los convencionales en la técnica para este fin.

Las combinaciones de la presente invención también se pueden usar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad concreta contra la afección que se está tratando.

Se formula como una dosis fija, los ingredientes activos de las composiciones de la combinación de la presente invención se usan dentro de los intervalos de dosis que se describen más adelante. Como alternativa, el agente anti-CTLA4 y los compuestos de fórmula 1 se pueden administrar por separado en los intervalos de dosis que se describen más adelante. En una realización preferida de la presente invención, el agente anti-CTLA4 se administra en el intervalo de dosis que se describe más adelante después o simultáneamente a la administración del compuesto de fórmula I en el intervalo de la dosis que se describe más adelante.

A continuación se exponen combinaciones terapéuticas preferidas y dosis de ejemplo para usar en la combinación de la presente invención.

COMBINACIÓN TERAPÉUTICA	DOSIS mg/m <sup>2</sup> (por dosis)
Compuesto de fórmula I (Ixabepilona) + anticuerpo anti-CTLA4	1 – 500 mg/m <sup>2</sup>
	0,1 – 25 mg/kg

Aunque esta tabla proporciona ejemplos de intervalos de dosificación del compuesto de fórmula I y el agente anticanceroso de la invención, al formular las composiciones farmacéuticas, el clínico puede usar dosificaciones preferidas según indica la afección del paciente que se esté tratando. Por ejemplo, el compuesto de Fórmula I puede administrarse preferiblemente a aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup> cada 3 semanas.

El anticuerpo anti-CTLA4 puede administrarse preferiblemente a aproximadamente 0,3 - 10 mg/kg, o la dosis máxima tolerada. En una forma de realización de la invención, una dosis del anticuerpo CTLA-4 se administra aproximadamente cada tres semanas. Como alternativa, el anticuerpo CTLA-4 se puede administrar mediante un régimen de dosificación creciente que incluye la administración de una primera dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 a aproximadamente 3 mg/kg, una segunda dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 a aproximadamente 5 mg/kg, y una tercera dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 a aproximadamente 9 mg/kg.

En otra forma de realización específica, el régimen de dosificación creciente incluye la administración de una primera dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 a aproximadamente 5 mg/kg y una segunda dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 a aproximadamente 9 mg/kg.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un régimen de dosificación creciente, que incluye la administración de una dosis creciente de anticuerpo frente a CTLA-4 aproximadamente cada seis semanas.

- 5 En un aspecto de la presente invención se proporciona un régimen de dosificación creciente por etapas, que incluye la administración de una primera dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 de aproximadamente 3 mg/kg, una tercera dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 de aproximadamente 5 mg/kg, una cuarta dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 de aproximadamente 5 mg/kg, y una quinta dosis de anticuerpo frente a CTLA-4 de aproximadamente 9 mg/kg. En otro aspecto de la presente invención se proporciona un régimen de dosificación creciente por etapas, que incluye la administración de una primera dosis de 5 mg/kg, una segunda dosis de 5 mg/kg y una tercera dosis de 9 mg/kg.

- 10 La dosificación real usada puede variar en función de los requisitos del paciente y de la gravedad de la afección que se esté tratando. La determinación de la dosificación adecuada para una situación concreta está dentro de la experiencia en la técnica. En general, el tratamiento s inicia con dosificaciones menores que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Después, 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 (p. ej., una semana de cada tres semanas o tres de cada cuatro semanas).

- 15 20 Ciertos cánceres pueden tratarse eficazmente con el compuesto de Fórmula I y el uno o más agentes anti-CTLA4. Dichas combinaciones triples y cuádruples pueden proporcionar mayor eficacia. Cuando se usan en dichas combinaciones triples y cuádruples se pueden usar las dosificaciones indicadas anteriormente.

- 25 Al usar la combinación o composición de la presente invención, también se pueden administrar, según se desee, otros agentes usados en la modulación del crecimiento o la metástasis tumorales en un contexto clínico, tales como antieméticos.

- 30 La presente invención proporciona el tratamiento sinérgico de cáncer en el que el agente anti-CTLA4 y el compuesto de Fórmula I se administran simultáneamente o secuencialmente. Por tanto, aunque una formulación farmacéutica que comprende el o los agente(s) anti-CTLA4 y un compuesto de fórmula I puede ser ventajosa para administrar la combinación para un tratamiento concreto, la administración previa del o los agentes anti-CTLA4 puede ser ventajosa en otro tratamiento. También se entiende que la presente combinación de agente(s) anti-CTLA4 y el compuesto de fórmula I pueden usarse junto con otros métodos de tratamiento para el cáncer (preferentemente tumores cancerosos), incluidas radioterapia y cirugía. Se entiende adicionalmente que un agente citostático o quiescente, en su caso, se puede administrar secuencial o simultáneamente con cualquiera o todas las demás terapias sinérgicas.

- 35 40 La combinación de la presente invención también se puede coadministrar con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su utilidad concreta contra la afección que se está tratando. La combinación de la presente invención pueden usarse secuencialmente con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocidos(s) cuando una formulación de combinación múltiple es adecuada.

- 45 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 (es decir, agente(s) anti-CTLA4 o radiación) sobre el paciente y a la luz de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

- 50 55 El compuesto de Fórmula I se administra simultáneamente o secuencialmente con un agente anti-CTLA4. Por tanto, no es necesario que el o los agentes terapéuticos anti-CTLA4 y el compuesto de fórmula I se administren de forma simultánea o esencialmente simultánea. La ventaja de la administración simultánea o esencialmente simultánea está bien dentro de la determinación del clínico experto.

- 60 Asimismo, en general, el compuesto de fórmula I y el o los agentes anti-CTLA4, como se define en las reivindicaciones, no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica y pueden, por diferentes características físicas y químicas, tener que administrarse por vías diferentes. Por ejemplo, el compuesto de fórmula I se puede administrar por vía intravenosa para generar y mantener buenos niveles en sangre del mismo, mientras que el(los) agente(s) anti-CTLA4 también se pueden administrar por vía intravenosa. Como alternativa, el compuesto de fórmula I se puede administrar por vía oral para generar y mantener buenos niveles en sangre del mismo, mientras que el(los) agente(s) anti-CTLA4 también se pueden administrar por vía intravenosa. Como alternativa, el compuesto de fórmula I se puede administrar por vía intravenosa para generar y mantener buenos niveles en sangre del mismo, mientras que el(los) agente(s) anti-CTLA4 también se pueden administrar por vía oral. La determinación del modo de administración y la conveniencia de la administración, cuando sea posible, en la

misma composición farmacéutica está dentro de los conocimientos del clínico experto. La administración inicial se puede realizar de acuerdo con los protocolos establecidos conocidos en la técnica y, después, basándose en los efectos observados, el clínico experto puede variar la dosificación, los modos de administración y los tiempos de administración.

5 La elección concreta del compuesto de fórmula I o análogos del mismo y del o los agente (s) anti-CTLA4 dependerá del diagnóstico del los médicos de atención y su juicio de la afección del paciente y el protocolo de tratamiento adecuado.

10 Si el compuesto de fórmula I y el o los agente(s) anti-CTLA4 no se administran de forma simultánea o esencialmente simultánea, la orden inicial de administración del compuesto de fórmula I y el o los agentes(s) anti-CTLA4 se pueden variar. Por tanto, por ejemplo, el compuesto de fórmula I se puede administrar primero, seguido de la administración del o los agentes anti-CTLA4; o el o los agentes anti-CTLA4 se pueden administrar primero seguido de la administración del compuesto de fórmula I. Esta administración alternativa se puede repetir durante un único protocolo de tratamiento. La determinación del orden de administración y el número de repeticiones de administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento está dentro de los conocimientos del médico experto tras la evaluación de la enfermedad que se está tratando y la afección del paciente. Por ejemplo, el o los agentes anti-CTLA4 se pueden administrar inicialmente. Después, el tratamiento continua con la administración del compuesto de fórmula I y seguido, opcionalmente, por la administración de un agente citostático, si se desea, hasta que el protocolo de tratamiento esté completo. Como alternativa, la administración del compuesto de Fórmula I y, opcionalmente, seguido de la administración de un agente citostático pueden administrarse inicialmente. Después, el tratamiento continúa con la administración del o los agentes anti-CTLA4 hasta que el protocolo de tratamiento esté completo.

25 Por tanto, de acuerdo con la experiencia y conocimientos, el médico de atención puede modificar cada protocolo para el administración de un componente (agente terapéutico, es decir el compuesto de fórmula I, agente(s) anti-CTLA4 del tratamiento de acuerdo con las necesidades de cada paciente individual, a medida que el tratamiento procede.

30 El médico de atención, a la hora de juzgar si el tratamiento es eficaz a la dosis administrada, considerará el bienestar general del paciente así como signos más claros, tales como el alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, la inhibición del crecimiento tumoral la reducción real del tamaño del tumor o la inhibición de la metástasis. El tamaño del tumor se puede medir mediante procedimientos convencionales, tales como estudios radiológicos, por ejemplo CAT o RM, y se pueden usar mediciones sucesivas para juzgar si el crecimiento del tumor se ha retrasado o no o incluso si se ha invertido. El alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, como el dolor, y la mejora de la afección global también se puede usar para ayudar a juzgar la eficacia del tratamiento.

Con el fin de facilitar una comprensión adicional de la invención, los ejemplos siguientes se presentan principalmente con el fin de ilustrar detalles más específicos de la misma.

40

## Referencias

1. Long, B.H. et al., "Mechanisms of resistance to etoposide and teniposide in acquired resistant human colon and lung carcinoma cell lines", *Cancer Res.*, 51:5275 – 5284 (1991).
- 45 2. Giannakakou, P. et al., "Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization", *J. Biol. Chem.*, 272(27):17118 – 17125 (1997).
3. Riss, T.L. et al., "Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays", *Mol. Biol. Cell*, 3(Suppl.):184a (1992).
- 50 4. Stephens, T.C. et al., "The evaluation of combinations of cytotoxic drugs and radiation: Isobolograms and therapeutic synergism", *Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*, p. 248. Pergamon Press, NY, publ., Kallman, R.F., ed.
5. Long, B.H., "Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G(1) phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase", *Cancer Res.*, 54(16):4355 – 4361 (1994).
- 55 6. Williams, R.C. et al., "Preparation of tubulin from brain", *Meth. Enzymol.*, 85(Pt. D):376 – 385 (1982).
7. Gehan, G.A., "A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples", *Biometrika*, 52:203 – 233 (1985).
8. Walunas, T.L. et al., "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation", *Immunity*, 1(5):405 – 413 (Aug. 1994).
- 60 9. Bretscher, P. et al., *Science*, 169:1042 – 1049 (1970).
10. Schwartz, R.H., *Science*, 248:1349 – 1356 (1990).
11. Linsley, P.S. et al., *J. Exp. Med.*, 173:721 – 730 (1991).
12. Linsley, P.S. et al., *J. Exp. Med.*, 174:561 – 569 (1991).
13. Brunet, J.F. et al., *Nature*, 328:267 – 270 (1987).
- 65 14. Gross, J.A. et al., *J. Immunol.*, 149:380 – 388 (1992).
15. Alegre, M.L. et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 1:220 – 228 (2002).

16. Lindsten, T. et al., J. Immunol., 151:3489 – 3499 (1993).  
 17. Walunas, T.L. et al., Immunity, 1:405 – 413 (1994).  
 18. Linsley, P.S. et al., Immunity, 1:793 – 801 (1994).  
 19. Walunas, T.L. et al., J. Exp. Med., 183:2541 – 2550 (1996).  
 20. Krummel, M.F. et al., J. Exp. Med., 183:2533 – 2540 (1996).  
 21. Brunner, M.C. et al., J. Immunol., 162:5813 – 5820 (1999).  
 22. Greenwald, R.J. et al., Eur. J. Immunol., 32:366 – 373 (2002).  
 23. Leach, D.R. et al., Science, 271:1734 – 1736 (1996).  
 24. van Elsas, A. et al., J. Exp. Med., 190:355 – 366 (1999).  
 25. van Elsas, A. et al., J. Exp. Med., 194:481 – 489 (2001).  
 26. Hurwitz, A.A. et al., Cancer– Res., 60:2444 – 2448 (2000).

**Ejemplo 1 - Método de evaluación del efecto de la combinación de agentes de estabilización de la microtubulina con bloqueo anti-CTLA4 sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de fibrosarcoma SA1N in vitro**

**Antecedentes**

La actividad antitumoral de un homólogo de ipilimumab, un agente bloqueante de CTLA-4, se investigó en combinación con ixabepilona, un fármaco estabilizador de los microtúbulos, en estudios preclínicos. Los inventores plantearon la hipótesis de que este enfoque combinatorio puede producir sinergia terapéutica basada en su mecanismo de acción único y a las dianas celulares.

La ixabepilona induce necrosis de células tumorales, de modo que se proporciona una fuente de antígenos tumorales y cambios en la arquitectura tumoral que facilitan el cebado e infiltración de las células T, mientras que el AcMo de bloqueo de CTLA-4 estimula la expansión y la infiltración de las células T citotóxicas sensibilizadas por tumores.

**Métodos**

Se realizaron estudios de eficacia en 3 líneas tumorales diferentes implantadas en ratones inmunocompetentes: Fibrosarcoma SA1N, carcinoma de pulmón MI09 y carcinoma mamario EMT-6. Ixabepilona y el AcMo CTLA-4 se administraron a su dosis y calendario óptimos: ixabepilona, 8 mg/kg; AcMo CTLA-4, 20 mg/kg cada 4 días para 3 dosis. Para el grupo de combinación, el AcMo anti-CTLA-4 se administró un día después de cada tratamiento de ixabepilona. En estudios seleccionados, los animales con regresiones tumorales completas fueron expuestos a una dosis letal de células tumorales para determinar el nivel de protección inmune. En otros estudios, la eficacia combinada del AcMo anti-CTLA-4 + ixabepilona se comparó directamente con el AcMo anti-CTLA-4 + paclitaxel.

**Resultados**

La combinación del homólogo ipilimumab acMo CTLA-4 e ixabepilona mostró un efecto antitumoral sinérgico en todos los modelos tumorales analizados que dan lugar a respuestas completas duraderas en el 70 – 100 % de los animales, lo que demuestra una eficacia superior en comparación con cada tratamiento solo (p <0,05). Adicionalmente, los animales tratados con ixabepilona y AcMo CTLA-4 rechazaron una reexposición posterior al tumor, lo que sugiere el desarrollo de una respuesta inmunitaria de memoria protectora. Por el contrario, los animales tratados con ixabepilona mostraron solo una protección parcial, como es evidente por un retraso en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones no tratados previamente. Los tratamientos combinados fueron bien tolerados, sin signos de una mayor toxicidad. La combinación de AcmMo CTLA-4 + ixabepilona produjo una eficacia superior de CTLA-4 + paclitaxel.

**Conclusiones**

Estos hallazgos proporcionan evidencia de que la combinación de ixabepilona y el homólogo de ipilimumab AcMo de bloqueo de CTLA-4 provocan efectos antitumorales eficaces y duraderos, y requieren investigación del régimen de ipilimumab e ixabepilona en ensayos clínicos.

**Ejemplo 2 - Método de evaluación del efecto de la combinación de agentes de estabilización de la microtubulina con bloqueo anti-CTLA4 sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de fibrosarcoma SA1N in vivo**

La quimioinmunoterapia es un nuevo enfoque para el tratamiento del cáncer que consiste en la combinación de agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos. Este enfoque combina los efectos de la quimioterapia que provoca un ataque directo sobre las células tumorales, lo que dan como resultado necrosis o apoptosis de las células tumorales, y, los agentes que modulan respuestas inmunitarias del huésped a los antígenos tumorales. El efecto de un anticuerpo bloqueante de CTLA-4 antiratón, el homólogo murino de ipilimumab, se evaluó en varios múltiples modelos de tumores murinos en combinación con los agentes estabilizadores de microtúbulos paclitaxel

(TAXOL®), e ixabepilona (IXEMPRA™). Se realizaron estudios de eficacia en 5 líneas tumorales diferentes: fibrosarcoma SA1N, carcinoma de pulmón M109, carcinoma mamario EMT-6, carcinoma de colon CT-26 y melanoma B16. Ixabepilona, paclitaxel y el AcMo CTLA-4 se administraron a su dosis y calendario óptimos: ixabepilona, 8 mg/kg; paclitaxel, 24 mg/kg, acmo CTLA-4, 20 mg/kg cada 4 días para 3 dosis. Para el grupo de combinación, el AcMo anti-CTLA-4 se administró un día después de cada tratamiento de ixabepilona o paclitaxel. En estudios seleccionados, los animales con regresiones tumorales completas fueron expuestos a una dosis letal de células tumorales para determinar el nivel de protección inmune. La combinación del homólogo ipilimumab acMo CTLA-4 e ixabepilona mostró un efecto antitumoral sinérgico en todos los modelos tumorales analizados a excepción del melanoma B16, que dan lugar a respuestas completas duraderas en el 70 – 100 % de los animales, lo que demuestra una eficacia superior en comparación con cada tratamiento solo ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, los animales tratados con ixabepilona + AcMo CTLA-4 rechazaron una reexposición posterior al tumor, lo que sugiere el desarrollo de una respuesta inmunitaria de memoria protectora. Por el contrario, los animales tratados con ixabepilona mostraron solo una protección parcial, como es evidente por un retraso en el crecimiento tumoral. Los tratamientos combinados fueron bien tolerados. La combinación de paclitaxel y bloqueo de CTLA-4 también mostró sinergia en 2 de 5 modelos probados. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que la combinación de ixabepilona y el homólogo de ipilimumab AcMo de bloqueo de CTLA-4 provoca efectos antitumorales eficaces y duraderos, y requieren investigación del régimen de ipilimumab e ixabepilona en ensayos clínicos.

## 20 Materiales y procedimientos

### 20 Anticuerpos

El hibridoma para el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 (AcMo), el clon 4F10-UC10 (Walunas et al, Immunity, 1 (5):. 405-413 (Agosto 1994)), se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). El anticuerpo UC10 (CTLA-4 IgG anti-ratón de hámster) se produjo y se purificó en BMS (Protein Therapeutics Division, Hopewell, New Jersey, EE.UU.). Se ha certificado que el anti-CTLA-4 tenía niveles de endotoxinas  $< 0,5$  UE /mg, una pureza  $> 95$  % de pureza y  $<$  un peso molecular alto  $< 5$  %. Las soluciones madre de anti-CTLA-4 se mantuvieron a  $-80$  °C y se descongelaron a 4 °C antes de su uso. El anticuerpo de control consistió en una IgG policlonal de hámster (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se prepararon soluciones de dosificación de anti-CTLA-4 y control de IgG de hámster semanalmente en solución salina estéril tamponada con fosfato (pH 7,0).

### Animales

35 Ratones BALB/c, A/J o C57/BL6 de ocho a doce semanas de edad se adquirieron de Harlan, Indianapolis, IN. Los ratones recibieron alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ambiente controlado de acuerdo a las regulaciones de AALAC.

### Modelos de tumor

40 Las líneas celulares tumorales se mantuvieron *in vitro*. Se iniciaron los tratamientos cuando los tumores subcutáneos alcanzaron una mediana del tamaño de entre 100 - 200 mm<sup>3</sup> (modelo establecido) o antes de la detección (modelo de iniciación). Los tumores se midieron dos veces a la semana y el tamaño del tumor (mm<sup>3</sup>) se calculó como (longitud x anchura<sup>2</sup>)/2. Los pesos corporales se obtuvieron semanalmente. Los modelos tumorales usados en estos estudios se resumen en la Tabla 1.

45 **TABLA 1**

Características de las líneas tumorales utilizadas en los estudios de eficacia (MFR <sup>a</sup> )							
Línea tumoral	Cepa de ratón	Origen	MHC de clase I	CD137L	CD137	B7.1	B7.2
SA1N	A/J	Fibrosarcoma					
EMT-6	Balb/c	Cáncer de mama	5	1	1	35	10
M109	Balb/c	Cáncer de pulmón	2,7	14	1	2	1
CT-26	Balb/c	Colon					
B16-F10-Luc	C57/BL6	Melanoma					

### Estudios de eficacia

50 Los niveles de dosis, vías y calendarios de dosificación se indican para cada estudio en particular descrito a continuación. Los anticuerpos y los agentes quimioterapéuticos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.). Cada régimen de tratamiento consistía en una cohorte de ocho a diez ratones. La actividad antitumoral, definida como inhibición del crecimiento tumoral en porcentaje, se calculó como sigue:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento tumoral} = 100 - ((Tt/To)/(Ct/Co)) / 100 - (Ct/Co)$$

en la que,

- 5  
 Tt = mediana del tamaño del tumor del grupo tratado al final del tratamiento  
 To = mediana del tamaño del tumor del grupo tratado al principio del tratamiento  
 Ct = mediana del tamaño del tumor del grupo control al final del tratamiento  
 Co = mediana del tamaño del tumor al principio del tratamiento

10 Además, otro parámetro utilizado para definir la eficacia fue determinar el tiempo hasta la progresión del tumor al tamaño diana (T-C), donde el tiempo (días) para la mediana del tamaño tumoral de los ratones control (C) para alcanzar el tamaño diana se restó del tiempo para que la mediana del tamaño del tumor de ratones tratados (T) para alcanzar el tamaño diana. Una demora en llegar a tamaño diana por los grupos tratados de > de un tiempo de duplicación del volumen tumoral (TDVT) se consideró un resultado activo.

### 15 Análisis estadístico

Se utilizó el análisis no paramétrico mediante el test de Wilcoxon para determinar la significación estadística.

### 20 Resultados

25 El fibrosarcoma SA1N es una línea de tumor inherentemente inmunogénica que es sensible a los efectos del bloqueo de CTLA-4. Se realizaron dos estudios para determinar el efecto del bloqueo de CTLA-4 en combinación con paclitaxel o ixabepilona en este modelo de tumor (véase la Tabla 1). Se implantó a los animales células SA1N por vía subcutánea y se iniciaron los tratamientos cuando los tumores alcanzaron 100- 150 mm<sup>3</sup>. Los grupos experimentales consistieron en cohortes de 8 ratones. Se administraron ixabepilona, paclitaxel y el AcMo CTLA-4 por vía intraperitoneal (i.p.) cada 4 días para 3 dosis. En los grupos de combinación, el AcMo anti-CTLA-4 se administró un día después de cada tratamiento de quimioterapia.

30 El AcMo CTLA-4 fue eficaz para producir valores de inhibición del crecimiento tumoral en % (ICT) de 65 - 90 %, con retraso en el crecimiento del tumor y 25 - 50 % de regresiones completas (RC, véase la Tabla 2). Ixabepilona también fue eficaz en este modelo, produciendo un % de ICT de 92 y 83, en los que 3 de 8 ratones mostraron regresiones completas en un estudio. Además, cuando el AcMo de CTLA-4 se analizó en combinación con ixabepilona, se observaron efectos sinérgicos en ambos estudios con un alto número de regresiones completas (71,4; 87,5 % de RC, véase la Tabla 2).

40 Del mismo modo, el efecto del AcMo de CTLA-4 en combinación con paclitaxel se estudió en 2 estudios independientes (Tabla 2). Paclitaxel mostró un efecto variable en estos estudios, mientras que se demostró que e el AcMo de CTLA-4 tenía efectos antitumorales similares en ambos. Sin embargo, en ambos estudios, la combinación de AcMo de CTLA-4 con paclitaxel dio como resultado efectos sinérgicos con respuestas completas duraderas (véase la Tabla 2).

**TABLA 2**

Actividad antitumoral del bloqueo de CTLA-4 en combinación con varios agentes estabilizadores de microtúbulos en el modelo tumoral de fibrosarcoma SA1N								
N.º de estudio	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa	Vía	% ICT <sup>a</sup>	T-C (días) <sup>b</sup>	RC/n.º total de ratones	Mejor efecto de combinación
9	AcMo CTLA-4 <sup>c</sup>	20	Día 11, 15, 19	i.p.	90	11	4/8(50)	
	Ixabepilona	8	Día 10, 14, 18	i.p.	92	11	3/8(37,5)	
	Ixabepilona	8	Día 10, 14, 18	i.p.	110	> 39	7/8(87,5)	Sinergia terapéutica <sup>d</sup>
	AcMo CTLA-4	20	Día 11, 15, 19	i.p.				
17	AcMo CTLA-4 <sup>c</sup>	20	Día 12, 16,20	i.p.	79	7	2/8(25)	
	Ixabepilona	8	Día 11, 15, 19	i.p.	83	7	0/8(0)	
	Ixabepilona	8	Día 11, 15, 19	i.p.	112	> 95	5/7(71)	Sinergia terapéutica <sup>d</sup>
	AcMo CTLA-4	20	Día 12, 16,20	i.p.				

11	AcMo CTLA-4	20	Día 11, 15, 19	i.p.	65	6	2/8	
	Paclitaxel	24	Día 10, 14, 18	i.p.	88	13	3/8	
	Paclitaxel	24	Día 10, 14, 18	i.p.	122	> 28	7/8	Sinergia terapéutica <sup>e</sup>
	AcMo CTLA4-4	20	Día 11, 15, 19	i.p.				
17	AcMo CTLA-4	20	Día 11, 15, 19	i.p.	79	7	2/8	
	Paclitaxel	24	Día 10, 14, 18	IP	0	0	0/8	
	Paclitaxel	24	Día 10, 14, 18	i.p.	112	> 95	7/8	Sinergia terapéutica <sup>e</sup>
	AcMo CTLA-4	20	Día 11, 15, 19	i.p.				

<sup>a</sup> %ICT = % inhibición del crecimiento tumoral calculada sobre la última medición para el grupo control. Estudio 9 = Día 36; Estudio 11 = Día 34; Estudio 17 = Día 33  
<sup>b</sup> T-C = Número de días para que el grupo tratado alcance el tamaño diana - número de días para que el grupo control alcance el tamaño diana. Tamaño diana= 500 mm<sup>3</sup>. Los estudios se terminaron en los siguientes días: Día 39 días para el estudio n.º 9, día 52 para el estudio n.º 11 y día 116 para el estudio n.º 17  
<sup>c</sup> En los estudios n.º 9 y n.º 17 se observó una RC no relacionada con el tratamiento en el grupo control  
<sup>d</sup> El tratamiento combinado produjo una mejora significativa de la actividad antitumoral en comparación con el acMo CTLA-4 o la ixabepilona sola (p <0,05)  
<sup>e</sup> El tratamiento combinado produjo una mejora significativa de la actividad antitumoral en comparación con el acMo CTLA-4 o el paclitaxel solo (p <0,05)

**Ejemplo 3 - Método de evaluación del efecto de la combinación de agentes de estabilización de la microtubulina con bloqueo anti-CTLA4 sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de carcinoma de mama emt-6 in vivo**

5 EMT-6 es una línea de tumor inmunogénico bajo con una sensibilidad modesta al bloqueo el AcMo de CTLA-4 solo cuando se inician los tratamientos antes de establecer los tumores. Como se muestra en la Tabla 3, AcMo de CTLA-4 e ixabepilona provocaron un efecto antitumoral con una T-C de 29 y 19 respectivamente. Paclitaxel fue ineficaz. La combinación de ixabepilona más AcMo de CTLA-4 produjo un efecto sinérgico con un T-C > 37 días y 100 % de ratones libres de tumores. En este modelo de tumor, el AcMo de CTLA-4 más paclitaxel no mostraron ningún efecto antitumoral adicional en comparación con el efecto provocado por el AcMo de CTLA-4 solo.

**TABLA 3**

Actividad antitumoral del AcMo CTLA-4 en combinación con ixabepilona o paclitaxel en el modelo de tumor mamario EMT-6							
N.º de estudio	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa	Vía	T-C (días)	% de ratones libres de tumor	Efecto
27	AcMo CTLA44	20	Día 4, 8, 12	i.p.	29	40	
	Ixabepilona	8	Día 3, 7, 11	i.p.	19	20	
	AcMo CTLA-4	20	Día 4, 8, 12	i.p.	> 37	100	Sinergia terapéutica <sup>a</sup>
	Ixabepilona	8	Día 3, 7, 11	i.p.			
	Paclitaxel	24			0	0	
	AcMo CTLA-4	20	Día 4, 8, 12	i.p.	37	40	Ninguna
	Paclitaxel	24	Día 3, 7, 11	i.p.			

<sup>a</sup> El tratamiento combinado produjo una mejora significativa de la actividad antitumoral en comparación con el acMo CTLA-4 o la ixabepilona sola (p <0,05)

15 En algunos estudios, los ganglios linfáticos de los ratones bajo el mismo protocolo se recogieron los 2 y 7 días después del último tratamiento con el AcMo CTLA-4. Las células de los ganglios linfáticos se tiñeron con anticuerpos monoclonales frente a CD4, CD8, y CD107 para determinar el número de células T efectoras citotóxicas. Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento con anticuerpos CTLA-4 y anticuerpos CTLA-4 más ixabepilona aumentó el número de células T CD8<sup>+</sup>CD107<sup>+</sup> 2 días después del tratamiento, y dio como resultado un efecto más persistente 7 días después del tratamiento en relación con los anticuerpos CTLA-4 o ixabepilona de forma individual.

**Ejemplo 4 - Método de evaluación del efecto de la combinación de agentes de estabilización de la microtubulina con bloqueo anti-CTLA4 sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de carcinoma de pulmón M109 in vivo**

5 También se estudiaron los efectos antitumorales deL AcMo CTLA-4 y agentes estabilizadores de microtúbulos en el modelo de carcinoma de pulmón M109, una línea de tumor que no es sensible al efecto de bloqueo de CTLA-4. En estos estudios se iniciaron los tratamientos con agentes quimioterapéuticos cuando los tumores eran palpables, en el día 3 después de la implantación del tumor. Este régimen se seleccionó para producir un efecto antitumoral medible, lo que se observó cuando se iniciaron los tratamientos en un momento posterior. Al igual que en los estudios llevados a cabo en las líneas tumorales el SA1N y EMT-6, el acMO CTLA-4 se dosificó un día después de tratamiento con quimioterapia.

15 Los tratamientos con acMO CTLA-4 o paclitaxel no produjeron efectos antitumorales. Por otro lado, la ixabepilona fue muy eficaz para inhibir el crecimiento tumoral en el 50 % de los animales tratados. La combinación de paclitaxel + acMO CTLA-4 produjo un efecto modesto sobre el crecimiento del tumor con un 80 % de incidencia de tumores. Además, la combinación de ixabepilona y acMO CTLA-4 produjo un mejor efecto que ixabepilona sola con 8 de cada 10 ratones libres de tumor (la incidencia tumoral del 20 %, Tabla 2).

20 Para determinar si la combinación de CTLA-4 + ixabepilona producía una respuesta inmunitaria de memoria capaz de rechazar una exposición tumoral secundaria, se volvió a exponer a los animales libres de tumores para el día 97 a un inóculo letal de células M109. Para esta parte del estudio, las células M109 se inyectaron en: a) 10 ratones no expuestos previamente (para controlar el crecimiento del tumor); y en ratones del estudio libres de tumores: b) 5 ratones tratados previamente con ixabepilona y c) 8 ratones tratados previamente con ixabepilona + AcMo CTLA-4. Todos los ratones control desarrollaron tumores progresivos con una mediana del tamaño del tumor de 1.000 mm<sup>3</sup> 10 días después, mientras que 4 de cada 5 ratones en los ratones tratados con ixabepilona desarrollaron tumores (80 %). La observación de que un animal rechazó la reexposición a M109 sugiere que ixabepilona por sí sola puede producir un efecto en la provocación de una respuesta inmunitaria antitumoral. Por el contrario, solo 2 de 8 ratones en el grupo tratado con ixabepilona + AcMo CTLA-4 desarrollaron tumores (25 %), lo que sugiere que la adición del AcMo CTLA a ixabepilona provocó una respuesta inmunitaria de memoria capaz de rechazar la exposición al tumor secundario (Tabla 4, Figura 1).

**TABLA 4**

<b>Actividad antitumoral de AcMo CTL-4en combinación con agentes estabilizadores de microtúbulos en el modelo de carcinoma de pulmón M109 (M109 n.º 40)</b>						
N.º de estudio	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa	Vía	% de ratones libres de tumores tras la implantación inicial del tumor	% de ratones libres de tumores tras la reexposición <sup>b</sup>
40	AcMo CTLA-4	20	Días 4, 8, 12	i.p.	100	N/A
	Ixabepilona	8	Días 3, 7, 11	i.p.	50	75
	Ixabepilona + AcMo CTLA-4	24	Días 3, 7, 11 Días 4, 8, 12	i.p.	20	25
	Paclitaxel	24	Días 3, 7, 11	i.p.	100	N/A
	Paclitaxel + AcMo CTLA-4	24	Días 3, 7, 11 Días 4, 8, 12	i.p.	80	N/A
<sup>a</sup> Porcentaje de animales que desarrollan tumores después de la implantación el día 0.						
<sup>b</sup> Porcentaje de ratones que desarrollan tumores después de la reexposición al tumor el día 95.						

35 **Ejemplo 5 - Método de evaluación del efecto de la combinación de agentes de estabilización de la microtubulina con bloqueo anti-CTLA4 sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de carcinoma de colon CT26 in vivo**

40 A continuación, se estudiaron los efectos antitumorales de AcMo CTLA-4 y agentes estabilizadores de microtúbulos en un modelo no sensible a ixabepilona o paclitaxel, el modelo de carcinoma de colon CT26. En esta línea tumoral, el tratamiento con AcMo CTLA-4 produjo un efecto antitumoral modesto, como se muestra en la Tabla 4 (2 de cada 10 RC). A pesar de que ni paclitaxel ni ixabepilona produjeron ninguna actividad antitumoral medible, la combinación de AcMo CTLA-4 más estos agentes produjo el rechazo del tumor de larga duración en la mayoría de los ratones (Tabla 5, Figura 2).

45



TABLA 5

Actividad antitumoral del bloqueo de AcMo CTLA-4 en combinación con agentes estabilizadores de microtúbulos en el modelo de tumor de colon CT26				
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa	Vía	% de regresiones completas/n.º total de ratones
AcMo CTLA-4	20	Días 5, 9, 13	i.p.	2/10
Ixabepilona	8	Días 4, 8, 12	i.p.	0/10
Ixabepilona + AcMo CTLA-4	24	Días 4, 8, 12 Días 5, 9, 13	i.p.	7/10 <sup>a</sup>
Paclitaxel	24	Días 4, 8, 12	i.p.	0/10
Paclitaxel + AcMo CTLA-4	24	Días 4, 8, 12 Días 5, 9, 13	i.p.	5/10 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> El tratamiento combinado produjo una mejora significativa de la actividad antitumoral en comparación con el acMo CTLA-4 o la ixabepilona sola (p <0,05)

<sup>b</sup> El tratamiento combinado produjo una mejora significativa de la actividad antitumoral en comparación con el AcMo CTLA-4 o el paclitaxel solo (p <0,05)

En algunos estudios, los ganglios linfáticos se recogieron 2 días después del último tratamiento con AcMo CTLA-4 se sometieron a inmunofenotipo. Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento con AcMo CTLA-4 aumentó el número de células T activadas CD4 y CD8 (CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>). La adición de ixabepilona o paclitaxel al tratamiento con AcMo CTLA-4 no alteró la expansión de las células T activadas producida por el tratamiento con AcMo CTLA-4.

### Conclusión

En resumen, se observaron efectos sinérgicos con la combinación del AcMo de bloqueo de CTLA-4 más ixabepilona o paclitaxel en varios modelos tumorales que justifica la investigación de sus efectos combinados en los ensayos clínicos. La combinación Ixabepilona + AcMo CTLA-4 mostró efectos superiores a los de paclitaxel + AcMo CTLA-4 en los modelos tumorales EMT-6 y M109. Es importante destacar que la adición de AcMo CTLA-4 a ixabepilona dio como resultado la generación de una respuesta inmunitaria de memoria capaz de rechazar una exposición al tumor secundario. Los tratamientos de combinación expandieron la población de células T CD8 activadas y citolíticas, que apoya la eficacia sinérgica observada en la inhibición del crecimiento tumoral (p <0,05). Se están realizando otros estudios para entender los mecanismos que subyacen a estos efectos sinérgicos.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> COMBINACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-CTLA4 CON AGENTES MODULADORES DE LA TUBULINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS

<130> 19960 PCT

<150> US 61/019.778

<151> 08-01-2008

<150> US 61/056.957

<151> 29-05-2008

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 558 568 T3

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

<210> 2  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

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

10

ES 2 558 568 T3

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val  
1 5

10 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

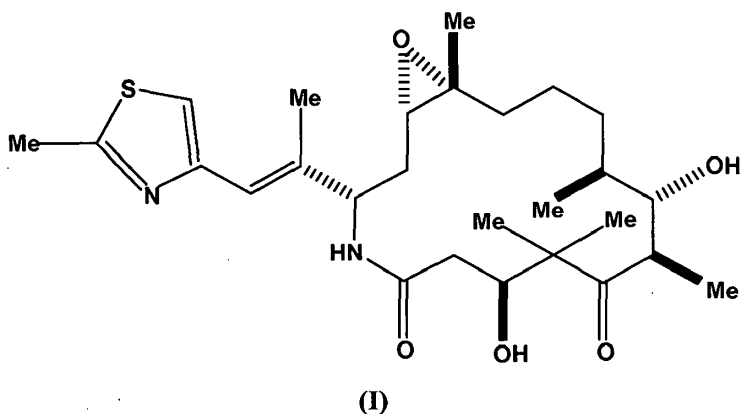
15

<400> 4

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un agente antiproliferativo y al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, incluyendo el cáncer, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad sinérgica y terapéuticamente, eficaz de 1) al menos un agente anti-CTLA-4 y 2) un agente antiproliferativo, en donde el agente antiproliferativo es un compuesto de fórmula I:



10 y en el que el agente anti-CTLA-4 es ipilimumab.

2. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente anti-CTLA-4 y un compuesto de Fórmula I como se describe en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el agente anti-CTLA-4 es ipilimumab.

15 3. El agente antiproliferativo y el al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso según la reivindicación 1, en el que el agente anti-CTLA-4 se administra al mismo tiempo que, o después de, la administración del compuesto de Fórmula I.

20 4. El agente antiproliferativo y el al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3 para el tratamiento de un miembro del grupo que consiste en: tumores sólidos cancerosos y tumores refractarios.

25 5. El agente antiproliferativo y el al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en donde dicho cáncer es cáncer de pulmón.

6. El agente antiproliferativo y el al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en el que dicho cáncer es fibrosarcoma.

30 7. El agente antiproliferativo y el al menos un agente anti-CTLA-4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en el que dicho cáncer es cáncer de mama.

FIG. 1

Estudio M109 N°. 40

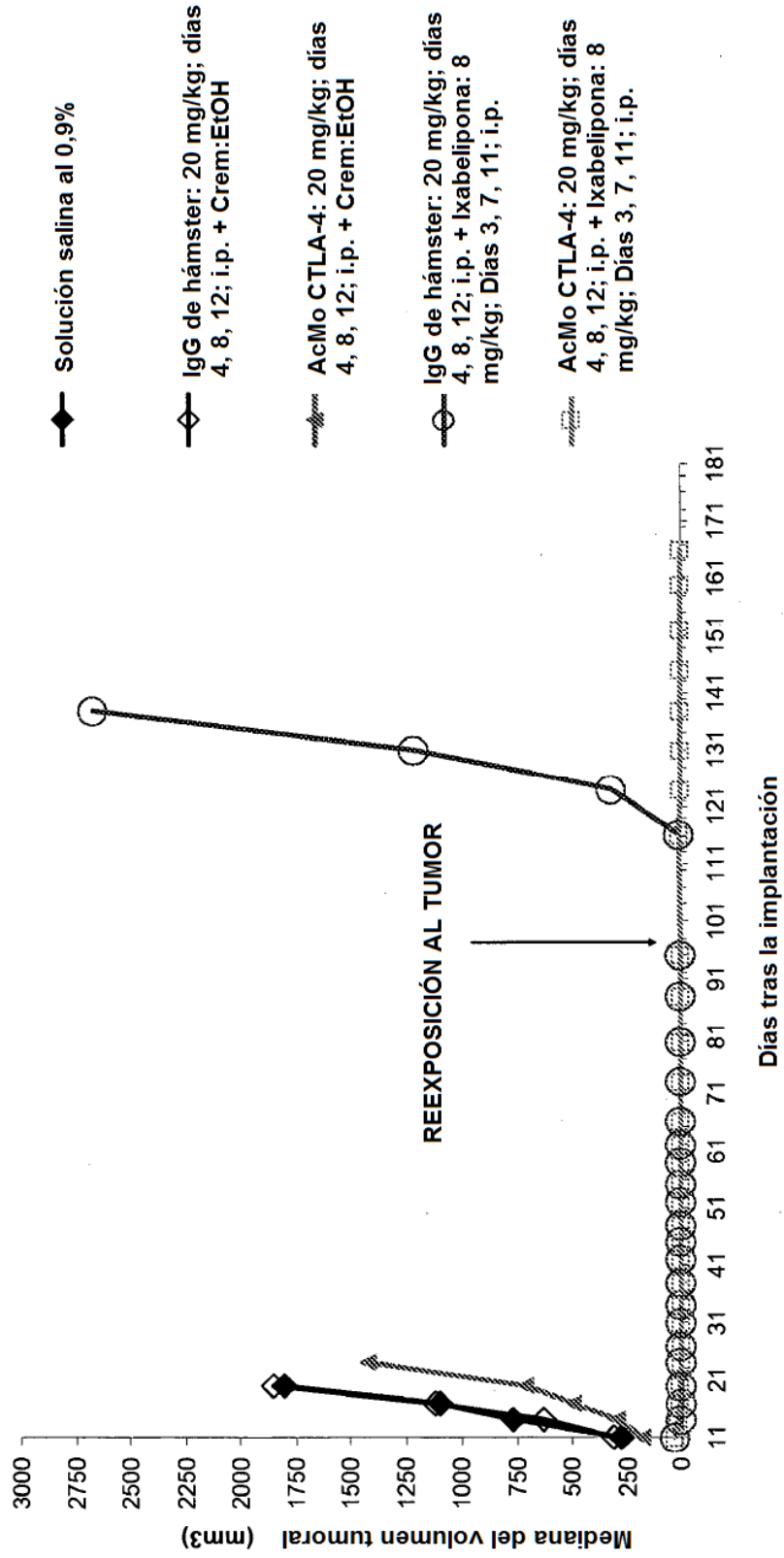


FIG. 2

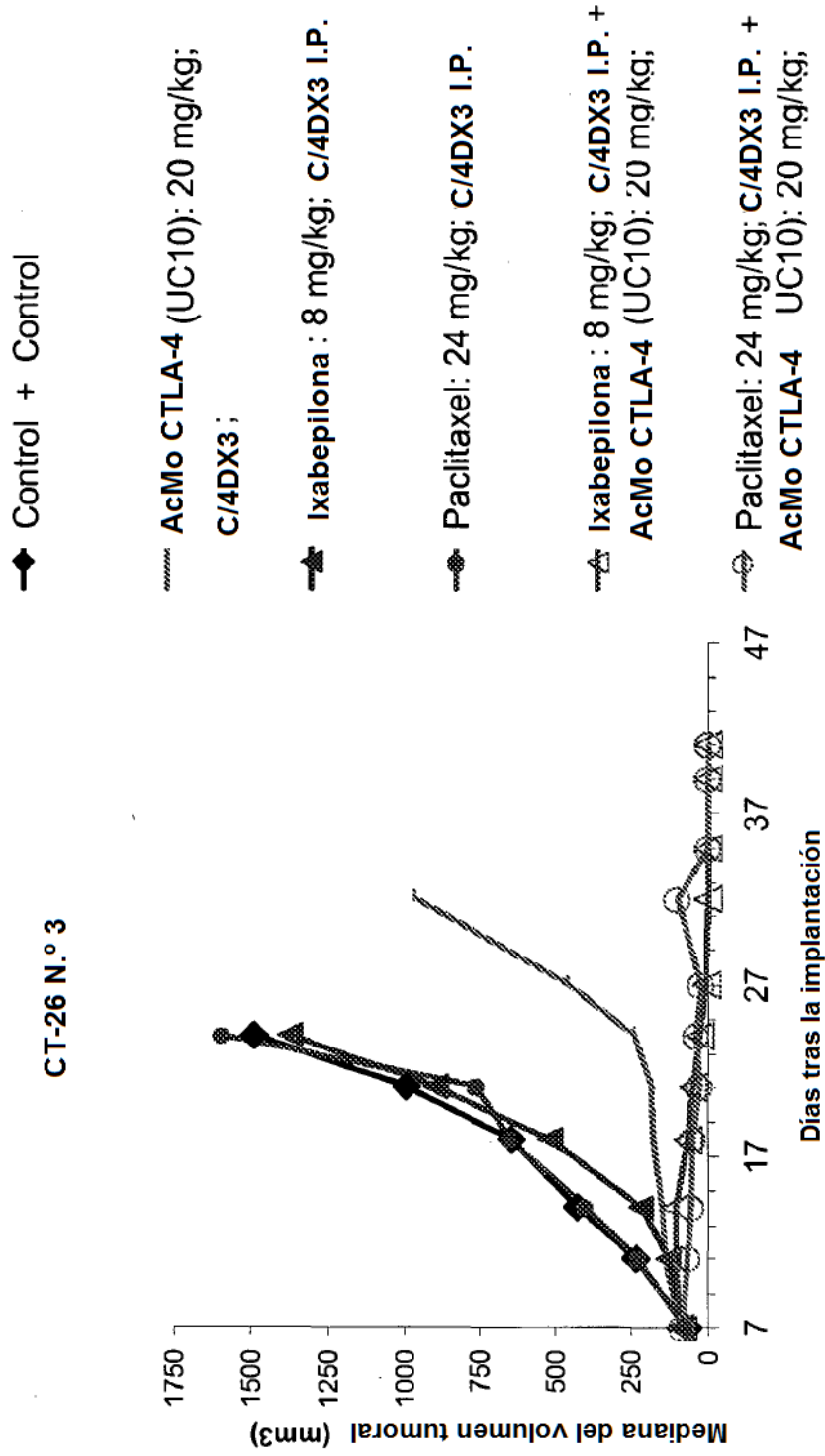
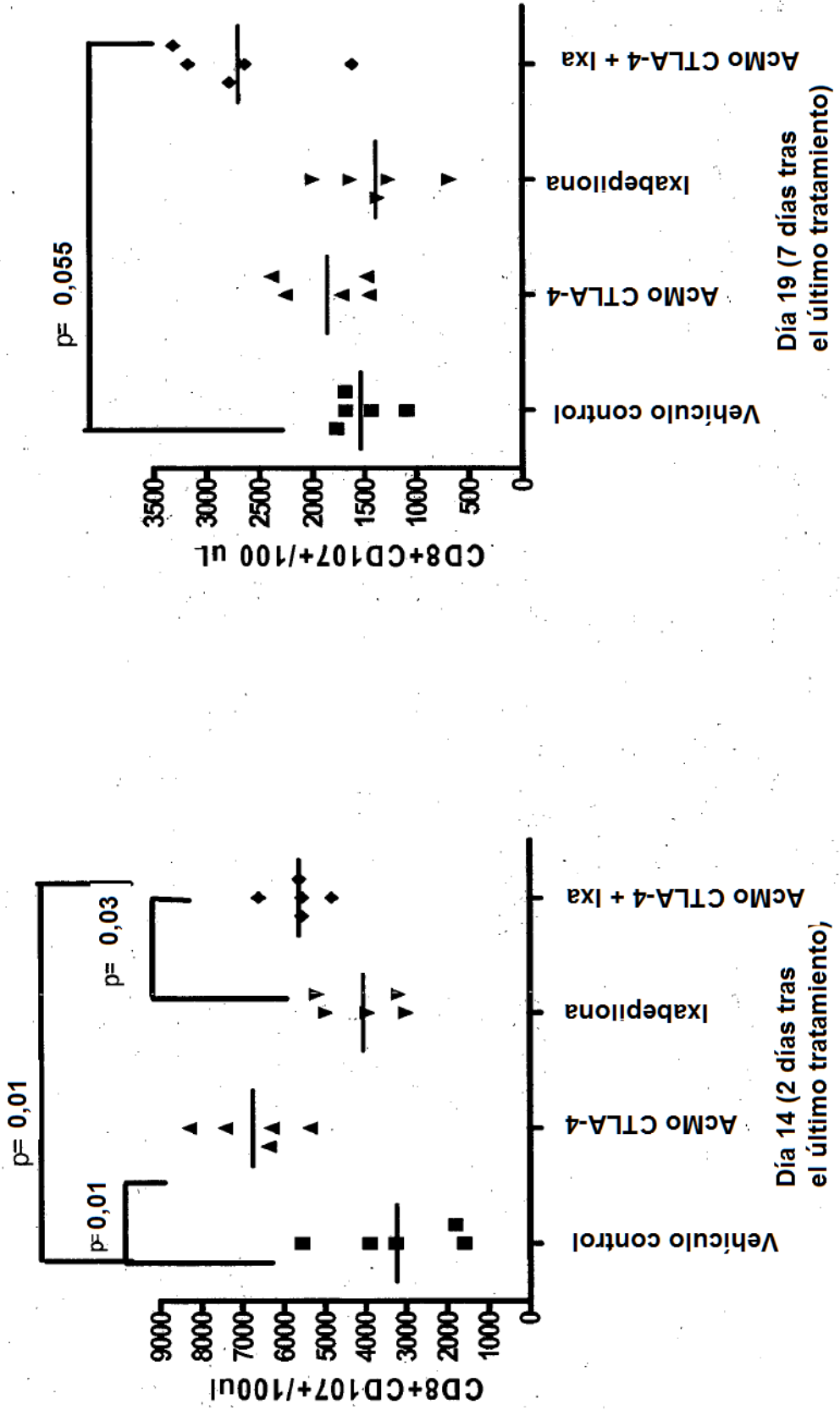


FIG. 3



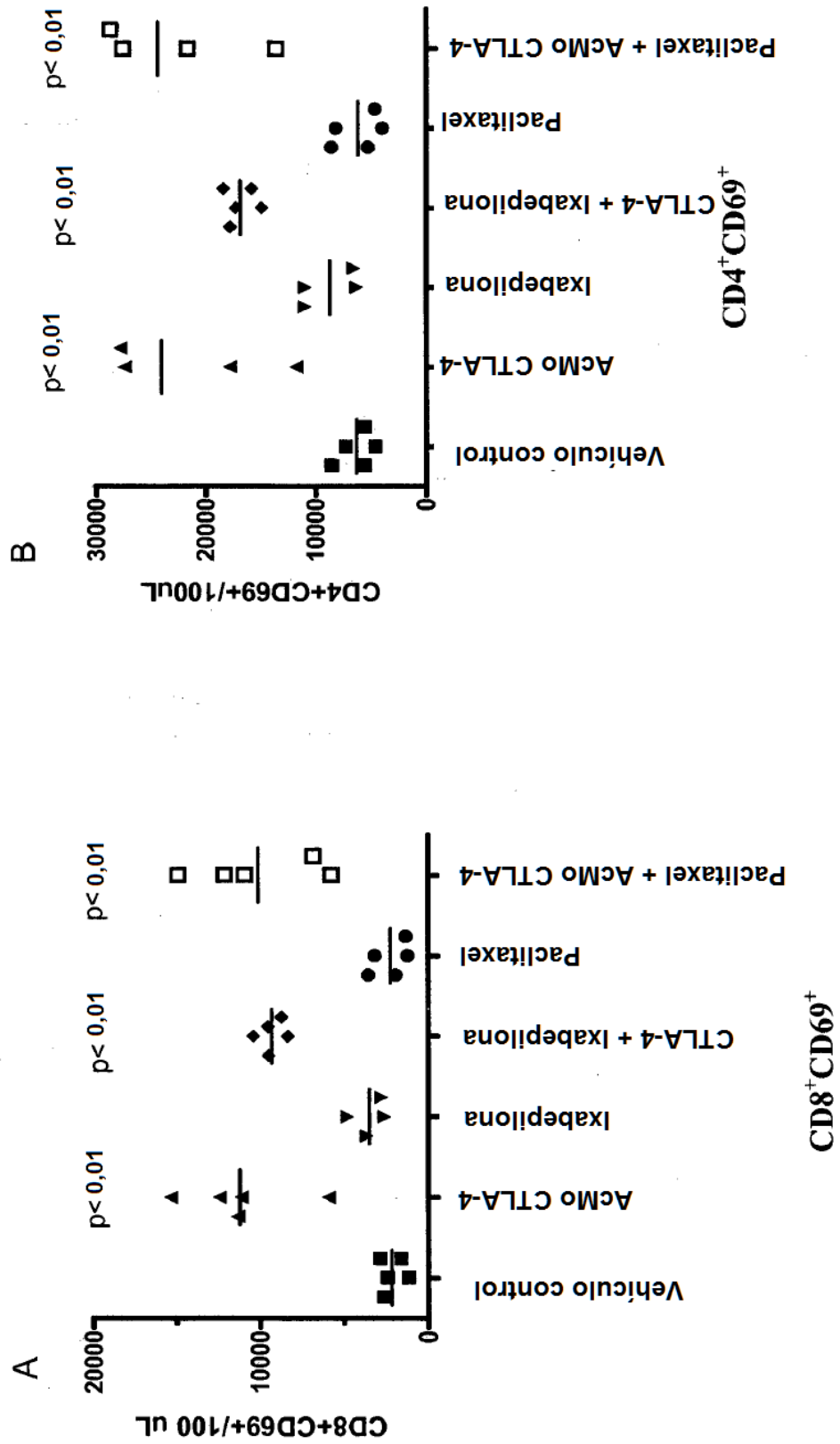


FIG. 4