

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 449**

51 Int. Cl.:

A61K 31/55	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/122	(2006.01)		
A61K 9/127	(2006.01)		
A61K 9/48	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 47/48	(2006.01)		
A61K 31/704	(2006.01)		
A61K 31/7068	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 31/675	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2011 PCT/US2011/054654**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO2012045090**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2011 E 11830073 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2621500**

54 Título: **Uso terapéutico de un agonista de TLR y terapia de combinación**

30 Prioridad:

06.10.2010 US 390447 P
01.10.2010 US 388967 P
01.10.2010 US 388953 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2017

73 Titular/es:

VENTIRX PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
1191 Second Avenue, Suite 1105
Seattle, WA 98101, US y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)

72 Inventor/es:

HERSHBERG, ROBERT;
COUKOS, GEORGE;
DIETSCH, GREGORY;
FACCIABENE, ANDREA;
MANJARREZ, KRISTI y
RANDALL, TRESSA, D.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 616 449 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

Uso terapéutico de un agonista de TLR y terapia de combinación

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones de un agonista de TLR8, y una terapia de combinación que comprende la administración de un agonista de TLR8 y un agente anticanceroso para uso en el tratamiento de cáncer.

10 Antecedentes de la invención

La estimulación del sistema inmune, que incluye o bien la estimulación de inmunidad innata, o de inmunidad adaptativa, o ambas, es un fenómeno complejo que puede resultar o bien en resultados fisiológicos protectores o adversos para el huésped. En los últimos años ha aumentado el interés en los mecanismos subyacentes a la inmunidad innata, que se cree que inician y apoyan la inmunidad adaptativa. Este interés ha sido alimentado en parte por el reciente descubrimiento de una familia de proteínas receptoras de reconocimiento de patrones altamente conservados conocidas como receptores tipo Toll (TLR) que se cree que están implicados en la inmunidad innata como receptores para los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Las composiciones y métodos útiles para modular la inmunidad innata son por lo tanto de gran interés, ya que pueden afectar los enfoques terapéuticos de afecciones que implican cáncer, enfermedades infecciosas, autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) e inmunodeficiencia.

Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de proteínas transmembrana tipo I cuya activación in vivo inicia una respuesta inmune innata que involucra citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento específicos. Aunque todos los TLR pueden activar ciertas moléculas de señalización intracelular como el factor nuclear kappa beta (NF- κ B) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas), el conjunto específico de citoquinas y quimiocinas liberadas parece ser único para cada TLR. TLR7, 8, y 9 comprenden una subfamilia de TLR que están localizados en compartimentos endosómicos o lisosómicos de células inmunes tales como células dendríticas y monocitos. En contraste con TLR7 y 9 que se expresan altamente en células dendríticas plasmacitoides (pDC), TLR8 se expresa principalmente en DC mielóide (mDC) y monocitos. Esta subfamilia media el reconocimiento de ácidos nucleicos microbianos, tales como ARN de cadena sencilla. Los agonistas de TLR8 estimulan la producción de diversas citoquinas inflamatorias incluyendo interleuquina 6, interleuquina 12, factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma. Tales agonistas también promueven la expresión aumentada de moléculas coestimuladoras tales como CD40, CD80, CD83 y CD86, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y receptores de quimoquina. Los interferones de tipo I, IFN α y IKN β , también son producidos por células tras la activación con agonistas de TLR8.

Pequeños compuestos sintéticos de imidazoquinolina de bajo peso molecular (menos de 400 Daltons) que se asemejan a los nucleótidos de purina, adenosina y guanosina, fueron los primeros agonistas de TLR7 y TLR8 que se identificaron. Una cantidad de estos compuestos han demostrado propiedades antivirales y anticancerígenas. Por ejemplo, el agonista de TLR7 imiquimod (ALDARA^{MR}) fue aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos como un agente tópico para el tratamiento de lesiones cutáneas causadas por ciertas cepas del virus del papiloma humano. El imiquimod también puede ser útil para el tratamiento de cánceres primarios de piel y tumores cutáneos tales como carcinomas de células basales, queratoacantomas, queratosis actínica y enfermedad de Bowen. El agonista de TLR7/8 resiquimod (R-848) está siendo evaluado como un agente tópico para el tratamiento del herpes genital humano.

La doxorrubicina es un fármaco utilizado en la quimioterapia del cáncer. Es un antibiótico de antraciclina, estrechamente relacionado con el producto natural daunomicina, y como todas las antraciclinas actúa intercalando ADN. La doxorrubicina se utiliza comúnmente en el tratamiento de una amplia gama de cánceres, incluyendo neoplasias hematológicas, muchos tipos de carcinoma y sarcomas de tejidos blandos.

El documento US 2010/029585 describe ciertas formulaciones agonistas de receptores tipo TOLL y su uso. Más particularmente, describe formulaciones que comprenden un agonista de TLR de benzo[b]azepina administrado en combinación con uno o más agentes anticancerígenos.

55 Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. La presente divulgación se dirige generalmente a una terapia de combinación que comprende la administración de un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina y una o más modalidades de tratamiento adicionales tales como un agente anticancerígeno (por ejemplo, doxorrubicina) para uso en el tratamiento, el alivio o prevención de cáncer, preferiblemente tumores sólidos (tales como sarcomas, carcinomas y linfomas), y para otros usos incluyendo el tratamiento de leucemias, el tratamiento de ciertas afecciones o enfermedades de la piel, tales como dermatitis atópica, el tratamiento de enfermedades infecciosas, preferiblemente enfermedades virales, y para uso como adyuvantes en vacunas formuladas para uso en la terapia del cáncer y en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Específicamente, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica para uso en una terapia de combinación para tratamiento de cáncer de ovario en un sujeto,

preferiblemente un mamífero, que comprende una formulación que incluye un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la terapia combinatoria comprende además una cantidad eficaz de doxorubicina y el agonista de TLR8 es 2-amino-N,N-dipropil-8-(4-(pirrolidin-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepina-4-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Preferiblemente, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 0,001 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 40 mg/ml, o de aproximadamente 2 mg/ml hasta aproximadamente 15 mg/ml. En ciertas realizaciones, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 8 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 6 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 4 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 2 mg/ml. En ciertas realizaciones, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml. Preferiblemente, la formulación comprende aproximadamente 1-30%, 5-15%, o 5-10% peso/volumen (p/v) de una ciclodextrina, preferiblemente una β -ciclodextrina, y lo más preferiblemente sulfobutiléter β -ciclodextrina. En ciertas realizaciones, la formulación comprende 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% p/v de una ciclodextrina, preferiblemente una β -ciclodextrina, y lo más preferiblemente sulfobutiléter β -ciclodextrina. En una realización particular, la formulación es una solución acuosa que comprende VTX-2337 a una concentración de al menos 2 mg/ml. En una realización adicional, la formulación comprende 15% p/v de una ciclodextrina, preferiblemente una β -ciclodextrina, y lo más preferible sulfobutiléter β -ciclodextrina. En realizaciones preferidas, la formulación es adecuada para inyección en un mamífero, preferiblemente un ser humano. En realizaciones particulares, la inyección es por vía subcutánea, vía intramuscular o vía transdérmica. En ciertas realizaciones, la formulación es adecuada para administración intravenosa.

Preferiblemente, la formulación reconstituida es adecuada para inyección en un mamífero, preferiblemente un humano. En realizaciones particulares, la inyección es por vía subcutánea, vía intramuscular o vía transdérmica. En ciertas realizaciones, la formulación es adecuada para administración intravenosa.

También se divulgan métodos para el tratamiento del cáncer mediante la administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, doxorubicina y agonista de TLR8 VTX-2337, que contiene una ciclodextrina. En tales métodos, VTX-2337 se puede administrar en combinación con una o más modalidades de tratamiento adicionales, donde las modalidades se seleccionan de entre un agente quimioterapéutico, una citoquina, un anticuerpo, terapia hormonal o terapia de radiación. En tales métodos, VTX-2337 se puede administrar como parte de un régimen para el tratamiento de un tumor sólido. El tumor sólido puede ser una forma de cáncer seleccionado entre cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer hepatocelular, cáncer colorrectal o linfoma, o cualquier combinación de los mismos. En tales métodos, VTX-2337 se puede administrar como parte de un régimen para el tratamiento de un linfoma, que puede ser linfoma de Hodgkin. Alternativamente, el linfoma puede ser linfoma no Hodgkin. En tales métodos, VTX-2337 se puede usar como adyuvante de vacuna para el tratamiento del cáncer. VTX-2337 se puede administrar por inyección o en forma intravenosa. La inyección puede ser por una vía subcutánea, una vía intramuscular o una vía transdérmica. En una realización particular, la formulación se puede administrar por inyección subcutánea.

En ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación para tratar el cáncer, VTX-2337 se puede administrar al sujeto en una dosis de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 0,05-0,075 mg/kg, o aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg) del peso corporal del sujeto. En tales métodos, VTX-2337 se puede administrar a una dosis de aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, o aproximadamente 5 mg/kg. Por ejemplo, suponiendo que el sujeto tiene un peso corporal de aproximadamente 70 kg, VTX-2337 se puede administrar a una dosis de aproximadamente 1,4 mg-700 mg (por ejemplo, 3,5 mg-5,25 mg, o aproximadamente 2,8-350 mg). VTX-2337 se puede administrar al sujeto cada semana o cada dos semanas.

También se divulga un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con VTX-2337 líquido o liofilizado y un agente anticancerígeno (por ejemplo, doxorubicina) de la divulgación para el tratamiento de cáncer o uno o más de sus síntomas. El VTX-2337 líquido o liofilizado y un agente anticancerígeno (por ejemplo, doxorubicina) se pueden empacar en el mismo o en diferentes contenedores del kit. Preferiblemente, la formulación de VTX-2337 comprende aproximadamente 1-30%, 5-15%, o 5-10% p/v de una ciclodextrina, preferiblemente una β -ciclodextrina, y lo más preferiblemente sulfobutiléter β -ciclodextrina. En ciertas realizaciones, la formulación de VTX-2337 comprende 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, o 30% p/v de una ciclodextrina, preferiblemente una β -ciclodextrina y lo más preferiblemente sulfobutiléter β -ciclodextrina. En una realización particular, la formulación es una formulación acuosa de VTX-2337. Preferiblemente, VTX-2337 se formula a una concentración de al menos 2 mg/ml y la formulación, ya sea acuosa o una formulación liofilizada reconstituida, es adecuada para inyección subcutánea en un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En una realización, VTX-2337 se formula a una concentración de al menos 2 mg/ml. Además, la formulación es adecuada para la administración al sujeto, donde el sujeto es preferiblemente un ser humano, mediante inyección y es

por inyección subcutánea, intramuscular o transdérmica. VTX-2337 se puede administrar al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg, a una dosis de aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg o a una dosis de aproximadamente 0,05-0,075 mg/kg. VTX-2337 se puede administrar al sujeto cada semana o cada dos semanas.

5 VTX-2337 se puede administrar en combinación con una o más modalidades de tratamiento adicionales, donde las modalidades se seleccionan de entre un agente quimioterapéutico, una citoquina, un anticuerpo, terapia hormonal o terapia de radiación. La presente divulgación también proporciona métodos para el tratamiento de enfermedades infecciosas que son causadas por un virus, donde el virus es un virus de hepatitis.

10 En una realización preferida, la doxorrubicina se formula para inyección, lo más preferiblemente administración intravenosa. En ciertas realizaciones, VTX-2337 de la divulgación se formula para administración por vía intradérmica, transdérmica, subcutánea o intramuscular.

15 En ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación para tratar el cáncer, se administra doxorrubicina al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto.

20 La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer con una formulación de dosis baja de un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina. El método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina a una dosis por debajo de 0,007 mg/kg/semana, por ejemplo, entre 0,002 mg/kg/semana y 0,006 mg/kg/semana. En tal método, el agonista de TLR8 de benzo[b]azepina es 2-amino-N,N-dipropil-8-(4-(pirrolidina-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepina-4-carboxamida. Tal método puede incluir administrar agonista de TLR8 de benzo[b]azepina como el único ingrediente activo o incluso incluya la administración de un segundo agente terapéutico tal como un fármaco anticanceroso en combinación con la formulación de dosis baja del agonista de TLR8 de benzo[b]azepina. El segundo agente terapéutico puede ser otro agonista de TLR8 de benzo[b]azepina o una molécula de fármaco descrita en la presente memoria (por ejemplo, doxorrubicina, gemcitabina o ciclofosfamida). El método también puede llevarse a cabo en combinación con una o más modalidades de tratamiento adicionales (por ejemplo, terapia de radiación) en un régimen para el tratamiento de cáncer.

30 También se divulga una forma de dosificación subcutánea que comprende un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina para el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde la forma de dosificación subcutánea, tras la administración a un ser humano a una dosificación de 2-4 mg/m² del agonista, proporciona un AUC_{0-inf} del agonista de aproximadamente 55 hasta aproximadamente 90 h*ng/mL, por ejemplo, de aproximadamente 60 hasta aproximadamente 80 h*ng/mL.

35 También se divulga una forma de dosificación subcutánea que comprende un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina para el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde la forma de dosificación subcutánea, tras la administración a un ser humano a una dosis de 2-4 mg/m² del agonista, proporciona una C_{máx} del agonista de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 ng/mL, por ejemplo, de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 ng/mL.

40 También se divulga una composición farmacéutica que incluye una formulación líquida o liofilizada de agonista de TLR8 de benzo[b]azepina (por ejemplo, VTX-2337) y un agente anticancerígeno (por ejemplo, doxorrubicina). La formulación del agonista y el agente anticancerígeno pueden estar en la misma composición farmacéutica o en composiciones diferentes, en cuyo caso, la formulación del agonista y el agente anticancerígeno se pueden administrar concurrentemente o secuencialmente.

45 Descripción de las figuras

50 La Figura 1A es un conjunto de imágenes de FACS adquiridas en células hematolinfóides de ratones NSG-HIS. Los ratones NSG recibieron células madre CD34⁺ hematopoyéticas humanas derivadas de sangre de cordón umbilical. Se muestra el nivel de injerto de células humanas (CD45⁺, CD45⁺ CD14⁺, CD45⁺CD33). Los ratones se trataron con 0,5 o 5 mg/kg de VTX-2337. Se muestra la maduración de las células CD14⁺ (CD83, CD86).

55 La Figura 1B es un conjunto de gráficos de barras que muestran un cambio en el nivel de marcadores de activación (CD86⁺, MHC Clase II) en monocitos (CD45⁺ CD14⁺), mDC (CD45⁺ CD11c⁺) y pDC (CD45⁺ CD123⁺) 6 horas después de la administración SC de VTX-2337 a ratones NSG-HIS.

La Figura 1C es un conjunto de gráficos de barras que muestran un cambio en los niveles plasmáticos de citoquinas (INF-g, TNF-alfa, IL-12 e IL-10) 6 horas después de la administración SC de VTX-2337 a ratones NSG-HIS.

60 La Figura 2 es un conjunto de gráficos de barras que muestran un cambio en los niveles plasmáticos de citoquinas (IFN-g, IL-10, TNF-alfa) en ratones que no recibieron tratamiento (CTRL), Doxil en la dosis máxima tolerada (MTD, 50 mg/m²) o 5 mg/kg de VTX-2337, 5 días después del tratamiento con Doxil.

65 La Figura 3A es un esquema que muestra el protocolo para tratar ratones NSG-HIS con Doxil, VTX-2337 o su combinación en un modelo de cáncer de ovario de ratón humanizado (NSG-HIS) que usó la línea celular de cáncer ovárico humano OVCAR5 para generar tumores.

- La Figura 3B es un gráfico lineal que muestra los cambios de tamaño en tumores de ratones NSG-HIS tratados con Doxil a razón de 50 mg/m², VTX-2337 a razón de 0,5 mg/kg o su combinación en el tiempo después de la inoculación con células OVCAR5.
- 5 La Figura 3C es un conjunto de imágenes IHC que muestran tumores infiltrados con células CD45⁺ de ratones tratados con Doxil a razón de 50 mg/m², VTX-2337 a razón de 0,5 mg/kg o su combinación en un modelo de cáncer de ovario humanizado.
- 10 La Figura 3D es un conjunto de gráficos de barras que muestran un cambio en el nivel de células T CD3⁺CD8⁺, activadas por CD3⁺, CD8⁺, CD69⁺ que infiltran el tumor y macrófagos activados por CD40⁺ (CD45⁺CD11b⁺), pDC (CD45⁺CD123⁺) y mDC (CD45⁺CD11c⁺) en ratones tratados con Doxil a razón de 50 mg/m², VTX-2337 a razón de 0,5 mg/kg, o su combinación en un modelo de cáncer de ovario humanizado.
- 15 La Figura 4A es un gráfico lineal que muestra los cambios en el recuento por minuto (cpm) de células líticas OVCAR5 marcadas con ⁵¹Cr lisadas por los TIL, expandidas de ratones tratados con Doxil o la combinación de VTX-2337 y Doxil, en respuesta a una relación variable de TIL efectores sobre células OVCAR5 objetivo.
- 20 La Figura 4B es un gráfico lineal que muestra los cambios en el tamaño del tumor a lo largo del tiempo en ratones NSG-HIS que fueron inoculados con células OVCAR 5 y las tratados con TIL transferidos adoptivamente de ratones en el experimento descrito en la Figura 3.
- 25 La Figura 4C es un conjunto de gráficos lineales que muestran los cambios en los recuentos de células líticas OVCAR5 marcadas con ⁵¹Cr lisadas por TIL de los ratones tratados con Doxil o la combinación de VTX-2337 y Doxil, en ausencia o presencia de un anticuerpo neutralizante anti MHC clase I (MHCI).
- La Figura 4D es un conjunto de gráficos de barras que muestran un cambio en el nivel de IFN- γ liberado por TIL incubado con células OVCAR5 o células de melanoma.
- 30 La Figura 5A es un gráfico de barras que muestra un cambio en el porcentaje de células apoptóticas teñidas por anexina V y 7AAD en células OVCAR5 tratadas con medios acondicionados de PBMC humanas que habían sido incubadas con tampón solo, perlas CD3/CD28 o 1 μ g/mL de VTX - 2337.
- 35 La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra un cambio en el número de células vivas en células OVCAR5 tratadas con medios acondicionados de PBMC humanas que habían sido incubadas con regulador solo, perlas de CD3/CD28 o 1 μ g/ml de VTX-2337.
- La Figura 5C es una imagen que muestra una película de una transferencia de Western que muestra la expresión del receptor 1 de TNF-alfa en células OVCAR5.
- 40 La Figura 5D es un conjunto de gráficos que muestran imágenes de FACS de células OVCAR5 tratadas con TNF-alfa (10 ng/mL) o Doxil (1 μ g/ml) o su combinación y el cambio resultante en el porcentaje de células apoptóticas teñidas por anexina V y 7AAD.
- 45 La Figura 5E es una imagen que muestra una película de una transferencia de Western de expresión de FLIP_L en células OVCAR 5 tratadas con 0,5 o 2,5 μ g/mL de Doxil.
- La Figura 5F es un conjunto de gráficos que muestran imágenes de FACS de células OVCAR5 que fueron cultivadas previamente con 10 μ g/ml de cicloheximida (ciclohex) durante 24 horas y luego tratadas con 10 o 50 ng/mL de TNF-alfa, y un cambio resultante en el porcentaje de células apoptóticas teñidas por anexina V y 7AAD.
- 50 La Figura 6 es un conjunto de gráficos que muestran la potencia y selectividad de VTX-2337 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 15 donantes sanos y también en células HEK293 transfectadas con TLR8 o TLR7 y un gen informador dirigido por NF- κ B.
- 55 La Figura 7 es un conjunto de gráficos que muestran que VTX-2337 estimula una gama de citoquinas y quimoquinas en sangre humana entera.
- La Figura 8 es un conjunto de gráficos que muestran que VTX-2337 activa monocitos y células dendríticas mieloides (mDC) pero no células dendríticas plasmacitoides (pDC).
- 60 La Figura 9 es un gráfico que muestra la farmacocinética de VTX-2337 después de administración subcutánea. Las etiquetas numéricas "1-8" en esta Figura corresponden a las cohortes 1-8, respectivamente.
- 65 Las Figuras 10A y 10B son gráficos que muestran respuestas farmacodinámicas consistentes durante múltiples ciclos de tratamiento.

Descripción detallada de la invención

En la especificación, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. En el caso de conflicto, la presente memoria descriptiva predominará.

La presente invención proporciona una composición y métodos para usar un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina, (por ejemplo, VTX-2337) y otra modalidad terapéutica (tal como un agente anticanceroso, por ejemplo, doxorrubicina) para tratar, aliviar o prevenir el cáncer u otros trastornos descritos en la presente memoria. VTX-2337 es un agonista de TLR8 de molécula pequeña, nuevo y potente. Las formulaciones de VTX-2337 se describen en la publicación internacional PCT WO 10/014913. Las formulaciones de la presente invención son adecuadas para su uso en métodos para el tratamiento de un cáncer humano como se describe en la presente memoria. La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas y por lo tanto proporciona una composición farmacéutica para uso en una terapia combinatoria para tratamiento de cáncer en un sujeto, preferiblemente un mamífero, que comprende una formulación que incluye un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la terapia combinatoria comprende además una cantidad eficaz de doxorrubicina y el agonista de TLR8 es 2-amino-N,N-dipropil-8-(4-(pirrolidina-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepina-4-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa. En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos, que se definirán para contar con las definiciones que se exponen a continuación.

Un "sujeto" en el contexto de la presente invención es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un primate humano, no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca. Un sujeto puede ser macho o hembra. Un sujeto puede ser uno que ha sido previamente diagnosticado o identificado con cáncer y, opcionalmente, ya ha experimentado, o está experimentando, una intervención terapéutica para el cáncer tal como el tratamiento con Doxil o radioterapia. Alternativamente, un sujeto también puede ser uno que no ha sido previamente diagnosticado con cáncer, pero que está en riesgo de desarrollar tal condición. Por ejemplo, un sujeto puede ser uno que exhibe uno o más síntomas para el cáncer.

Los términos "enfermedad", "trastorno" y "condición" se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a cualquier interrupción de la función normal del cuerpo, o la aparición de cualquier tipo de patología. El agente etiológico que causa la alteración de la fisiología normal puede o no ser conocido. Además, aunque dos pacientes pueden ser diagnosticados con el mismo trastorno, los síntomas particulares que muestran esos individuos pueden o no ser idénticos.

Los términos "tratar" y "tratamiento" tal como se usan en la presente memoria se refieren a la reducción en la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminación de los síntomas y/o causa subyacente, prevención de la aparición de síntomas y/o su causa subyacente, y mejora o reparación de los daños. Por ejemplo, el tratamiento de un paciente mediante la administración de un agente anticanceroso de la invención abarca la quimioprevención en un paciente susceptible de desarrollar cáncer (por ejemplo, en mayor riesgo, como resultado de predisposición genética, factores ambientales o similares) y/o en sobrevivientes de cáncer en riesgo de recurrencia de cáncer, así como el tratamiento de un paciente de cáncer ya sea mediante inhibición o causando la regresión de un trastorno o enfermedad.

El término "alivio" o "mejoría" como se usa en la presente memoria se refiere al alivio de al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o condición.

El término "prevenir", tal como se usa en la presente memoria, incluye prevenir o retardar el comienzo de una progresión de la enfermedad clínicamente evidente, o prevenir o retardar la aparición de una etapa preclínica evidente de una enfermedad en individuos en riesgo. Esto incluye el tratamiento profiláctico de las personas en riesgo de desarrollar una enfermedad.

Cuando se hace referencia a un compuesto de la invención, los solicitantes pretenden que el término "compuesto" abarque no sólo la entidad molecular especificada sino también sus análogos farmacológicamente activos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitarse a, sales, ésteres, amidas, profármacos, conjugados, metabolitos activos y otros derivados, análogos y compuestos relacionados.

Por los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención se entiende una cantidad no tóxica pero suficiente del fármaco o agente para proporcionar el efecto deseado.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede incorporarse en una composición farmacéutica administrada a un paciente sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuando de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está contenido. Cuando se usa el término "farmacéuticamente aceptable" para referirse a un

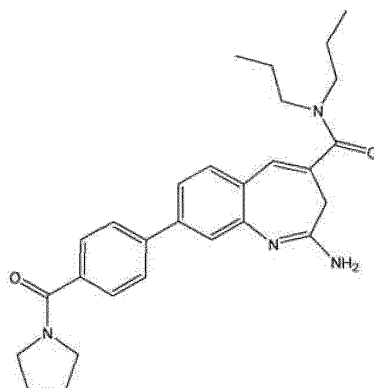
vehículo o excipiente farmacéutico, está implícito que el vehículo o excipiente ha cumplido con los estándares requeridos de pruebas toxicológicas y de fabricación o que está incluido en la Guía de Ingredientes Inactivos preparada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. "Farmacológicamente activo" (o simplemente "activo") como en un derivado o análogo "farmacológicamente activo", se refiere a un derivado o análogo que tiene el mismo tipo de actividad farmacológica que el compuesto original y aproximadamente de grado equivalente.

Por "según sea necesario", como en "administración que se necesite" o "en necesidad de la misma" se entiende que se administra una formulación a un paciente cuando se observan síntomas, o cuando se espera que aparezcan síntomas, o en cualquier momento que el paciente y/o el médico tratante consideren apropiado tratar (terapéutica o profilácticamente) síntomas indeseables (por ejemplo, síntomas derivados del cáncer).

Agonistas de TLR de la invención

1.1 Formulación

Las formulaciones de VTX-2337 comprenden un compuesto activo con la siguiente estructura. Las formulaciones de la presente invención son adecuadas para administración subcutánea a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, pero pueden usarse para la administración por otros medios.



Las formulaciones de VTX-2337 de la presente invención comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término excipiente, tal como se utiliza aquí, se refiere ampliamente a una sustancia biológicamente inactiva utilizada en combinación con los agentes activos de la formulación. Un excipiente puede utilizarse, por ejemplo, como un agente solubilizante, un agente estabilizante, un diluyente, un vehículo inerte, un conservante, un aglutinante, un desintegrante, un agente de recubrimiento, un agente saborizante o un agente colorante. Preferiblemente, se elige al menos un excipiente para proporcionar una o más propiedades físicas beneficiosas a la formulación, tales como una mayor estabilidad y/o solubilidad del (de los) agente(s) activo(s). VTX-2337 como se describe aquí es el agente activo primario en las formulaciones de la presente invención. Sin embargo, VTX-2337 puede formularse con otros agentes activos, por ejemplo, otros agonistas de TLR, agentes anticancerígenos o agentes antivirales, como se describe en la presente memoria.

Un excipiente "farmacéuticamente aceptable" es aquel que ha sido aprobado por un organismo regulador estatal o federal para su uso en animales, y preferiblemente para uso en seres humanos, o está listado en la Farmacopea de EE.UU., la Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y preferiblemente para uso en seres humanos.

Ejemplos de excipientes incluyen ciertas proteínas inertes tales como albúminas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como ácido aspártico (que alternativamente se puede denominar aspartato), ácido glutámico (que alternativamente se puede denominar glutamato), lisina, arginina, glicina e histidina; ácidos grasos y fosfolípidos tales como sulfonatos de alquilo y caprilato; surfactantes tales como dodecilsulfato de sodio y polisorbato; surfactantes no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG); carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, manosa, maltosa, trehalosa y dextrinas, incluyendo ciclodextrinas; polioles tales como manitol y sorbitol; agentes quelantes tales como EDTA; y contraiones formadores de sales tales como sodio.

Las formulaciones de VTX-2337 pueden contener una ciclodextrina que aumenta la solubilidad acuosa del agonista de TLR. Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos cristalinos, no higroscópicos de α -D-glucopiranosas. Como resultado de una falta de rotación alrededor de los enlaces que conectan las unidades de glucopiranosas, las ciclodextrinas no son cilíndricas, sino de forma toroidal. Debido a esta rotación restringida tienen una estructura rígida con una cavidad central cuyo tamaño varía según el número de unidades de glucopiranosas en la molécula. Las tres ciclodextrinas más comunes son α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, que consisten en seis, siete u ocho unidades glucopiranosas, respectivamente. Debido a la disposición de grupos hidroxilo dentro de la molécula de ciclodextrina y la forma de la molécula, la superficie interna de la cavidad es hidrófoba, mientras que la superficie exterior es hidrófila. Los grupos

hidroxilo primarios están situados en el lado más estrecho (interior) de la molécula toroidal, mientras que los grupos hidroxilo secundarios están situados en el borde más ancho (exterior). Esta disposición permite que las ciclodextrinas se adapten a una amplia variedad de pequeñas moléculas hidrófobas dentro de la cavidad hidrófoba formando un complejo de inclusión.

Las ciclodextrinas adecuadas para uso en las formulaciones de la invención son conocidas en la técnica. Por ejemplo, TRAPPSOL^{MR} y otras ciclodextrinas están fabricadas por CTD, Inc. (High Springs, FL) y CAPTISOL® (sulfobutíler β-ciclodextrina) está presente en inyectables comercialmente disponibles tales como ABILIFY IM^{MR}, GEODON y VFEND IV. Preferiblemente, CAPTISOL® se usa en las formulaciones de la presente invención.

Se pueden usar otros agentes solubilizantes en agua. Ejemplos de otros agentes de este tipo incluyen Poloxámero, Povidona K17, Povidona K12, Tween 80, etanol, Cremóforo/etanol, polietilenglicol 300, polietilenglicol 400 y propilenglicol. En realizaciones preferidas, las formulaciones de la invención contienen menos del 10% v/v de tales agentes. En ciertas realizaciones, se usan agentes solubilizantes de base oleosa tales como lipodol o aceite de cacahuete.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de VTX-2337 pueden prepararse como un líquido o en una forma sólida tal como un polvo, tableta, píldora o cápsula. Las formulaciones líquidas pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. En una realización, la formulación es una solución acuosa. En otra realización, la formulación final es liofilizada. En otras realizaciones, la formulación comprende un sistema coloidal de suministro de fármacos. Tales sistemas de administración de fármacos incluyen, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas.

En una realización, VTX-2337 es una formulación líquida o liofilizada adecuada para inyección en un mamífero, preferiblemente un ser humano. En una realización, la formulación es estéril. En otra realización, la formulación es una formulación estéril liofilizada que es adecuada para inyección tras reconstitución con una cantidad de un vehículo acuoso. En una realización, la formulación líquida o liofilizada se prepara como una forma de dosificación unitaria como se describe a continuación. Las formulaciones pueden contener o no un conservante añadido.

En ciertas realizaciones, VTX-2337 comprende además uno o más adyuvantes. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen potenciadores de la respuesta inmune tales como derivados microbianos (por ejemplo, productos bacterianos, toxinas tales como toxina del cólera y toxina lábil al calor de E. coli, lípidos, lipoproteínas, ácidos nucleicos, peptidoglicanos, carbohidratos, péptidos), células, citoquinas (por ejemplo, células dendríticas, IL-12 y GM-CSF), hormonas y moléculas pequeñas. Los adyuvantes contemplados incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de base oleosa (por ejemplo, adyuvante de Freund), oligonucleótidos CpG, adyuvantes de sales de aluminio, adyuvantes de sales de calcio, emulsiones y formulaciones a base de surfactantes (por ejemplo, MF59, AS02, Montanida, ISA-51, ISA-720 y QA21).

De acuerdo con ciertas realizaciones, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 50 mg/ml. En algunas realizaciones, el agonista de TLR de benzo[b]azepina se formula a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 30 mg/ml. En otras realizaciones, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 2 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml. En ciertas realizaciones, VTX-2337 se formula a una concentración entre 0,5 y 10 mg/ml, entre 0,5 y 5 mg/ml, o entre 1 y 5 mg/ml. En otras realizaciones, VTX-2337 se formula a una concentración entre 10-20 mg/ml, 20-30 mg/ml, o entre 30-50 mg/ml. En realizaciones específicas, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, o aproximadamente 40 mg/ml.

Las formulaciones de VTX-2337 pueden prepararse opcionalmente como formas de dosificación unitaria. "Forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para el uso pretendido, es decir, como una administración única al sujeto a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada del agente o agentes activos formulados con el excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados. Por ejemplo, una dosis unitaria por vial puede contener un cierto volumen, tal como 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml, que tiene una concentración particular del agente activo. Una unidad de dosificación puede comprender un solo agente activo, es decir, VTX-2337 como se describe aquí, sus derivados y análogos, o mezclas de los mismos con otros agentes activos (por ejemplo, un agente anticancerígeno tal como doxorubicina) para uso en terapias de combinación. En realizaciones preferidas, la forma de dosificación unitaria comprende aproximadamente 15 mg/ml hasta aproximadamente 40 mg/ml de VTX-2337. Las formulaciones están contenidas opcionalmente en recipientes de dosis unitaria o múltiples dosis, por ejemplo, en ampollas o viales sellados, y pueden estar en una condición liofilizada. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles según métodos reconocidos en la técnica. Los ejemplos de formas de dosificación unitarias incluyen, pero no

se limitan a: comprimidos; comprimidos oblongos; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina elástica blanda; tabletas; pastillas; grageas; dispersiones; supositorios; ungüentos; cataplasmas; pastas; polvos; apósitos; cremas; emplastos; soluciones; parches; aerosoles (por ejemplo, atomizadores nasales o inhaladores); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración oral o en la mucosa a un paciente, incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua, o emulsiones líquidas de agua en aceite), soluciones y elixires; formas de dosificación líquidas adecuadas para administración subcutánea a un sujeto; y sólidos estériles (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) que se pueden reconstituir para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para administración subcutánea a un sujeto.

Se puede encontrar información adicional con respecto a los métodos de fabricación de las composiciones y formulaciones y los ingredientes que comprenden las composiciones y formulaciones de acuerdo con la presente invención en referencias estándar en el campo, tales como por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA.

1.2 Métodos de uso

La combinación de VTX-2337 y una o más modalidades de tratamiento adicionales (por ejemplo, agentes anticancerígenos tales como doxorrubicina) es útil en métodos para el tratamiento de cáncer. Preferiblemente, las formulaciones de VTX-2337 se usan en combinación con una o más modalidades de tratamiento adicionales en un régimen para el tratamiento del cáncer.

Los métodos para probar la eficacia del agonista de TLR8 para tratar el cáncer o la combinación de un agente anticancerígeno y un agonista de TLR8 para tratar el cáncer incluyen, ensayos *in vitro* tales como los que usan células PBMC, HEK humanas, o IHC y FACS para células infiltrantes, y lisis de células tumorales, y ensayos *in vivo* tales como los que usan ratones NSG-HIS o un ratón humanizado (NSG-HIS) inyectados con líneas celulares de ovario o pacientes humanos.

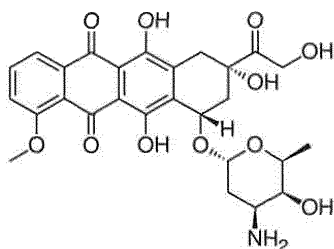
1.2.1 Terapia de combinación

La terapia de combinación abarca, además de la administración de VTX-2337, el uso coadyuvante de una o más modalidades que ayudan en la prevención o tratamiento del cáncer. Tales modalidades incluyen, agentes quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos, agentes antiangiogénicos, citoquinas, hormonas, anticuerpos, polinucleótidos, radiación y agentes terapéuticos fotodinámicos. En realizaciones específicas, la terapia de combinación se puede usar para prevenir la recurrencia del cáncer, inhibir la metástasis, o inhibir el crecimiento y/o la propagación de cáncer o metástasis. Tal como se utiliza en la presente memoria, "en combinación con" significa que la formulación de VTX-2337 de la invención se administra como parte de un régimen de tratamiento que comprende una o más modalidades de tratamiento adicionales tal como se describe con más detalle en las siguientes secciones.

En ciertas realizaciones, VTX-2337 se administra antes, simultáneamente con, o posteriormente a la administración de una o más de otras modalidades. En ciertas realizaciones, VTX-2337 se administra antes o después (por ejemplo, 5 días después) de la administración de un agente anticancerígeno (por ejemplo, doxorrubicina). En una realización, VTX-2337 se formula con una o más modalidades. En otra realización, las una o más de otras modalidades se administran en una composición farmacéutica separada. De acuerdo con esta realización, las o más de otras modalidades se pueden administrar a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración como las usadas para administrar VTX-2337.

1.2.1.1 Combinación con doxorrubicina

En ciertas realizaciones, la formulación que comprende VTX-2337 se administra en combinación con doxorrubicina. Preferiblemente, la doxorrubicina está en una forma liposomal PEGilada. La estructura química de la doxorrubicina se muestra a continuación:



1.2.1.2 Combinación con otros agentes anticancerígenos

En ciertas realizaciones, la formulación que comprende VTX-2337 de la invención se puede administrar en combinación

con uno o más agentes anticancerígenos, preferiblemente un agente quimioterapéutico. Tales agentes quimioterapéuticos incluyen los siguientes grupos de compuestos: antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, agentes antimitóticos, agentes alquilantes, compuestos de platino, compuestos de arsénico, inhibidores de ADN topoisomerasa, taxanos, análogos de nucleósidos, alcaloides de plantas y toxinas; y sus derivados sintéticos. Los siguientes son ejemplos de compuestos particulares dentro de estos grupos. Los agentes alquilantes incluyen mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida y clorambucilo; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU); alquilsulfonatos tales como busulfán y treosulfán; y triazenos tales como dacarbazina. Los compuestos que contienen platino incluyen cisplatino, carboplatino, aroplatino y oxaliplatino. Los alcaloides vegetales incluyen los alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina; y taxoides tales como paclitaxel y docetaxel. Los inhibidores de ADN topoisomerasa incluyen epipodofilinas tales como etopósido, tenipósido, topotecano, 9-aminocamptotecina, camptotecina y crisnatol; y mitomicinas tales como mitomicina C. Los antifolatos incluyen inhibidores de DHFR tales como metotrexato y trimetrexato; inhibidores de IMP deshidrogenasa tales como ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina, hidroxurea y EICAR; e inhibidores de ribonucleótido reductasa tales como deferaxamina. Los análogos de pirimidina incluyen análogos de uracilo tales como 5-fluorouracilo, floxuridina, doxifluridina y raltitrexed; y análogos de citosina tales como citarabina (ara C), arabinósido de citosina y fludarabina. Los análogos de purina incluyen mercaptopurina y tioguanina. Los antimetabolitos de ADN incluyen 3-HP, 2'-desoxi-5-fluorouridina, 5-HP, alfa-TGDR, glicinato de afidicolina, ara-C, 5-aza-2'-desoxicitidina, beta-TGDR, ciclocitidina, guanazol, inosina glicodialdehído, macebecina II y pirazoloimidazol. Los agentes antimitóticos incluyen alocolchicina, halicondrina B, colchicina, derivado de colchicina, dolastatina 10, maytansina, rizoxina, tiocolchicina y tritil cisteína.

Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos para uso con las formulaciones agonistas de TLR de benzo[b]azepina de la invención incluyen inhibidores de isoprenilación; neurotoxinas dopaminérgicas tales como el ión 1-metil-4-fenilpiridinio; inhibidores del ciclo celular tales como estaurosporina; actinomicinas tales como actinomicina D y dactinomicina; bleomicinas tales como bleomicina A2, bleomicina B2 y peplomicina; antraciclinas tales como daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarubicina, epirubicina, pirarubicina, zorubicina y mitoxantrona; inhibidores de MDR tales como verapamilo; y los inhibidores de la ATPasa de Ca^{2+} tales como tapsigargina.

También se contemplan composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, FLAG, CHOP) para su uso en combinación con VTX-2337 de la invención. FLAG comprende fludarabina, arabinósido de citosina (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona. Cada una de las listas anteriores es ilustrativa y no pretende ser limitativa.

En una realización, VTX-2337 se administra en combinación con uno o más de los siguientes: IFN α , IL-2, Dacarbazina (Bayer), Temozolomida (Schering), Tamoxifeno (AZ), Carmustina (BMS), Melfalán (GSK), Procarbazina (Sigma-Tau), Vinblastina, carboplatino, cisplatino, taxol, ciclofosfamida, doxorubicina, Rituxan (Genentech/Roche), Herceptina (Genentech/Roche), Gleevec, Iressa (AZ), Avastin (Genentech/Roche) o Tarceva (Genentech/Roche).

En otra realización, VTX-2337 de la invención se puede administrar en combinación con uno o más de los siguientes: un enediino tal como calicheamicina y esperamicina; duocarmicina, metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, Ara-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo.

Las toxinas y agentes quimioterapéuticos adecuados que se pueden usar en combinación con las formulaciones agonistas de TLR de benzo[b]azepina de esta invención se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en Goodman y Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co., 1985). Otras toxinas y/o agentes quimioterapéuticos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

Otros ejemplos de agentes anticancerígenos que pueden usarse en combinación con VTX-2337 de esta invención incluyen los siguientes: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antrammina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquna; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de efloinitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofoquina; interleuquina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; Interferón alfa-n3; Interferón beta-1a; Interferón gamma-1b; iproplatino; clorhidrato de irinotecano; acetato de lanreótido; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maytansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcin; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano;

clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipsulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiampirina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreótido; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina.

Otros agentes anticancerígenos que pueden usarse incluyen 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adacipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética antidorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosorina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de la caseína quinasa (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cisporfirina; cladribina; análogos del clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; octoesfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dextrazoxano; dexverapamilo; diaziquna; didemnina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselén; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasteride; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametilén bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplaquinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreótido; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuporelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxorribina; lurtotecano; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos lífticos; maitansina; manostatina a; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario no coincidente; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; lípido A monofosforilado + pared celular de micobacteria sk; mopidamol; inhibidor de múltiples genes de resistencia a fármacos; terapia basada en el supresor de tumores múltiples 1; mostaza de agente anticancerígeno; micaperoxido B; extracto de la pared celular de micobacterias; miriaporona; n-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nitrógeno antioxidante; nitulina; O6-bencilguanina; octeótido; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrona; oracina; inductor oral de citoquina; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubrona; perfosfamida; alcohol perilífico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en la proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrona; inhibidores de la proteína farnesil transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; rohituquina; romurtida roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; sarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos Sdi 1; semustina;

inhibidor derivado de la senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena sencilla; sizofurano; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámina; inhibidores de la estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metioduro de tamoxifeno; taumomustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporquina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de la timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor totipotente de células madre; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrona; turosterida; inhibidores de la tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor uroquinasa; vapreótido; variolina B; sistema vector, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimulador de zinostatina.

1.2.1.3 Combinación con radioterapia

En otra realización, VTX-2337 de la invención se administra junto con un régimen de radioterapia para el tratamiento del cáncer. Los métodos abarcan regímenes que comprenden radioterapia de haz externo, implantación intersticial de radioisótopos (I-125, paladio, iridio), radioisótopos tales como estroncio 89, radioterapia torácica, radioterapia intraperitoneal con P-32 y/o radioterapia abdominal y pélvica total. Puede utilizarse cualquier radionucleido citotóxico o isótopo terapéutico adecuado en el régimen de radioterapia. En ciertas realizaciones, el isótopo es un isótopo emisor alfa tal como ^{225}Ac , ^{224}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{224}Ra , o ^{223}Ra . En otras realizaciones, el radionucleido citotóxico es un isótopo emisor beta tal como ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{166}Ho o ^{64}Cu . En algunas realizaciones, un radionucleido citotóxico es un isótopo que emite electrones Auger y de baja energía tales como ^{125}I , ^{123}I o ^{77}Br . En otras realizaciones, el isótopo es ^{198}Au o ^{32}P .

En ciertas realizaciones, la cantidad de radionucleido administrado al sujeto está entre aproximadamente 0,001 mCi/kg y aproximadamente 10 mCi/kg. En algunas realizaciones, la cantidad de radionucleido administrada al sujeto está entre aproximadamente 0,1 mCi/kg y aproximadamente 1,0 mCi/kg. En otras realizaciones, la cantidad de radionucleido administrada al sujeto está entre aproximadamente 0,005 mCi/kg y 0,1 mCi/kg.

1.2.1.4 Combinación con anticuerpos terapéuticos

En otra realización, VTX-2337 de la invención se administra en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos, tales como un anticuerpo o una vacuna. En algunas realizaciones, los anticuerpos tienen usos terapéuticos y/o profilácticos *in vivo* contra el cáncer.

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos y profilácticos que pueden ser usados en combinación con una formulación del agonista de TLR de benzo[b]azepina de la invención incluyen MDX-010 (Medarex, NJ) que es un anticuerpo anti-CTLA-4 humanizado actualmente en clínica para el tratamiento del cáncer de próstata; SYNAGIS® (MedImmune, MD) que es un anticuerpo monoclonal de antiviral respiratorio sincitial humanizado (RSV) para el tratamiento de infección por RSV; y HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Otros ejemplos son F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Genentech); CDP860 que es un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Celltech, RU); PR0542 que es un anticuerpo gp120 anti-VIH fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); Ostavir que es un anticuerpo del virus anti-Hepatitis B humano (Protein Design Lab/Novartis); PROTOVIR^{MR} que es un anticuerpo IgG1 anti-CMV (Protein Design Lab/Novartis); MAK-195 (SEGARD) que es F(ab')₂ anti-TNF-α murino (Knoll Pharma/BASF); IC14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo IgG1 anti-VEGF humanizado (Genentech); OVAREX^{MR} que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); PANOREX^{MR} que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular anti-17-1A murino (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG anti-idiotipo murino (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN^{MR} que es un anticuerpo de integrina anti-αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo IgG1 anti-CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN^{MR} que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettayu); LYMPHOCIDE^{MR} que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); Smart ID 10 que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (Protein Design Lab); ONCOLYM^{MR} (Lym-1) es un anticuerpo anti-HLA murino marcado en forma radioactiva de DIAGNOSTIC REAGENT (Techniclone); ABX-IL8 es un anticuerpo anti-IL8 humano (Abgenix); Anti-CD11 es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genentech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN^{MR} es un anticuerpo anti-CD20 murino marcado en forma radioactiva (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un anticuerpo IgG anti-CD3 humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor 5 del complemento humanizado (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF-α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF-α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un

anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA^{MR} es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN^{MR} es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo anti-CD64 humano (Fc γ R) (Medarex/Centeon); SCH55700 es un anticuerpo IgG4 anti-IL-5 humanizado (Celltech/Schering); SB-240563 y SB-240683 son anticuerpos anti-IL-5 y IL-4 humanizados respectivamente, (SmithKline Beecham); RhuMab-E25 es un anticuerpo IgG1 anti-IgE humanizado (Genentech/Novartis/Tanox Biosystems); ABX-CBL es un anticuerpo IgM anti CD-147 murino (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo IgG anti-CD2 de rata (MedImmune/Bio Transplant); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo IgG2a anti-CD3 murino (Ortho Biotech); SIMULECT^{MR} es un anticuerpo IgG1 anti-CD25 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo IgG anti- β_2 -integrina humanizado (LeukoSite); Anti-LFA-1 es un F(ab')₂ anti-CD18 murino (Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β_2 humano (Cambridge Ab Tech); Y Corsevina M es un anticuerpo anti-Factor VII quimérico (Centocor). Los reactivos inmunorreactivos enumerados anteriormente, así como cualesquiera otros reactivos inmunorreactivos, se pueden administrar de acuerdo con cualquier régimen conocido por los expertos en la técnica, incluyendo los regímenes recomendados por los proveedores de los reactivos inmunorreactivos.

1.2.1.5 Combinación con otros agentes terapéuticos

Además de los agentes anticancerígenos y anticuerpos terapéuticos, VTX-2337 de la invención se pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes anti-angiogénicos (por ejemplo, en métodos para el tratamiento de tumores sólidos y para el tratamiento y prevención de metástasis) y agentes anti-hormonales (particularmente en métodos para el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas tales como cáncer de mama y cáncer de próstata).

En una realización, VTX-2337 de la invención se administra en combinación con uno o más agentes anti-angiogénicos. Tales agentes incluyen, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpina (inhibidor de serina proteasa), antitrombina, fragmentos proteolíticos del extremo terminal N de 29 kDa y del extremo terminal C de 40 kDa de fibronectina, fragmento proteolítico de 16 kDa de prolactina, fragmento proteolítico de 7,8 kDa del factor plaquetario 4, un péptido de 13 aminoácidos que corresponde a un fragmento del factor plaquetario-4 (Maione y colaboradores, 1990, Cancer Res. 51: 2077- 2083), un péptido de 14 aminoácidos que corresponde a un fragmento de colágeno I (Tolma y colaboradores, 1993, J. Cell Biol. 122: 497- 511), un péptido de 19 aminoácidos que corresponde a un fragmento de Trombospondina I (Tolsma y colaboradores, 1993, J. Cell Biol. 122: 497-511), un péptido de 20 aminoácidos que corresponde a un fragmento de SPARC (Sage y colaboradores, 1995, J. Cell. Biochem., 57: 1329- 1334), o cualquiera de los fragmentos, miembros de la familia o variantes de los mismos, incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables.

También se han descrito otros péptidos que inhiben la angiogénesis y corresponden a fragmentos de laminina, fibronectina, procolágeno y EGF (véase, por ejemplo, Cao, 1998, Prog Mol Subcell Biol. 20: 161-176). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales y los pentapéptidos cíclicos que bloquean ciertas integrinas que unen proteínas RGD (es decir, poseen el motivo peptídico Arg-Gly-Asp) tienen actividades anti-vascularización (Brooks y colaboradores, 1994, Science 264: 569- 571; Hammes y colaboradores, 1996, Nature Medicine 2: 529- 533). Además, la inhibición del receptor activador del plasminógeno uroquinasa por antagonistas del receptor inhibe la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (Min y colaboradores, 1996, Cancer Res. 56: 2428-33; Crowley y colaboradores, 1993, Proc Natl Acad Sci. 90: 5021- 25).

En otra realización, VTX-2337 de la invención se utiliza junto con una modalidad de tratamiento hormonal. Tales modalidades de tratamiento incluyen la administración de antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, tamoxifeno, raloxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON), antagonistas de LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y procesamiento de hormonas y esteroides (por ejemplo dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, testosterona, progestinas), derivados de vitamina A (por ejemplo, ácido all trans retinoico (ATRA)); análogos de vitamina D3; antigestágenos (por ejemplo, mifepristona, onapristona) y antiandrógenos (por ejemplo, acetato de ciproterona).

En otra realización, VTX-2337 de la invención se utiliza junto con una modalidad de tratamiento que utiliza compuestos polinucleótidos, tales como polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, y polinucleótidos de triple hélice y similares.

1.2.1.6 Combinación con agentes inmunorreguladores

En ciertas realizaciones, VTX-2337 de la invención se administra en combinación con un agente inmunorregulador. En algunas realizaciones, el agonista de TLR de benzo[b]azepina se formula con el agente inmunorregulador. Un "agente inmunorregulador" es una sustancia que suprime, enmascara o mejora el sistema inmune del sujeto a quien se le administra. Ejemplos de agentes son aquellos que suprimen la producción de citoquinas, subregulan o suprimen la expresión del propio antígeno, o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de tales agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5 sustituidas (véase la patente estadounidense No. 4.665.077), azatioprina (o ciclofosfamida,

si hay una reacción adversa a la azatioprina); bromocriptina; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en la patente estadounidense No. 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina A; esteroides tales como glucocorticosteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona y dexametasona; citoquina o antagonistas de receptores de citoquina que incluyen anticuerpos anti-interferón γ , β o α ; anticuerpos anti-factor- α de necrosis tumoral; anticuerpos anti-factor- β de necrosis tumoral; anticuerpos anti-interleuquina 2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-L3T4; anti-globulina linfocítica heteróloga; anticuerpos panT, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3; estreptoquinasa; TGF- β ; estreptodornasa; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; y rapamicina. Los ejemplos de citoquinas incluyen, linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas están incluidas la hormona del crecimiento tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humano N-metionilo y la hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínas tales como hormona estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; Factor de necrosis tumoral α ; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- α ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factores de crecimiento I y II tipo insulina; eritropoyetina (EPO); Factores osteoinductivos; interferones; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófago (M-CSF); CgP de macrófago- granulocito (GM-CSF); CSF de granulocitos (G-CSF); Interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

En ciertas realizaciones, los métodos incluyen además la administración al sujeto de uno o más agentes inmunomoduladores, preferiblemente una citoquina. Las citoquinas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en interleuquina 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina y el Interferón γ .

1.2.1.7 Combinación con compuestos que mejoran la función de los monocitos o los macrófagos

En ciertas realizaciones, se puede usar un compuesto que mejora la función de los monocitos o macrófagos (por ejemplo, al menos aproximadamente 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 99% o más) junto con las formulaciones del agonista de TLR de benzo[b] azepina de la invención. Tales compuestos son conocidos en la técnica e incluyen, citoquinas tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-12), e interferones (por ejemplo, interferón alfa o gamma).

En ciertas realizaciones, el compuesto que mejora la función de los monocitos o macrófagos se formula con VTX-233 y, se administra por lo tanto, simultáneamente con VTX-2337.

En otras realizaciones, el compuesto que mejora la función de monocitos o macrófagos se administra separadamente de VTX-2337 y se puede administrar simultáneamente (dentro de un período de horas entre sí), durante el transcurso de la misma terapia, o secuencialmente con VTX-2337. En tales realizaciones, el compuesto que mejora la función de monocitos o macrófagos se administra preferiblemente a un sujeto humano. En una realización, el sujeto humano tiene un recuento sanguíneo de leucocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos y/o basófilos que está dentro del intervalo normal para humanos. El intervalo normal para los leucocitos de sangre humana (total) es aproximadamente de 3,5-10,5 ($10^9/L$). El intervalo normal para los neutrófilos de la sangre humana es aproximadamente de 1,7-7,0 ($10^9/L$), de monocitos es aproximadamente de 0,3-0,9 ($10^9/L$), los linfocitos es aproximadamente de 0,9-2,9 ($10^9/L$), de basófilos es aproximadamente de 0-0,3 ($10^9/L$), y de eosinófilos es aproximadamente de 0,05-0,5 ($10^9/L$). En otras realizaciones, el sujeto humano tiene un recuento de leucocitos en sangre que es menor que el intervalo normal para humanos, por ejemplo al menos aproximadamente de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 ($10^9/L$) leucocitos.

1.2.2 Cánceres objetivo

La composición farmacéutica como se define en la reivindicación 1 e las reivindicaciones adjuntas se puede usar en una terapia de combinación para tratamiento del cáncer de ovario. El tipo de cáncer que se trata mediante los métodos de la presente invención es un cáncer sólido tal como cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer hepatocelular, cáncer colorrectal o linfoma, o cualquier combinación de los mismos. Otros tipos de cánceres que pueden ser tratados por los métodos de la presente invención incluyen, incluyen sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, Carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma meduloblastoma craneofaringioma, ependimoma, pinealoma,

hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y enfermedad de cadena pesada.

1.3 Administración y dosificación

VTX-2337 de la invención se formula preferiblemente para inyección, lo más preferible administración subcutánea. En ciertas realizaciones, VTX-2337 de la invención se formula para administración por vía intradérmica, transdérmica, intravenosa o intramuscular.

Las formulaciones de la presente invención contienen una cantidad de VTX-2337 que es eficaz para el uso pretendido. Las dosis particulares también se seleccionan con base en una serie de otros factores incluyendo la edad, sexo, especie y condición del paciente. Las cantidades efectivas también pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

En ciertas realizaciones, la dosis de VTX-2337 se mide en unidades de mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, la dosis se mide en unidades de mg/kg de peso corporal magro (es decir, peso corporal menos contenido de grasa corporal). En otras realizaciones, la dosis se mide en unidades de mg/m² de área superficial corporal. En otras realizaciones, la dosis se mide en unidades de mg por dosis administrada a un paciente. Cualquier medición de la dosis se puede usar junto con las composiciones y métodos de la invención y las unidades de dosificación pueden convertirse mediante medios estándar en la técnica.

Ejemplos de regímenes de dosificación que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen, diariamente, tres veces por semana (intermitente), semanalmente o cada 14 días. En ciertas realizaciones, los regímenes de dosificación incluyen, dosificación mensual o dosificación cada 6-8 semanas. En una realización preferida, una formulación agonista de TLR de benzo[b]azepina de la presente invención se puede administrar por inyección subcutánea semanalmente o quincenalmente en combinación con una modalidad de tratamiento adecuada para el tratamiento de cáncer en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano.

Los ejemplos de dosis de VTX-2337 incluyen cantidades en miligramos por kilogramo del sujeto. En una realización, la dosis es de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg de peso corporal. En una realización específica, la dosificación es de aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto.

En ciertas realizaciones de los métodos para tratar el cáncer, VTX-2337 se administra solo o en la terapia de combinación para el tratamiento del cáncer al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente de 0,04 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto. En realizaciones particulares, el agonista de TLR de benzo[b]azepina se administra a una dosis de aproximadamente de 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. En ciertas realizaciones adicionales, VTX-2337 se administra al sujeto en forma semanal o quincenal. En realizaciones específicas, una dosis diaria es al menos de 0,05 mg, 0,50 mg, 1,0 mg, 5,0 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg o al menos 50 mg.

En algunas realizaciones, la dosis para el agonista de TLR8 de benzo[b]azepina (por ejemplo, VTX-2337) administrada sola o en la terapia combinatoria para el tratamiento del cáncer está entre 0,1-10 mg/m² (por ejemplo, 0,1- 0,3 mg/m², 0,1-3,9 mg/m², 0,1- 1 mg/m², 0,1- 2 mg/m², 0,1- 4 mg/m², 2 -4 mg/m², 2,5-3,5 mg/m², 2-6 mg/m², 2-8 mg/m². Esta incluye 0,1 mg/m², 1 mg/m², 2 mg/m², 3 mg/m², 4 mg/m², 5 mg/m², 6 mg/m², 7 mg/m², 8 mg/m² y puntos intermedios. Se observa que 2.5-3.5 mg/m² corresponde a ~ 0,05-0,075 mg/kg si se asume un área superficial corporal de 1,5 m² que corresponde a un peso corporal de 70 kg. La frecuencia de administración es preferiblemente una vez cada 7 a 21 días (por ejemplo, una vez cada 7, 10, 14, 18, 21 días). En algunas realizaciones, la frecuencia de administración es preferiblemente de 1, 2 o 3 veces cada 7 a 21 días (por ejemplo, una vez cada 7, 10, 14, 18, 21 días). El agonista de TLR de benzo[b]azepina se puede administrar hasta que exista avance de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. En algunas realizaciones, se suministran 2- 20 dosis (por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 dosis). La vía de administración preferida es subcutánea.

En ciertas realizaciones de los métodos para tratar el cáncer, la doxorubicina se administra sola o en la terapia combinación de la invención al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto o no más de 50 mg/m² del área superficial corporal del sujeto.

Las dosificaciones recomendadas para la administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, epidural o intravenosa están en el intervalo de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg de peso corporal por día. Las dosis adecuadas para la administración tópica están en el intervalo de aproximadamente 0,001 miligramos hasta

aproximadamente 50 miligramos, dependiendo del área de administración. Los expertos en la técnica apreciarán que las dosificaciones son generalmente más altas y/o la frecuencia de administración mayor para el tratamiento inicial en comparación con regímenes de mantenimiento.

5 La doxorrubicina se formula preferiblemente para inyección, lo más preferiblemente administración intravenosa. En ciertas realizaciones, la doxorrubicina se formula para administración por vía intradérmica, transdérmica, subcutánea o intramuscular.

10 En ciertas realizaciones, la dosis de doxorrubicina se mide en unidades de mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, la dosis se mide en unidades de mg/kg de peso corporal magro (es decir, peso corporal menos contenido de grasa corporal). En otras realizaciones, la dosis se mide en unidades de mg/m² de área superficial corporal. En otras realizaciones, la dosis se mide en unidades de mg por dosis administrada a un paciente. Cualquier medición de la dosis se puede usar junto con las composiciones y métodos de la invención y las unidades de dosificación pueden convertirse mediante medios estándar en la técnica.

15 En ciertas realizaciones, la doxorrubicina se administra antes de, conjuntamente con, o posterior a la administración de VTX-2337.

20 En ciertas realizaciones de los métodos para tratar el cáncer, la doxorrubicina se administra al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto.

1.3.1 Ejemplo de regímenes para el tratamiento del cáncer

25 En realizaciones particulares, las formulaciones de VTX-2337 de la invención se usan en combinación con un régimen de tratamiento existente para el tratamiento del cáncer en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano. De acuerdo con esta realización, la formulación agonista de TLR de benzo[b]azepina se puede administrar antes de, posteriormente o conjuntamente con un agente o agentes anticancerígenos adecuados para el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, la administración de VTX-2337 se coordina con la dosificación y sincronización del agente o agentes anticancerígenos dependiendo del tipo de cáncer, la historia y el estado del sujeto, y el agente o agentes anticancerígenos particulares de elección.

30 En una realización, el régimen comprende 5-fluorouracilo, cisplatino, docetaxel, HERCEPTIN®, gemcitabina, IL-2, paclitaxel y/o VP-16 (etopósido) para el tratamiento de cáncer de mama. En otra realización, el régimen comprende paclitaxel, docetaxel, mitoxantrona y/o un antagonista receptor de andrógenos (por ejemplo, flutamida) para el tratamiento de cáncer de próstata. En otra realización, el régimen comprende fludarabina, arabinósido de citosina, gemtuzumab (MYLOTARG), daunorrubicina, metotrexato, vincristina, 6-mercaptopurina, idarrubicina, mitoxantrona, etopósido, asparaginasa, prednisona y/o ciclofosfamida para el tratamiento de la leucemia. En una realización, el régimen comprende dexametasona para el tratamiento del mieloma. En una realización, el régimen comprende dacarbazina para el tratamiento de melanoma. En una realización, el régimen comprende irinotecano para el tratamiento de cáncer colorrectal. En una realización, el régimen comprende paclitaxel, docetaxel, etopósido y/o cisplatino para el tratamiento de cáncer de pulmón. En una realización, el régimen comprende ciclofosfamida, CHOP, etopósido, bleomicina, mitoxantrona y/o cisplatino para el tratamiento del linfoma no Hodgkin. En una el régimen comprende cisplatino para el tratamiento del cáncer gástrico. En una realización, el régimen comprende gemcitabina para el tratamiento del cáncer pancreático.

45 La duración del tratamiento con el agente anticancerígeno puede variar de acuerdo con el agente terapéutico particular utilizado. En ciertas realizaciones, la administración es discontinua, es decir, las dosis diarias se dividen en varias administraciones parciales. Según ciertas realizaciones, el método de tratamiento comprende al menos un ciclo, preferiblemente más de un ciclo, durante el cual se puede administrar una única terapia o secuencia de agentes terapéuticos. Un período de tiempo apropiado para un ciclo se puede determinar de acuerdo con métodos de rutina por el experto en la técnica, así como el número total de ciclos, y el intervalo entre ciclos.

50 En una realización específica, el régimen comprende gemcitabina en una dosis que varía de 100 a 1.000 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende dacarbazina a una dosis comprendida entre 200 y 4000 mg/m²/ciclo. En una realización preferida, la dosis de dacarbazina oscila entre 700 y 1000 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende fludarabina a una dosis que oscila entre 25 y 50 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende arabinósido de citosina (Ara-C) a una dosis que oscila entre 200 a 2.000 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende docetaxel a una dosis que oscila entre 1,5 y 7,5 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende paclitaxel a una dosis que oscila entre 5 y 15 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende cisplatino en una dosis que oscila entre 5 y 20 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende 5-fluorouracilo en una dosis que oscila entre 5 y 20 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende doxorrubicina en una dosis que oscila entre 2 a 8 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende epipodofilotoxina en una dosis que oscila entre 40 y 160 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende ciclofosfamida en una dosis que oscila entre 50 y 200 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende irinotecano en una dosis que oscila entre 50 a 75, 75 a 100, 100 a 125, o 125 a 150 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende vinblastina en una dosis que oscila entre 3,7 a 5,4, 5,5 a 7,4, 7,5 a 11, u 11 a 18,5 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende vincristina a una dosis que

oscila entre 0,7 a 1,4, o de 1,5 a 2 mg/m²/ciclo. En aún otra realización, el régimen comprende metotrexato a una dosis que oscila entre 3,3 a 5, 5 a 10, 10 a 100, o 100 a 1.000 mg/m²/ciclo.

5 En una realización, el régimen abarca el uso de una dosis baja de un agente quimioterapéutico. De acuerdo con esta realización, el tratamiento inicial de un sujeto con VTX-2337 de la invención aumenta la sensibilidad de un tumor a una
 10 exposición posterior con un agente anticancerígeno. De este modo, el agente anticancerígeno se puede administrar al sujeto a una dosis que está cerca o por debajo del intervalo inferior de dosificaciones aceptables para ese agente administrado solo. En una realización, el régimen comprende la administración posterior de docetaxel a razón de 6 hasta 60 mg/m²/día o menos. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de paclitaxel a razón
 15 de 10 a 135 mg/m²/día o menos. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de fludarabina a razón de 2,5 a 25 mg/m²/día o menos. En otra realización, el régimen comprende la administración subsiguiente de citosina arabinósido (Ara-C) a razón de 0,5 a 1,5 g/m²/día o menos. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de gemcitabina a razón de 10 y 100 mg/m²/ciclo. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de cisplatino, por ejemplo PLATINOL o PLATINOL-AQ (Bristol Myers), a una dosis que oscila
 20 entre 5 a 10, 10 a 20, 20 a 40, o 40 a 75 mg/m² /ciclo. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de cisplatino comprendida entre 7,5 y 75 mg/m² /ciclo. En otra realización, el régimen comprende la administración subsiguiente de carboplatino, por ejemplo, PARAPLATIN (Bristol Myers), a una dosis que varía de 2 a 4, 4 a 8, 8 a 16, 16 a 35, o 35 a 75 mg/m² /ciclo. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE (Rhône Poulenc Rorer) a una dosis que oscila entre 6 a 10, 10 a 30, o de 30 a 60 mg/m² /ciclo. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de paclitaxel, por ejemplo, TAXOL (Bristol Myers Squibb), a una dosis que oscila entre 10 a 20, 20 a 40, 40 a 70, o 70 a 135 mg/kg/ciclo. En otra
 25 realización, el régimen comprende la administración posterior de 5-fluorouracilo a una dosis que oscila entre 0,5 y 5 mg/kg/ciclo. En otra realización, el régimen comprende la administración posterior de doxorubicina, por ejemplo ADRIAMICINA (Pharmacia & Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), a una dosis que oscila entre 2 a 4, 4 a 8, 8 a 15, 15 a 30, o 30 a 60 mg/kg/ciclo.

Los esquemas de administración descritos anteriormente se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes.

30 1.4 Kits

La presente invención proporciona un empaque o kit farmacéutico que comprende uno o más contenedores rellenos con un VTX-2337 líquido o liofilizado y/o doxorubicina. En realizaciones preferidas, la formulación líquida o liofilizada es
 35 estéril. En una realización, el kit comprende una formulación líquida o liofilizada de la invención, en uno o más contenedores, y uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa. Los uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos pueden estar en el mismo contenedor que el VTX-2337 o en uno o más de otros contenedores. Preferiblemente, VTX-2337 se formula a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml hasta
 40 aproximadamente 40 mg/ml, o desde aproximadamente 2 mg/ml hasta aproximadamente 15 mg/ml, y la formulación es adecuada para inyección, preferiblemente inyección subcutánea. Preferiblemente, el kit contiene VTX-2337 en forma de dosificación unitaria. Lo más preferible, la forma de dosificación unitaria está en una forma adecuada para proporcionar una dosis unitaria de aproximadamente 0,02 a 10 mg/kg o aproximadamente 0,04 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto que va a ser tratado.

45 En ciertas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para uso en el tratamiento de cáncer (por ejemplo, usando las formulaciones líquidas de la invención solamente o en combinación con otro agente profiláctico o terapéutico), así como efectos secundarios e información de dosificación para una o más vías de administración. Opcionalmente asociado con tal(es) contenedor(es) está una información en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya información refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

50 1.5 Ejemplos

55 Ejemplo 1: Agonista de TLR8 y quimioterapia con Doxil activan en forma potente la respuesta inmunitaria antitumoral humana en un modelo de ratón del sistema inmune humano

Debido a las diferencias entre los sistemas inmunitarios humano y de ratón, muchos de los efectos de los fármacos inmunomoduladores no pueden estudiarse completamente en modelos de ratones singénicos. Se generó un nuevo
 60 modelo de ratón portador de tumor con sistema inmunitario humano (HIS) para estudiar las interacciones entre la quimioterapia y la terapia inmunomoduladora. Los efectos individuales y las interacciones entre la doxorubicina, un fármaco que induce la muerte de células tumorales inmunogénicas y activa las células presentadoras de antígeno, y VTX-2337, un agonista de TLR8, que induce la activación potente y la polarización tipo 1 de DC mieloides humanas, fueron analizados y mostraron actividad reducida en leucocitos murinos. Se inocularon ratones Nod/SCID/ILRyc desactivados (NSG) con células sanguíneas de cordón umbilical CD34+ humanas de donantes humanos HLA-A2+; tumores de cáncer de ovario HLA-A2+ OVCAR5 humanos; y se trataron con doxorubicina liposomal PEGilada (Doxil o
 65 PLD); VTX- 337; o los dos agentes en combinación. Los ratones NSG-HIS mostraron un sistema hematopoyético

humano completo, que incluye monocitos humanos, macrófagos y DC plasmacitoides y mieloides, así como subconjuntos de células T. En ratones NSG-HIS, VTX-2337 indujo activación dependiente de la dosis de células CD14+ y CD11c+ humanas *in vivo* en un lapso de 6 h. Se observó una sobreexpresión transitoria, dependiente de la dosis, de citoquinas Th1 humanas, pero también se observó IL-10 en el plasma de ratones tratados con VTX-2337, alcanzando picos en el lapso de 6 horas y disminuyendo en un lapso de 24 horas. Doxil solo también indujo una activación suave de DC CD11c+ *in vivo* y una sobreexpresión moderada de citoquinas Th1. La combinación de dos fármacos indujo una activación potente de + DC CD11c+ y monocitos, y aumentó notablemente las citoquinas Th1 pero no IL-10. Los tumores de HLA-A2+ OVCAR5 fueron exitosamente injertados, exhibiendo infiltración por leucocitos humanos. El tratamiento con VTX-2337 y Doxil indujo independientemente leucocitos humanos que se infiltran en el tumor y un crecimiento restringido de xenoinjertos de tumor de ovario humanos en una forma dependiente de la dosis, mientras que la combinación de los dos fármacos indujo la frecuencia más alta de leucocitos humanos que infiltran el tumor y potencialmente restringieron el crecimiento de tumores de ovario. La activación combinada de inmunidad innata y adaptativa por VTX-2337 y Doxil, así como la sensibilización de las células tumorales por Doxil a los mecanismos efectores inmunes innatos y adaptativos fue la base de las interacciones observadas suprimiendo el crecimiento tumoral. El NSG-HIS proporcionó una herramienta adecuada para establecer interacciones durante la quimioterapia con el agonista de TLR8 y Doxil, y los resultados requieren pruebas clínicas.

Materiales y métodos

Reactivos:

Formulación de VTX-2337: 40 mg/mL de 2-amino-N,N-dipropil-8-(4-(pirrolidin-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepina-4-carboxamida, que se formula como un complejo de inclusión con 15% p/v de Captisol® (sulfobutiléter β -ciclodextrina) en regulador de citrato 10 mM (pH = 6,5). La formulación se diluyó además con cloruro de sodio estéril al 0,9% hasta las concentraciones apropiadas antes de uso.

Se adquirió PLD (es decir, Doxil, fabricado por Ben Venue Laboratories Inc. Bedford OH 4414146) de la farmacia del hospital de la Universidad de Pensilvania.

Generación de ratones NSG-HIS: Todos los estudios con ratones *in vivo* fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). Los ratones NOD-scid y *IL2ry^{null}* (NSG) obtenidos de las instalaciones de xenoinjertos de la Universidad de Pensilvania fueron previamente irradiados (250 Rads), seguido al día siguiente por inyección intravenosa (iv) de células sanguíneas humanas de cordón umbilical sin células T que contienen $1-2 \times 10^5$ CD34⁺ (LONZA, 2C-101). Después de aproximadamente 3 meses, se verificaron los niveles de injerto y reconstitución del sistema hematopoyético humano por sangrado y tinción con hCD45 (BD Pharmingen, clon 2D1 catálogo # 557833 APC-CY7).

Medición de citoquinas: En algunos experimentos se inyectaron NSG-HIS por vía subcutánea (s.c.) con 0,5 o 5 mg/kg de VTX-2337 solo o en combinación con inyección intraperitoneal (i.p.), PLD a la máxima dosis tolerada (MTD, 50 mg/m²). En otros experimentos, se estimularon PBMC humanas *in vitro* con VTX-2337. En todos los experimentos, se recogieron sobrenadantes del plasma o del medio 6 horas después de la administración de VTX-2337. Los niveles de citoquinas inducidas por VTX-2337 o VTX-2337 más administración de PLD se midieron tanto *in vitro* como *in vivo* por Rules Based Medicine (Austin, TX) utilizando una tecnología basada en Luminex que evalúa los niveles de 96 analitos humanos en cualquiera de los sobrenadantes de cultivo o muestras de plasma recogidas de animales tratados.

Tratamiento de ratones NSG-HIS portadores de tumor OVCAR5: se inyectaron células OVCAR5 por vía s.c. (5×10^6 células) en ratones se estimularon injertados con HLA-A2⁺ CD34⁺. En ratones de control no tratados, se desarrollaron progresivamente tumores que dieron como resultado la muerte del animal dentro de los 90 días de la exposición al tumor. Los tumores se midieron dos veces por semana, y el volumen se calculó como sigue: (longitud x longitud) x (ancho)/2. Los ratones portadores de tumores se asignaron al azar a cuatro grupos de tratamiento (n = 8-10/grupo) cuando los volúmenes medios de tumor alcanzaron aproximadamente 50 mm³, o ~ 30 días después de la implantación de células tumorales. Los grupos de tratamiento consistieron en un control de vehículo, PLD (50 mg/m² i.p. administrados cada dos semanas), VTX-2337 (0,5 mg/kg s.c. día de por medio tres veces para cada ciclo) o la combinación de PLD y VTX-2337, con tratamiento con VTX-2337 comenzando 5 días después de PLD. Los ciclos de tratamiento fueron de 14 días de duración y se administraron tres ciclos de tratamiento a cada grupo. A lo largo de cada ciclo de tratamiento, los grupos que recibieron PLD recibieron el fármaco de quimioterapia el día 1, mientras que los grupos que recibieron VTX-2337 solo o en combinación con PLD recibieron VTX-2337 los días 5, 7 y 9 del ciclo.

Citometría de flujo: Para análisis de citometría de flujo de leucocitos, se trituraron tumores, médula ósea o bazo en placas de Petri de 6 cm, se transfirieron a tubos de 15 mL y se incubaron durante 2 h en una solución que contenía 2 mg/mL de colagenasa (Sigma # C9407) y ADNasa (Sigma # D5025-15KO) en RPMI (Cellgro # 1640CV) bajo rotación continua. La suspensión se hizo pasar a través de un filtro de células de 70 μ m usando un émbolo de jeringa, se lavó, se centrifugó y el sedimento se resuspendió en PBS, FBS al 2% (GIBCO # 10437). Después de la disociación, se tiñeron $3-5 \times 10^6$ células con 0,5 μ g/mL de Ab durante 30 min a 4°C, se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo FACS-Canto (BD Pharmingen). Las células se tiñeron usando hCD45 humano (clon 2D1 de BD Pharmingen, catálogo # 557833 APC-CY7), hCD3 (clon UCHT1 de Biolegend, catálogo # 300429 PerCP/Cy5.5), hCD4 (clon RPA-T4 de BD

Pharmingen catálogo # 555349 APC), hCD8 (clon RPA-T8 de eBioscience catálogo # 11-0088 FITC, hCD11b (Clon ICRF44 de BD Pharmingen catálogo # 555388 PE), hCD11c (Biolegend, clon 3,9 catálogo # 301608 Pe-Cy7), hCD123 (clon 7G3 de BD Pharmingen catálogo # 558714 PerCP-Cy5.5), hCD14 (clon 61D3 de eBioscience catálogo # 25-0149 PE-Cy7), hCD40 (clon 5C3 de eBioscience catálogo # 11-0409 FITC) hCD80 (clon 2D10 de Biolegend catálogo # 305216 AF647) y hCD86 (clon 2331 (FUN-1) de BD Pharmingen catálogo # 555658 PE).

Expansión de células T *in vitro*, selección de reactividad y estudio de transferencia adoptiva: Los leucocitos infiltrantes de tumores (TIL) se expandieron inicialmente a partir de fragmentos de tumores de diferentes grupos de tratamiento colocados en cultivo con una alta concentración de interleuquina 2 recombinante humana (rhIL-2, 600 IU/mL) como se reportó en otra parte (Véase, por ejemplo, Dudley, ME, y colaboradores, 2003. J Immunother 26: 332-342 y Riddell, SR, y Greenberg, PD 1990. J Immunol Methods 128: 189-201). En resumen, se colocaron fragmentos de tumores (~ 2x2 mm) de diferentes grupos de tratamiento en medio AIMV (GIBCO # 12055) suplementado con suero humano al 5% (Valley Biomedical Inc # 1017) y 600 IU/mL hIL-2 (PeproTech No AF- 200-02). La mitad del medio se reemplazó cada 3 días hasta que se logró un crecimiento exponencial; luego se dividieron los cultivos según fuera necesario para mantener la concentración de células dentro de un intervalo de aproximadamente 5×10^5 - 1×10^6 células por mL. Una vez que se obtuvo una cantidad suficiente de células, se evaluaron todos los cultivos para determinar la reactividad de OVCAR5 *in vitro*. Los TIL reactivos específicos para OVCAR5 se expandieron después usando técnicas que se han descrito previamente (véase, por ejemplo, Dudley, M.E., y colaboradores, 2003. J Immunother 26: 332-342). En resumen, se combinaron 2×10^8 células alimentadoras irradiadas alogénicas (PBMC humanas HLA-A2*) con 30 µg/mL de anticuerpo OKT3 (Clones OKT3 de eBioscience catálogo # 16-0037-85), 600 IU/mL de rhIL-2 (PeproTech # AF-200-02), y 1×10^6 TIL, se mezclaron y se vertieron alícuotas en matraces de cultivo de tejidos de 175 cm². Luego se incubaron los matraces en posición vertical a 37°C en CO₂ al 5%. El día 5, se reemplazó la mitad del medio con una mezcla 1:1 de AIM V que contenía 600 IU/mL de rhIL-2. Se añadió medio a estos matraces según fuera necesario para mantener la densidad celular alrededor de $0,5-1 \times 10^6$ células/mL. Cada pozo inicial se consideró como un cultivo independiente de TIL y se mantuvo separado de los otros. En el estudio de transferencia adoptiva, se expusieron ratones NSG injertados con CD34⁺ no humanas en forma s.c. con 5×10^6 células OVCAR5, 30 a 40 días después de la inyección intravenosa (i.v.) de 1×10^7 células T expandidas.

Ensayos de Liberación de citoquinas y de citotoxicidad: Se determinaron la actividad y especificidad de TIL mediante análisis de secreción de citoquinas y CTL directo. Para el ensayo de interferón γ (IFNγ), se lavaron dos veces las líneas de células T de control y ITL antes del ensayo de cocultivo para eliminar rhIL-2. Se sembraron en placa 1×10^5 TIL y 1×10^5 células estimuladoras en cada pozo de una placa fondo plano de 96 pozos. Generalmente se estimularon los cultivos de TIL con OVCAR5 y dos líneas de células tumorales de melanoma HLA-A2⁺ de control (526mel y 624mel). En algunos pozos, para asegurar la actividad dependiente del MHC, las células objetivo se trataron previamente con un anticuerpo neutralizante anti-HLA A, B y C (clon w6/32 de eBioscience catálogo # 16-9983-85). Después del cocultivo durante la noche, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la secreción de IFNγ mediante ELISA (Biolegend # 430102). En el ensayo de CTL, se pulsaron OVCAR5 con cromo 55, y se sembraron en placa diferentes proporciones de TIL: objetivo en placas de 96 pozos y se incubaron durante 4 h. En algunos pozos, se incubaron previamente OVCAR5 con anticuerpo neutralizante anti-HLA-A, B y C. Después de incubación, se colocaron 30 µL de medio de los cocultivos en una Lumaplate y se dejaron secar durante la noche. La radiactividad fue detectada por el contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Plus.

Viabilidad celular con anexina V/7AAD: Para detectar apoptosis, las células tumorales se tiñeron con anexina V/7AAD (BD Pharmingen # 559763). Se analizaron las células apoptóticas por citometría de flujo de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se recogieron células OVCAR5 cultivadas y sometidas a diferentes tratamientos y se sedimentaron a 1200 rpm y luego se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo y se resuspendieron en regulador de unión (Pharmingen # 51-66121 E) a una concentración de 1×10^6 células/mL; Se transfirieron 100 µL de la solución (1×10^5 células) a cada uno de los dos tubos de cultivo de 5 mL. Se sometieron a agitación suave tipo vórtice cinco µL de anexina V-PE (Pharmingen # 51-65875Y) y se añadieron a cada solución de 100 µL, se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavaron con PBS, se incubaron con 5 µL de 7AAD (BD Pharmingen # 51-6898 1E) durante 10 minutos, y se analizaron mediante FACS en 1 h.

Extracción de proteínas y análisis por transferencia de Western: Se extrajo la proteína celular total sobre hielo durante 30 min en un regulador de lisis [Reactivo de Extracción de Proteínas de Mamífero M-PER catálogo # 78501 ThermoScientific]. Se desnaturalizaron luego 50 µg de proteína de cada muestra en regulador de carga 2X a 100°C durante 5 min, se separaron en un gel de electroforesis de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron entonces en leche descremada al 5% durante 2 h a temperatura ambiente y luego se incubaron con el primer anticuerpo (Cell Signaling # 3210 de conejo) durante la noche a 4°C. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con solución salina regulada con fosfato (PBS) Tween 20 al 0,5% (Sigma) y se incubaron con el anticuerpo secundario (BioRad 172-1019) durante 2 h a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas se visualizaron utilizando ECL (Amersham # RPN2132) con películas X (Bioexpress # F-9023).

Agonista de TLR8 que activa los mecanismos efectores antitumorales en PBMC humanas *in vitro*

VX-2337 es un agonista selectivo y potente de TLR8 que activa de forma efectiva tanto mDC como monocitos humanos. Su actividad está principalmente restringida a estas poblaciones, y otras poblaciones de leucocitos humanos no se activan directamente, aunque la activación indirecta puede resultar en la activación de monocitos y DC. Para ensayar los efectos globales de la activación de TLR8 en leucocitos humanos, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios humanos normales (n = 6) con VTX-2337 en un amplio intervalo de concentraciones durante 24 horas. Se indujeron altos niveles de TNF α , IFN γ e IL-12p70 en respuesta a la activación de TLR8 por VTX-2337, de una manera dependiente de la dosis. Por tanto, una característica única de la activación de TLR8 de PBMC es la inducción de mediadores efectores que se sabe que juegan un papel crítico en la respuesta inmune mediada por células de cáncer. Como resultado, los agonistas de TLR8 son útiles para la inmunoterapia humana.

Agonista de TLR8 que activa en forma potente APC humanas y dirige la activación inmune de Th1 *in vivo* en ratones NSG-HIS

Se evaluó la actividad de VTX-2337 en un nuevo modelo murino donde los ratones NSG se reconstituyen con células sanguíneas de cordón CD34+ humanas. Una vez que las células madre hematopoyéticas humanas reconstituyen la médula ósea y comienzan la hematopoyesis, los animales muestran dentro de tres a cuatro meses una reconstitución completa del sistema inmune humano, incluyendo células B, CD3, CD4, CD8, NK, mDC, pDC y monocitos. Debido a los efectos inmunoestimuladores observados en las PBMC humanas mediante la estimulación con VTX-2337, se esperaba que los ratones NSG-HIS respondieran altamente a VTX-2337. De hecho, la administración de VTX-2337 a estos ratones replicó los efectos inmunoestimuladores ya demostrados en PBMC humanas con un aumento dependiente de la dosis en la expresión superficial de múltiples moléculas coestimuladoras, incluyendo CD83, CD86 y MHC clase II en monocitos CD14+ humanos injertados CD11c, mDC y pDC CD123. También se demostró un aumento en los niveles sanguíneos de citoquinas humanas, que se sabe que son importantes en la respuesta inmune a tumores y ya están asociadas con la activación de TLR8. Estos incluyen IFN γ , TNF α e IL-12p40.

La estructura de la proteína TLR8 varía entre especies, y mientras VTX-2337 tiene actividad en ratones, la molécula se optimizó en cuanto a la potencia y selectividad contra TLR8 humanas.

Debido a la selectividad de VTX-2337 para TLR8 humano, se eligió NSG-HIS como modelo de huésped de ratón reconstituido con un sistema hematopoyético humano, para estudiar los efectos de VTX-2337 en leucocitos humanos *in vivo*. Se observó un alto nivel de injerto de células hematolinfóides humanas en ratones NSG-HIS 14 a 22 semanas después de la transferencia de células CD34+ sanguíneas de cordón umbilical humano administradas por vía i.v. a ratones NSG a las 6 semanas de edad, como se evaluó mediante cuantificación de (h)CD45 humana en diversos compartimentos (Figura 1A); las células hCD45+ representaron 35-75% de las células totales en la sangre, 40-68% de las células totales en el bazo y 40-70% de las células totales en la médula ósea.

Para demostrar la actividad de VTX-2337 *in vivo*, se administró VTX-2337 a razón de 0,5 o 5 mg/kg s.c. a ratones NSG-HIS completamente reconstituidos semanas después del trasplante. Las células del bazo se recogieron seis horas más tarde para evaluar los niveles de marcadores de activación. Los ratones tratados con 0,5 o 5 mg/kg de VTX-2337 demostraron un marcado aumento en la expresión de CD83, CD86 así como de MHC clase II en monocitos (CD45⁺ CD14⁺), DC mielóide (mDC, CD45⁺CD11c⁺) y DC plasmacitóides (pDC, CD45⁺ CD123⁺) en comparación con los ratones no tratados de control (Figura 1B).

Se examinó el perfil de citoquina humana en plasma de ratón después de una administración s.c. única de VTX-2337 (0,5 o 5 mg/kg) usando un ensayo con base en Luminex (Figura 1C). Se observó un aumento dependiente de la dosis en la concentración de citoquinas polarizantes Th1 incluyendo IFN γ , TNF α e IL-12p40 a las seis horas. También se detectó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de IL-10 en animales tratados con VTX-2337 en comparación con los controles. Por lo tanto, VTX-2337 indujo la activación directa del compartimento monocito/DC humano y una subsiguiente activación potente de Th1 del sistema inmune humano *in vivo*, aunque también se observó una mayor producción de IL-10.

Activación de TLR8 después de PLD que da como resultado la respuesta de citoquinas Th1

Se ensayó un programa de administración "en fase", en donde se administró PLD a una dosis máxima tolerada (MTD, 50 mg/m², i.p.) primero en ratones NSG de 20 a 28 semanas de edad injertados con hCD34+, para infligir daño a las células tumorales y liberación de antígeno inmunogénico; se administró VTX-2337 (0,5 mg/kg) cinco días después, para activar APC. Se midieron los niveles de citoquinas múltiples en el plasma 6 horas después de la inyección de VTX-2337. Los ratones NSG-HIS sin tratar no mostraron ningún interferón gamma (IFN γ) detectable en plasma. De manera similar, el tratamiento con solo PLD no indujo ningún IFN γ ; sin embargo, la combinación de VTX-2337 y PLD (Figura 2) indujo niveles significativos de IFN γ , que eran similares a los inducidos por VTX-2337 solo (Figura 1C). Además, el tratamiento combinado con VTX-2337 y PLD indujo sobreexpresión de TNF α sobre controles no tratados, que fue similar ya sea a PLD o VTX-2337 solamente. Por lo tanto, la administración después de PLD permitió que VTX-2337 indujera una respuesta de Th1. Es importante destacar que, aunque PLD, así como VTX-2337 indujeron sobreexpresión de IL-10 cuando se administraron solos (Figura 2), este efecto fue atenuado mediante la combinación de dos fármacos (Figura 2)]. En general, estos datos indican que un intervalo de 5 días entre la administración de PLD y VTX-2337 mantuvo el perfil de citoquinas de Th1 inducido por VTX-2337 y, además, redujo los niveles de IL-10. Por lo tanto, esta combinación

indujo una respuesta óptima de citoquinas. La administración simultánea de PLD y VTX-2337 produjo interacciones negativas, ya que suprimió la respuesta de IFN γ .

Un aumento en los niveles plasmáticos de TNF α e IL-10 demostró que el tratamiento de ratones NSG-HIS con PLD indujo activación inmunitaria. Esta activación inmune es coherente con la doxorrubicina que induce la "muerte celular antigénica" tanto en células normales como tumorales, y apoya que la activación de TLR8 por VTX-2337 mejora la respuesta antitumoral. La administración de VTX-2337 y PLD® resultó tanto en una reducción de los niveles plasmáticos del mediador anti-inflamatorio IL-10 como en el aumento de los niveles de IFN γ y TNF α .

Activación de TLR8 que mejora la actividad antitumoral de PLD *in vivo*

Esta combinación de PLD a MTD y VTX-2337 a razón de 0,5 mg/kg, una dosis en ratones comparable a aquella que es evaluada en estudios clínicos de oncología, fue posteriormente utilizada para ratones NSG-HIS portadores de tumores tratados. El régimen de tratamiento se diseñó para tomar ventaja de las actividades farmacodinámicas de PLD y VTX-2337, usando múltiples ciclos de tratamiento de 14 días. Los ratones NSG-HIS portadores de tumores recibieron inicialmente PLD para inducir muerte celular tumoral. Esto fue seguido 5 días después con múltiples tratamientos con VTX-2337 para activar células depuradoras inmunes, incluyendo mDC, monocitos y macrófagos que removían células tumorales moribundas. Como se esperaba, PLD a la MTD dio como resultado una reducción significativa en la tasa de crecimiento tumoral en relación con el vehículo de control, mientras que un pequeño efecto en la tasa de crecimiento tumoral se observó con VTX-2337 solo. La combinación de los dos agentes produjo una marcada disminución en la tasa de crecimiento tumoral sobre PLD solo durante tres ciclos de tratamiento de 14 días.

En el curso del estudio del efecto de combinar PLD con VTX-2337 en cáncer de ovario humano, se inocularon ratones NSG-HIS-A2 injertados con hCD34 con la línea de células de cáncer de ovario OVCAR5 humana emparejada con HLA-2 más arriba (5×10^6). Una vez que los tumores estaban bien establecidos, se trataron grupos de ratones ($n = 8-9$ /grupo) ya sea con vehículo, Doxil solamente, VTX-2337 solo o la combinación de VTX-2337 y Doxil. De manera interesante, a pesar de los efectos inmunomoduladores de VTX-2337, los ratones tratados con el agonista de TLR8 solo mostraron un crecimiento tumoral similar al de los ratones no tratados de control. Como era de esperar, los ratones tratados con PLD a MTD (50 mg/m 2 , i.p.) mostraron un crecimiento tumoral reducido en relación con los ratones no tratados de control. Es importante destacar que hubo una fuerte interacción positiva entre los dos fármacos; el efecto de PLD fue significativamente mejorado por la combinación con VTX-2337 ($P = 0,04$) (Figura 3B), que casi suprimió completamente el crecimiento del tumor.

Durante la etapa de caracterización adicional de esta interacción de fármacos, se recogieron tumores de cada grupo de tratamiento al final del estudio y se evaluaron para la infiltración de leucocitos mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo. Relativamente pocas células CD45 $^+$ humanas estaban presentes en tumores del grupo de control (Figura 3C), mientras que todos los tratamientos dieron como resultado una mayor infiltración de CD45 $^+$. Los tumores de ratones tratados con la combinación de PLD y VTX-2337 mostraron el mayor incremento en la infiltración de células CD45 $^+$ humanas en relación con PLD o VTX-2337 solos (Figura 3C). Se utilizó citometría de flujo para caracterizar adicionalmente la composición y el estado de maduración de las poblaciones de leucocitos humanos que infiltran tumores en los diferentes grupos. PLD solo no indujo cambios significativos en los linfocitos que infiltran tumores sobre la línea basal. De manera interesante, el agonista de TLR8 indujo un aumento significativo en las células T CD3 $^+$ totales, en el porcentaje de células T CD8 $^+$, así como en el porcentaje de células T CD3 $^+$ CD8 $^+$ (activadas por CD69 $^+$). La combinación de PLD y el agonista de TLR8 indujo cambios similares. Además, se encontró un aumento en los macrófagos CD40 $^+$ (activados) que infiltran el tumor (CD45 $^+$ CD11b $^+$), pDC (CD45 $^+$ CD123 $^+$) y mDC (CD45 $^+$ CD11c $^+$) en ratones tratados con VTX-2337, PLD solo o su combinación (Figura 3D). Curiosamente, hubo un aumento relativo en la relación de macrófagos que infiltran el tumor con respecto a pDC y la relación mDC con respecto a pDC en ratones tratados con la combinación relativa a cada fármaco solo.

Activación de TLR8 que promueve el desarrollo de CTL específicos del tumor después de PLD

Los resultados anteriores indican una fuerte interacción positiva entre PLD y VTX-2337 contra tumores. El rechazo mediado por células T CD8 $^+$ es un componente crítico de la respuesta inmune antitumoral y podría ser uno de los mecanismos que median la interacción anterior. Es importante destacar que la combinación VTX-2337 más PLD produjo una supresión tumoral efectiva.

Durante el transcurso de la investigación de esta interacción, se analizó la calidad del infiltrado de células T en respuesta a PLD, VTX-2337 o su combinación. Se aislaron los TIL de tumores recogidos de ratones NSG-HIS-A2 tratados ya sea con fármacos solamente, combinación de PLD y VTX-2337 o con control/vehículo y se expandieron utilizando rhIL-2 (600 UI/mL). Se aislaron células T de bazos de ratones NSG-HIS-A2 no portadores de tumores como controles.

Se transfirió de forma adoptivamente TIL expandidos *ex vivo* (los días 30 y 40 después de la inoculación del tumor) a ratones NSG que portan tumores OVCAR5. Los TIL aislados ya sea de controles de vehículo o donantes tratados con PLD, así como células T de bazos de ratones no portadores de tumores, transferidos adoptivamente a receptores portadores de tumores, fallaron en controlar el crecimiento tumoral en ratones receptores (Figura 4B). Sin embargo, los

TIL de ratones tratados con la combinación PLD y VTX-2337 ("PLD/VTX-2337" o "VTX-2337/Doxil") fueron capaces de controlar eficazmente el crecimiento de tumores OVCAR5 en ratones receptores (Figura 4B). Estos resultados confirman que PLD y agonista de TLR8 *in vivo*, en combinación provocan una respuesta inmune antitumoral efectiva de células T.

Los TIL se analizaron para la presencia de CTL específicos del tumor *in vitro*. Los TIL de ratones donantes tratados con la combinación de PLD y VTX-2337 lisaron eficazmente células objetivo OVCAR5 marcadas con ^{51}Cr (Figura 4A), mientras que los TIL de ratones donantes tratados con PLD solamente tuvieron menos actividad lítica. Su capacidad para lisar células objetivo fue considerablemente mayor que los TIL del grupo tratado de control/vehículo. En todos los grupos de tratamiento, la lisis de células objetivo por TIL fue atribuida a CTL que responden a antígenos restringidos por el MHC-I, ya que la adición del anticuerpo que neutraliza a anti-MHC de clase I redujo la muerte por los CTL (Figura 4C). Se co-cultivaron TIL ya sea con células OVCAR5 o una línea celular de melanoma. Los TIL tanto de donantes tratados con PLD como de PLD/VTX-2337 liberaron considerablemente más IFN γ en respuesta a las células OVCAR5 que a las células de melanoma (Figura 4D). Los TIL de ratones de control no tratados produjeron IFN γ específico mínimo en respuesta a la estimulación con OVCAR5. Los linfocitos expandidos a partir de los bazo de ratones no portadores de tumores no mostraron actividad citolítica ni producción de IFN γ en respuesta a las células OVCAR5.

Los CTL (células T citotóxicas o linfocitos citotóxicos) de ratones tratados con PLD/VTX-2337 tuvieron un nivel mucho más alto de actividad citotóxica que los de ratones tratados con PLD solo, lo que confirma que la activación de TLR8 de APC mejora el desarrollo de células T específicas antitumorales. La actividad de CTL fue tanto restringida por MHC de clase I como específica para OVCAR5, como se demuestra mediante la adición de mAb al MHC de clase I y la carencia de actividad hacia células objetivo HLA-A2* irrelevantes. Usando experimentos de transferencia adoptiva, se demostró que el aumento en la actividad CTL específica de tumor resultante del tratamiento con PLD/VTX-2337 confirió actividad antitumoral *in vivo*. En ratones NSG portadores de tumores no reconstituidos transferidos adoptivamente con 1×10^7 células T el día 30 y el día 40 después del reto con OVCAR5, que expandieron las células infiltrantes tumorales de ratones que recibieron VTX-2337/PLD® fueron capaces de controlar eficazmente el crecimiento tumoral. De manera muy interesante, las células derivadas de los tumores de ratones tratados con PLD® solamente ya no fueron más efectivas que las células de ratones tratados con control.

Los resultados demostraron además que la activación de APC por VTX-2337 mejora el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas inducidas por antraciclinas. Aunque el desarrollo de CTL específicos del tumor es un componente importante del efecto terapéutico de VTX-2337 cuando se administra con PLD, la liberación de mediadores con actividad antitumoral puede ser complementaria. La liberación de altos niveles de IFN γ puede activar células NK, aumentando la lisis de células tumorales. La liberación de IL-12 por VTX-2337 también tiene implicaciones importantes en el desarrollo de una respuesta inmune exitosa a los tumores. Se ha informado que este mediador activa las células NK, potencia las vías antiangiogénicas, y aumenta las respuestas de Th1 y CTL, y también tiene actividad antitumoral directa que se potencia con TNF α . Por lo tanto, los mediadores inducidos por la activación selectiva de TLR8 por VTX-2337 fueron evaluados para la actividad directa en células tumorales OVCAR5.

TNF α que media en parte la interacción entre la activación de TLR8 y PLD

Se llevaron a cabo experimentos para demostrar que TNF α es responsable de la actividad antitumoral mejorada observada con la combinación de Doxil/VTX-2337. Las PBMC humanas elutriadas frescas se activaron ya sea con VTX-2337 (1 $\mu\text{g/ml}$) o con pelas anti CD3/28 y se recogió el medio después de 6 horas. Se expusieron células OVCAR5 al medio de cultivo y se realizó una evaluación de la apoptosis a las 24 horas, mientras que la viabilidad celular se evaluó a las 48 horas.

Además de los CTL específicos de tumores, la activación de TLR8 puede también invocar respuestas antitumorales innatas, incluyendo la liberación de mediadores solubles tales como miembros de la familia TNF, que pueden actuar directamente sobre células tumorales para inducir la apoptosis. Puesto que la activación de TLR8 está asociada con la producción de altos niveles de TNF α , como se muestra en la Figura 1, TNF α es un posible mediador de los efectos de VTX-2337. La expresión del receptor 1 de TNF α (TNFR1) en células OVCAR5 se probó y documentó mediante transferencias de Western (Figura 5C). Durante el ensayo de sensibilidad de células OVCAR5 a TNF α , las células se incubaron durante 24 horas con 20 ng/mL de TNF α , una dosis que ejerce efectos citotóxicos directos. A pesar de expresar TNFR1, las células OVCAR5 fueron resistentes a apoptosis mediada por TNF α , como se midió por la tinción con anexina V y 7AAD (Figura 5D).

Las células tumorales pueden resistir la apoptosis mediada por TNF α mediante la sobreexpresión de la proteína inhibidora tipo enzima que convierte IL-1h similar a FADD (FLICE), o FLIP. FLIP, que puede existir tanto en forma larga (FLIP_L, 55 KDa) como en forma corta (FLIP_S, 28 KDa), pueden bloquear la apoptosis inducida por los miembros de la familia TNF α que incluyen TNF α y TRAIL en diferentes tipos de células. Las células OVCAR5 expresaron FLIP_L, la forma de 55 Kd de FLIP (Figura 5E, L carril CTR: células de control no tratadas).

Dado que la doxorrubicina desencadena la muerte celular y su actividad *in vivo* es mejorada por VTX-2337, se ha probado que la doxorrubicina hace que las células OVCAR5 sean más sensibles a la apoptosis inducida por TNF α . Las células OVCAR5 se incubaron previamente ya sea con medio de control o con medio que contenía PLD a razón de 1

µg/mL durante 24 horas, y luego se incubaron ya sea con el medio de control o con el medio que contenía TNFα (20 ng/mL) durante 12 h. TNFα y Doxil solos indujeron apoptosis mínima, aunque se detectó un aumento significativo en la apoptosis cuando se trataron las células con la combinación de estos dos agentes (Figura 5D). Se encontró que el tratamiento de células OVCAR5 con PLD inhibe la expresión de FLIP, mostrada mediante transferencia de Western (Figura 5E).

El TNFα fue subregulado marcadamente *in vivo* mediante VTX-2337 o un tratamiento de combinación como se muestra en la Figura 1C y la Figura 2. La activación de la familia de receptores de TNFα en células tumorales puede conducir a la activación de la caspasa 8, dando como resultado apoptosis. Se encontró que las células OVCAR5 expresan al receptor 1 de TNFα, pero eran casi completamente resistentes a TNFα solo. Sin embargo, se detectó un aumento en la apoptosis cuando se trataron las células OVCAR5 con agentes de combinación en comparación con agentes solos. La doxorubicina mata células por intercalación en el ADN, lo que perjudica la replicación del ADN, inhibe la traducción que conduce a una biosíntesis macromolecular debilitada y daña el ADN a través de la producción de ROS. También se demostró que la inhibición de la expresión de FLIP por células OVCAR5 que fueron pretratadas con PLD, sugiere que el deterioro de la nueva síntesis de proteínas hace estas células tumorales más sensibles a la apoptosis mediada por los miembros de la familia TNF.

En resumen, la muerte de las células tumorales mediada por la doxorubicina no es inmunológicamente silenciosa, sino que está mediada por la activación del sistema inmune y el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que participa en el control de las células tumorales. Sin embargo, la actividad de la doxorubicina puede también perjudicar el desarrollo de una respuesta inmune protectora debido a la toxicidad del sistema inmune. Inesperadamente, se encontró que la adición del agonista de TLR8 VTX-2337 al régimen de tratamiento potenciaba los efectos antitumorales de PLD® en un nuevo modelo murino de cáncer de ovario usando ratones NSG-HIS portadores de tumores. Se encontró que el tratamiento con VTX-2337 aumentaba la migración de células inmunes a los tumores y potenciaba el desarrollo de CTL específicos de tumores que eran capaces de lisar células OVCAR5 *in vitro* y controlar el crecimiento tumoral *in vivo*. La activación de TLR8 también conduce a la liberación de múltiples mediadores incluyendo TNFα, IL-12 e IFNγ que tienen actividades antitumorales y pueden mejorar aún más la respuesta antitumoral. Los altos niveles de TNFα resultante de la activación de TLR8 pueden actuar directamente sobre las células OVCAR5 para inducir apoptosis, mientras que las células se hacen más sensibles a esta vía apoptótica debido a los efectos de la doxorubicina sobre la síntesis de proteínas. Colectivamente, estos resultados demuestran que la inmunoterapia puede aumentar la efectividad de los tratamientos actuales contra el cáncer en cáncer de ovario. Está en curso un estudio de VTX-2337 en combinación con PLD® como tratamiento de segunda línea para pacientes con cáncer de ovario recurrente avanzado.

Ejemplo 2 Potencia y selectividad de VTX-2337

La concentración media efectiva máxima (EC₅₀) para la activación de VTX-2337 de TLR8 y TLR7 se evaluó en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 15 donantes sanos y también en células HEK293 transfectadas con TLR8 o TLR7 y un gen informador activado por NF-κ. Como se muestra en la Figura 6, en las PBMC, VTX-2337 estimuló la producción de TNFα, un marcador de la activación de TLR8 con una EC₅₀ de 74 nM y la producción de TNFα, una activación de marcador TLR7, con una EC₅₀ > 3.333 nM, indicando que VTX-2337 es 45 veces más selectivo para TLR8 con respecto a TLR7. Los datos de los transfectantes HEK293 de TLR7 y TLR8 se correlacionaron estrechamente con los datos obtenidos usando las PBMC con las EC₅₀ de 70 nM para TLR8 y 2.005 nM para TLR7. También se observó que VTX-2337 no tenía actividad sobre TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 o TLR9 en concentraciones hasta de 25 µM.

Ejemplo 3: VTX-2337 que estimula un intervalo de citoquinas y quimioquinas en sangre humana entera

Las propiedades inmunoestimuladoras de VTX-2337 se caracterizaron usando el panel de múltiples analitos humanos (MAP), versión 1.8 (Rules Based Medicine), para cuantificar los niveles de 98 analitos diferentes asociados con procesos inflamatorios que incluyen citoquinas, quimioquinas y otras proteínas elaboradas por p leucocitos en respuesta a la activación de TLR7/8. Se recogió sangre entera de 6 voluntarios humanos normales y se activó *in vitro* con concentraciones de VTX-2337 de 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 µM utilizando el presente sistema de cultivo de leucocitos. El cultivo conjunto con VTX-2337 dio como resultado incrementos dependientes de la dosis en una cantidad de mediadores inmunes incluyendo TNFα, IL-12p40, IL-1β y MIP-1β, como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 4: Monocitos activadores de VTX-2337 y células dendríticas mieloides (mDC) pero no células dendríticas plasmacitoides (pDC)

Para evaluar la especificidad celular de VTX-2337, se estimularon PBMC humanas de donantes sanos con VTX-2337 de 0,8 µM y se evaluó la producción de citoquinas intracelulares en subconjuntos de células específicas presentes en PBMC mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 8, los datos se expresan como porcentajes de células positivas para IL-12, TNFα e IFNα en monocitos (CD14+), pDC (CD123+) y mDC (CD11c+). Cada punto de datos representa la respuesta de un donante individual (n = 10). La barra horizontal representa la media del grupo. Los niveles intracelulares de IL-12 y TNFα que se elevaron en monocitos tratados con VTX-2337 y mDC, pero no pDC, fueron consistentes con el patrón de expresión celular de TLR8.

Ejemplo 5: Fase I del estudio clínico de VTX-2337

Se llevó a cabo un estudio de escalamiento de la dosis para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacología de VTX-2337 cuando se administra a sujetos adultos con tumores sólidos avanzados o linfoma. Los objetivos principales del estudio fueron evaluar la seguridad y la farmacocinética de VTX-2337 e identificar cualquier toxicidad limitante de la dosis. Los objetivos secundarios del estudio fueron evaluar la respuesta farmacodinámica a VTX-2337 y determinar la dosis máxima tolerada (MTD) para un único ciclo de tratamiento con VTX-2337.

Procedimientos del estudio: Se administró VTX-2337 semanalmente mediante inyección subcutánea en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de dosificación de 28 días durante dos ciclos. Utilizando un esquema de escalamiento modificado de dosis de Fibonacci, las cohortes sucesivas recibieron dosis que variaban de 0,1 mg/m² a 3,9 mg/m² de VTX-2337. Se recogieron muestras de plasma para análisis farmacocinético después de la primera dosis del primer ciclo de tratamiento y para análisis farmacodinámico después de la primera dosis del primero y segundo ciclos de tratamiento.

Las respuestas clínicas se evaluaron mediante RECIST y se permitió que los sujetos con CR (es decir, respuesta completa), PR (es decir, respuesta parcial) o SD (es decir, enfermedad estable) recibieran ciclos adicionales de tratamiento.

Datos demográficos de los pacientes: Se evaluaron treinta y tres sujetos con diversas neoplasias sólidas en etapa tardía en 8 cohortes sucesivas. La distribución de los cánceres evaluados fue la siguiente: colorrectal (n = 9, 27% de los sujetos inscritos), pancreático (n = 6/18%), melanoma (n = 5/15%), colangiocarcinoma (n = 2/6%), células renales (n = 2/6%) y 1 sujeto cada uno (3%) con carcinoma hepatocelular, de mama, de endometrial, de próstata, de ovario, de carcinoma quístico adenoide de la lengua, de células basales metastásicas, carcinoma neuroendocrino del duodeno y el hígado, un tumor de origen desconocido.

Las muestras se recogieron a las 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8 y 24 horas después de administración subcutánea de la primera dosis de VTX-2337 y los niveles de plasma de VTX-2337 se cuantificaron mediante LC-MS/MS. VTX-2337 fue rápidamente absorbido en la circulación sistémica con la T_{máx} media que se producen entre 0,5 y 0,8 horas después de la dosificación. VTX-2337 también fue rápidamente eliminado de la circulación con una semivida media (t_{1/2}) que oscila entre 1,7 y 6,7 horas. Los niveles máximos en plasma (C_{máx}) y la exposición sistémica total se incrementaron ambos con el aumento de la dosis. Se calcularon los valores normalizados de la dosis (DN) para C_{máx} y AUC_(0-∞). En general, en los intervalos de dosis evaluados, la farmacocinética de VTX-2337 parece ser lineal. Los resultados farmacocinéticos se muestran en la Figura 9 y en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Dosis (mg/m ²)	~Dosis (mg/kg)	T _{1/2} (h)	T _{máx} (h)	C _{máx} (ng/mL)	AUC _(0-∞) (ng•h/mL)	DN C _{máx} (ng/mL)/(mg/m ²)	DNAUC _(0-∞) (ng•h/mL)/(mg/m ²)
0,1	0,0022	1,7	0,	1,52	3,12	15,2	31,2
0,2	0,0054	3,0	0,8	1,97	4,74	9,9	23,7
0,4	0,011	6,6	0,5	6,69	10,94	16,7	27,4
0,8	0,022	5,3	0,5	5,93	19,17	7,4	24,0
1,3	0,035	5,6	0,5	10,9	29,50	8,4	22,7
2,0	0,054	6,7	0,5	14,6	59,15	7,3	29,6
2,8	0,076	5,7	0,5	19,9	80,35	7,1	28,7
3,9	0,105	5,3	0,5	23,0	81,10	5,9	20,8

Para evaluar la respuesta farmacodinámica (PD) para VTX-2337, se recogieron muestras de sangre a las 0, 4, 8, 24 horas después de la administración subcutánea de la primera dosis del primer ciclo de VTX-2337. Los niveles en plasma de los mediadores inmunes se cuantificaron utilizando el panel de múltiples analitos humanos (MAP), versión 1.8 (Rules Based Medicine). Se observaron aumentos dependientes de la dosis en una serie de biomarcadores, incluyendo G-CSF, MCP-1, MIP-1β y TNFα, entre 4 y 8 horas después de la dosificación con los niveles generalmente regresando a la línea base en 24 horas. Los niveles de mediadores en plasma recogidos de 9 voluntarios sanos se muestran para comparación con la población de oncología. Las respuestas farmacodinámicas después de la administración subcutánea de VTX-2337 se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Analito	Tiempo (h)	Normales	Cohorte 1 (0,1 mg/m ²)	Cohorte 2 (0,2 mg/m ²)	Cohorte 3 (0,4 mg/m ²)	Cohorte 4 (0,8 mg/m ²)	Cohorte 5 (1,3 mg/m ²)	Cohorte 6 (2,0 mg/m ²)	Cohorte 7 (2,8 mg/m ²)	Cohorte 8 (3,9 mg/m ²)
G-CSF (pg/mL)	0	0,7 ± 0,5	9,7 ± 1,9	7,8 ± 3,2	12,7 ± 6,0	13,2 ± 8,9	5,0 ± 0,3	9,9 ± 8,2	7,4 ± 3,2	29,1 ± 55,8
	4		8,6 ± 1,6	11,5 ± 7,8	9,5 ± 0,9	49,8 ± 80,3	20,5 ± 24,7	14,0 ± 4,3	12,4 ± 2,4	83,3 ± 104,7
	8		11,9 ± 4,4	19,0 ± 16,5	63,8 ± 60,1	137 ± 124	196 ± 145	134 ± 149	553 ± 246	2151 ± 3586
	24		9,2 ± 2,5	15,4 ± 9,0	15,8 ± 3,5	35,7 ± 14,7	30,8 ± 10,4	42,2 ± 31,6	59,0 ± 31,7	141,4 ± 228,8
MCP-1β (pg/mL)	0	131 ± 24,3	247 ± 62,7	245 ± 167	129 ± 30,0	260 ± 150	227 ± 79,8	265 ± 161	250 ± 110	249 ± 56
	4		223 ± 58,8	235 ± 84,6	137 ± 30,7	1037 ± 1920	911 ± 951	247 ± 80,5	719 ± 433	5227 ± 8362
	8		280 ± 97,0	298 ± 100	251 ± 87,9	673 ± 386	954 ± 638	722 ± 224	2043 ± 760	8128 ± 10588
	24		250 ± 85,0	301 ± 159	99,5 ± 6,9	267 ± 104	246 ± 158	320 ± 244	273 ± 109	532 ± 571
MIP-1 (pg/mL)	0	136 ± 36,2	201 ± 73,8	230 ± 84,0	172 ± 59,0	165 ± 63,9	182 ± 36,9	136 ± 28,3	136 ± 22	236 ± 111
	4		196 ± 71,9	239 ± 74,0	215 ± 65,6	450 ± 641	543 ± 477	196 ± 62,5	517 ± 305	7793 ± 10824
	8		204 ± 74,0	247 ± 84,7	213 ± 88,8	287 ± 177	688 ± 635	289 ± 111	646 ± 216	2259 ± 2456
	24		207 ± 73,8	280 ± 115	173 ± 67,4	183 ± 55,9	228 ± 70,1	155 ± 26	152 ± 82	276 ± 108
TNFα (pg/mL)	0	5,2 ± 2,6	11,4 ± 4,4	9,7 ± 5,7	9,0 ± 4,9	16,7 ± 12,6	9,3 ± 4,1	4,4 ± 1,6	6,1 ± 1,8	14,9 ± 9,1
	4		10,5 ± 2,6	10,8 ± 5,0	10,8 ± 3,3	22,0 ± 14,6	14,9 ± 12,5	8,4 ± 1,5	10,9 ± 1,4	56,9 ± 48,3
	8		10,3 ± 4,0	10,6 ± 6,0	9,6 ± 3,1	19,0 ± 10,6	21,6 ± 13,3	10,0 ± 2,3	12,8 ± 2,5	42,7 ± 27,4
	24		10,2 ± 3,6	12,4 ± 6,1	10,0 ± 2,9	17,5 ± 8,7	15,3 ± 4,2	10,0 ± 0,2	8,8 ± 4,1	24,2 ± 9,4

Las respuestas farmacodinámicas a VTX-2337 se midieron después de la primera dosis del primer y segundo ciclos de tratamiento con VTX-2337 (día 1 y día 29) para evaluar si la administración repetida produciría efectos comparables. Las barras en las Figuras 10A y 10B representan los niveles en plasma de G-CSF y MIP-1β de pacientes individuales en cada cohorte que recibieron ciclos múltiples de VTX-2337. No hubo ni un aumento ni una desensibilización amplia de la respuesta inmune después de un ciclo de tratamiento con VTX-2337. En otras palabras, las respuestas farmacodinámicas son consistentes durante múltiples ciclos de tratamiento.

Perfil de eventos adversos: VTX-2337 fue generalmente seguro y bien tolerado. Los eventos adversos relacionados con el fármaco más común fueron reacciones en el lugar de la inyección, fiebres leves y síntomas similares a los de la gripe. Estas observaciones no fueron inesperadas después de la administración de un agente inmunomodulador. No se observaron eventos adversos hematológicos o gastrointestinales relacionados con fármacos.

En resumen, se observó que la administración subcutánea semanal del nuevo agonista de TLR8 VTX-2337 era generalmente segura y bien tolerada; los niveles en plasma de VTX-2337 y las respuestas de PD a VTX-2337 aumentaron de una manera dependiente de la dosis; y que la administración subcutánea de VTX-2337 estimuló la producción de múltiples mediadores inflamatorios incluyendo citoquinas y quimioquinas consistentes con la activación de una respuesta inmune innata.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición farmacéutica para uso en una terapia de combinación de tratamiento de cáncer de ovario en un sujeto, preferiblemente un mamífero, que comprende una formulación que incluye un agonista de TLR8 de benzo[b]azepina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la terapia de combinación comprende además una cantidad eficaz de doxorrubicina y el agonista de TLR8 es 2-amino-N,N-dipropil-8-(4-(pirrolidin-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepin-4-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma .
- 10 2. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que:
(I) el agonista de TLR8 y la doxorrubicina se administran simultáneamente;
(II) el agonista de TLR8 y la doxorrubicina se administran separadas por 5 días; o
(III) el agonista de TLR8 se administra antes o después de la administración de la doxorrubicina.
- 15 3. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en la que la doxorrubicina es una forma liposomal PEGilada de doxorrubicina, preferiblemente en una forma adecuada para administración intravenosa y/o que se dosifica preferiblemente desde aproximadamente 0,02 hasta 10 mg/kg de peso corporal o desde aproximadamente 0,04 hasta 5 mg/kg de peso corporal del sujeto.
- 20 4. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en la que la formulación del agonista de TLR8 es adecuada para inyección por vía subcutánea, vía intravenosa, vía intramuscular o vía transdérmica.
- 25 5. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que la formulación del agonista de TLR8 es adecuada para la inyección por vía subcutánea.
- 30 6. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en la que el agonista de TLR8 se dosifica a una concentración desde aproximadamente 0,02 hasta aproximadamente 10 mg/kg o desde aproximadamente 0,04 hasta aproximadamente 10 mg/kg o desde aproximadamente 0,04 hasta aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal del sujeto; o el agonista de TLR8 se dosifica a una concentración desde aproximadamente 2,5 a 3,5 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto; preferiblemente el agonista de TLR8 se administra al sujeto de forma semanal o quincenal.
- 35 7. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en la que la formulación comprende además desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 30%, desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30%, desde aproximadamente 5% hasta 15%, desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, o desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 10% en peso/volumen de una ciclodextrina, preferiblemente una ciclodextrina beta.
- 40 8. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 7, en la que la ciclodextrina es una sulfobutíler β-ciclodextrina.
- 45 9. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en la que la formulación tiene una concentración desde aproximadamente 0,01 hasta 50 mg/mL, desde aproximadamente 0,5 mg/mL hasta aproximadamente 50 mg/mL, desde aproximadamente 1 mg/mL hasta aproximadamente 40 mg/mL, desde aproximadamente 2 mg/mL hasta aproximadamente 15 mg/mL, desde aproximadamente 4 mg/mL hasta aproximadamente 15 mg/mL, desde aproximadamente 8 mg/mL hasta aproximadamente 15 mg/mL, o desde aproximadamente 10 mg/mL hasta aproximadamente 15 mg/mL, del agonista de TLR8.
- 50 10. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en la que la doxorrubicina está en una forma de una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en una forma liposomal PEGilada.

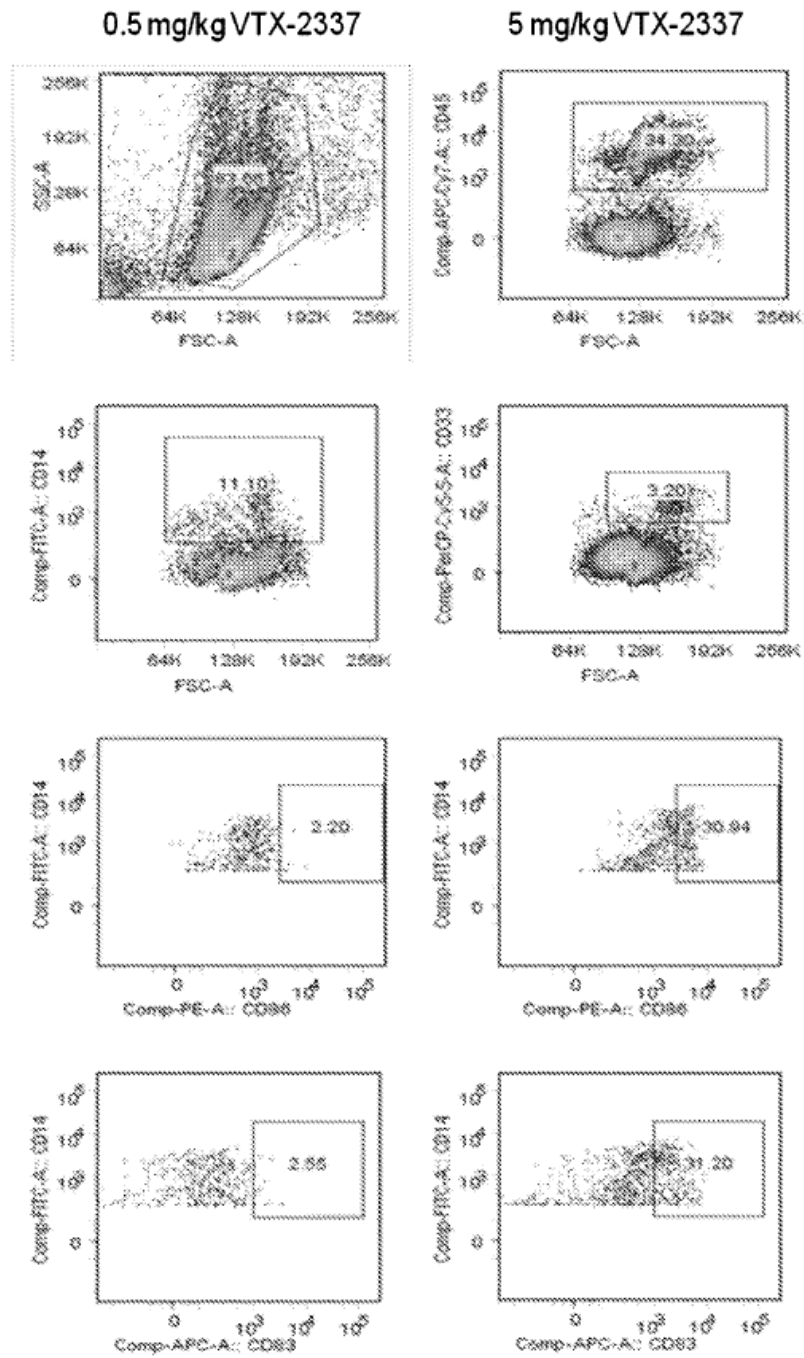


Figura 1A

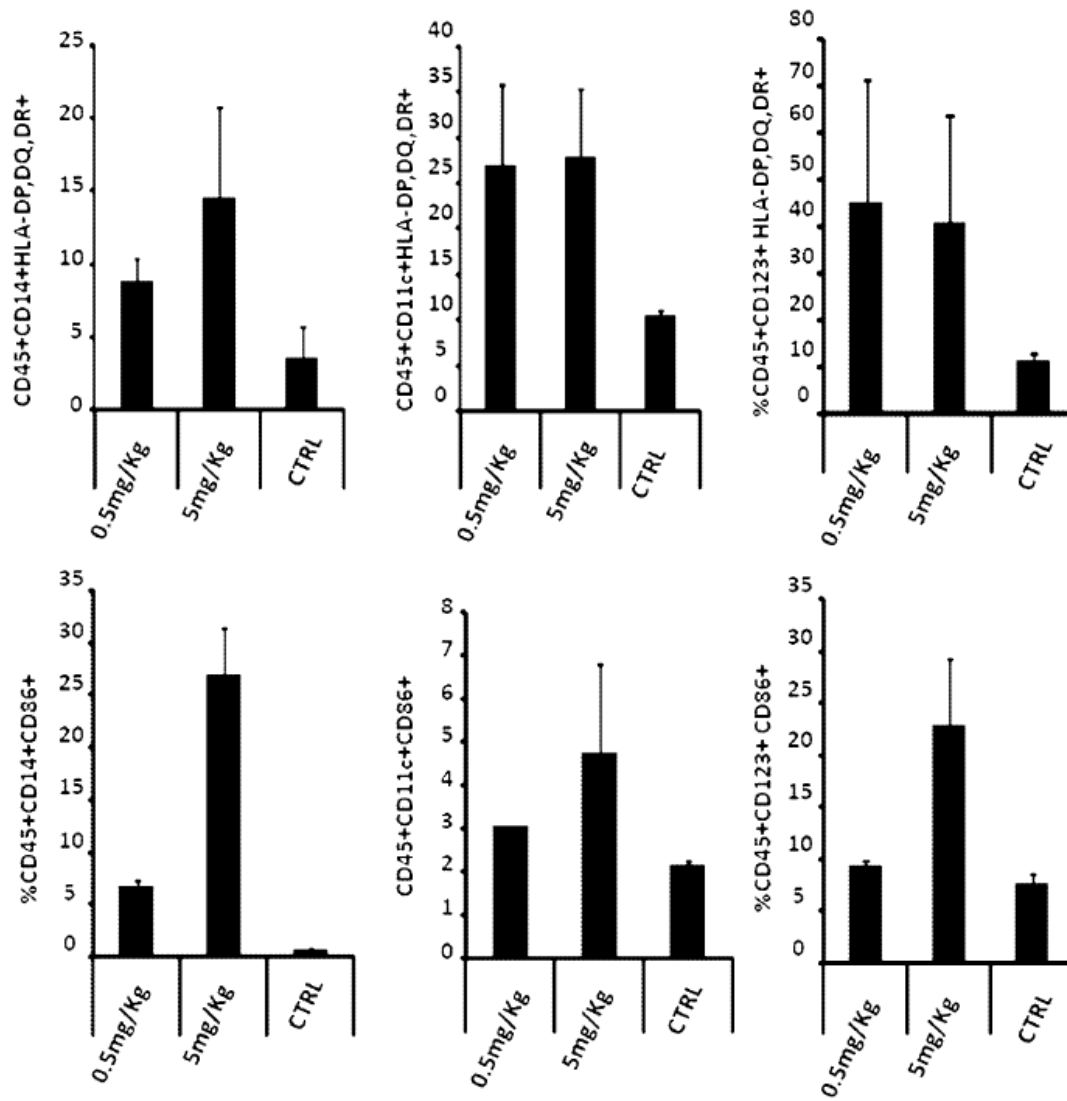


Figura 1B

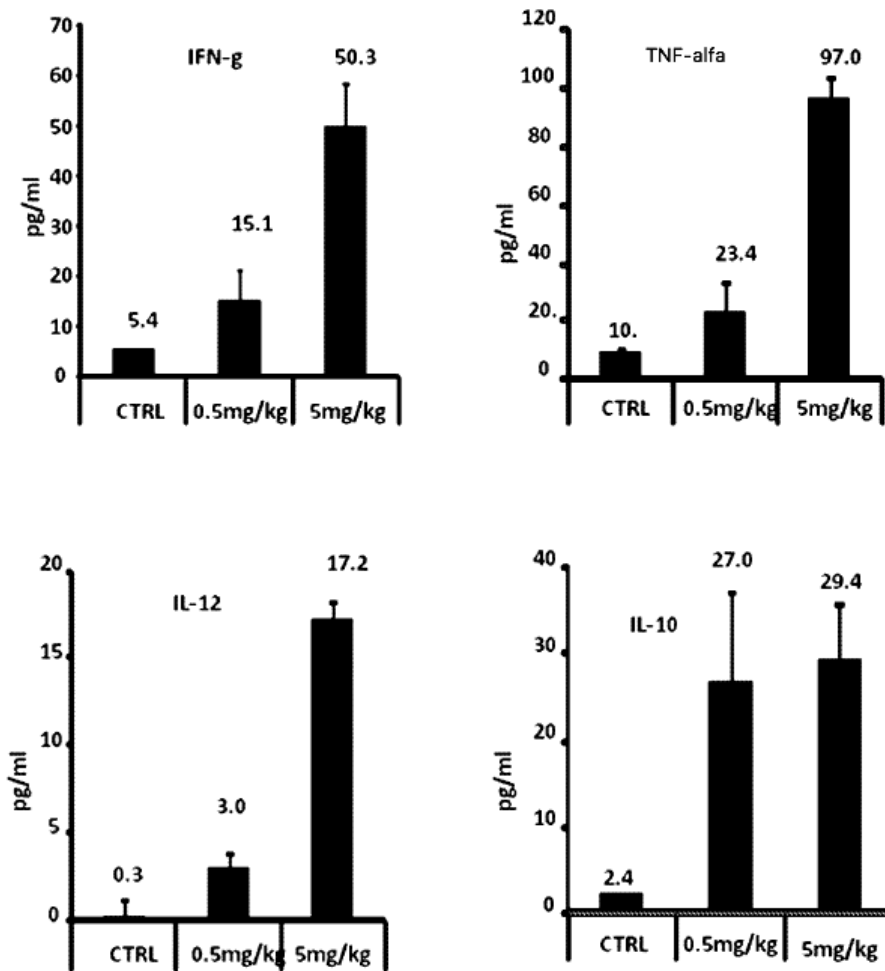


Figura 1C

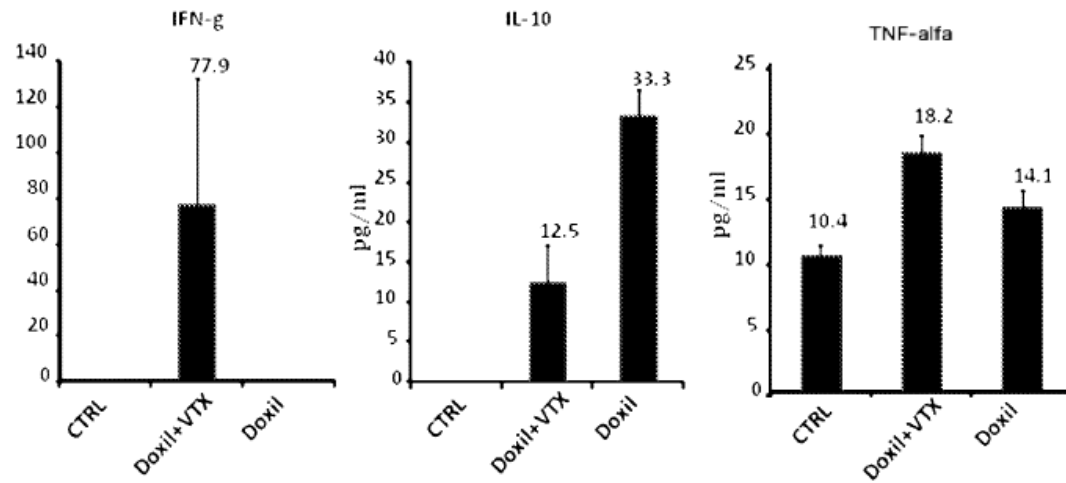


Figura 2

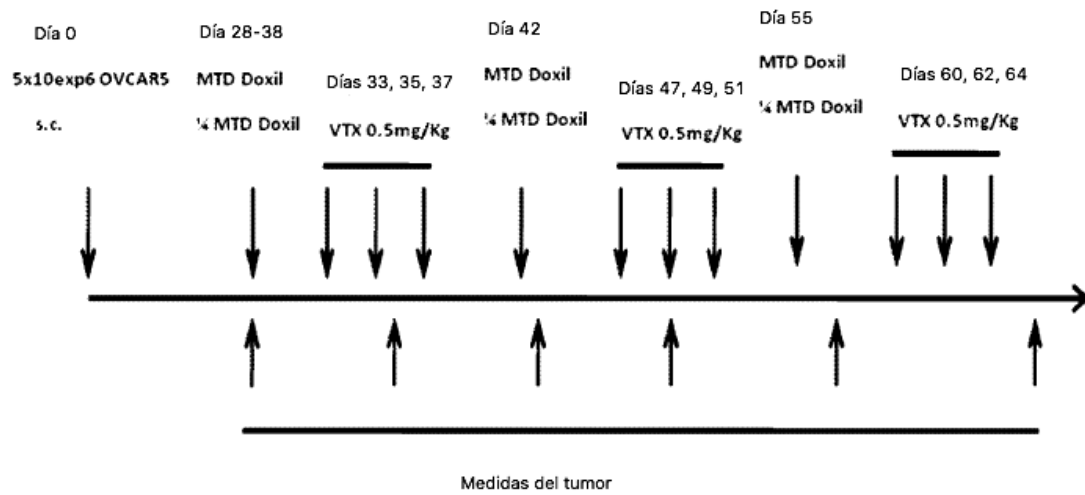


Figura 3A

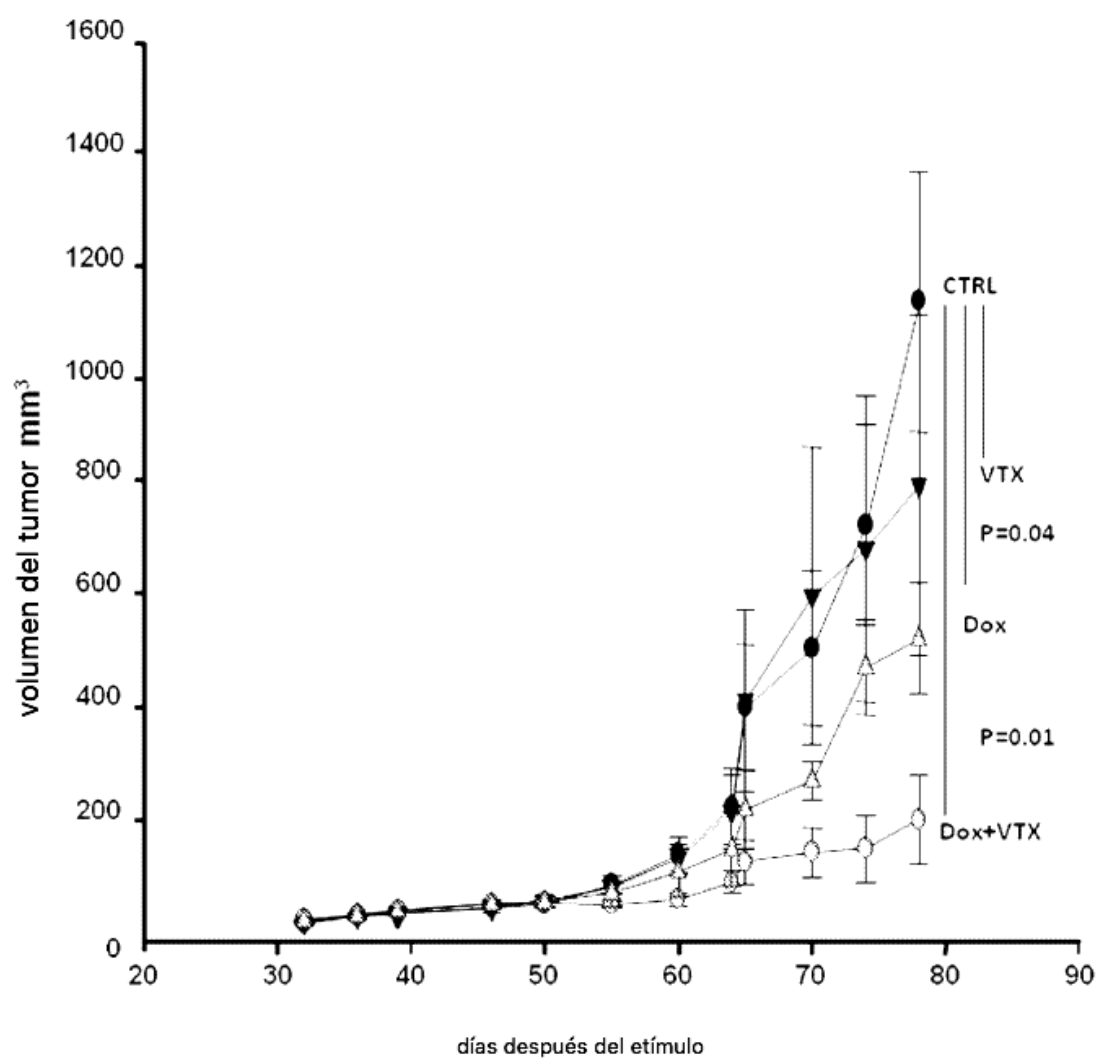


Figura 3B

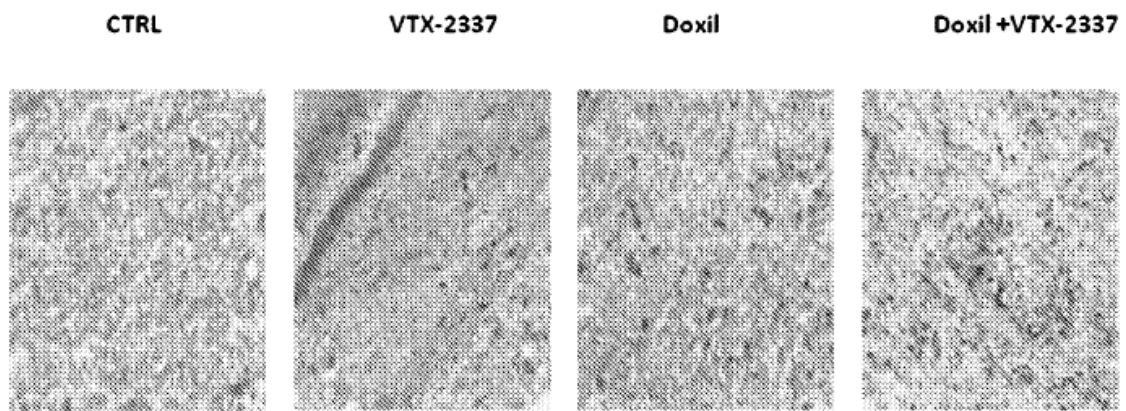


Figura 3C

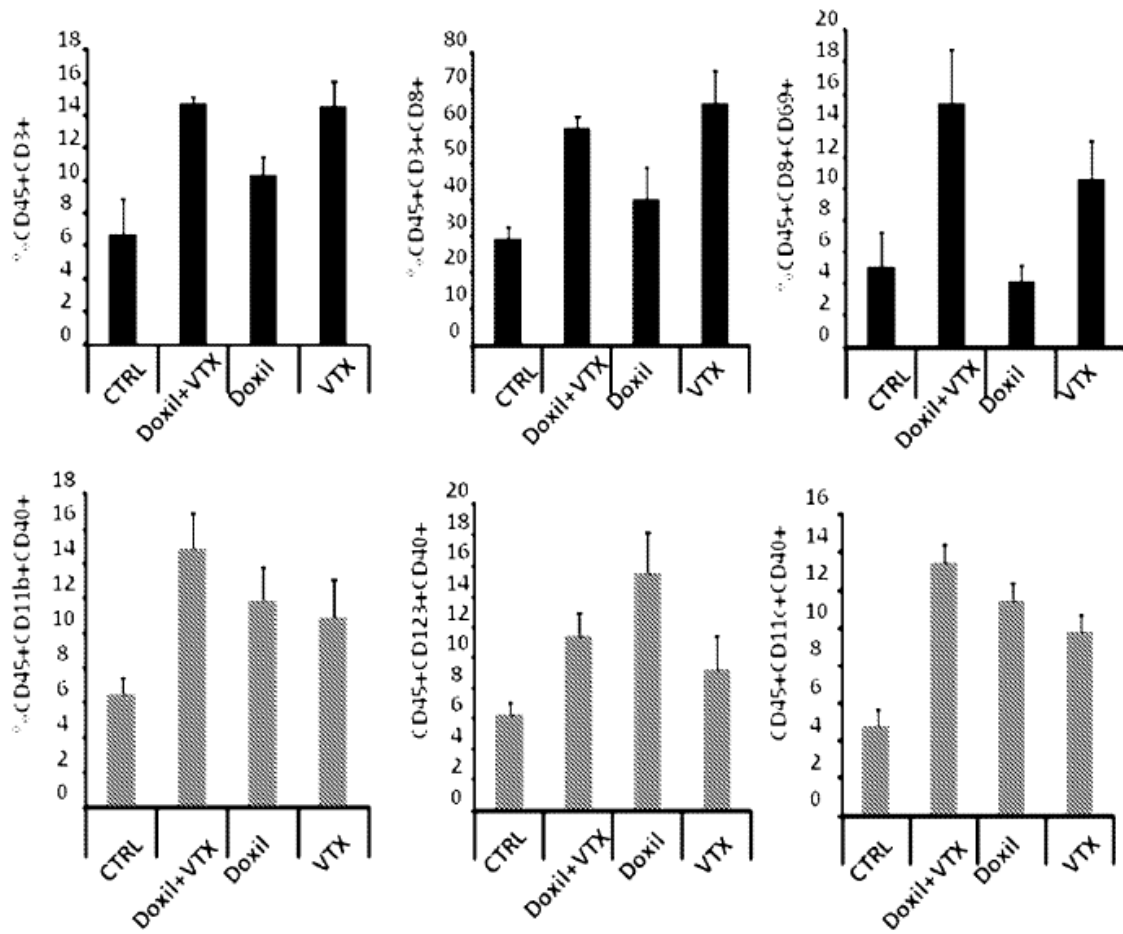


Figura 3D

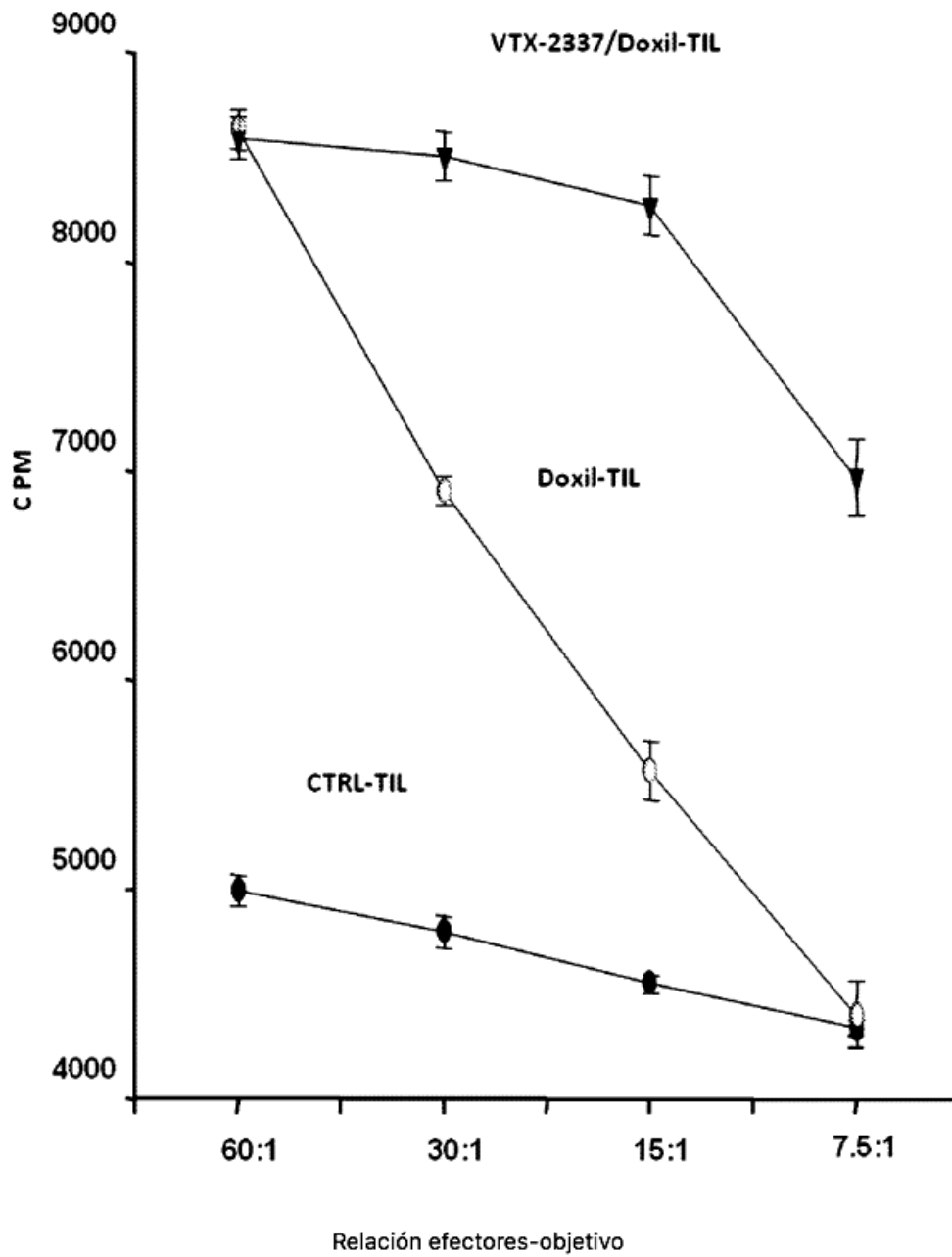


Figura 4A

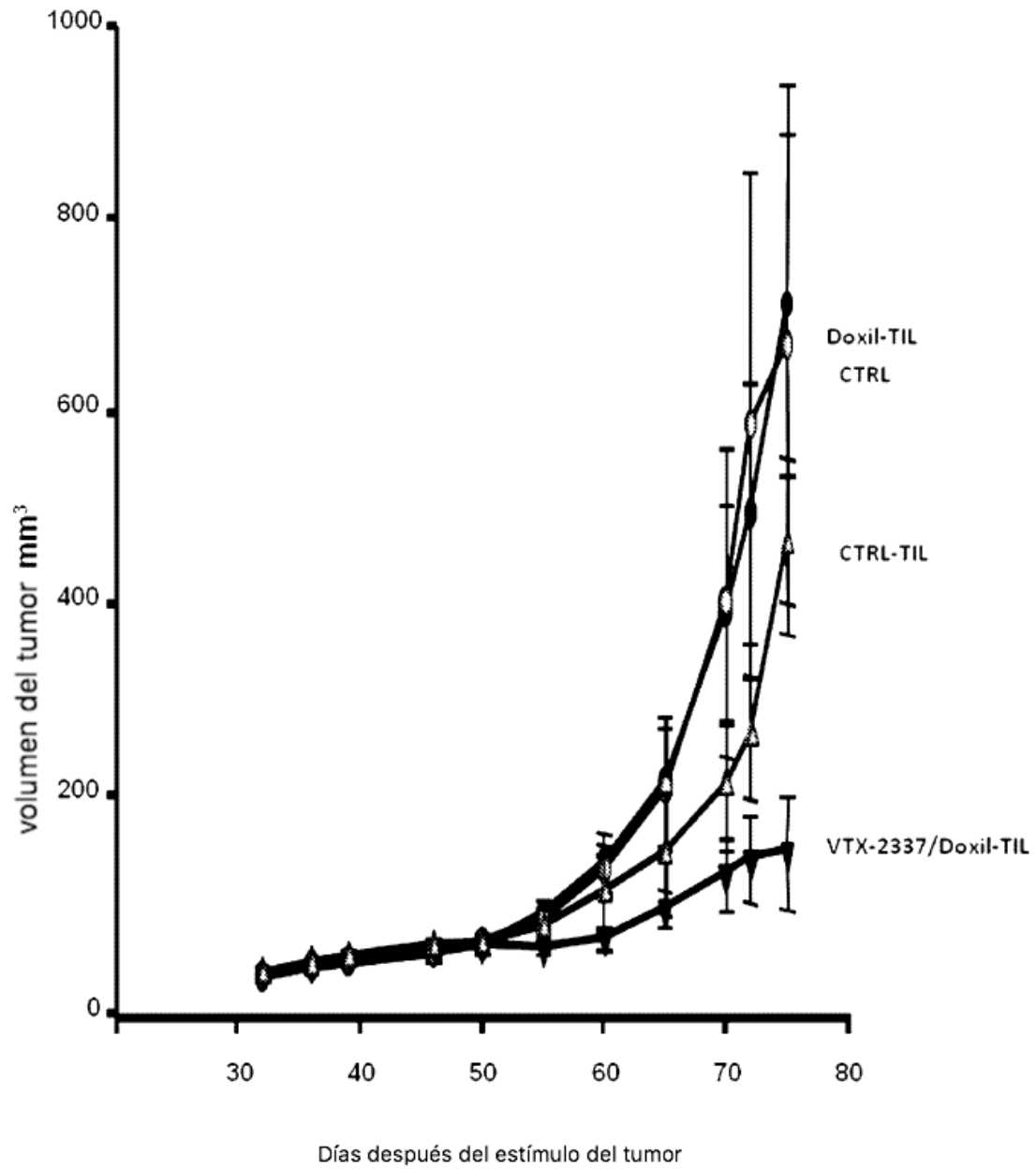


Figura 4B

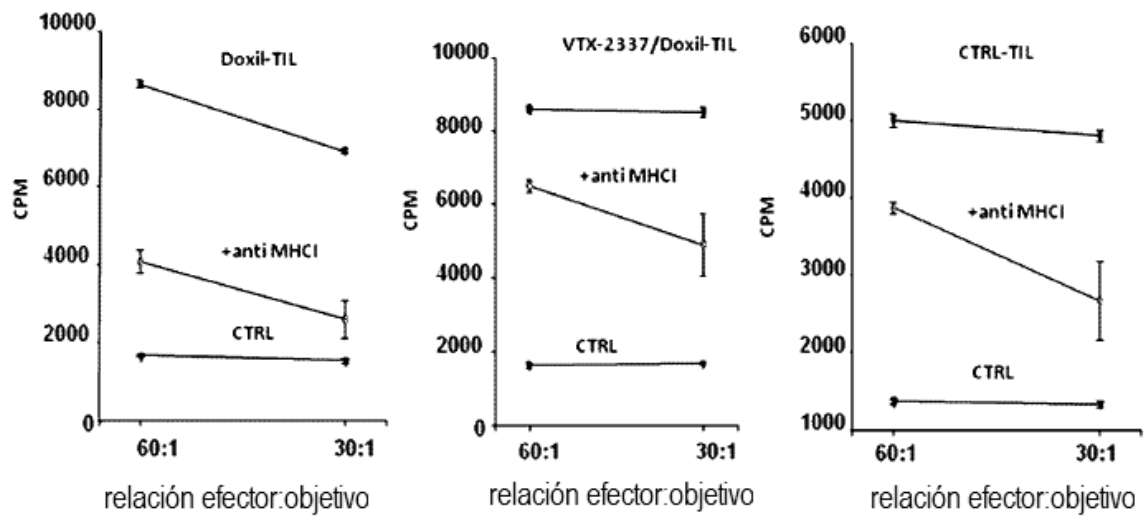


Figura 4C

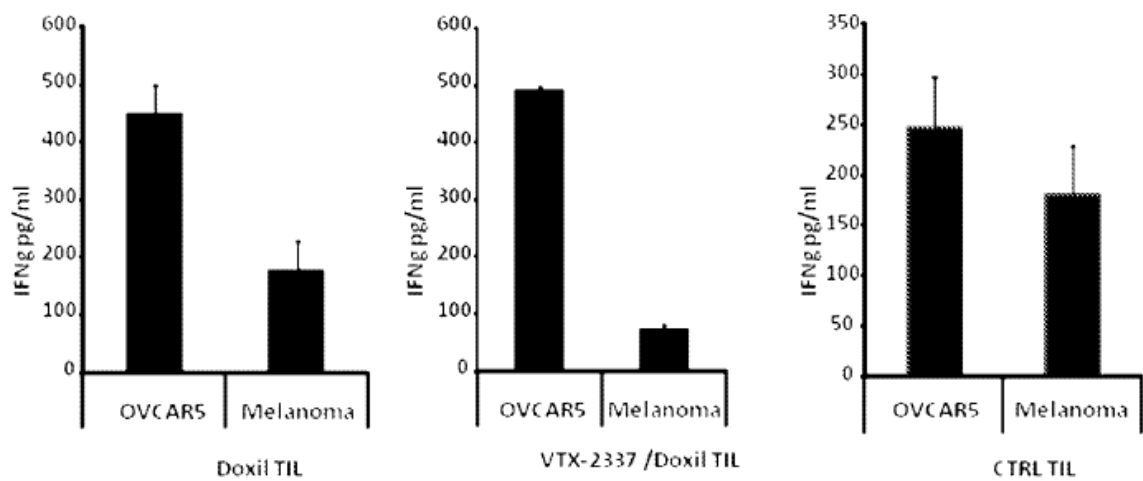


Figura 4D

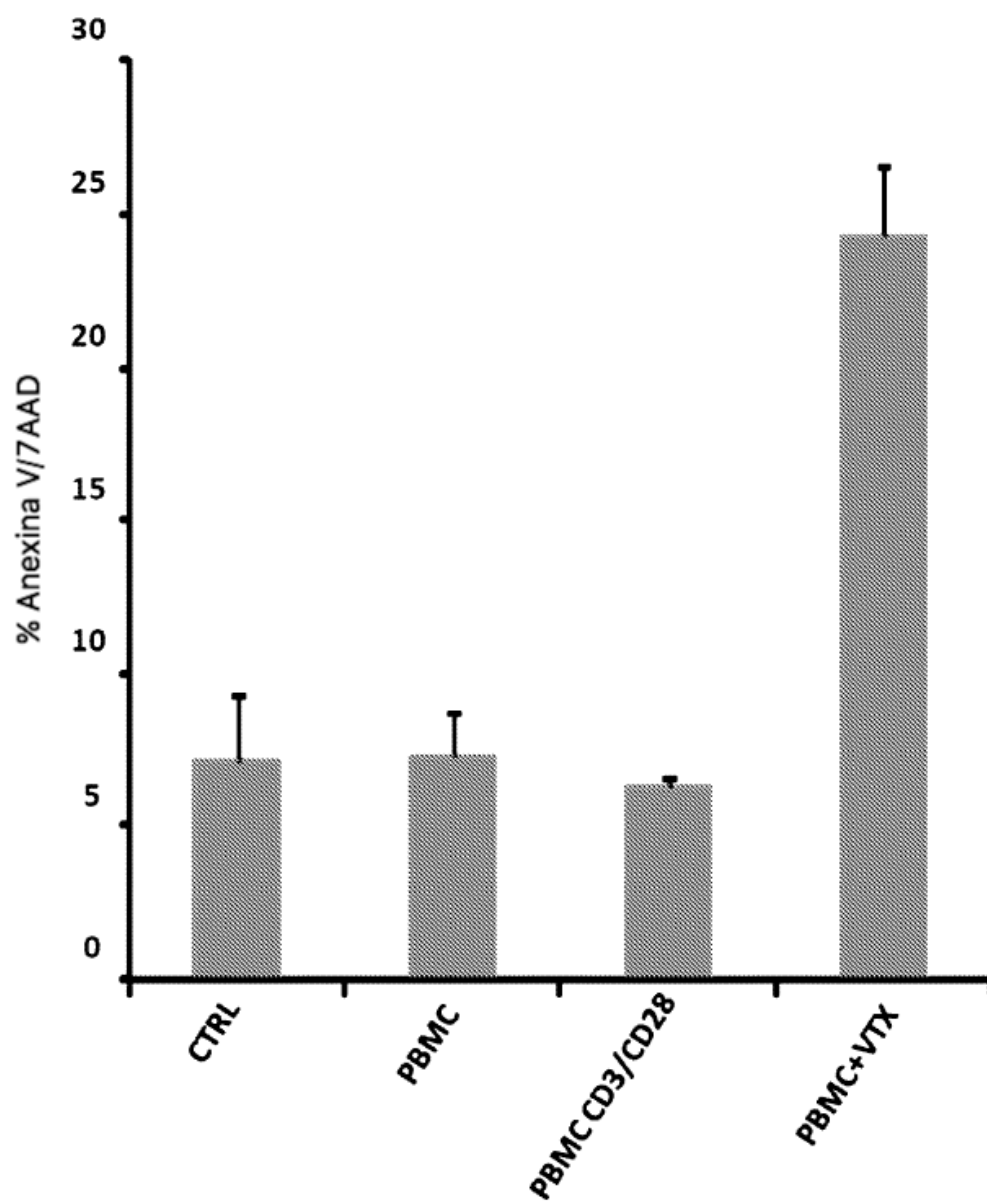


Figura 5A

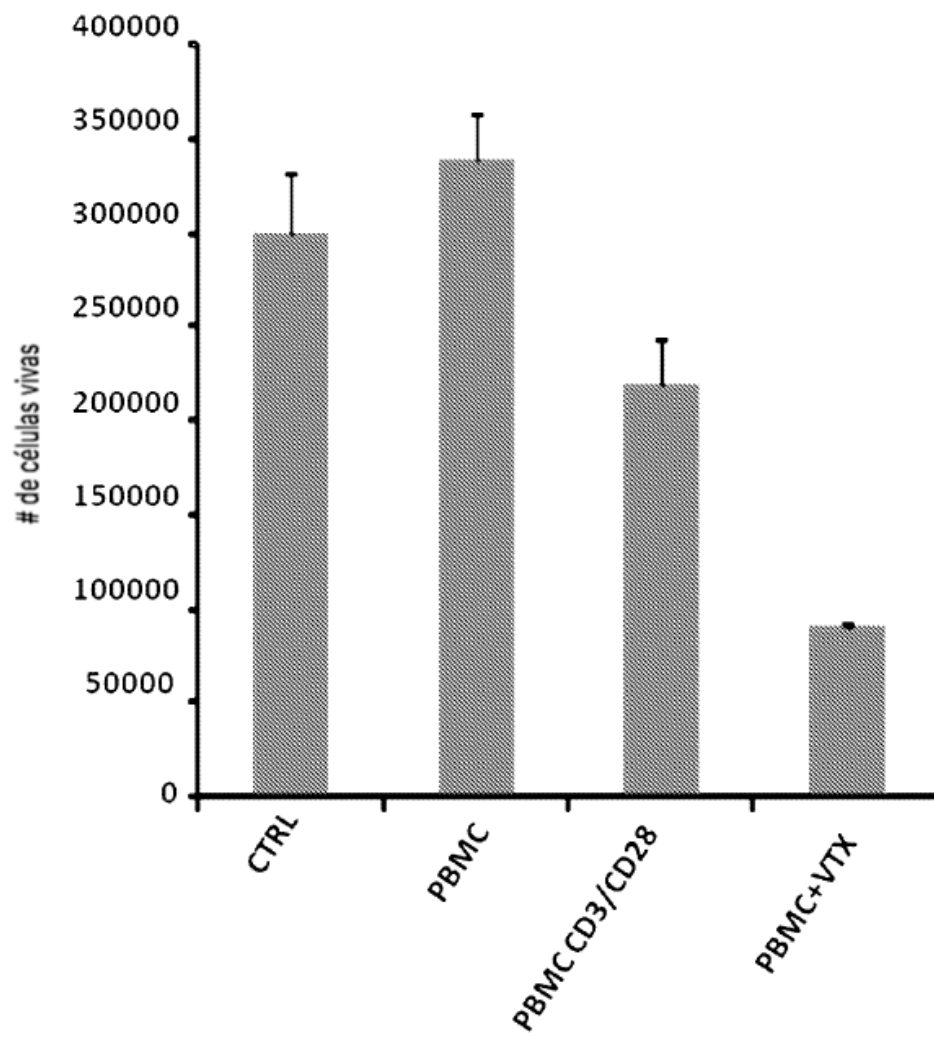


Figura 5B

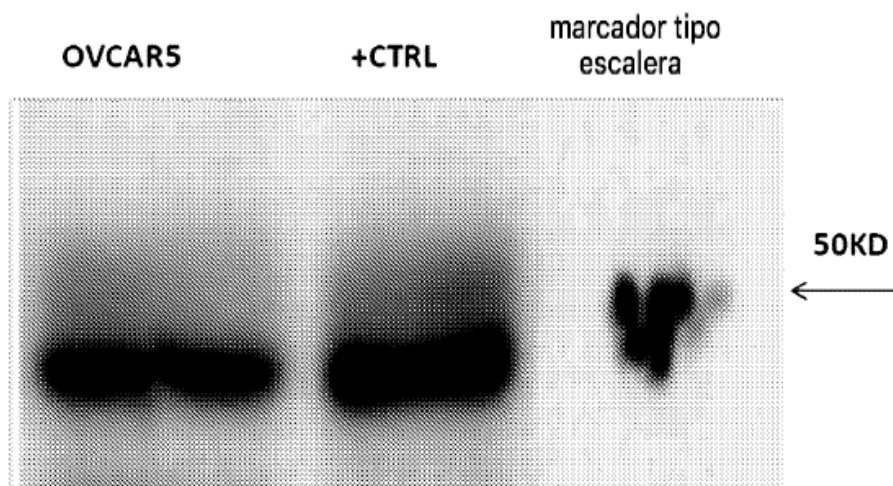


Figura 5C

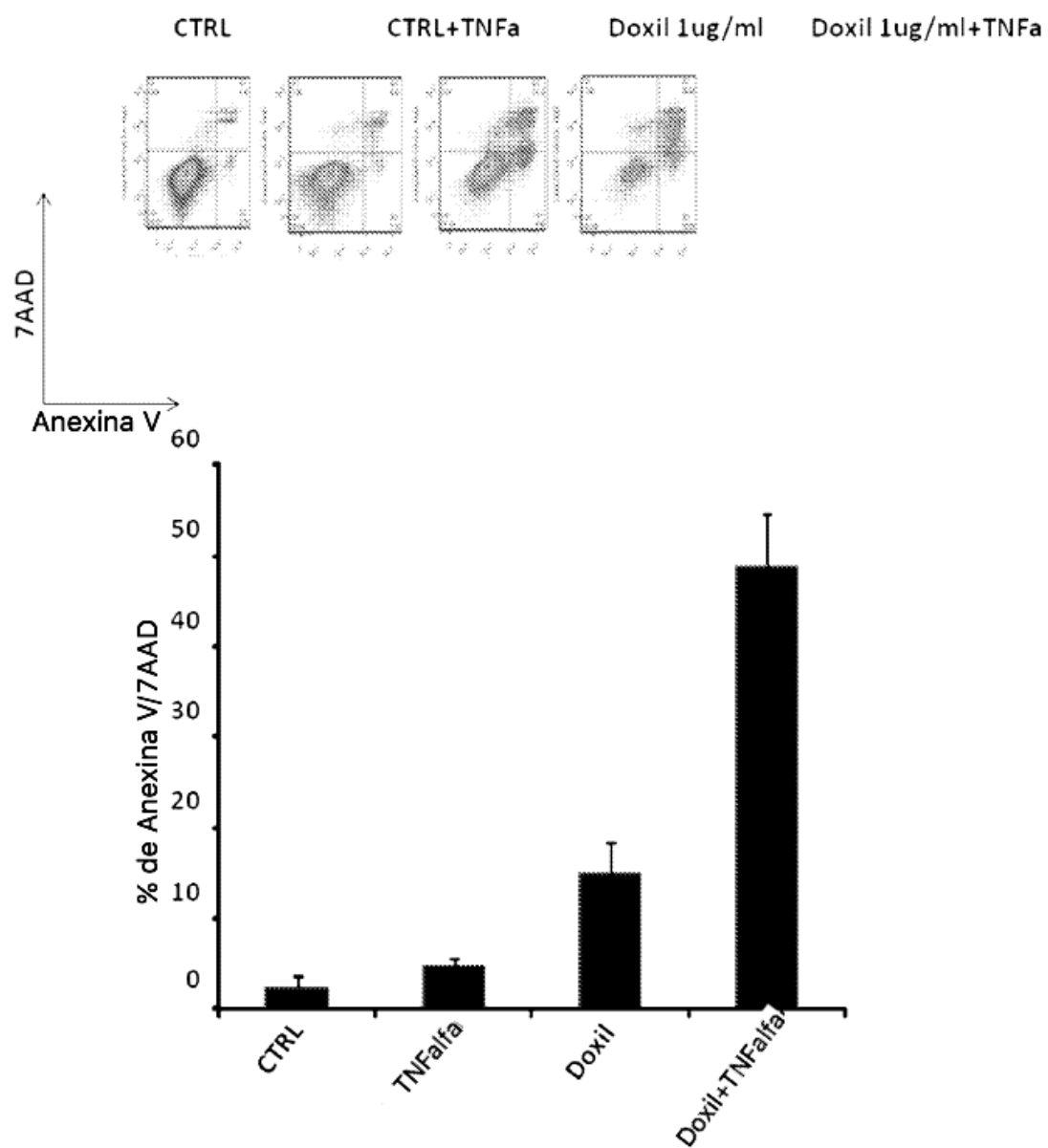


Figura 5D

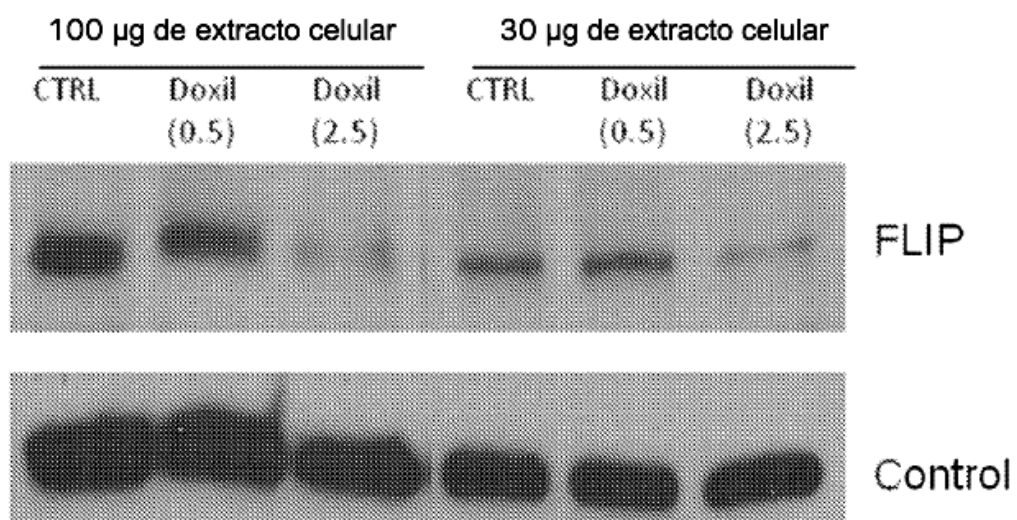


Figura 5E

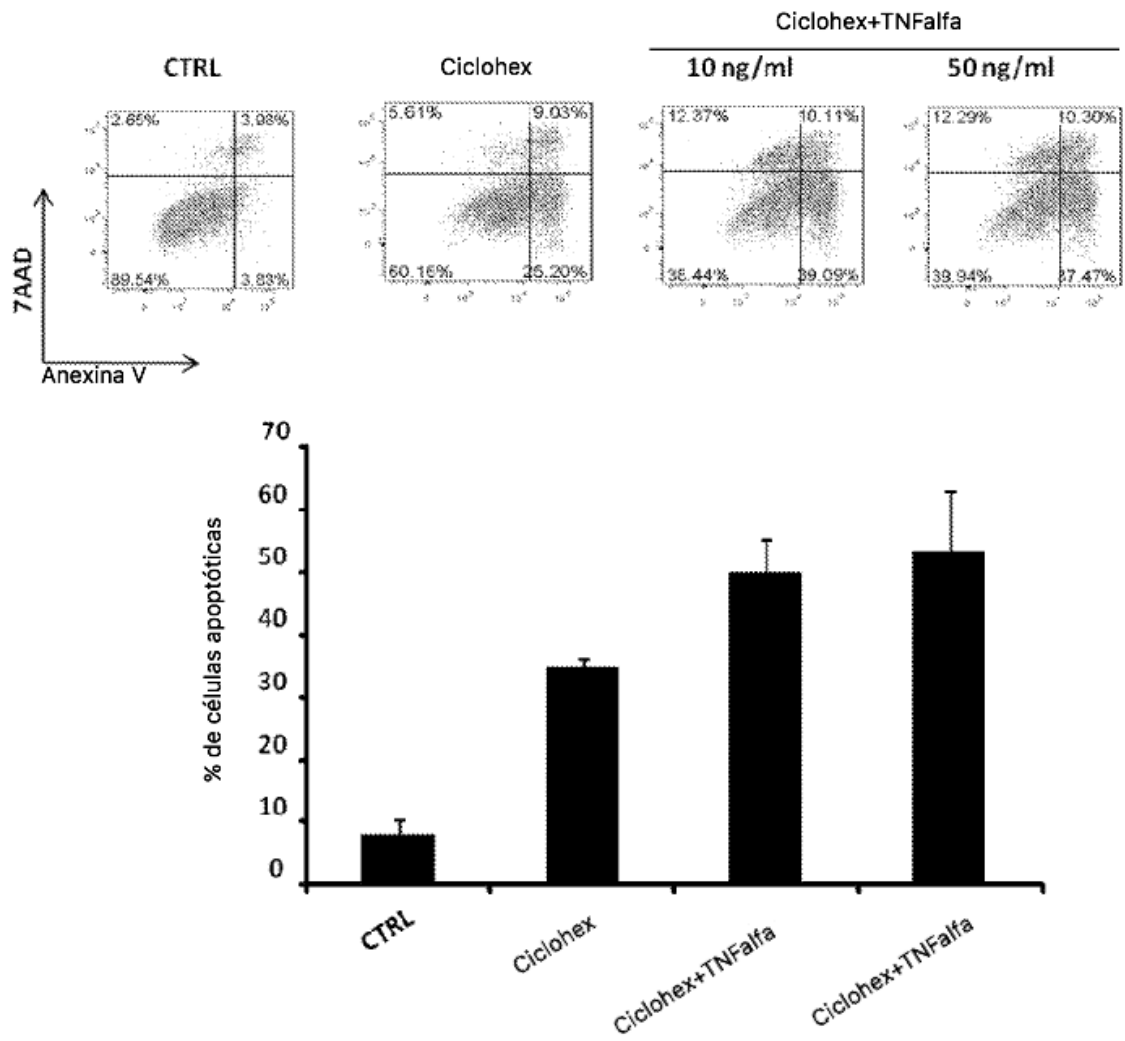


Figura 5F

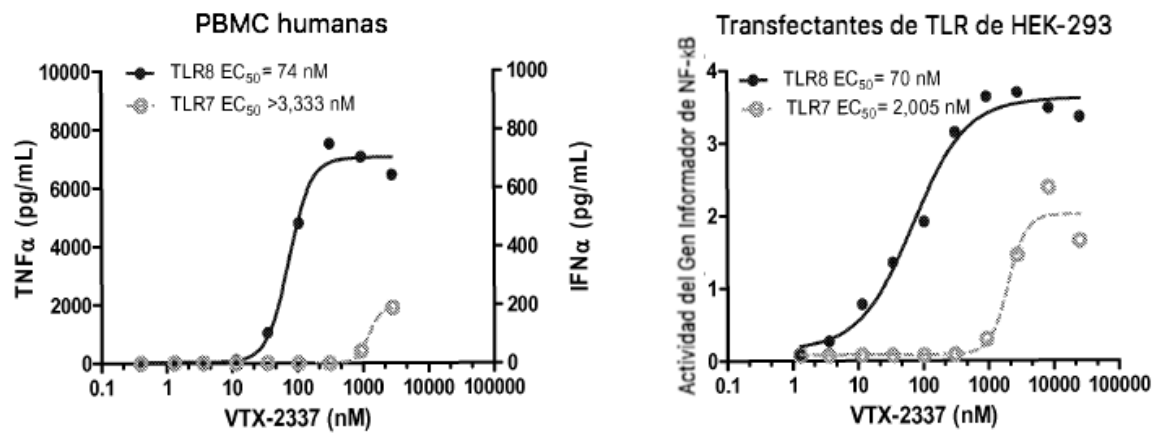


Figura 6

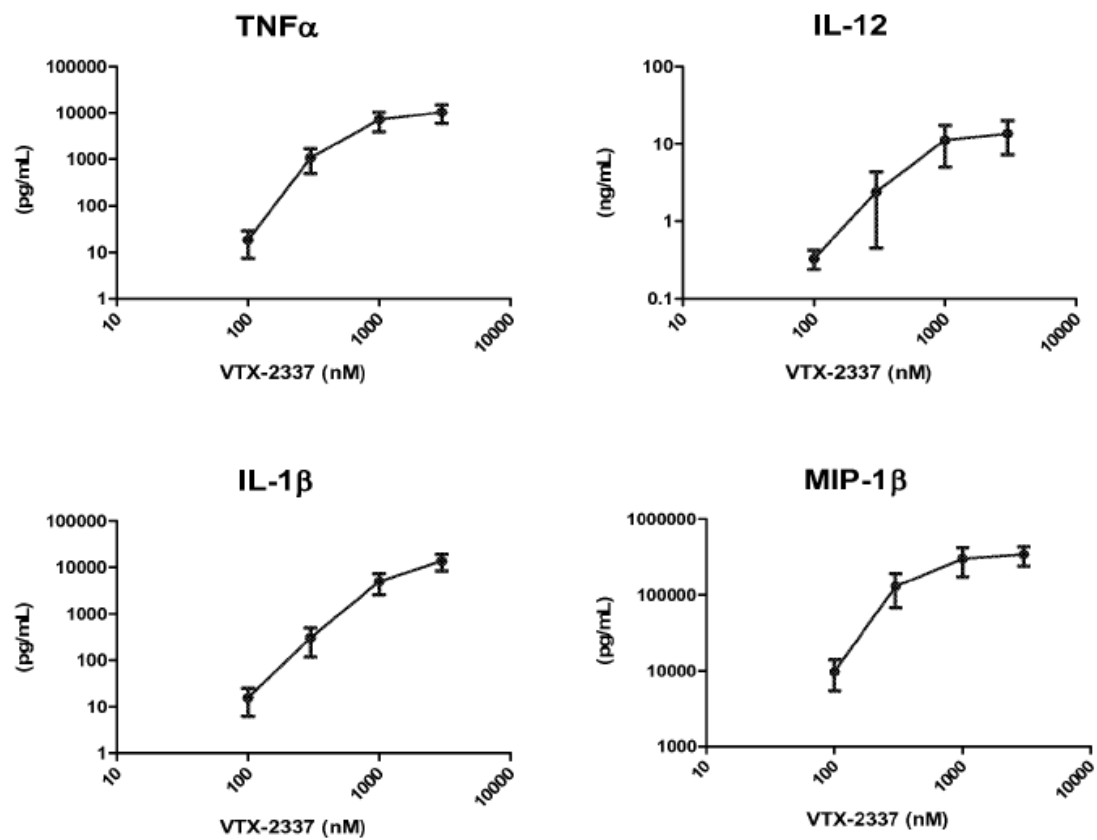


Figura 7

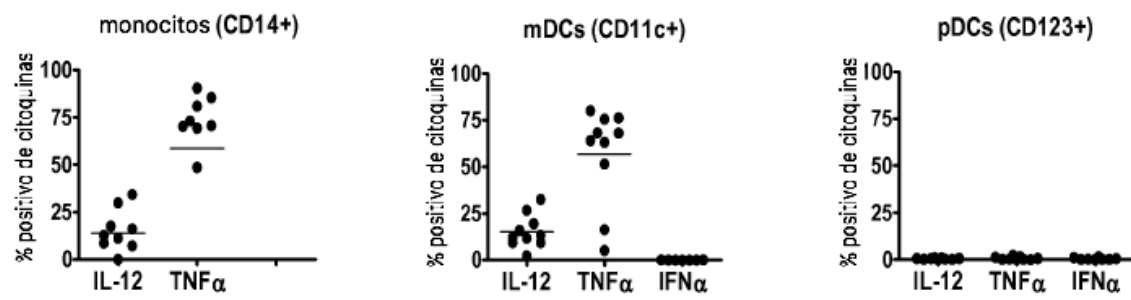


Figura 8

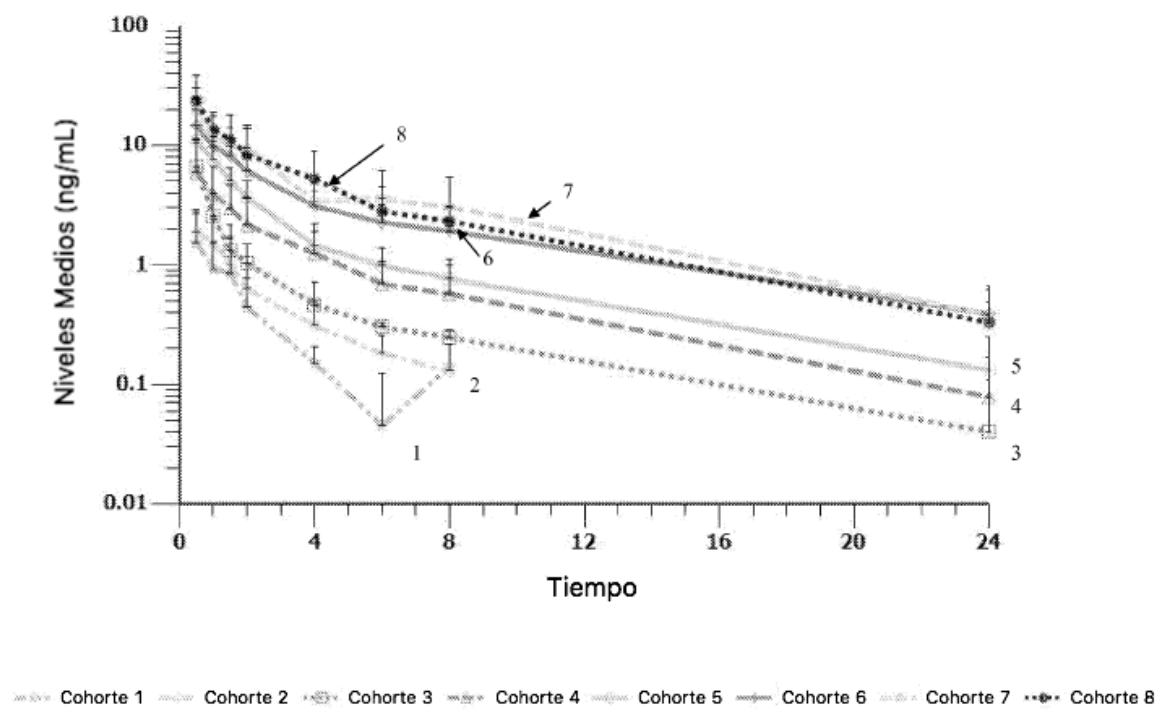


Figura 9

Repetición del Ciclo (Día 1 contra el Día 29) Niveles en Plasma de G-CSF

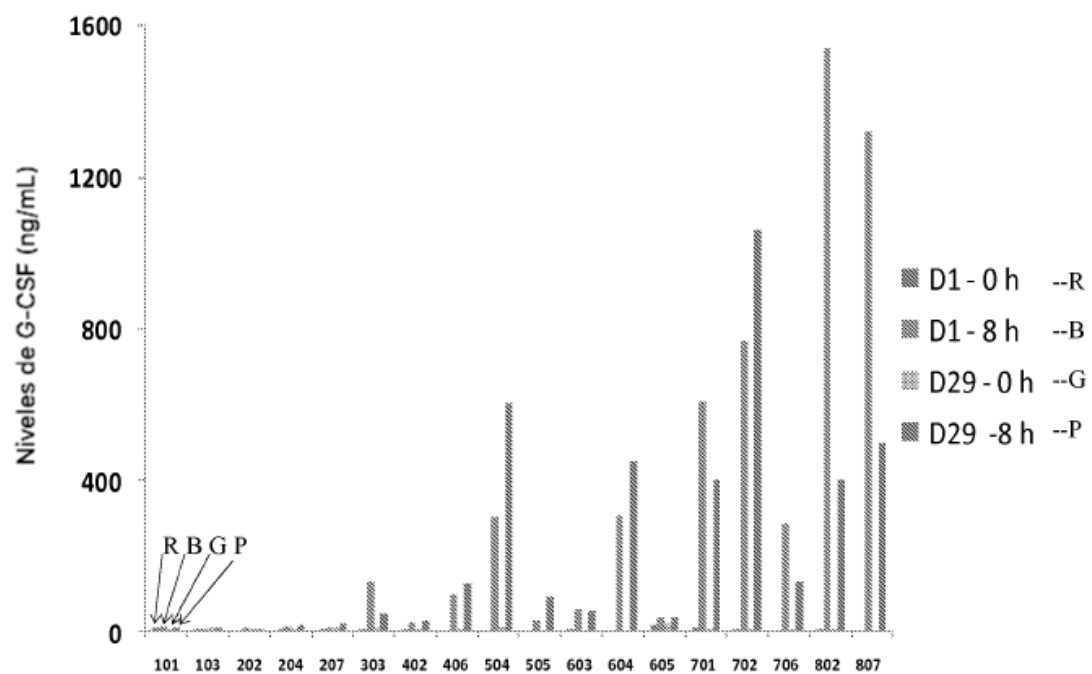


Figura 10A

Repetición del Ciclo (Día 1 contra el Día 29)
Niveles en Plasma de MIP-1 β

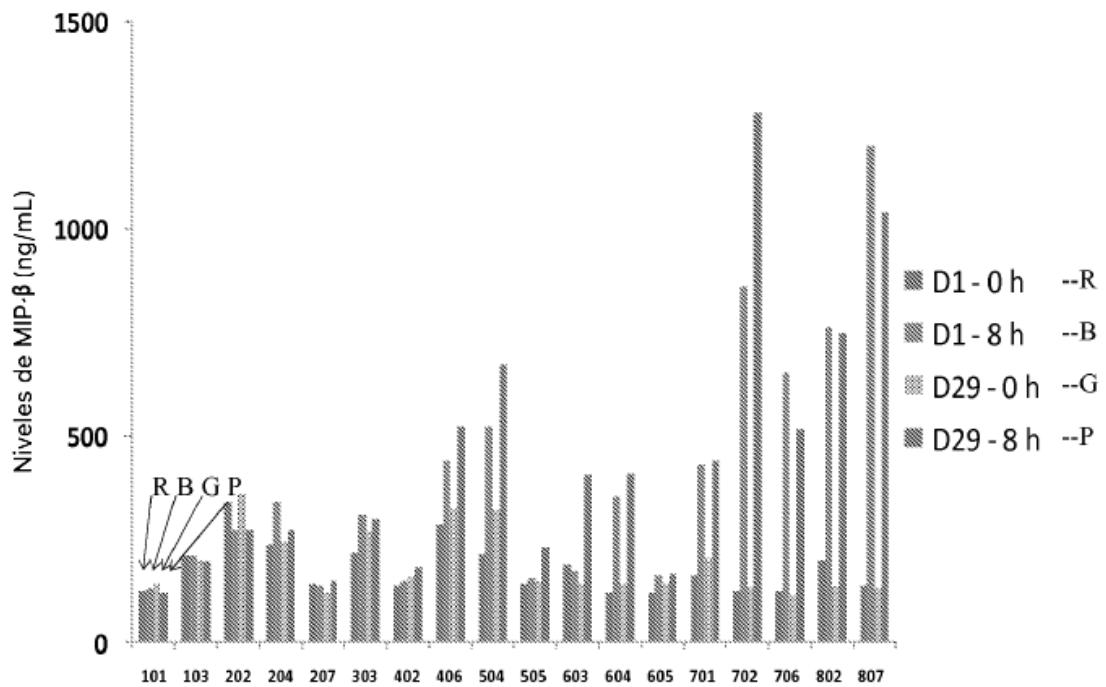


Figura 10B