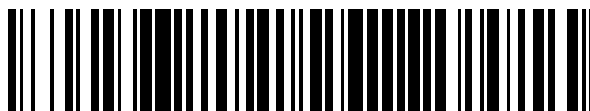


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 167**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/385 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009** **E 14162613 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2769737**

54 Título: **Combinación de anticuerpo anti-CTLA4 con etopósido para el tratamiento sinérgico de enfermedades proliferativas**

30 Prioridad:

20.07.2009 US 226910 P
30.07.2009 US 462168
30.07.2009 WO PCT/US2009/052209

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LEE, FRANCIS, Y. y
JURE-KUNKEL, MARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 629 167 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de anticuerpo anti-CTLA4 con etopósido para el tratamiento sinérgico de enfermedades proliferativas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la oncología y a pautas terapéuticas mejoradas.

10 **Antecedentes de la invención**

El Instituto Nacional del Cáncer ha estimado que solo en los Estados Unidos de América, 1 de 3 personas padecerán cáncer durante su tiempo de vida. Además, aproximadamente 50 % hasta 60 % de las personas que contraen cáncer finalmente sucumbirán a la enfermedad. La manifestación extendida de esta enfermedad subraya la necesidad de pautas antineoplásicas mejoradas para el tratamiento de neoplasias malignas.

Debido a la amplia variedad de cánceres observados actualmente, numerosos agentes antineoplásicos han sido desarrollados para destruir al cáncer dentro del cuerpo. Estos compuestos se administran a los pacientes con cáncer con el objetivo de destruir o inhibir de otra manera el crecimiento de las células malignas mientras se mantienen sin alterar las células sanas y normales. Los agentes antineoplásicos han sido clasificados en función de su mecanismo de acción.

Se denomina tipo de sustancia quimioterapéutica a un complejo de coordinación metálico. Se cree que este tipo de formas quimioterapéuticas forma predominantemente el entrecruzamiento de la inter-cadena de ADN en los núcleos de las células, por lo que se previene la replicación celular. Como resultado, el crecimiento del tumor se reprime inicialmente, y luego se revierte. Otro tipo de sustancia quimioterapéutica se denomina agente alquilante. Estos compuestos funcionan por la inserción de composiciones o moléculas extrañas en el ADN de las células cancerosas que se están dividiendo. Como resultado de estas fracciones extrañas, se alteran las funciones normales de las células cancerosas y se previene la proliferación. Otro tipo de sustancia quimioterapéutica es un agente antineoplásico. Este tipo de agente previene, extermina o bloquea el crecimiento y la dispersión de las células cancerosas. Entre otros tipos de agentes antineoplásicos se incluyen los inhibidores de la aromatasa no esteroideos, los agentes alquilantes bifuncionales, etc.

La quimioinmunoterapia, combinación de agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, es un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer que combina los efectos de los agentes que atacan directamente a las células tumorales que producen la necrosis o apoptosis de las células tumorales, y los agentes que modulan las respuestas inmunitarias del animal hospedador con respecto al tumor. Los agentes quimioterapéuticos podrían mejorar el efecto de la inmunoterapia generando antígenos tumorales que han de presentar las células presentadoras de antígeno, creando una vacuna de las células tumorales "polivalente", y distorsionando la arquitectura del tumor, facilitando así la penetración de los agentes inmunoterapéuticos, así como una población inmunitaria extendida.

El ipilimumab es un anticuerpo humano anti CTLA-4 humano, que bloquea la unión de CTLA-4 con CD80 y CD86 que se expresa en células presentadoras de antígeno y de este modo, bloquea la regulación a la baja negativa de las respuestas inmunitarias producidas por la interacción de estas moléculas. Puesto que el ipilimumab no reconoce el CTLA-4 de ratón, se utilizó un anticuerpo anti-CTLA-4 de ratón (clon UC10-4F10) en los estudios presentados en el presente documento para investigar el efecto del bloqueo de CTLA-4 con agentes quimioterapéuticos.

El dasatinib (SPRYCEL®) se utiliza comúnmente para el tratamiento de muchos tipos de cáncer y representa una clase atractiva de agentes para combinarse con el bloqueo de CTLA-4.

Los agentes estabilizantes de los microtúbulos, tales como ixabepilona (IXEMPRATM) y paclitaxel (TAXOL®), se utilizan comúnmente para el tratamiento de muchos tipos de cáncer y representan una clase atractiva de agentes para combinarse con el bloqueo de CTLA-4.

Los análogos nucleosídicos, tales como gemcitabina, también son utilizados comúnmente para el tratamiento de muchos tipos de cánceres. La gemcitabina es un análogo nucleosídico del antimetabolito (2',2'-difluorodesoxicidina) que llega a ser activo después de la fosforilación intracelular por la desoxicitidina quinasa porque solamente sus formas de di y tri-fosfato poseen actividad citotóxica. Específicamente, la forma del trifosfato compete con el trifosfato de desoxicitidina para su incorporación en el ADN como una base inactiva, y la forma del difosfato inhibe la ribonucleótido reductasa, una enzima que es esencial para la síntesis del ADN normal.

La gemcitabina ha sido estudiada en una amplia variedad de neoplasias malignas, tanto como agente único como en combinación con otros fármacos citotóxicos. Además, esta fue aprobada en muchos países para el tratamiento de varias neoplasias en el ser humano, incluyendo el carcinoma pancreático, de ovarios, de pulmón de células no pequeñas, de vejiga y de mama. Su uso terapéutico en estos tumores también es compatible con un perfil de toxicidad favorable.

Otro mecanismo común de inhibición de las células cancerosas es inducir roturas del ADN bicatenario. Tales roturas del ADN exterminan específicamente las células que se dividen rápidamente, tales como las células cancerosas. El etopósido es un fármaco contra el cáncer que induce roturas de la cadena en el ADN celular por la inhibición del religamiento de la topoisomerasa II (topoII) de las células del ADN segmentadas. Aunque la segmentación del ADN por la topoisomerasa II siempre produce roturas de doble cadena en el ADN (DSB) enlazado a la topoisomerasa II, la acción del etopósido también conduce a roturas de una sola cadena (SSB), puesto que el religamiento de las dos cadenas es inhibida independientemente por el etopósido.

Los documentos US 2005/226875 A1 y WO 2007/113648 A2 describen el tratamiento del cáncer mediante la administración de un anticuerpo CTLA4 y un agente quimioterapéutico. El documento US 2009/117132 A1 describe una composición que comprende un anticuerpo CTLA4, otro agente y, opcionalmente, un etopósido. El documento US 2007/160619 A1 describe una posología de un anticuerpo CTLA4 y de un agente quimioterapéutico. El documento US 2004/005318 A1 describe una composición de un anticuerpo anti-CTLA4 y de un agente quimioterapéutico.

En los estudios descritos en el presente documento, la combinación de dasatinib, paclitaxel, etopósido y gemcitabina, de manera individual con un inhibidor de CTLA-4, se investigó en varios modelos tumorales con diferente sensibilidad a cada agente.

Los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína, tal como dasatinib, con un inhibidor de anti-CTLA-4 para el tratamiento de las enfermedades proliferativas. Además, los presentes inventores han descubierto por primera vez el efecto sinérgico de combinar un agente estabilizante de la microtubulina, tal como el paclitaxel, con un inhibidor de anti-CTLA-4 para el tratamiento de las enfermedades proliferativas. Además, los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un análogo nucleosídico, tal como la gemcitabina, con un inhibidor de anti-CTLA-4 para el tratamiento de las enfermedades proliferativas. Además, los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un agente inductor de la doble cadena del ADN, tal como el etopósido, con un inhibidor de anti-CTLA-4 para el tratamiento de las enfermedades proliferativas. Es un objetivo de la invención proporcionar pautas de tratamiento quimioterapéutico combinadas, eficaces, en las que uno o más de los siguientes: un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína, un agente estabilizante de la microtubulina, un análogo nucleosídico o un agente inductor de la doble cadena del ADN, se combina con uno o más agentes de anti-CTLA-4 para el tratamiento de las enfermedades proliferativas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y 4'-demetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido], 4'-(dihidrógeno fosfato) o a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, que comprende su administración a un mamífero que necesite una cantidad sinérgica y terapéuticamente aceptable de un anticuerpo anti-CTLA-4 con 4'-Dimetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido], 4'-(dihidrógeno fosfato) o a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, el cáncer son uno o más tumores cancerosos sólidos, tales como cáncer del pulmón, cáncer pancreático, cáncer del colon, cáncer de próstata, y/o CML o leucemia. En otro aspecto, el cáncer es uno o más tumores refractarios. En otro aspecto más, el anticuerpo de CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab.

Entre los agentes antagonistas de anticuerpos de anti-CTLA4 adecuados se incluyen anticuerpos de anti-CTLA, anticuerpos de anti-CTLA humanos, anticuerpos de anti-CTLA de ratón, anticuerpos de anti-CTLA de mamífero, anticuerpos de anti-CTLA humanizados, anticuerpos de anti-CTLA monoclonales, anticuerpos de anti-CTLA policlonales, anticuerpos de anti-CTLA quiméricos, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, adnectinas de anti-CTLA4, anticuerpos del dominio de anti-CTLA4, fragmentos de anti-CTLA4 de una sola cadena, fragmentos de anti-CTLA4 de cadena pesada, fragmentos de anti-CTLA4 de cadena ligera, los anticuerpos descritos en la publicación del PCT N.º WO 2001/014424, los anticuerpos divulgados en la publicación del PCT N.º WO 2004/035607, los anticuerpos divulgados en la publicación estadounidense N.º 2005/0201994, y los anticuerpos divulgados en la patente europea otorgada N.º EP 1212422 B1. Los anticuerpos de CTLA-4 adicionales se describen en las patentes estadounidenses N.º 5.811.097, 5.855.887, 6.051.227 y 6.984.720; en las publicaciones del PCT N.º WO 01/14424 y WO 00/37504, y en las publicaciones estadounidenses N.º 2002/0039581 y 2002/086014. Entre otros anticuerpos anti-CTLA-4 que pueden ser utilizados se incluyen, por ejemplo, aquellos divulgados en: WO 98/42752; las patentes estadounidenses N.º 6.682.736 y 6.207.156; Hurwitz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071 (1998); Camacho *et al.*, J. Clin. Oncology, 22(145): Resumen N.º 2505 (2004) (anticuerpo CP-675206); Mokyr *et al.*, Cancer Res., 58:5301-5304 (1998), y en las patentes estadounidenses N.º 5.977.318, 6.682.736, 7.109.003, y 7.132.281. Cada una de estas referencias describe anticuerpos de CTLA-4. En el documento WO 01/14424 se divulga un anticuerpo de CTLA-4 clínico preferente, que es el anticuerpo monoclonal humano 10D1 (también denominado como MDX-010 e ipilimumab y disponible en Medarex, Inc., Bloomsbury, Nueva Jersey).

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B ilustran los resultados que muestran que el tratamiento simultáneo con CTLA-4 mAb y dasatinib produjo efectos sinérgicos en el modelo tumoral del fibrosarcoma SA1N. Dasatinib fue administrado diariamente durante 11 días ("A") o durante 15 días después de un programa intermitente (5 días sí/2 días no) ("B").

La figura 2 ilustra los resultados que muestran que el tratamiento simultáneo con dasatinib y CTLA-4 mAb produjo efectos sinérgicos en el modelo tumoral de CT-26.

Las figuras 3A-3C ilustran los resultados que muestran que el tratamiento con dasatinib aumenta la actividad citolítica de CTLA-4 mAb. Los ratones que portan tumores de colon CT26 subcutáneos fueron tratados con dasatinib (30 mg/kg, c1dx14, dos veces al día, los días 4-18 después la implantación de las células tumorales), CTLA-4 mAb (20 mg/kg, c4dx3, los días 4, 8, 12 después de la implantación de las células tumorales) o la combinación de ambos agentes. Dos (A), 7 (B) y 14 (C) días después del tratamiento final, los ratones (n=5/grupo) fueron inyectados con esplenocitos singeneicos etiquetados con CFSE aplicando impulsos con péptidos específicos para CT26 (AH-1). Dieciocho horas más tarde, los esplenocitos fueron aislados y la actividad citolítica fue determinada midiendo la relación de las células etiquetadas con CFSE (CFSE elevado = péptidos pulsados, CFSE bajo = no pulsados). La combinación de dasatinib y CTLA-4 mostró una mejora de la lisis de esplenocitos con impulsos de péptidos que alcanzó un significado estadístico en el día 14 (p=0,055).

Las figuras 4A-4B ilustran los resultados que muestran que el tratamiento combinatorio con dasatinib y CTLA-4 mAb conduce a un incremento en la relación de las células T activadas con CD8 (CD8+CD69, células efectoras T) sobre A) células reguladoras T (CD4+CD25+FoxP3+, células supresoras T) y B) CD4 activado+células T en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor (TDLN, por sus siglas en inglés). Los ratones que portan tumores de colon CT26 subcutáneos fueron tratados con dasatinib (30 mg/kg, c1dx14, dos veces al día, los días 4-18 después de la implantación de las células tumorales), CTLA-4 mAb (20 mg/kg, c4dx3, los días 4, 8, 12 después de la implantación de las células tumorales) o con la combinación de ambos agentes. Los TDLN fueron extirpados 2 días después del tratamiento final, y se sometieron a la caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo.

La figura 5 ilustra que el tratamiento simultáneo con SPRYCEL® y CTLA-4 mAb produjo efectos mejorados en un modelo del tumor P815. SPRYCEL® fue administrado por vía oral los días 9-13, 16-20, 23-27 después de la implantación del tumor en donde el mAb de anti-CTLA-4 fue dosificado por vía intraperitoneal los días 10, 14, 18.

La figura 6 muestra que la actividad de bloqueo de CTLA-4 no fue anulada por el tratamiento simultáneo con etopósido, paclitaxel, o gemcitabina.

La figura 7 muestra que el mAb que bloquea CTLA-4 en combinación con gemcitabina produjo efectos sinérgicos. Los ratones que lograron una remisión completa ("RC") rechazaron una segunda reexposición con células CT-26 vivas, indicando que este tratamiento combinado produjo una respuesta inmunitaria de memoria.

La figura 8 muestra que el mAb que bloquea CTLA-4 en combinación con etopósido produjo efectos sinérgicos.

La figura 9 muestra que el mAb que bloquea CTLA-4 en combinación con agente(s) estabilizante(s) de microtúbulos produjo efectos sinérgicos.

La figura 10 muestra el orden en el que se administran la combinación de mAb que bloquea el CTLA-4 y el agente quimioterapéutico, lo que tiene relevancia para la inhibición de la proliferación. Como se muestra, la administración conjunta de gemcitabina simultáneamente con el mAb que bloquea el CTLA-4 produjo el mayor efecto antiproliferativo en comparación con la administración consecutiva.

La figura 11 muestra la expansión de las células CD8+ T citotóxicas por el tratamiento con CTLA-4 mAb e ixabepilona. El CTLA-4 mAb + ixabepilona produjo la expansión de las células T citotóxicas (CD8+CD107+) en este modelo, pero no en combinación con paclitaxel.

La figura 12 muestra que la gemcitabina y el etopósido promueven la citotoxicidad *in vivo*.

La figura 13 muestra que la gemcitabina modula la composición de las células inmunitarias en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor.

La figura 14 muestra la expresión modulada por el bloqueo de Gemcitabina + CTLA-4 de los genes involucrados en la regulación inmunitaria.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y 4'-demetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido], 4'-(dihidrógeno fosfato) o a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, que comprende su administración a un mamífero que necesite una cantidad sinérgica y terapéuticamente aceptable de un anticuerpo anti-CTLA-4 con 4'-Dimetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosida], 4'-(dihidrógeno fosfato) o a una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

La activación de las células T óptimas requiere la interacción entre el receptor de las células T y el antígeno específico (Bretscher, P. *et al.*, Science, 169:1042-1049 (1970)) (la primera señal) y el acoplamiento de los receptores coestimuladores sobre la superficie de las células T con los ligandos coestimuladores expresados por la célula que presenta el antígeno (APC) (la segunda señal). El fallo de las células T para recibir una segunda señal puede conducir a anergia clonal (Schwartz, R.H., Science, 248:1349-1356 (1990)). Dos receptores coestimuladores de las células T importantes son CD28 y el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4, CD152) cuyos

ligandos sobre el APC son B7-1 y B7-2 (Linsley, P. S. *et al.*, J. Exp. Med., 173:721-730 (1991); Linsley, P.S. *et al.*, J. Exp. Med., 174:561-569 (1991)). Aunque CD28 y CTLA-4 son elementos relacionados estrechamente de la superfamilia de Ig (Brunet, J.F. *et al.*, Nature, 328:267-270 (1987)), estos funcionan antagonísticamente. CD28 se expresa constitutivamente sobre la superficie de las células T (Gross, J.A. *et al.*, J. Immunol., 149:380-388 (1992)), y durante el acoplamiento con B7-1 o B7-2, mejora la señal receptor de células T-péptido-MHC para promover la activación de las células T, la proliferación, y la producción de IL-2 (Linsley, P.S. *et al.*, J. Exp. Med., 173:721-730 (1991); Alegre, M.L. *et al.*, Nat. Rev. Immunol., 1(3):220-228 (diciembre 2001)). El CTLA-4 no se encuentra sobre las células T en reposo pero está regulado al alza durante 2-3 días después de la activación de las células T (Lindsten, T. *et al.*, J Immunol., 151:3489-3499 (1993); Walunas, T.L. *et al.*, Immunity, 1, 405-413 (1994)). El CTLA-4 también se une a B7-1 y B7-2 pero con mayor afinidad hacia CD28 (Linsley, P.S. *et al.*, Immunity, 1:793-801 (1994)) y antagoniza la activación de las células T, interfiere con la producción de IL-2 y la expresión del receptor IL-2, e interrumpe la progresión del ciclo celular de las células T activadas (Walunas, T.L. *et al.*, J. Exp. Med., 183:2541-2550 (1996); Krummel, M.F. *et al.*, J. Exp. Med., 183:2533-2540 (1996); Brunner, M.C. *et al.*, J. Immunol., 162:5813-5820 (1999); Greenwald, R.J. *et al.*, Eur. J. Immunol., 32:366-373 (2002)). La respuesta total de las células T se determina por la integración de todas las señales, estimuladoras e inhibidoras.

A causa de que CTLA-4 parece que menoscaba la activación de las células T, se han hecho intentos para bloquear la actividad de CTLA-4 en los modelos murino de inmunoterapia contra el cáncer. En los ratones implantados con tumores inmunogénicos, la administración del anti-CTLA-4 Ab mejoró el rechazo del tumor (Leach, D.R. *et al.*, Science, 271:1734-1736 (1996)), aunque se observó un efecto pequeño con los tumores poco inmunogénicos, tales como el carcinoma mamario SM1 o el melanoma B16. Se observó una inmunidad antitumoral mejorada cuando el anti-CTLA-4 Ab fue suministrado con la vacuna de las células B16 transducidas con el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y se asoció con la despigmentación, indicando que al menos una parte de la respuesta antitumoral fue específica contra los antígenos de diferenciación de los melanocitos "propios" (van Elsas, A. *et al.*, J. Exp. Med., 190:355-366 (1999); van Elsas, A. *et al.*, J. Exp. Med., 194:481-489 (2001)). En un modelo de murino transgénico de cáncer de próstata primario, la administración del anti-CTLA-4 Ab más las células cancerosas de próstata que expresan el GM-CSF redujo la incidencia y la gravedad histológica del cáncer de próstata y condujo a la prostatitis en ratones normales, que indican nuevamente una respuesta inmunitaria específica para el antígeno contra los autoantígenos en el rechazo del tumor (Hurwitz, A.A., Cancer Res., 60:2444-2448 (2000)). Además, a causa de que muchos antígenos de los tumores humanos son autoantígenos normales, romper la tolerancia contra los mismos puede ser fundamental para el éxito de la inmunoterapia contra el cáncer. Las respuestas tumorales favorables del bloqueo de CTLA-4 junto con las vacunas contra el tumor en los modelos del murino condujeron al interés en el uso del bloqueo del CTLA-4 en la inmunoterapia contra el cáncer humano.

La quimioinmunoterapia, combinación de los agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, es un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer que combina los efectos de los agentes que atacan directamente a las células tumorales que producen la necrosis o apoptosis de las células tumorales, y los agentes que modulan las respuestas inmunitarias del animal hospedador con respecto al tumor. Los agentes quimioterapéuticos podrían mejorar el efecto de la inmunoterapia generando antígenos tumorales que han de presentar las células presentadoras de antígeno, creando una vacuna de las células tumorales "polivalente", y distorsionando la arquitectura del tumor, facilitando así la penetración de los agentes inmunoterapéuticos, así como la población inmunitaria extendida.

La presente invención proporciona el tratamiento sinérgico de los tumores cancerosos. Ventajosamente, la sinergia reduce el desarrollo de tumores, reduce la carga tumoral o produce la regresión tumoral en un mamífero hospedador.

La combinación del ADN bicatenario que induce el agente etopósido con al menos un anticuerpo anti-CTLA4 también puede incluir la adición de un agente citotóxico antiproliferativo, ya sea individualmente o en combinación con radioterapia.

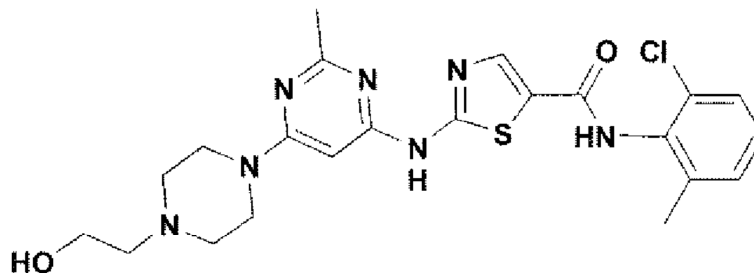
Otros agentes citotóxicos antiproliferativos son navelbena, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

Los productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfoquinas y epipodofilotoxinas.): Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Bleomicina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarrubicina, Ara-C, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL®), Mitramicina, Desoxicoformicina, Mitomicina-C, L-Asparaginasa, Interferones (especialmente IFN- α), Etopósido, y Tenipósido.

La expresión "radioterapia" incluye, pero no está limitada a, los rayos X o los rayos gamma que se suministran desde ya sea una fuente aplicada externamente, tal como un haz, o por la implantación de fuentes radioactivas pequeñas. Cuando se utilice en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un péptido" incluye una combinación de dos o más péptidos, y similares.

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

5 Como se sabe en la técnica, el dasatinib también se denomina N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y describe un compuesto que tiene la siguiente estructura (I):



(I)

10 El compuesto (I) también puede denominarse N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-((6-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)-2-metil-4-pirimidinil)amino)-1,3-tiazol-5-carboxamida de conformidad con la nomenclatura IUPAC. El uso del término "N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida" abarca (a menos que se indique lo contrario) los solvatos (incluyendo los hidratos) y las formas polimórficas del compuesto (I) o sus sales (tales como la forma del monohidrato de (I) descrita en el documento USSN 11/051.208, presentado el 4 de febrero del 2005). Las composiciones farmacéuticas de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes, tales como aquellas composiciones descritas en el documento USSN 11/402.502, presentado el 12 de abril del 2006. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida es SPRYCEL® (Bristol-Myers Squibb Company). El SPRYCEL® comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida como el ingrediente activo, también denominado dasatinib, y como ingredientes o excipientes inactivos, lactosa monohidratada, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, hidroxipropil celulosa, y estearato de magnesio en un comprimido que comprende hipromelosa, dióxido de titanio, y polietilenglicol.

30 Como ya se sabe en la técnica, el ipilimumab se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4, y es un anticuerpo de IgG_{1N} totalmente humano que procede de ratones transgénicos que tienen genes humanos que codifican las cadenas ligera y pesada para generar un repertorio humano funcional. El ipilimumab también puede denominarse mediante su N.º de registro del CAS: 477202-00-9, y se describe como el anticuerpo 10DI en la publicación del PCT N.º WO 01/14424. Específicamente, el ipilimumab describe un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al CTLA4, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende la SEC ID NO: 1, y que comprende una región de la cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 2. Las composiciones farmacéuticas de ipilimumab incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden ipilimumab y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Los ejemplos de una composición farmacéutica que comprende ipilimumab se proporcionan en la publicación del PCT N.º WO 2007/67959. El ipilimumab puede ser administrado por vía intravenosa.

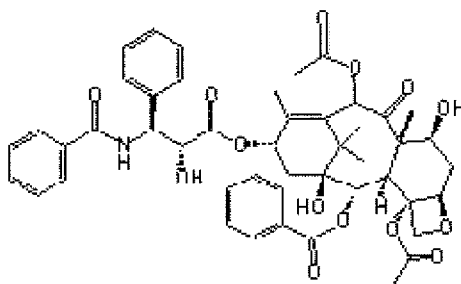
Región variable de la cadena ligera para ipilimumab:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGKVEIK
(SEQ ID NO:1)

Región variable de la cadena pesada para ipilimumab:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS
YDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLG
PFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:2)

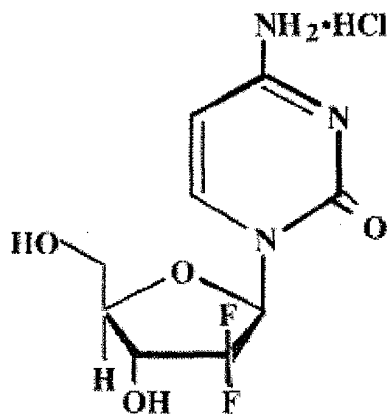
Como ya se sabe en la técnica, paclitaxel se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (II):



(II).

- 5 El compuesto (II) también puede denominarse 5beta,20-Epoxi-1,2alfa,4,7beta,10beta,13alfa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-fenilisoserina de conformidad con la nomenclatura IUPAC. El uso de la expresión "5beta,20-Epoxi-1,2alfa,4,7beta,10beta,13alfa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-fenilisoserina" abarca (a menos que se indique lo contrario) los solvatos (incluyendo hidratos) y las formas polimórficas del compuesto (II) o sus sales, tales como las formas de (II) descritas
- 10 en la patente estadounidense N.º 5.504.102, expedida el 2 de abril de 1996. Las composiciones farmacéuticas del 5beta,20-Epoxi-1,2alfa,4,7beta,10beta,13alfa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-fenilisoserina incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden el 5beta,20-Epoxi-1,2alfa,4,7beta,10beta,13alfa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Un ejemplo de una
- 15 composición farmacéutica que comprende el 5beta,20-Epoxi-1,2alfa,4,7beta,10beta,13alfa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina, es TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Company). El TAXOL® comprende el 5beta,20-Epoxi-1,2alfa,4,7beta,10beta,13alfa-hidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina como ingrediente activo, también denominado como paclitaxel, para la infusión intravenosa incluyendo los ingredientes inactivos en forma de diluyente que
- 20 consiste de una inyección de cloruro de sodio estéril al 0,9 % de USP, Inyección de dextrosa al 5 % de USP, 0,9 % de cloruro de sodio y 5 % de Inyección de Dextrosa de USP, o 5 % de dextrosa en la inyección de Ringer a una concentración final de 0,3 hasta 1,2 mg/ml.

Como se sabe en la técnica, gemcitabina se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (III):

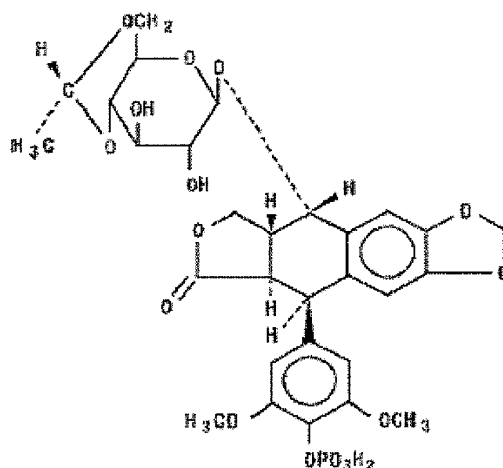


(III).

El compuesto (III) también puede denominarse monoclóhidrato de la 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) de conformidad con la nomenclatura de la IUPC. El uso de la expresión "monoclóhidrato de la 2'-desoxi-2',2'-

difluorocitidina (isómero β)" abarca (a menos que se indique lo contrario) los solvatos (incluyendo los hidratos) y las formas polimórficas del compuesto (III) o sus sales. Las composiciones farmacéuticas del monoclóhidrato de la 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende el monoclóhidrato de la 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) es GEMZAR® (HCl de gemcitabina). GEMZAR® comprende el monoclóhidrato de la 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) como ingrediente activo, para la infusión intravenosa incluyendo los ingredientes activos en una forma estéril, únicamente para uso intravenoso. Las ampollas de GEMZAR® contienen o 200 mg o 1 g de HCl de gemcitabina (expresado como la base libre) formulado con manitol (200 mg o 1 g, respectivamente) y acetato de sodio (12,5 g o 62,5 mg, respectivamente) como polvo liofilizado estéril. El ácido clorhídrico y/o el hidróxido de sodio pueden haberse agregado para ajustar el pH.

Como ya se sabe en la técnica, el etopósido se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (IV):



(III).

El compuesto (IV) también puede denominarse como 9-[4,6-O-(R)-etilideno- β -D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno), de conformidad con la nomenclatura de la IUPAC. El uso de la expresión "9-[4,6-O-(R)-etilideno- β -D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno)" abarca (a menos que se indique lo contrario) los solvatos (incluyendo los hidratos) y las formas polimórficas del compuesto (IV) o sus sales. Las composiciones farmacéuticas de 9-[4,6-O-(R)-etilideno- β -D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno), y uno o más diluyentes, vehículos y excipientes. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende el 9-[4,6-O-(R)-etilideno- β -D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno), es ETOPOPHOS (fosfato de etopósido). El ETOPOPHOS comprende 9-[4,6-O-(R)-etilideno- β -D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno), como ingrediente activo, para la infusión intravenosa incluyendo los ingredientes inactivos en una forma estéril, únicamente para uso intravenoso, en ampollas de una sola dosis que contienen el fosfato de etopósido equivalente a 100 mg del etopósido, 32,7 mg de citrato de sodio USP y 300 mg de dextrano 40.

Los agentes antiproliferativos adecuados incluyen, sin limitación, los taxanos, el paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL®), docetaxel, discodermolida (DDM), dictiostatina (DCT), pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona B1, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]-deshidrodesoxiepotilona B, C12,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A unida con un puente de C6-C8, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discodermolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, BMS-310705, ABJ-789, XAA296A (discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (clorhidrato de tasidotina), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hermiasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, inmunconjugados de maytansinoide (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didesmetil-(+)-discodermolidas, y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizantes de microtubulina conocidos en la técnica.

La expresión "inhibidor de tirosina quinasa de la proteína" se entiende que se refiere a agentes que inhiben uno o más miembros de la familia de la tirosina quinasa de la proteína. Entre los ejemplos no limitativos de los inhibidores de tirosina quinasa de la proteína se incluyen, pero no están limitados a dasatinib, imatinib, nilotinib, PD180970, GGP76030, AP23464, SKI 606, NS-187, y/o AZD0530. Tales inhibidores de tirosina quinasa de la proteína pueden ser administrados ya sea solos o en combinación con otras moléculas, tales como inhibidores de T3151.

La expresión “agente modulador de microtubulina” se entiende que se refiere a agentes que o estabilizan la microtubulina o desestabilizan la síntesis y/o polimerización de microtubulina.

Cuando se haga referencia en el presente documento, el al menos un agente antiproliferativo puede ser un agente que afecta los microtúbulos. El agente que afecta los microtúbulos interfiere con la mitosis celular y es bien conocido en la técnica por su actividad citotóxica anti-proliferativa. Entre los agentes que afectan los microtúbulos se incluyen alocolchicina (NSC 406042), Halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolastatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rioxina (NSC 332598), paclitaxel (TAXOL®, NSC 125973), derivados de TAXOL® (por ejemplo, derivados (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina (NSC 361792), tritil cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas entre las que se incluyen epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, desoxiepotilona A, desoxiepotilona B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7-11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (divulgada en la patente estadounidense 6.262.094, expedida el 17 de julio del 2001), [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminometil)-4-tiazolil]-1-metiletenil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4-17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (divulgado en el documento USSN 09/506.481 presentado el 17 de febrero del 2000, y los ejemplos 7 y 8 del presente documento), y derivados de los mismos; y otros agentes alteradores de los microtúbulos. Entre los agentes antineoplásicos adicionales se incluyen, discodermolida (véase Service, Science, 274:2009 (1996)) estramustina, nocodazol, MAP4 y similares. Los ejemplos de tales agentes también son descritos en la literatura científica y de patentes, véase por ejemplo, Bulinski, J. Cell Sci., 110:3055-3064 (1997), Panda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:10560-10564 (1997); Muhlratt, Cancer Res., 57:3344-3346 (1997); Nicolaou, Nature, 387:268-272 (1997); Vasquez, Mol. Biol. Cell. 8:973-985 (1997); Panda, J. Biol. Chem., 271:29807-29812 (1996).

En los casos en donde sea deseable que las células anormalmente proliferativas permanezcan inactivas a lo largo del tratamiento o antes del mismo con los métodos quimioterapéuticos, las hormonas y los esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17a-etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, ZOLADEX® también pueden ser administrados al paciente.

También son adecuados para su uso en la combinación de los métodos quimioterapéuticos los antiangiogénicos tales como los inhibidores de metaloproteínasa de la matriz, y también se incluyen otros inhibidores de VEGF, tales como los anticuerpos de anti-VEGF y las moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU6668. Los anticuerpos de anti-Her2 de Genentech también pueden ser utilizados. Un inhibidor de EGFR adecuado es EKB-569 (un inhibidor irreversible). También está incluido el anticuerpo C225 de Imclone inmunoespecífico para el EGFR, y los inhibidores de src.

También adecuado para su uso como agente citostático antiproliferativo es CASODEX® que vuelve a los carcinomas dependientes del andrógeno como no proliferativos. Otro ejemplo más de un agente citostático es el antiestrógeno Tamoxifeno, que inhibe la proliferación o el crecimiento del cáncer de mama dependiente de los estrógenos. Los inhibidores de la transducción de las señales proliferativas celulares son agentes citostáticos. Entre los ejemplos se encuentran los inhibidores del factor del crecimiento epidérmico, los inhibidores de Her-2, los inhibidores de MEK-1 quinasa, los inhibidores de MAPK quinasa, los inhibidores de PI3, los inhibidores de Src quinasa, y los inhibidores de PDGF.

Tal y como se mencionó, ciertos agentes antiproliferativos son agentes antiangiogénicos y antivasculares y, mediante la interrupción del flujo de sangre a los tumores sólidos, hacen que las células cancerosas queden inactivas porque se les priva de la nutrición. La castración, que también vuelve a los carcinomas dependientes de los andrógenos no proliferativos, también puede utilizarse. El ayuno por medios diferentes que la interrupción quirúrgica del flujo de sangre es otro ejemplo de un agente citostático. Una clase particularmente preferida de agentes citostáticos antivasculares son las combretastinas. Entre otros agentes citostáticos a modo de ejemplo se incluyen los inhibidores de MET quinasa, los inhibidores de MAP quinasa, los inhibidores de las tirosinas quinasas receptoras y no receptoras, los inhibidores de la señalización de integrina, y los inhibidores de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina. Un agente estabilizante de la microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de la doble cadena del ADN, tal como un etopósido, pueden administrarse en combinación(es) sinérgica(s) con al menos un modulador de la ruta coestimulante, particularmente un agente de anti-CTLA4, para el tratamiento y la prevención de un trastorno proliferativo, además de un trastorno asociado con el BCR-ABL, un trastorno asociado con BCR-ABL mutante, y/o un trastorno asociado con la tirosina quinasa de la proteína, un trastorno asociado con la presencia de una mutación de BCR-ABL resistente a imatinib, una mutación de BCR-ABL resistente a dasatinib, CML, CML resistente a imatinib, y/o CML intolerante a imatinib.

El término “BCR-ABL” como se utiliza en el presente documento es inclusivo del BCR-ABL tanto del tipo silvestre como mutante.

Los “trastornos asociados con BCR-ABL” son aquellos trastornos que resultan de la actividad del BCR-ABL, incluyendo la actividad de BCR-ABL mutante, y/o que son aliviados por la inhibición de BCR-ABL, incluyendo la expresión y/o la actividad del BCR-ABL mutante. Una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 produce una proteína de fusión de BCR-ABL oncogénica. La expresión “trastornos asociados con BCR-ABL” es inclusiva de

Entre los trastornos se incluyen, por ejemplo, las leucemias, incluyendo, por ejemplo, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, y leucemia linfoblástica aguda positiva del cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer del pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cuello y cabeza, cáncer gástrico, tumor de las células germinales, sarcoma pediátrico, exterminador natural sinonasal, mieloma múltiple, leucemia mielogenosa aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado con la mastocitosis. Además, entre los trastornos se incluyen la urticaria pigmentosa, las mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en el ser humano, así como el mastocitoma en el perro y algunas mastocitosis de subtipos raros similares a la mastocitosis bulosa, eritrodérmica y telangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con la mastocitosis y la leucemia de los mastocitos. Varios cánceres adicionales también están incluidos dentro del alcance de los trastornos asociados con la tirosina quinasa de la proteína incluyendo, por ejemplo, los siguientes: carcinoma, incluyendo el de la vejiga, de mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovarios, páncreas, estómago, cuello de útero, tiroides, testículos, particularmente seminomas testiculares, y de la piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores estromales gastrointestinales (GIST); tumores hematopoyéticos de linaje linfóide incluyendo la leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, el linfoma de las células B, el linfoma de las células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de las células pilosas, y el linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, incluyendo leucemias mielogenosas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; los tumores de origen mesenquimal incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de la tiroides, teratocarcinoma; tumores de las células germinales no seminomatosos refractarios a quimioterapia, y sarcoma de Kaposi. En ciertas realizaciones preferidas, el trastorno es la leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, o tumores sólidos. En ciertas realizaciones preferentes, la leucemia es leucemia mieloide crónica (CML), Ph+ ALL, CLM resistente a imatinib, CML intolerante a imatinib, CML acelerada, CML de la fase de linfoblastoide.

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

Los términos “cáncer”, “canceroso”, o “maligno” se refieren a, o describen, la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por el crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Entre los ejemplos más particulares de tales cánceres se incluyen la leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva del cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cuello y cabeza, cáncer gástrico, tumor de las células germinales, sarcoma pediátrico, exterminador natural sinonasal, mieloma múltiple, leucemia mielogenosa aguda (AML), y leucemia linfocítica crónica (LLC).

El término “leucemia” se refiere a enfermedades malignas, progresivas, de los órganos formadores de la sangre, y generalmente está caracterizada por una proliferación distorsionada y del desarrollo de los leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. La leucemia se clasifica clínica y generalmente sobre la base de: (1) la duración y el carácter de la enfermedad (aguda o crónica); (2) el tipo de célula involucrada; mieloide (mielogenosa), linfóide (linfógena), o monocítica; y (3) el incremento o no incremento en el número de células anormales en la sangre leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de las células T en el adulto, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basofílica, leucemia de los mastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutánea, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de las células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de los citoblastos, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfóide, leucemia de las células del linfoma, leucemia de los mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica

mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de las células del plasma, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de las células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de los citoblastos, leucemia subleucémica, y leucemia de las células no diferenciadas. En ciertos aspectos, la presente invención proporciona el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda, y/o la leucemia linfoblástica aguda positiva del cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL).

Un "BCR-ABL mutante" abarca una tirosina quinasa de BCR-ABL con una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la tirosina quinasa de BCR-ABL del tipo silvestre por una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Por ejemplo una sustitución del aminoácido en la posición 507 de la SEQ ID NO: 2 con otro aminoácido podría conducir a una tirosina quinasa de BCR-ABL mutante.

El "trastorno asociado con BCR-ABL mutante" se utiliza para describir un trastorno asociado con BCR-ABL en el que las células involucradas en el trastorno son o han llegado a ser resistentes al tratamiento con un inhibidor de quinasa utilizado para tratar dicho trastorno como resultado de una mutación en BCR-ABL. Por ejemplo, un compuesto del inhibidor de quinasa puede utilizarse para tratar una afección cancerosa; tal compuesto inhibe la actividad del BCR-ABL de tipo silvestre que inhibirá la proliferación y/o que inducirá la apoptosis de las células cancerosas. Con el paso del tiempo, puede introducirse una mutación en el gen que codifica la quinasa de BCR-ABL, que puede alterar la secuencia de aminoácidos de la quinasa de BCR-ABL y provocar que las células cancerosas lleguen a ser resistentes, o al menos parcialmente resistentes, al tratamiento con el compuesto. Alternativamente, una mutación ya puede estar presente dentro del gen que codifica la quinasa de BCR-ABL, ya sea genéticamente o como una consecuencia de un episodio oncogénico, independientemente del tratamiento con un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína, que puede ser un factor que conduce a que estas células sean propensas a diferenciarse en un estado canceroso o proliferativo, y también conduce a que estas células sean menos sensibles al tratamiento con un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína. Tales situaciones se espera que conduzcan, ya sea directa o indirectamente, a un "trastorno asociado con la BCR-ABL quinasa mutante" y el tratamiento de tal afección requerirá un compuesto que es al menos parcialmente efectivo contra el BCR-ABL mutante, preferentemente contra tanto el BCR-ABL del tipo silvestre como el BCR-ABL mutante. En el caso en el que un individuo desarrolla una resistencia, al menos parcial, al inhibidor de quinasa imatinib, el trastorno asociado con BCR-ABL mutante es uno que resulta de una mutación de BCR-ABL resistente a imatinib, o de un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína resistente a la mutación del BCR-ABL. De manera similar, en el caso en el que un individuo desarrolla una resistencia al menos parcial al inhibidor de quinasa N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, el trastorno asociado con BCR-ABL mutante es uno que resulta de una mutación de BCR-ABL resistente a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una mutación de BCR-ABL resistente al inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína. Los presentes inventores descubrieron que después del tratamiento con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, ciertos individuos desarrollaron mutaciones de E507G. Se describen los métodos para tratar los trastornos asociados con BCR-ABL mutante y los métodos de identificación si un individuo tiene un trastorno asociado con BCR-ABL mutante.

Los "trastornos asociados con la tirosina quinasa de la proteína" de interés particular en el presente documento son aquellos trastornos que resultan, al menos en parte, de la actividad de SRC o BCR-ABL (silvestre o mutante) anormal y/o que son aliviados por la inhibición del SRC o BCR-ABL (silvestre o mutante) denominados en el presente documento como "trastornos asociados con SRC", "cáncer asociado con SRC", o "trastornos asociados con BCR-ABL", "cáncer asociado con BCR-ABL".

La expresión "mutación de BCR-ABL resistente a imatinib" se refiere a una mutación específica en la secuencia de aminoácidos de BCR-ABL que confiere a las células que expresan dicha mutación resistencia al tratamiento con imatinib. Como se comentó en el presente documento, tales mutaciones pueden incluir las mutaciones en la posición T315I de BCR-ABL. Entre las mutaciones adicionales que pueden volver a una proteína de BCR-ABL al menos parcialmente resistente a imatinib se pueden incluir, por ejemplo, E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S, D233H, T243S, M244V, G249D, G250E, G251S, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, V256L, Y257F, Y257R, F259S, K262E, D263G, K264R, S265R, V268A, V270A, T272A, Y274C, Y274R, D276N, T277P, M278K, E279K, E282G, F283S, A288T, A288V, M290T, K291R, E292G, I293T, P296S, L298M, L298P, V299L, Q300R, G303E, V304A, V304D, C305S, C305Y, T306A, F311L, I314V, T315I, T315A, E316G, F317L, F317I, M318T, Y320C, Y320H, G321E, D325H, Y326C, L327P, R328K, E329V, Q333L, A337V, V339G, L342E, M343V, M343T, A344T, A344V, I347V, A350T, M351T, E352A, E352K, E355G, K357E, N358D, N358S, F359V, F359C, F359I, I360K, I360T, L364H, L364I, E373K, N374D, K378R, V379I, A380T, A380V, D381G, F382L, L387M, M388L, T389S, T392A, T394A, A395G, H396K, H396R, A399G, P402T, T406A, S417Y, F486S, y E507G. Las mutaciones de BCR-ABL resistentes a imatinib adicionales también pueden incluir otras mutaciones de BCR-ABL divulgadas en en otra parte del presente documento.

La expresión "mutación de BCR-ABL resistente a dasatinib" se refiere a una mutación específica en la secuencia de aminoácidos de BCR-ABL que confiere a las células que expresan dicha mutación al menos una resistencia parcial al tratamiento con dasatinib. Tal y como se ha comentado en el presente documento, tales mutaciones pueden incluir las mutaciones en las posiciones T315I, T315A, F317A, F317I, y E507G de BCR-ABL. Las mutaciones de BCR-ABL resistentes a dasatinib adicionales también pueden incluir otras mutaciones de BCR-ABL descritas en otra

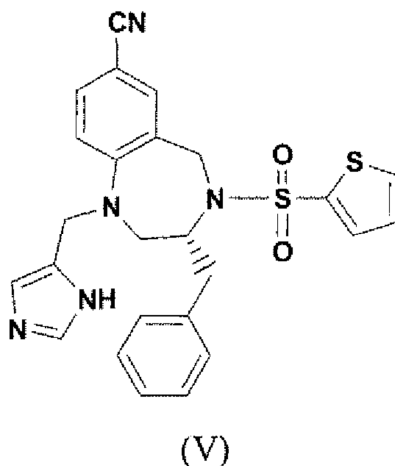
parte del presente documento.

La expresión "CML resistente a imatinib" se refiere a la CML en la que las células involucradas en la CML son resistentes al tratamiento con imatinib. En general esto es resultado de una mutación en BCR-ABL.

La expresión "CML intolerante a imatinib" se refiere a la CML en la que el individuo que tiene CML es intolerante al tratamiento con imatinib, es decir, los efectos secundarios tóxicos y/o perjudiciales de imatinib sobrepasan cualesquiera efectos terapéuticamente beneficiosos.

La combinación sinérgica de un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína, un agente estabilizante de la microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de la doble cadena del ADN, tal como un etopósido con un modulador de la ruta coestimulante, también puede incluir la adición de uno o más compuestos adicionales, que incluyen los siguientes: un agente estabilizador de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.), un inhibidor de la farnesil transferasa (por ejemplo, (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo, sal de clorhidrato); otro inhibidor de tirosina quinasa de la proteína; una pauta aumentada de la frecuencia de dosificación de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida; el inhibidor no competitivo de ATP ONO12380; el inhibidor de quinasa Aurora VX-680; el inhibidor de p38 MAP de BIRB-796; y cualquier otra combinación o pauta de dosificación que comprenda la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida divulgada en el presente documento, o cualquier otra combinación divulgada en el presente documento.

La expresión "inhibidor de la farnesil transferasa" puede ser cualquier compuesto o molécula que inhiba la farnesil transferasa. El inhibidor de farnesil transferasa puede tener la fórmula (II), (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo, sal clorhidrato. El compuesto de la fórmula (V) es un inhibidor de FT citotóxico que ya se sabe que extermina las células cancerosas no proliferativas preferentemente. El compuesto de la fórmula (V) puede ser útil además en la exterminación de los citoblastos.



El compuesto de la fórmula (V), su preparación, y los usos de del mismo se describen en la patente estadounidense N.º 6.011.029. Los usos del compuesto de la fórmula (II) también se describen en el documento WO 2004/015130, publicado el 19 de febrero del 2004.

La expresión "tirosina quinasa de la proteína" cuando se utilice en el presente documento incluye las enzimas que catalizan la transferencia del fosfato terminal del trifosfato de adenosina (ATP) a los residuos de tirosina en los sustratos de proteína. Los ejemplos no limitantes de las tirosinas quinasas incluyen las tirosinas quinasas receptoras tales como EGFR (por ejemplo, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIIR, IRR (receptor relacionado con el receptor de insulina), PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, CSF-1R, FGFR 1-4, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, LTK (tirosina quinasa del leucocito), ALK (quinasa del linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, y RTK 106; y las tirosinas quinasas no receptoras tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, y LIMK. Un experto en la técnica conocerá otras tirosinas quinasas receptoras y/o no receptoras que pueden ser ubicadas como diana utilizando los inhibidores descritos en el presente documento.

El término "inhibidor de la tirosina quinasa" incluye cualquiera de varios agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de las tirosinas quinasas receptoras y/o no receptoras. Sin estar limitados por cualquier teoría particular, los inhibidores de tirosina quinasa generalmente inhiben las tirosinas quinasas diana mediante su unión al sitio de unión de ATP de la enzima. Entre los ejemplos de inhibidores de las

tirosinas quinasas se incluyen gefitinib (IRESSA®), sunitinib (SUTENT®; SU11248), erlotinib (TARCEVA®; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (GLEEVEC®; ST1571), dasatinib (BMS-354825), leflunomida (SU101), vandetanib (ZACTIMA®; ZD6474), nilotinib, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos.

Los inhibidores de la tirosina quinasa adicionales adecuados para su uso en la presente invención se describen, por ejemplo en las patentes estadounidenses N.º 5.618.829, 5.639.757, 5.728.868, 5.804.396, 6.100.254, 6.127.374, 6.245.759, 6.306.874, 6.313.138, 6.316.444, 6.329.380, 6.344.459, 6.420.382, 6.479.512, 6.498.165, 6.544.988, 6.562.818, 6.586.423, 6.586.424, 6.740.665, 6.794.393, 6.875.767, 6.927.293 y 6.958.340. Un experto en la materia conocerá otros inhibidores de tirosina quinasa adecuados para su uso en la presente invención.

Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos ya son conocidos por aquellos expertos en la materia. Además, su administración es descrita en la literatura estándar.

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

Las composiciones pueden comprender además uno o más ingrediente(s) adicional(es) farmacéuticamente aceptables tales como alumbre, estabilizadores, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes saboríferos, adyuvantes y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas de manera oral o parenteral incluyendo las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

Para uso oral, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables, o sellos, o como soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los transportadores que se utilizan comúnmente incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar, y habitualmente se agregan agentes lubricantes tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los transportadores útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar. Cuando las suspensiones acuosas se utilizan para la administración oral, habitualmente se agregan agentes emulsionantes y/o de suspensión.

Además, los agentes endulzantes y/o saboríferos pueden agregarse a las composiciones orales. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, se emplean normalmente las soluciones estériles del (de los) ingrediente(s) activo(s), y el pH de las soluciones ha de ajustarse y tamponarse adecuadamente. Para uso intravenoso, la concentración total del (de los) soluto(s) debe ser controlada para hacer la preparación isotónica.

Para la preparación de los supositorios, se funde primero una cera de punto de fusión bajo, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el ingrediente activo se dispersa homogéneamente en la cera, por ejemplo, mediante agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte entonces en moldes dimensionados convenientemente y se deja enfriar, y de este modo, solidificar.

Las preparaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Tales preparaciones se ejemplifican con agua o soluciones de agua/propilenglicol para la inyección parenteral. Las preparaciones líquidas pueden incluir también soluciones para administración intranasal.

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

Se describen las preparaciones sólidas que están destinadas a la conversión, brevemente antes de su uso, en preparaciones líquidas para administración ya sea oral o parenteral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

El modulador de la ruta coestimulante, preferentemente un agente anti-CTLA4 descrito en el presente documento también puede ser suministrado transdérmicamente. Las composiciones transdérmicas pueden adoptar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de la matriz o del tipo de depósito, pues son convencionales en la técnica para este fin.

Si son formulados como una dosis fija, los ingredientes activos de las composiciones combinadas farmacéuticas se emplean dentro de los intervalos de dosificación descritos a continuación. Alternativamente, el modulador de la ruta coestimulante y el inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína pueden administrarse individualmente en los intervalos de dosificación descritos a continuación. El modulador de la ruta coestimulante se administra en el intervalo de dosificación descrito a continuación o simultáneamente con la administración del inhibidor de tirosina quinasa de la proteína en el intervalo de dosificación descrito a continuación.

Lo siguiente expone las combinaciones terapéuticas preferentes y las dosificaciones a modo de ejemplo.

Combinación terapéutica	Dosificación mg/m ² (por dosis) ¹
Primera administración de dasatinib, con la administración del anticuerpo anti-CTLA4	50-180 mg BID 0,1-25 mg/kg
Primera administración de paclitaxel, con la administración del anticuerpo anti-CTLA4	40-250 mg/m ² 0,1-25 mg/kg
Primera administración de gemcitabina, con la administración del anticuerpo anti-CTLA4	200-1250 mg 0,1-25 mg/kg
Primera administración de etopósido, con la administración del anticuerpo anti-CTLA4	50-900 mg 0,1-25 mg/kg

Aunque esta tabla proporciona intervalos de dosificación a modo de ejemplo del inhibidor de tirosina quinasa de la proteína, preferentemente SPRYCEL®, un modulador de la ruta coestimulante, preferentemente el anticuerpo anti-CTLA4, y/o agentes de vacuna contra el cáncer, cuando se formulan las composiciones farmacéuticas, el médico puede utilizar las dosificaciones preferentes como tal y como justifique la condición del paciente que está siendo tratado. El anticuerpo anti-CTLA4 puede ser administrado preferentemente a aproximadamente 0,3-10 mg/kg, o la dosis tolerada máxima. En una realización, una dosificación de anticuerpo anti-CTLA4 se administra aproximadamente cada tres semanas. Alternativamente, el anticuerpo anti-CTLA4 puede administrarse mediante una pauta de dosificación en aumento que incluye la administración de una primera dosificación del anticuerpo anti-CTLA4 a aproximadamente 3 mg/kg, una segunda dosificación del anticuerpo anti-CTLA4 a aproximadamente 5 mg/kg, y una tercera dosificación de anticuerpo anti-CTLA4 a aproximadamente 9 mg/kg.

De manera similar, el inhibidor de tirosina quinasa de la proteína, preferentemente SPRYCEL®, puede administrarse preferente y aproximadamente 2 veces al día a 70 mg. Alternativamente, el mismo puede dosificarse a, por ejemplo, aproximadamente 50, aproximadamente 70, aproximadamente 90, aproximadamente 100, 110, o 120, dos veces al día, o 100, 140, o 180 una vez al día, o la dosis máxima tolerada. La dosis de un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína puede depender de un número de factores, incluyendo, el estadio de la enfermedad, la presencia de una o más mutaciones en la tirosina quinasa de la proteína etiquetada,

¹Cada combinación enumerada en el presente documento incluye opcionalmente la administración de una vacuna contra el cáncer desde aproximadamente 0,0001-100 mg. las mutaciones de BCR-ABL, etc. La dosis específica que debe ser administrada en función de la presencia de uno o más de tales factores que depende de la experiencia del experto.

De manera similar, el etopósido puede ser administrado preferentemente a aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 900 mg al día. El etopósido está disponible para la infusión intravenosa como un líofilo estéril en ampollas de una sola dosis que contienen el fosfato del etopósido equivalente a 100 mg del etopósido, 32,7 mg de citrato de sodio USP y 300 mg de dextrano 40. Alternativamente, el mismo puede dosificarse, por ejemplo, a aproximadamente 50, aproximadamente 70, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800 o aproximadamente 900 diariamente, o la dosis máxima tolerada.

De manera similar, la gemcitabina puede ser administrada preferentemente a aproximadamente 200 mg/m hasta aproximadamente 1250 mg/m al día mediante vía intravenosa durante una infusión de 30 a 90 minutos. La gemcitabina está disponible para infusión intravenosa que contiene desde aproximadamente 200 mg hasta aproximadamente 1250 mg de HCl de gemcitabina (expresada como la base libre) formulada con manitol (200 mg o 1 g, respectivamente) y acetato de sodio (12,5 mg o 62,5 mg, respectivamente) como polvo liofilizado estéril. Alternativamente, la misma puede ser dosificada a, por ejemplo, a aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, o aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1100, aproximadamente 1200 o aproximadamente 1250 diariamente, o la dosis máxima tolerada.

Las combinaciones de la presente invención también pueden ser emplearse junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad particular contra la afección que está siendo tratada.

El anticuerpo anti-CTLA4 puede administrarse preferentemente a aproximadamente 0,3-10 mg/kg, o la dosis máxima tolerada. En una realización, una dosificación del anticuerpo de CTLA-4 se administra aproximadamente cada tres semanas. Alternativamente, el anticuerpo de CTLA-4 puede administrarse mediante una pauta de dosificación en aumento que incluye administrar una primera dosificación del anticuerpo de CTLA-4 a aproximadamente 3 mg/kg, una segunda dosificación del anticuerpo de CTLA-4 a aproximadamente 5 mg/kg, y una tercera dosificación de anticuerpo de CTLA-4 a aproximadamente 9 mg/kg.

En otra realización específica, la pauta de dosificación en aumento incluye la administración de una primera dosificación del anticuerpo de CTLA-4 a aproximadamente 5 mg/kg y una segunda dosificación de anticuerpo de

CTLA-4 a aproximadamente 9 mg/kg.

Además, la presente invención proporciona una pauta de dosificación en aumento que incluye la administración de una dosificación creciente del anticuerpo de CTLA-4 aproximadamente cada seis semanas.

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

La dosificación real empleada se puede variar dependiendo de los requisitos del paciente y de la gravedad de la afección que está siendo tratada. La dosificación apropiada para una situación particular se determina a partir de los
15 conocimientos en la técnica. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después de esto, la dosificación aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en tales circunstancias. Por comodidad, si se desea, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en partes durante el día. También puede utilizarse la terapia intermitente (por ejemplo, una semana de las tres semanas o tres de las cuatro semanas).

20 Cuando se emplean las composiciones de la presente invención, también pueden administrarse en un entorno clínico y cuando se desee otros agentes utilizados en la modulación del crecimiento del tumor o de la metástasis, tales como antieméticos.

25 Las combinaciones de la presente invención también pueden administrarse junto con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su utilidad particular contra la afección que está siendo tratada. Las combinaciones de la presente invención pueden ser utilizadas alternativamente de manera consecutiva con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocido(s), cuando una formulación de combinaciones múltiples es inapropiada.

30 El(los) agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia pueden administrarse según los protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Será evidente para aquellos expertos la materia que la administración del (de los) agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia puede variar dependiendo de la enfermedad que está siendo tratada y los efectos conocidos del (de los) agente(s) quimioterapéutico(s) y de la radioterapia sobre esta
35 enfermedad. También, de conformidad con el conocimiento del médico experto, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, las cantidades de dosificación y los tiempos de administración) pueden variar en vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados (es decir, el(los) agente(s) anti-CTLA4 y el inhibidor de tirosina quinasa de la proteína) al paciente, y en vista de las respuestas observadas de la enfermedad con respecto a los agentes terapéuticos administrados.

40 Un inhibidor de tirosina quinasa de la proteína, tal como dasatinib, un agente de estabilización de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina, o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal como el etopósido, se administra de manera simultánea o consecutiva (antes o después) con un agente de anti-CTLA4. Por consiguiente, no es necesario que el(los) agente(s) terapéutico(s) de anti-CTLA4 y un agente de
45 estabilización de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal como el etopósido se administren de manera simultánea o esencialmente de manera simultánea. La ventaja de una administración simultánea o esencialmente simultánea o de una administración consecutiva (antes o después) la determina el médico experto.

50 Entre las combinaciones adicionales que también abarca la presente invención, se incluyen, pero no están limitadas a las siguientes: ipilimumab + etopósido + cisplatino o carboplatino; ipilimumab + pem (cisplatino, etopósido y mitomicina) + cisplatino. Estas combinaciones pueden administrarse, ya sea consecutivamente (antes o después una de la otra), al mismo tiempo, o en cualquier orden recomendado por un médico experto.

55 También, en general, un agente estabilizante de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal como un etopósido y el(los) agente(s) de anti-CTLA4 no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica, y pueden tener que administrarse mediante diferentes vías a causa de las diferentes características físicas y químicas.

60 Si un agente estabilizador de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal como el etopósido y el(los) agente(s) anti-CTLA4 no se administran simultáneamente o esencialmente de manera simultánea, entonces puede variar el orden inicial de administración de un inhibidor de tirosina quinasa de la proteína, tal como dasatinib, un agente estabilizante de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal
65 como el etopósido y el(los) agente(s) anti-CTLA4. Así, por ejemplo, un agente estabilizante de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal

como el etopósido puede administrarse primero, seguido de la administración del (de los) agente(s) anti-CTLA4; o el(los) agente(s) anti-CTLA4 puede(n) administrarse primero seguido(s) de la administración de un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína, un agente estabilizante de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal como el etopósido. Esta

administración alternativa puede repetirse únicamente durante un protocolo de tratamiento. El orden de administración, y el número de repeticiones de la administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento, también están determinados por el conocimiento del médico experto después haber evaluado la enfermedad que está siendo tratada y el estado del paciente.

Así, de acuerdo con la experiencia y el conocimiento, el médico especialista puede modificar cada protocolo para la administración de un componente (el agente terapéutico (es decir, un inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína, tal como dasatinib, un agente estabilizante de microtubulina, tal como paclitaxel; un análogo nucleosídico, tal como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena del ADN, tal como el etopósido, el(los) agente(s) anti-CTLA4)), del tratamiento según las necesidades individuales del paciente cuando se lleva a cabo el tratamiento.

El médico adjunto, al evaluar si el tratamiento es efectivo en la dosis administrada, considerará el bienestar general del paciente, así como otros signos más determinantes, tales como el alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, la inhibición del crecimiento del tumor, la contracción real del tumor, o la inhibición de la metástasis. El tamaño del tumor puede medirse con los métodos habituales, tales como los estudios radiológicos, por ejemplo, el escáner con TAC o IRM, y las mediciones sucesivas pueden utilizarse para evaluar si el crecimiento del tumor se ha retardado o incluso si se ha revertido. El alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, tales como el dolor, y la mejora en la condición total también pueden utilizarse para ayudar a evaluar la efectividad del tratamiento.

Como se ha hecho referencia en alguna parte del presente documento, la dosis óptima para el inhibidor de tirosina quinasa de la proteína puede depender de varios factores, incluyendo, pero sin estar limitado a la presencia de una o más mutaciones en el inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína diana y/o en el BCR-ABL.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un inhibidor de una quinasa de BCR-ABL mutante puede ser una función de la mutación presente. Por ejemplo, Shah *et al.* describen que las líneas celulares con ciertas mutaciones de la quinasa de BCR-ABL son más sensibles a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que las líneas celulares con diferentes mutaciones de la quinasa de BCR-ABL. Por ejemplo, las células que comprenden una mutación de F317L en la quinasa de BCR-ABL pueden requerir una concentración de tres a cinco veces más elevada de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que las líneas celulares que expresan una mutación de F317I. Un experto en la materia apreciará la diferencia en la sensibilidad de las células de quinasa de BCR-ABL mutantes y determinará una dosis terapéuticamente eficaz de acuerdo con esto.

Los ejemplos de las dosis terapéuticamente eficaces de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que pueden justificarse en función de la sensibilidad relativa de los mutantes de la quinasa de BCR-ABL con respecto a la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida comparada con la quinasa de BCR-ABL del tipo silvestre, puede determinarse realizando varios ensayos bioquímicos *in vitro*, incluyendo la proliferación celular, la fosforilación de la tirosina de BCR-ABL, la fosforilación del sustrato del péptido, y/o los ensayos de autofosforilación. Por ejemplo, las dosis aproximadas terapéuticamente eficaces de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida pueden calcularse en función de la multiplicación de la dosis típica por las veces del cambio en la sensibilidad en uno cualquiera o más de estos ensayos para cada mutante de la quinasa de BCR-ABL. O'Hare *et al.* (Cáncer Res., 65(11):4500-4505 (2005) efectuaron el análisis de la sensibilidad relativa de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con varios mutantes de la quinasa de BCR-ABL clínicamente relevantes. Por ejemplo, el mutante de E255V tiene un número de veces de cambio de "1" en el ensayo de la quinasa de GST-Ab1, mientras que este mismo mutante tiene un número de veces de cambio de "14" en el ensayo de proliferación celular. Por consiguiente, una dosis terapéuticamente relevante de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para los pacientes que presentan esta mutación podría oscilar, por ejemplo, en cualquier parte desde 1 hasta 14 veces más elevada que la dosis típica. En consecuencia, las dosis terapéuticamente relevantes de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para cualquiera de los mutantes de la quinasa de BCR-ABL pueden ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, o 300 veces más elevada que la dosis prescrita. Alternativamente, las dosis terapéuticamente relevantes de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida pueden ser, por ejemplo, 0,9x, 0,8x, 0,7x, 0,6x, 0,5x, 0,4x, 0,3x, 0,2x, 0,1x, 0,09x, 0,08x, 0,07x, 0,06x, 0,05x, 0,04x, 0,03x, 0,02x, o 0,01x de la dosis prescrita.

Según O'Hare *et al.*, el mutante de M244V tiene un número de veces de cambio de "1,3" en el ensayo de quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "1,1" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante G250E tuvo un número de veces de cambio de "0,5" en el ensayo de quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "3" en el ensayo de autofosforilación, y un

número de veces de cambio de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de Q252H tuvo un número de veces de cambio de "4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de Y253F tuvo un número de veces de cambio de "0,6" en el ensayo de la quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "4" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de Y253H
 5 tuvo un número de veces de cambio de "3" en el ensayo de quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de E255K tuvo un número de veces de cambio de "0,3" en el ensayo de la quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "7" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de F317L tuvo un número de veces de cambio de "1,5" en el ensayo de la
 10 quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "1,4" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "9" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de M351T tuvo un número de veces de cambio de "0,2" en el ensayo de la quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "1,4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante de F359V tuvo un número de veces de cambio de "0,8" en el ensayo de la quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "3" en el ensayo de
 15 proliferación celular; el mutante de H396R tuvo un número de veces de cambio de "1,3" en el ensayo de la quinasa de GST-Ab1, un número de veces de cambio de "3" en el ensayo de autofosforilación, y un número de veces de cambio de "2" en el ensayo de proliferación celular.

Para los pacientes que presentan la mutación de T315I, ya sea sola o junto con otra mutación de BCR-ABL divulgada en el presente documento, la administración de dosis más elevadas de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 20 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o combinaciones de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 25 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 30 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 35 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un inhibidor de la farnisil transferasa; una combinación de la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 40 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y otro inhibidor de la tirosina quinasa de la proteína; cualquier otra combinación divulgada en el presente documento; una pauta de dosificación aumentada en frecuencia de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 45 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida; y cualquier otra combinación o pauta de dosificación que comprenda N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 50 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida divulgada en el presente documento, puede justificarse. Alternativamente, las combinaciones de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 55 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con un inhibidor de T315I también pueden justificarse.

Las pautas de dosificación que involucran la N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-
 60 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida se describen en la patente estadounidense con n.º de serie 10/395.503, presentada el 24 de marzo del 2003; y Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004, Volumen 104; Abstract 20, "Hematologic and Cytogenetic Responses in imatinib-Resistant Accelerated and Blast Phase Chronic Myeloid
 65 Leukemia (CML) Patients Treated with the Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor N-(2-chloro-6-methylphenyl)-3-[[6-[4-(2-hidroxi-
 70 etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida: Results from a Phase I Dose Escalation Study", por Moshe Talpaz, *et al.*

Composiciones Anti-CTLA4 Adicionales

Un anticuerpo preferente de anti-CTLA4 preferente es el anticuerpo anti-CTLA4 de ipilimumab. La presente invención abarca otros anticuerpos de anti-CTLA4 y fragmentos. Estos se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido, fragmento de polipéptido o a la variante de CTLA4, y/o a un epítipo de CTLA4 (como se determinó por los inmunoensayos bien conocidos en la materia para analizar la unión del antígeno-anticuerpo específico). Los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, un heteroconjugado, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de una sola
 50 cadena, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), los fragmentos producidos por la genoteca de expresión de Fab, los anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo" como se utiliza
 55 en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunitariamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, las moléculas que contienen un sitio de unión del antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Además el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) se entiende que
 60 incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos de Fab y fragmentos de F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a la proteína. Los fragmentos de Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento de Fc del anticuerpo intacto, se despejan más rápidamente de la circulación del animal o de la planta, y pueden tener menos unión al tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med., 24:316-325 (1983)). Por consiguiente, estos fragmentos son preferentes, así como los productos de un Fab u otra
 65 genoteca de expresión de la inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de anti-CTLA4 incluyen anticuerpos quiméricos, de una sola cadena, y humanizados.

Los anticuerpos de anti-CTLA4 pueden producirse por cualquier método conocido en la materia para la síntesis de los anticuerpos, en particular, por la síntesis química o preferentemente, por técnicas de expresión recombinante.

- 5 Las adnectinas se pueden hacer según los métodos descritos en las publicaciones estadounidenses poseídas conjuntamente N.º 2007/0082365 y 2008/0139791.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente estadounidense N.º 4.946.778; Bird, Science, 242:423-442 (1988); Houston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988); y
10 Ward *et al.*, Nature, 334:544-554 (1989)) pueden adaptarse para producir anticuerpos de una sola cadena. Los anticuerpos de una sola cadena se forman por la unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región de Fv por medio de un puente de aminoácido, produciendo un polipéptido de una sola cadena. También pueden utilizarse las técnicas para el ensamblaje de los fragmentos de Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, Science, 242:1038-1041 (1988)).

15 La expresión recombinante de un anticuerpo anti-CTLA4, o un fragmento, derivado o análogo del mismo, (por ejemplo, una cadena ligera o pesada de un anticuerpo o un anticuerpo de una sola cadena), requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula del anticuerpo anti-CTLA4 o una cadena ligera o pesada de un anticuerpo,
20 o porción del mismo (que contiene preferentemente el dominio variable de cadena ligera o pesada), el vector para la producción de la molécula del anticuerpo anti-CTLA4 puede producirse por la tecnología de ADN recombinante utilizando las técnicas bien conocidas en la materia. Por consiguiente, los métodos para la preparación de una proteína por la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, se describen en el presente documento. Los métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en la materia
25 pueden utilizarse para la construcción de los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación del anticuerpo y las señales transcripcionales y de traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas del ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y la recombinación genética *in vivo*. Así, los vectores replicables comprenden una secuencia del nucleótido que codifica un anticuerpo anti-CTLA4, o una cadena ligera o pesada del mismo, o un dominio variable de la cadena ligera o pesada, enlazada operativamente a un promotor.
30 Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las publicaciones del PCT N.º WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente estadounidense N.º 5.122.464) y puede clonarse el dominio variable del anticuerpo en tal vector para la expresión de la cadena ligera o pesada completa.

35 El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas son cultivadas entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo anti-CTLA4. Por consiguiente, las células hospedadoras contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-CTLA4, o una cadena ligera o pesada del mismo, o un anticuerpo de una sola cadena de la invención, enlazado operativamente a un promotor heterólogo. Para la expresión de anticuerpos de la doble cadena, los vectores que codifican las
40 cadenas tanto ligera como pesada pueden ser co-expresados en la célula hospedadora para verificar la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

Puede utilizarse varios sistemas del vector de expresión del animal hospedador para expresar las moléculas del anticuerpo anti-CTLA4. Tales sistemas de expresión en el animal hospedador representan vehículos por los que
45 pueden producirse y purificarse posteriormente las secuencias de codificación de interés, pero también representan células que cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación del nucleótido apropiadas, pueden expresar una molécula del anticuerpo de la invención *in situ*. Estas incluyen microorganismos tales como las bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión del ADN del plásmido o del ADN del cósmido que contienen las secuencias de codificación del anticuerpo;
50 levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con los vectores de expresión de la levadura recombinantes que contienen las secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión del virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas de las células de las plantas infectados con los vectores de expresión del virus recombinante (por ejemplo, el virus de mosaico de la coliflor, CaMV; el virus de mosaico del tabaco, TMV) o
55 transformados con los vectores de expresión del plásmido recombinante (por ejemplo el plásmido Ti) que contiene las secuencias de codificación del anticuerpo; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que presentan las construcciones de expresión recombinante que contienen los promotores derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de los virus del mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus, el promotor del virus *vaccinia* 7,5K). Preferentemente, las
60 células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, las células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula del anticuerpo recombinante total, se utilizan para la expresión de una molécula del anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como las células de los ovarios del hámster chino (CHO), junto con un vector, tal como el elemento del promotor del gen temprano, intermedio, principal, del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para los anticuerpos (Foecking *et al.*, Gene, 45:101
65 (1986); Cockett *et al.*, Bio/Technology, 8:2 (1990)).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios de vectores de expresión dependiendo del uso propuesto para la molécula del anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de tal proteína va a producirse para generar las composiciones farmacéuticas de una molécula del anticuerpo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de los productos de la proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen el vector de expresión *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO J., 2:1791 (1983)), en los que la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en la estructura con la región de codificación de lac Z, de modo que se produzca una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye *et al.*, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109 (1985); Van Heeke *et al.*; J. Biol. Chem., 24:5503-5509 (1989)); y similares. Los vectores pGEX pueden utilizarse también para expresar los polipéptidos extraños como proteínas de fusión con la glutatona S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por la adsorción y unión a las perlas de glutatona-agarosa de la matriz seguido por la elución en la presencia de glutatona libre. Los vectores de pGEX son diseñados para incluir la trombina o los sitios de segmentación de la proteasa del factor Xa de modo que el producto del gen objetivo clonado pueda ser liberado de la fracción de GST.

En un sistema de insecto, se utiliza el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar los genes extraños. El virus crece en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede ser clonada individualmente en las regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocadas bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

En las células hospedadoras de mamífero, puede utilizarse un número de sistemas de expresión de base viral. En los casos en donde se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia que codifica el anticuerpo anti-CTLA4 puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia delantera tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma del adenovirus por la recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, las regiones E1 o R3) conducirá a un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula del anticuerpo en las células hospedadoras infectadas (véase, por ejemplo Logan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:355-359 (1984)). Las señales de inicio específicas también pueden ser requeridas para la traducción eficiente de las secuencias de codificación del anticuerpo insertado. Estas señales incluyen el codón de inicio de ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de traducción exógenas y los codones de inicio pueden ser de varios orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión puede mejorarse por la inclusión de los elementos de mejora de la transcripción apropiados, los terminadores de transcripción, etc. (véase Bitter *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516-544 (1987)).

Además, puede elegirse una cepa de la célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto del gen del modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, la glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, la escisión) de los productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Las células hospedadoras diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación post-traducción de las proteínas y los productos del gen. Pueden elegirse las líneas celulares o los sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correcto de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden utilizarse las células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glucosilación, y la fosforilación del producto del gen. Entre tales células hospedadoras de mamífero se incluyen CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y en particular, las líneas celulares del cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y la línea celular de la glándula mamaria normal tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de las proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse las líneas celulares que expresan establemente la molécula del anticuerpo anti-CTLA4. En lugar de utilizar los vectores de expresión que contengan orígenes virales para la replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con el ADN controlado por los elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, el promotor, el mejorador, las secuencias, los terminadores de transcripción, los sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede dejar que las células diseñadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en las líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan la molécula del anticuerpo. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de los compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula del anticuerpo anti-CTLA4.

Se pueden utilizar varios sistemas de selección, incluyendo la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, Cell, 11:223 (1977)), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202 (1992)), y pueden emplearse los genes de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell, 22:817 (1980)) en las células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia del antimetabolito puede utilizarse como la base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Clinical Pharmacy, 12(7):488-505 (1993) Wu *et al.*, Biotherapy, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol, 32:573-596 (1993); Mulligan, Science, 260:926-932 (1993); y Morgan *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 62:191-217 (1993); TBI TECH, 11(5):155-215 (mayo 1993)); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, Gene, 30:147 (1984)). Los métodos conocidos comúnmente en la materia de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990); y en los capítulos 12 y 13, Cracopoli *et al.*, eds., Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Nueva York (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol., 150:1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula del anticuerpo anti-CTLA4 pueden aumentar por la amplificación del vector (para un análisis, véase Bebbington *et al.*, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" en DNA Cloning, Vol. 3, Academic Press, Nueva York (1987)). Cuando un marcador en sistema de vectores que expresan el anticuerpo es ampliable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora incrementará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región ampliada está asociada al gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol., 3:257 (1983)).

La célula hospedadora puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido obtenido de una cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido obtenido de una cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que hacen posible la expresión idéntica de los polipéptidos de cadena ligera y pesada. Alternativamente, puede utilizarse un solo vector que codifique y sea capaz de expresar polipéptidos, tanto de cadena ligera como pesada. En tales situaciones, la cadena ligera debería colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de la cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature, 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2197 (1980)). Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender el ADNc o el ADN genómico.

Una vez que una molécula del anticuerpo ha sido producida por un animal, sintetizada químicamente o expresada de manera recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la materia para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, por intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad al antígeno específico tras la proteína A, y dimensionamiento por cromatografía en columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de anti-CTLA4 o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a las secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento o conocidas de otra manera en la materia, para facilitar la purificación.

Las composiciones pueden comprender polipéptidos conjugados en dominios del anticuerpo anti-CTLA4 diferentes de las regiones variables. Por ejemplo, los polipéptidos fusionarse o conjugarse en una región de Fc del anticuerpo, o porción del mismo. La porción del anticuerpo anti-CTLA4 fusionado a un polipéptido puede comprender la región constante, la región bisagra, el dominio de CH1, el dominio de CH2, y el dominio de CH3 o cualquier combinación de los dominios completos o porciones de los mismos. Los polipéptidos también pueden ser fusionados o conjugados en las porciones del anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones de Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros por medio de la unión del disulfuro entre las porciones de Fc. Las formas multiméricas más elevadas se pueden hacer por la fusión de los polipéptidos a las porciones de IgA e IgM. Los métodos para la fusión o conjugación de los polipéptidos de la presente invención a las porciones del anticuerpo ya se conocen en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses con N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, y 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; las publicaciones del PCT N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539 (1991); Zheng *et al.*, J. Immunol., 154:5590-5600 (1995); y Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341 (1992).

Además, un anticuerpo anti-CTLA4 o fragmento del mismo puede ser conjugado en una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocídico, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, por ejemplo, los emisores alfa tales como, por ejemplo, 213Bi. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Entre los ejemplos se incluyen paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desdihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (inicialmente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomomicina (inicialmente actinomicina), bleomocina, mitramicina, y antramocina (AMC)), y agentes antimicóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica determinada, el agente terapéutico o la fracción del fármaco han de interpretarse como limitantes de los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *pseudomonas* o la toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de la necrosis tumoral, el interferón- α , el interferón- β , el factor del crecimiento nervioso, el factor del crecimiento derivado de plaquetas, el activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (véase la publicación del PCT N.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación del PCT N.º WO 97/34911), el ligando Fas (Takahashi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGF (véase la publicación del PCT N.º 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), el factor de estimulación de la colonia de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), el factor estimulante de la colonia de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores del crecimiento.

Las técnicas para la conjugación de tal fracción terapéutica con los anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.*, eds., pp. 243-256, Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies for Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery*, 2/a. Ed., Robinson *et al.*, eds., pp. 623-653, Marcel Dekker, Inc. (1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera *et al.*, eds., pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin *et al.*, eds., pp. 303-316, Academic Press (1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-158 (1982).

Alternativamente, un anticuerpo anti-CTLA4 puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado del anticuerpo como se describe por Segal en la patente estadounidense N.º 4.676.980.

Puede utilizarse un anticuerpo anti-CTLA4, con o sin una fracción terapéutica conjugada con el mismo, administrada sola o en combinación con el (los) factor(es) citotóxico(s) y/o la(s) citocina(s), como sustancia terapéutica.

Pueden crearse anticuerpos sintéticos dirigidos contra los polipéptidos descritos en el presente documento. Un ejemplo de los anticuerpos sintéticos se describe en Radrizzani, M., *et al.*, *Medicina* (Aires), 59(6):373-758, (1999)). Recientemente, se ha descrito una nueva clase de anticuerpos sintéticos se denomina como los polímeros molecularmente impresos (MIP) (Semorex, Inc.). Los anticuerpos, péptidos y enzimas se utilizan frecuentemente como elementos de reconocimiento molecular en los sensores químicos y biológicos. Sin embargo, su falta de estabilidad y de mecanismos de transducción de señales limita su uso como dispositivos de detección. Los polímeros molecularmente impresos (MIP) son capaces de imitar la función de los receptores biológicos pero con menos limitaciones de estabilidad. Tales polímeros proporcionan una sensibilidad y selectividad elevadas mientras que se mantiene una excelente estabilidad térmica y mecánica. Los MPI tienen la capacidad de unirse a moléculas pequeñas y a moléculas diana, tales como sustancias orgánicas y proteínas con una potencia idéntica o más grande que aquella de los anticuerpos naturales. Estos "súper" MIP tienen afinidades más elevadas hacia su diana y por consiguiente requieren concentraciones menores para una unión eficaz.

Durante la síntesis, los MIP se imprimen para que tengan un tamaño, forma, carga y grupos funcionales complementarios de la diana seleccionada usando la propia molécula diana (tal como un polipéptido, anticuerpo, etc.), o una sustancia que tiene una estructura muy similar, como su "huella" o "molde". Los MIP pueden obtenerse con los mismos reactivos producidos para los anticuerpos. Por ejemplo, los "súper" MIP fluorescentes pueden ser recubiertos sobre perlas o cavidades para su uso en las separaciones o ensayos altamente sensibles, o para el uso en la selección total de proteínas de alto rendimiento.

Se pueden emplear varios métodos para crear los MIP a un receptor, ligando, polipéptido, péptido, molécula orgánica, específico. Se describen varios métodos preferentes en Esteban *et al.* en *J. Analytical Chem.*, 370(7):795-802 (2001). Los métodos adicionales ya se conocen en la técnica, tal como por ejemplo Hart, B.R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 123(9):2072-2073 (2001); y Quaglia, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 123(10):2146-2154 (2001).

Los oligonucleótidos no codificantes pueden ser mono o bicatenarios. El ARN bicatenario puede estar diseñado en función de las enseñanzas de Paddison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99:1443-1448 (2002); y de las publicaciones del PCT N.º WO 01/29058 y WO 99/32619.

El ARN bicatenario también puede adoptar la forma de un inhibidor del ARN ("ARNi"), de tal modo que los mismos sean competentes para la interferencia del ARN. Por ejemplo, las moléculas de ARNi del anti-CTLA4 pueden adoptar la forma de las moléculas descritas por Mello y FIRE en las publicaciones del PCT N.º WO 1999/032619 y WO 2001/029058; las publicaciones estadounidenses N.º 2003/0051263, 2003/0055020, 2003/0056235, 2004/265839, 2005/0100913; 2006/0024798, 2008/0050342, 2008/0081373, 2008/0248576, y 2008/055443; y/o las patentes estadounidenses N.º 6.506.559, 7.282.564, 7.538.095 y 7.560.438.

Por ejemplo, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 pueden ser de ARN bicatenario, y de entre aproximadamente 25 hasta 400 nucleótidos de longitud, y complementarias a la secuencia de nucleótidos de codificación de CTLA4. Tales moléculas de ARNi pueden ser de aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 45 y aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En este contexto, el término “aproximadamente” se interpreta para que sea de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o 6 nucleótidos más largo en dirección 5' o 3', o en ambas.

Alternativamente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 pueden adoptar forma de moléculas de ARNi bicatenarias descritas por Kreutzwer en las patentes europeas N.º EP 1144639 y EP 1214945. Específicamente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 pueden ser de ARN bicatenario que es complementario a la región de codificación de CTLA4, y está entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 49 nucleótidos de longitud, y preferentemente entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. En este contexto, el término “aproximadamente” se interpreta como de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos más largos en ya sea dirección 5' o 3', o en ambas. Tales moléculas de anti-CTLA4 pueden ser estabilizadas por el enlace químico de las cadenas de ARN sencillas.

Alternativamente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 pueden adoptar la forma de las moléculas de ARNi bicatenarias descritas por Tuschl en la patente europea N.º EP 1309726. Específicamente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 pueden ser de ARN bicatenario que es complementario a la región de codificación del CTLA4, y está entre aproximadamente 21 hasta aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, y tienen extremos romos o contienen ya sea uno o más elementos colgantes sobre el extremo 3' o el extremo 5' de una o ambas de las cadenas, siendo cada elemento colgante de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más nucleótidos de longitud. Los extremos de cada cadena pueden modificarse mediante fosforilación, hidroxilación, u otras modificaciones. Además, pueden modificarse los enlaces de internucleótidos de uno o más de los nucleótidos, y pueden contener 2'-OH. En este contexto, el término “aproximadamente” se interpreta como de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más en la dirección ya sea 5' o 3', o ambas. Tales moléculas de anti-CTLA4 pueden ser estabilizadas mediante enlace químico de las cadenas de ARN sencillas.

Alternativamente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 adoptan la forma de las moléculas de ARNi bicatenarias descritas por Tuschl en las patentes estadounidenses N.º 7.056.704 y 7.078.196. Específicamente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 ARNi de ARN bicatenario que es complementario a la región de codificación de CTLA4, y está entre aproximadamente 19 hasta aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y son de extremos romos o contienen ya sea uno o más elementos colgantes sobre el extremo 3' o el extremo 5' de una o ambas de las cadenas, siendo cada elemento colgante de aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 o más nucleótidos de longitud. Los extremos de cada cadena pueden ser modificados por fosforilación, hidroxilación, u otras modificaciones. Además, los enlaces de internucleótidos de uno o más de los nucleótidos pueden modificarse y pueden contener 2'-OH. En este contexto, el término “aproximadamente” se interpreta como de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más, ya sea en la dirección ya sea 5' como en la 3', o ambas. Tales moléculas de anti-CTLA4 pueden ser estabilizadas mediante enlace químico de las cadenas de ARN sencillas.

Adicionalmente, las moléculas de ARNi de anti-CTLA4 pueden adoptar la forma de las moléculas de ARN descritas por Crooke en las patentes estadounidenses N.º 5.898.031, 6.107.094, 7.432.249 y 7.432.250 y en la solicitud europea N.º EP 0928290. Específicamente, las moléculas de anti-CTLA4 pueden ser de ARN monocatenario, que contienen un primer segmento que tiene al menos una subunidad del nucleósido de ribofuranosilo que se modifica para mejorar la afinidad de unión de dicho compuesto a la diana de ARN preseleccionada cuando se compara con la afinidad de la unión de un oligorribonucleótido sin modificar a la diana de ARN; y un segundo segmento que comprende al menos cuatro subunidades del nucleósido de ribofuranosilo consecutivas que tiene fracciones de 2'-hidroxilo sobre las mismas; estando conectadas las subunidades del nucleósido de dicho compuesto oligomérico por los enlaces del internucleósido que se modifican para estabilizar los enlaces de la degradación cuando se compara con los enlaces del fosfodiéster. Preferentemente, tales moléculas de ARN son de aproximadamente 15 hasta 25 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 17 hasta aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Preferentemente tales moléculas son competentes para activar una enzima de ARN bicatenario para efectuar la escisión del ARN de CTLA4. En este contexto, el término “aproximadamente” se interpreta como de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más en la dirección 5' o 3', o ambas. Tales moléculas de anti-CTLA4 pueden ser estabilizadas mediante enlace químico de las cadenas de ARN sencillas.

Los reactivos de ARNsi son útiles para la inhibición de la expresión de los polinucleótidos y pueden tener eficacia terapéutica. En la técnica ya se conocen varios métodos para el tratamiento terapéutico de los trastornos mediante la administración de los reactivos de ARNsi. Uno de tales métodos se describe en Tiscornia *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci., 100(4):1844-1848 (2003)); en el documento WO 04/09769 presentado el 18 de julio del 2003 y en Reich, S.J. *et al.*, Mol. Vis., 9:210-216 (30 mayo del 2003).

Para facilitar un entendimiento adicional de la invención, los siguientes ejemplos se presentan principalmente con el propósito de ilustrar detalles más específicos de los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Método de evaluación del efecto de la combinación de un inhibidor de tirosina quinasa de la proteína con un modulador de la ruta coestimulante sobre el crecimiento tumoral en tres modelos de tumor de murino

El efecto del dasatinib sobre la función inmunitaria ha sido el objeto de las últimas investigaciones. Algunos informes demostraron que *in vitro*, el dasatinib (concentraciones de 10-50 nM) inhibe la función de las células T, tal y como se mide por la inhibición de la secreción y desgranulación de la citosina (Weischel *et al.*, 2008) que se postuló como el resultado de la inhibición de Lck. Otros informes demostraron que dasatinib produjo el bloqueo de la activación de las células T (Schade *et al.*, 2007). Sin embargo, el tratamiento con dasatinib podría también tener efectos inmunomoduladores en función de su inhibición potente de STAT3, que puede producir la maduración de las células dendríticas y la modulación de las respuestas de las células T (Yu H, *et al.*, 2007), y la sensibilidad diferencial de los efectores T y las células reguladoras T para la inhibición de la señalización de las células T (Siggs *et al.*, 2007). Además, los linfocitos granulares grandes han sido detectados en las efusiones pleurales de los pacientes tratados con dasatinib, y de manera interesante, la totalidad de estos pacientes tuvo al menos un alelo HLA-A2 (Mustojski *et al.*, 2008). Se tiene la hipótesis de que la infiltración de LGL podría ser el resultado de la inmunoestimulación. Por consiguiente, existe el interés en determinar si una potenciación de una respuesta inmunitaria del antitumor podría lograrse mediante la combinación de un mAb de bloqueo de CTL4 y dasatinib en modelos donde dasatinib tiene un efecto mínimo.

Los estudios de eficacia se llevaron a cabo en 3 modelos: fibrosarcoma SA1N, carcinoma de colon CT26 y carcinoma de pulmón M109. Los primeros 2 modelos son sensibles al efecto del bloqueo de CTLA-4, mientras que dasatinib mostró una actividad antitumoral leve en el modelo de SA1N pero una actividad mínima contra los modelos de CT 26 y M109. Como se muestra en las figuras 1A-1B y en la figura 2, el tratamiento simultáneo con CTLA-4 mAb + dasatinib condujo a efectos sinérgicos. La sinergia fue observada cuando dasatinib fue administrado a 30 mg/kg mediante una pauta de dosificación diaria o siguiendo un programa intermitente (5 días sí/2 días no). No se observó sinergia en el modelo del tumor M109.

Los estudios adicionales fueron llevados a cabo en el modelo del tumor de CT26 para determinar si el efecto de la combinación fue debido a una expansión de las células citotóxicas T y para determinar si los tratamientos estuvieron alterando la composición de las células inmunitarias en los nodos linfáticos de drenaje del tumor. El aumento de la actividad citolítica se observó en los animales tratados con el tratamiento combinado, en comparación con los animales tratados con tratamientos sencillos (FIG. 3A-3C). Adicionalmente, cuando se midió la relación de las células efectoras T/células reguladoras T (población supresora), el tratamiento combinado y el grupo tratado con dasatinib mostró una relación mejorada, indicando un número más elevado de células efectoras T sobre las células reguladoras T. En función de los resultados obtenidos en el modelo de CT-26, es probablemente la adición de dasatinib a la terapia de CTLA-4 lo que reduce el número de las células reguladoras T, mientras que amplía el porcentaje de células efectoras T que conducen a una mejora de la respuesta inmunitaria del antitumor producida por la monoterapia de anti-CTLA-4.

Ejemplo 2 - Método de evaluación del efecto de la combinación de un inhibidor de tirosina quinasa de la proteína con un modulador de la ruta coestimulante sobre el crecimiento del tumor en un modelo de tumor de murino con mastocitoma P815

El tratamiento simultáneo con SPRYCEL® y el anticuerpo de CTLA-4 se evaluó en el modelo de tumor de murino con mastocitoma P815. Los métodos utilizados fueron esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1 del presente documento.

SPRYCEL® mostró una actividad antitumoral leve en el modelo P815. Como se muestra en la figura 5, el tratamiento simultáneo con CTLA-4 mAb + SPRYCEL® condujo a efectos sinérgicos. La sinergia se observó cuando SPRYCEL® fue administrado a 30 mg/kg, mediante pauta de dosificación diaria o siguiendo un programa intermitente (5 días sí/2 días sí).

Estos resultados fueron consistentes con los resultados observados en los modelos del tumor de SA1N y CT26 (véanse las figuras 1A-1B y 2), y confirman que la administración de un inhibidor de tirosina quinasa de la proteína en combinación con un anticuerpo de CTLA-4 condujo a la reducción sinérgica en la proliferación del tumor.

Ejemplo 3 - Método de evaluación de la actividad antitumoral del bloqueo del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) solo o combinado con paclitaxel (PAC), etopósido (ETO), o gemcitabina (GEM) en los modelos de tumor de murino

Para determinar si la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal de anti-CTLA-4 (CTLA-4 mAb) es sinergizada o inhibida por la adición de los agentes quimioterapéuticos, el CTLA-4 mAb fue evaluado solo y en combinación con Pac, Eto, o Gem en los modelos de tumor de murino. Los modelos del carcinoma de pulmón M109, fibrosarcoma SA1N, y carcinoma de colon CT26 fueron elegidos en función de una sensibilidad diferente a los

agentes quimioterapéuticos y al bloqueo de CTLA-4.

Todos los compuestos fueron probados a su dosis y programación óptimas. Cuando se utilizaron en combinación, el CTLA-4 mAb fue iniciado un día después de la primera dosis de quimioterapia. La inhibición del crecimiento del tumor y el número de días para alcanzar el tamaño del tumor diana fueron utilizados para evaluar la eficacia. La actividad antitumoral fue evaluada como: regresión completa (CR; tumor no palpable para ≥ 2 evaluaciones) o la regresión parcial (PR; 50 % de reducción en el volumen del tumor para ≥ 2 evaluaciones). La sinergia fue definida como una actividad antitumoral significativamente superior ($p < 0,05$) a la actividad de la monoterapia con cada agente.

En el modelo de tumor subcutáneo M109, que es insensible al bloqueo de CTLA-4 y levemente sensible a Pac, Eto, y Gem, la sinergia de la línea de límite fue evidente con la combinación de CTLA-4 mAb y Pac, mientras que no se observó ningún efecto con Eto. La monoterapia con Gem no produjo una actividad antitumoral de M109 significativa; sin embargo, la combinación de Gem con CTLA-4 mAb condujo sinergia. En el modelo de metástasis de pulmón M109, la sinergia fue detectada para CTLA-4 mAb combinada con Eto, la sinergia en la línea de límite se halló con Gem, y Pac no mejoró la actividad.

El fibrosarcoma de SA1N es sensible al bloqueo de CTLA-4 y a la totalidad de las tres quimioterapias. Pac, Eto, y Gem mejoraron la actividad de CTLA-4 mAb en este modelo, pero la sinergia solamente fue observada con Eto. El CTLA-4 mAb y Pac fueron ineficaces contra los tumores del carcinoma de colon CT26 establecidos, pero sinérgicos cuando la carga tumoral era mínima. Tanto Eto como Gem fueron ineficaces como agentes únicos en este modelo y la actividad de ambos fue energizada significativamente mediante CTLA-4 mAb.

En resumen, la adición de CTLA-4 mAb a Eto, Gem, o Pac condujo a actividades sinérgicas dependientes del modelo. La sinergia fue observada sin importar la inmunogenicidad del tumor y solamente cuando al menos una de las terapias era activa. Todas las pautas combinadas fueron bien toleradas y no parece que las quimioterapias inhiban la actividad de CTLA-4 mAb en el modelo de tumor de SA1N. Como asunto de importancia particular, se observó una sinergia en los tumores sin respuesta al CTLA-4 mAb solo, indicando que los agentes quimioterapéuticos podrían haber inducido la muerte celular inmunogénica. Estos descubrimientos proporcionan soporte para la evaluación de combinaciones quimioinmunoterapéuticas en los ensayos clínicos. Los datos para las combinaciones en cada modelo de murino se describen individualmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 4 - Método de evaluación de la actividad antitumoral del bloqueo del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) solo o combinado con paclitaxel (PAC), etopósido (ETO) o gemcitabina (GEM) en los modelos de tumor de murino M109 subcutáneo

El efecto de paclitaxel, etopósido y gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 fue evaluado en un modelo de tumor del carcinoma del pulmón M109 subcutáneo para establecer la eficacia de cada combinación de tratamiento.

Los tumores de M109 son insensibles al bloqueo de CTLA-4 y levemente sensibles a paclitaxel, etopósido y gemcitabina. La combinación de CTLA-4 + paclitaxel produjo una actividad antitumoral mejorada en comparación con cada agente administrado de manera individual, mientras que no se observó ninguna mejora con el etopósido. Por otra parte, aun cuando la gemcitabina como agente único no produjo una actividad antitumoral significativa, la gemcitabina más CTLA-4 mAb produjo efectos sinérgicos (Tabla 1).

TABLA 1

Actividad antitumoral de CTLA-4 mAb en combinación con paclitaxel, etopósido y gemcitabina en el modelo de tumor subcutáneo de carcinoma de pulmón M109							
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa (días de estudio)	% TGI (promedio)	T-C (1000 mm ³)	PR	CR	Resultado
CTLA-4 mAb (clon UC10)	20	8, 12, 16	0	0	0	0	
Paclitaxel	24	7, 11, 15	45	5	0	0	
Paclitaxel + CTLA-4 mAb	24 20	7, 11, 15 8, 12, 16	62	8	0	0	Sinergia en la línea límite
Etopósido	50	7, 14, 21	59	9	0	0	
Etopósido + CTLA-4 mAb	50 20	7, 14, 21 8, 12, 16	65	11	0	0	
Gemcitabina	120	7, 11, 15	32	2,2	0	0	

Gemcitabina + CTLA-4 mAb	120 20	14, 18, 22 8, 12, 16	62	11	0	0	Sinergia
TVDT = 5,4 días							

Ejemplo 5 - Método de evaluación de la actividad antitumoral del bloqueo del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) solo o combinado con paclitaxel (PAC), etopósido (ETO) o gemcitabina (GEM) en un modelo experimental del tumor de murino de la metástasis pulmonar M109

- 5 Se evaluó el efecto de paclitaxel, etopósido y gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 en un modelo experimental del tumor de la metástasis pulmonar M109 para establecer la eficacia de cada combinación de tratamiento.
- 10 En el modelo de metástasis pulmonar M019, el etopósido y CTLA-4 mAb mostraron actividad sinérgica, mientras que la combinación con gemcitabina fue sinérgica en la línea de límite (Tabla 2).

TABLA 2

Efecto de CTLA-4 mAb en combinación con agentes quimioterapéuticos en el modelo experimental del carcinoma del pulmón de la metástasis pulmonar M019				
	Dosis (mg/kg)	Programa (días de estudio)	Tiempo de supervivencia promedio (días)	Efecto de la combinación
Vehículo de control			32	
CTLA-4 mAb	20	5, 9, 13	33	
Gemcitabina	150	4, 8, 12	42	
Gemcitabina + CTLA-4 mAb	150 20	4, 8, 12 5, 9, 13	47	Sinergia en la línea de límite
Etopósido	50	4, 11, 18	34	
Etopósido + CTLA-4 mAb	50 20	4, 11, 18 5, 9, 13	43	Sinergia
Paclitaxel	24	4, 8, 12	38	
Paclitaxel + CTLA-4 mAb	24 20	4, 8, 12 5, 9, 13	39	

Ejemplo 6 - Método de evaluación de la actividad antitumoral del bloqueo del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) solo o combinado con paclitaxel (PAC), etopósido (ETO) o gemcitabina (GEM) en un modelo del tumor de murino subcutáneo de fibrosarcoma SA1N

- 20 Se evaluó el efecto de paclitaxel, etopósido y gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 en un modelo de tumor de murino subcutáneo de fibrosarcoma SA1N para establecer la eficacia de cada combinación de tratamiento.
- 25 SA1N es una línea del tumor inmunogénico sensible a CTLA-4 mAb y a la quimioterapia. Aunque los 3 agentes quimioterapéuticos probados mejoraron la actividad de CTLA-4 mAb, la sinergia solamente fue observada con etopósido (Tabla 3).

TABLA 3

Actividad antitumoral de CTLA-4 mAb en combinación con paclitaxel, etopósido y gemcitabina en el modelo de tumor subcutáneo del fibrosarcoma SA1N							
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa (días de estudio)	% TGI (promedio)	T-C (1000 mm ³)	PR	CR	Resultado
CTLA-4 mAb (clon UC10)	10	15, 19, 23	81	23	1/8	1/8	
Paclitaxel	24	14, 18, 22	65	13	0/8	0/8	
Paclitaxel + CTLA-4 mAb	24 10	14, 18, 22 15, 19, 23	97	29	2/8	1/8	
Etopósido	40	14, 21, 28	88	14	1/8	0/8	

Etopósido + CTLA-4 mAb	40 10	14, 21, 28 15, 19, 23	112	>50	2/7	5/7	Sinergia
Gemcitabina	120	14, 18, 22	68	11	0/8	0/8	
Gemcitabina + CTLA-4 mAb	120 10	14, 18, 22 15, 19, 23	94	23	0/7	2/7	
TVDT = 8,2 (1000 mm ³)							

Ejemplo 7 - Método de evaluación de la actividad antitumoral del bloqueo del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) solo o combinado con paclitaxel (PAC), etopósido (ETO) o gemcitabina (GEM) en un modelo de tumor de murino del carcinoma de colon CT26

Se evaluó el efecto del paclitaxel, etopósido y gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 en un modelo de tumor de murino del carcinoma de colon CT26 para establecer la eficacia de cada combinación de tratamiento.

El CTLA-4 mAb y paclitaxel son terapias ineficaces contra los carcinomas de colon CT26; su combinación fue ineficaz contra los tumores establecidos, pero sinérgica contra la carga tumoral mínima. Como se muestra en la Tabla 4, tanto el etopósido como la gemcitabina fueron eficaces como agentes individuales, pero su actividad se potenció significativamente al añadir CTLA-4 mAb.

TABLA 4

Actividad antitumoral de CTLA-4 mAb en combinación con paclitaxel, etopósido y gemcitabina en el modelo de tumor subcutáneo del carcinoma de colon CT26							
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa (días de estudio)	% TGI (promedio)	T-C (1000 mm ³)	PR	CR	Resultado
CTLA-4 mAb (clon UC10)	20	9, 13, 17	5	0	0/8	0/8	
Paclitaxel	24	8, 12, 16	0	0	0/8	0/8	
Paclitaxel + CTLA-4 mAb	24 20	8, 12, 16 9, 13, 17	0	1	0/8	1/8	
Etopósido	50	8, 15, 22	66	11	0/8	1/8	
Etopósido + CTLA-4 mAb	50 20	8, 15, 22 9, 13, 17	91	>50	1/8	4/8	Sinergia
Gemcitabina	120	8, 12, 16	102	12	0/8	2/8	
Gemcitabina + CTLA-4 mAb	120 20	8, 12, 16 9, 13, 17	112	>50	1/8	5/8	Sinergia

En resumen, la adición de CTLA-4 mAb a los agentes quimioterapéuticos tales como etopósido, gemcitabina, paclitaxel, e ixabepilona condujo a una actividad sinérgica en los modelos de tumores múltiples. Todas las pautas combinadas fueron bien toleradas. Se debe señalar que la sinergia fue observada en los tumores que no respondían a CTLA-4 únicamente, indicando que los agentes quimioterapéuticos podrían haber inducido la muerte celular inmunogénica. La gemcitabina, el etopósido, el paclitaxel, y la ixabepilona como monoterapia parece que inducen una firma inmunogénica y la modulación de la respuesta inmunitaria. De manera importante, los resultados indican que, debido a su semivida corta, estos agentes no afectarán la función de las células T efectoras. Además, la sinergia de la gemcitabina, el etopósido, el paclitaxel, y la ixabepilona en combinación con el bloqueo de CTLA-4 puede observarse en los medios donde el agente quimioterapéutico no induce a regresión. Al menos para la gemcitabina, la temporización de la administración fue fundamental para el efecto sinérgico solamente con el tratamiento simultáneo con gemcitabina, siendo efectiva. Estos resultados indican que la administración de los agentes quimioterapéuticos junto con la inhibición de CTLA-4 puede ser óptima para el efecto sinérgico. Por último, los ratones con una respuesta completa ("CR") fueron capaces de rechazar una reexposición del tumor, lo que indicó que la generación de una respuesta inmunitaria de memoria no fue alterada por los agentes quimioterapéuticos.

En conclusión, estos descubrimientos proporcionan la prueba de que la combinación de los agentes quimioterapéuticos y un mAb de bloqueo del anti-CTLA-4 homólogo de ipilimumab producen efectos antitumorales efectivos y a largo plazo, y que la investigación del ipilimumab en combinación con un agente quimioterapéutico en los ensayos clínicos está garantizada.

Estará claro que la invención puede realizarse de otra manera que la descrita particularmente en la descripción y los ejemplos precedentes. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención en vista de las enseñanzas anteriores.

Listado de secuencias

<110> Bristol-Myers Squibb Company

5 <120> COMBINACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-CTLA4 CON DIVERSAS PAUTAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO SINÉRGICO DE ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS

<130> M/52523-EP-DIV

10 <140> EP 09749268.0
<141> 29-10-2009

<150> US 61/226.910
<151> 20-07-2009

15 <150> US 12/462168
<151> 30-07-2009

20 <150> PCT/US2009/052209
<151> 30-07-2009

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

35 <210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 629 167 T3

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 4
<211> 9
15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

20 Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en un método para el tratamiento contra el cáncer, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad sinérgica y terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 con 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.
2. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona del grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab.
3. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab.
4. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cáncer es un tumor sólido.
5. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según la reivindicación 4, en donde dicho tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de pulmón, sarcoma, fibrosarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de colon.
6. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho método es para el tratamiento de un tumor refractario a 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o a una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.
7. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo se administran antes de la administración de dicho anticuerpo anti-CTLA4.
8. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo se administran esencialmente de manera simultánea a la administración de dicho anticuerpo anti-CTLA4.
9. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho tratamiento contra el cáncer comprende además un agente citotóxico antiproliferativo ya sea solo o en combinación con radioterapia.
10. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho agente antiproliferativo es cisplatino.
11. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho agente antiproliferativo es carboplatino.
12. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo se administran a una dosis de aproximadamente 50 mg.
13. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo se administran por infusión intravenosa como un liófilo estéril en ampollas de una sola dosis que contienen fosfato de etopósido equivalente a 100 mg de etopósido, 32,7 mg de citrato de sodio USP y 300 mg de dextrano 40.

14. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho anti-CTLA-4 se administra aproximadamente cada tres semanas.

15. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera las reivindicaciones 1 a 14, en donde el cáncer es cáncer de pulmón microcítico.

16. El anticuerpo anti-CTLA-4 y 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde 9-[4,6-O-(R)-etilideno-β-D-glucopiranosido] de 4'-demetilepipodofilotoxina, 4'-(fosfato dihidrógeno) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo se administran a aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 900 mg por día, preferentemente a aproximadamente 100 mg diariamente.

FIG. 1A

SAIN N.º11

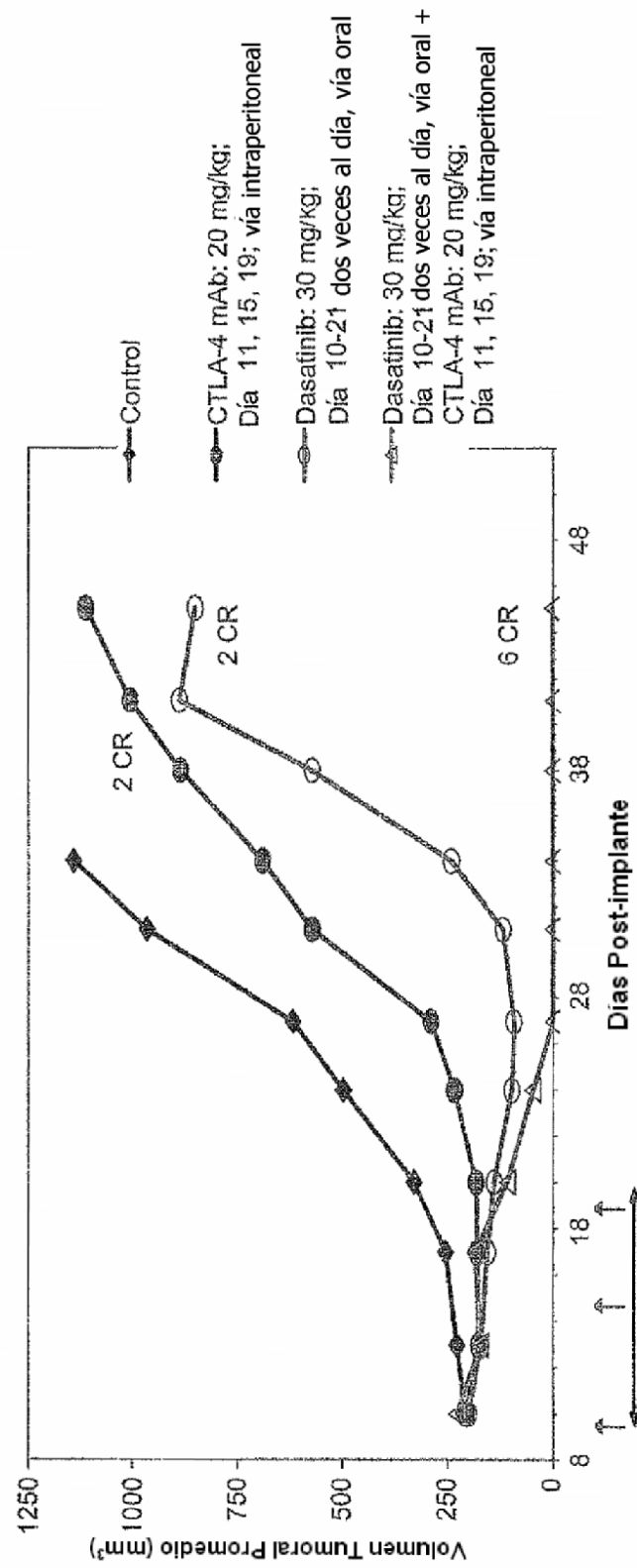


FIG. 1B

SA1N N.º 19

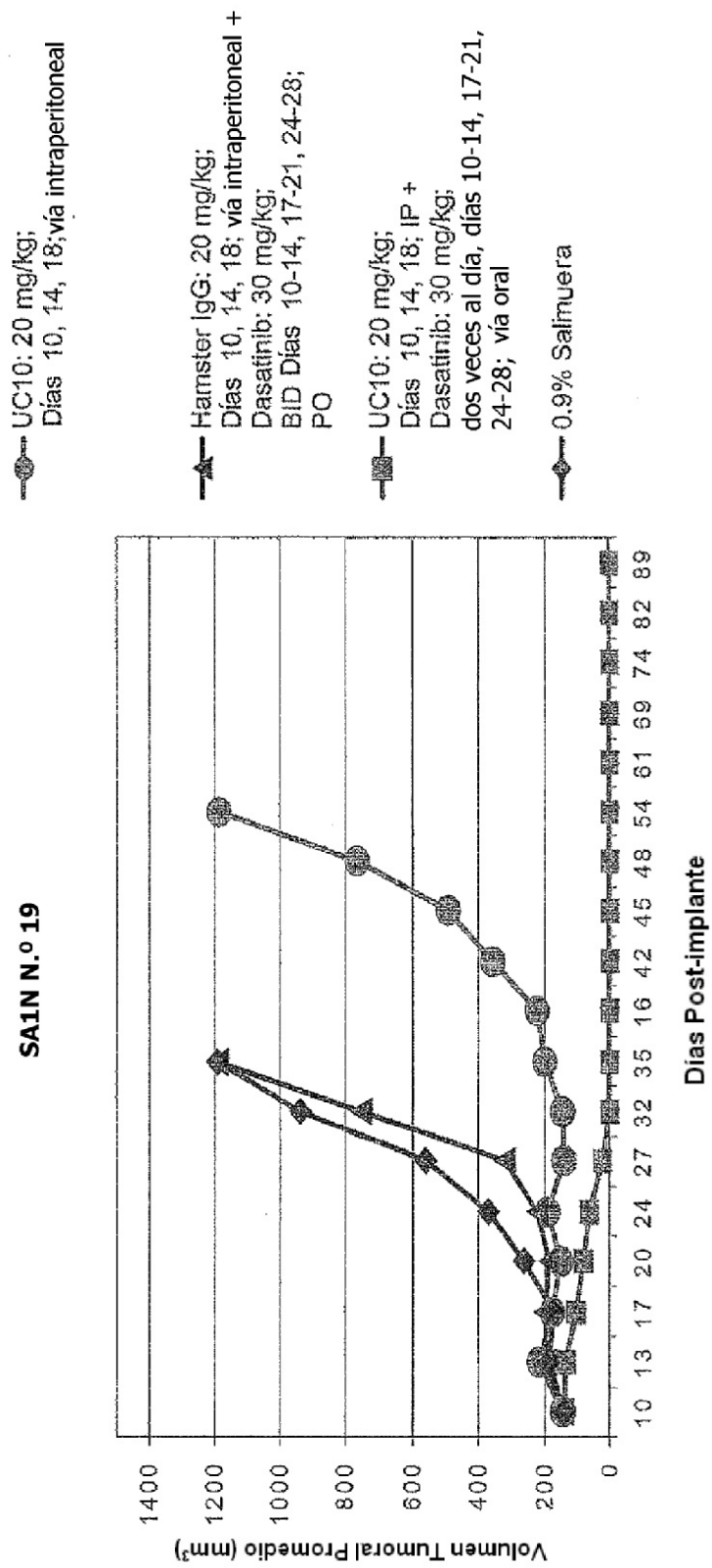
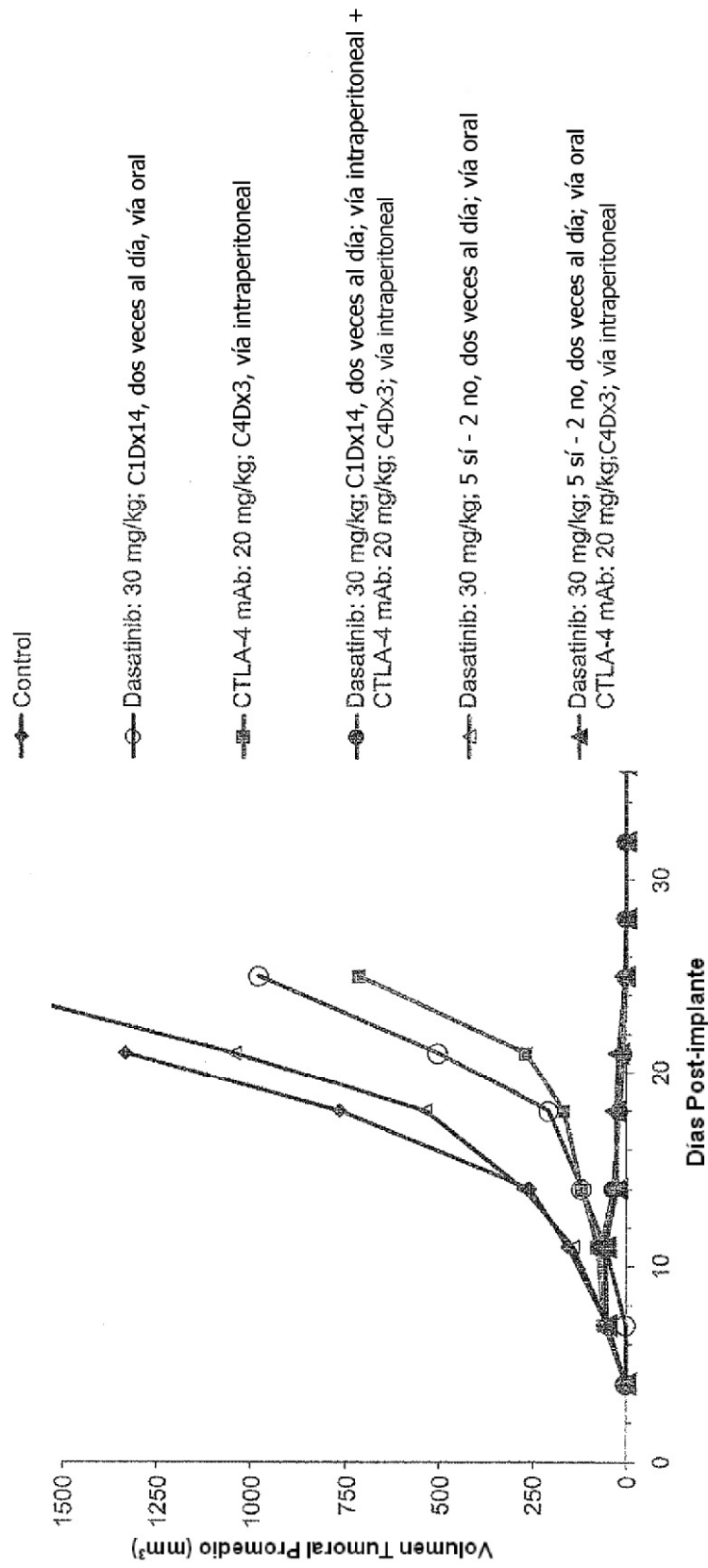


FIG. 2



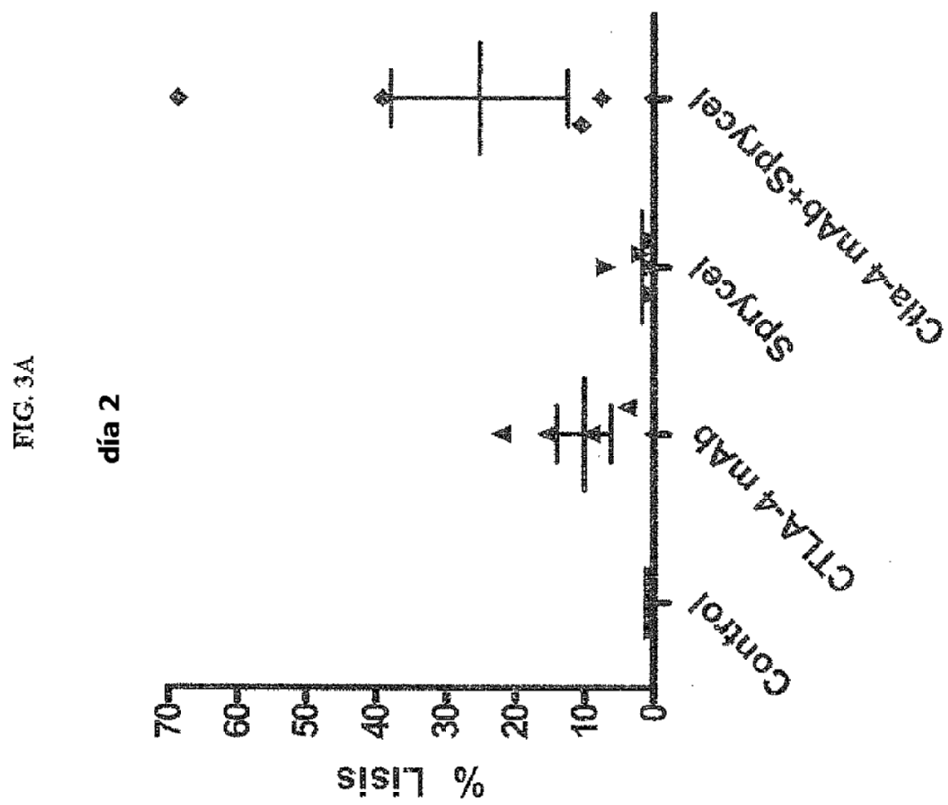


FIG. 3B

día 7

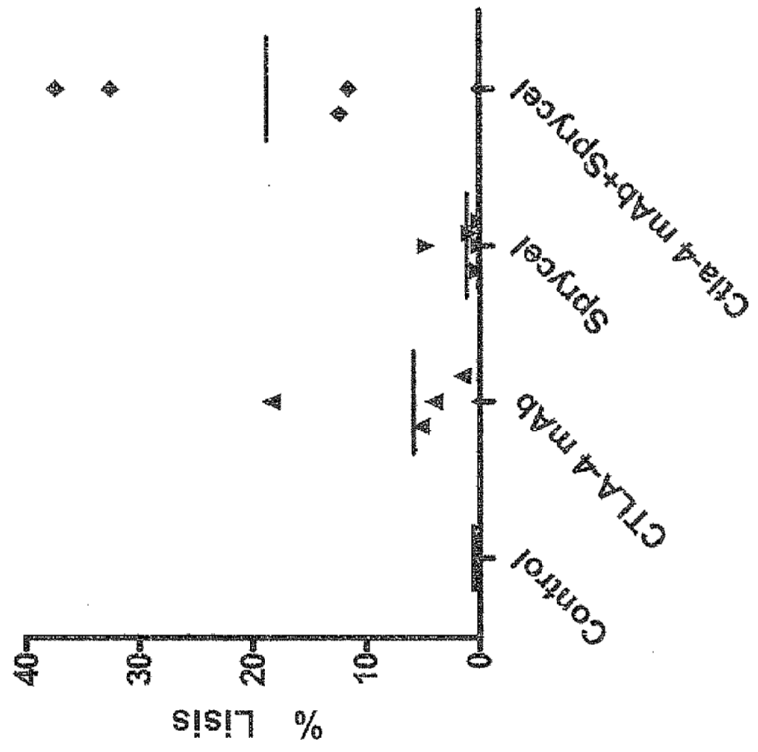


FIG. 3C

día 14

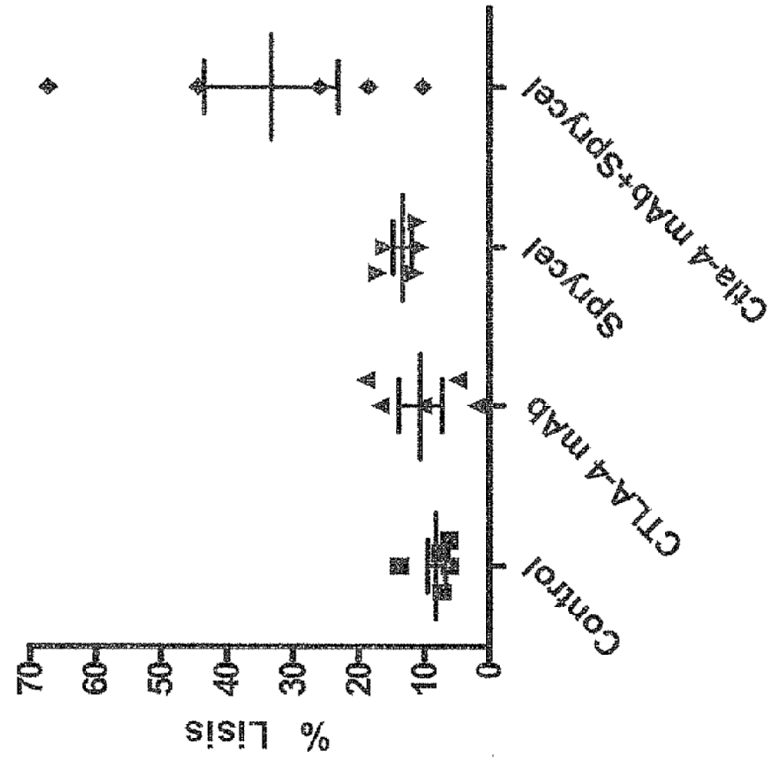


FIG. 4A

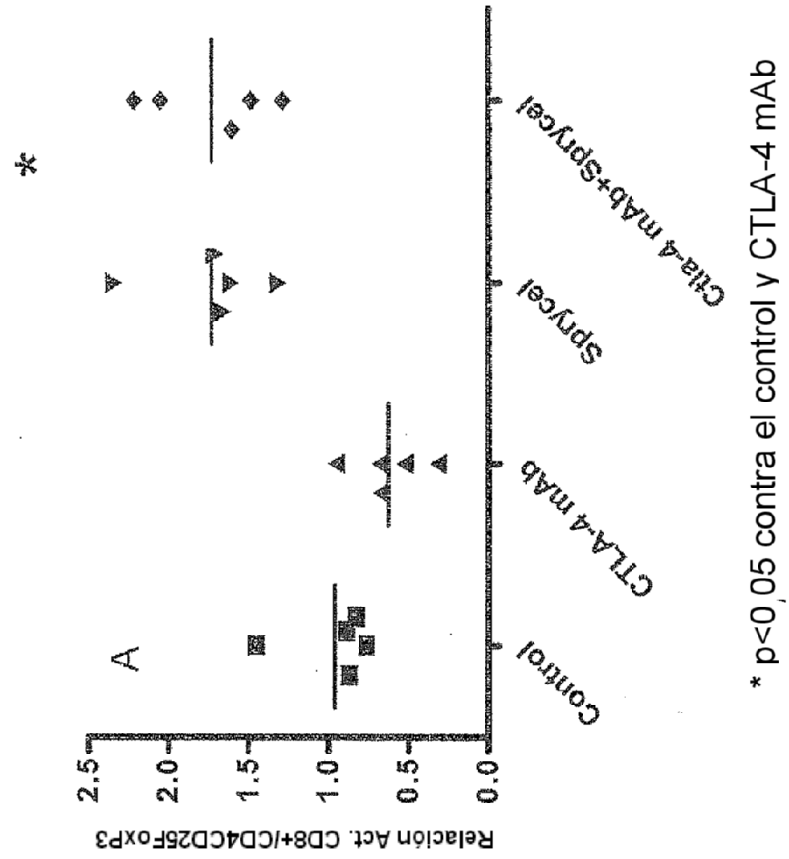


FIG. 4B

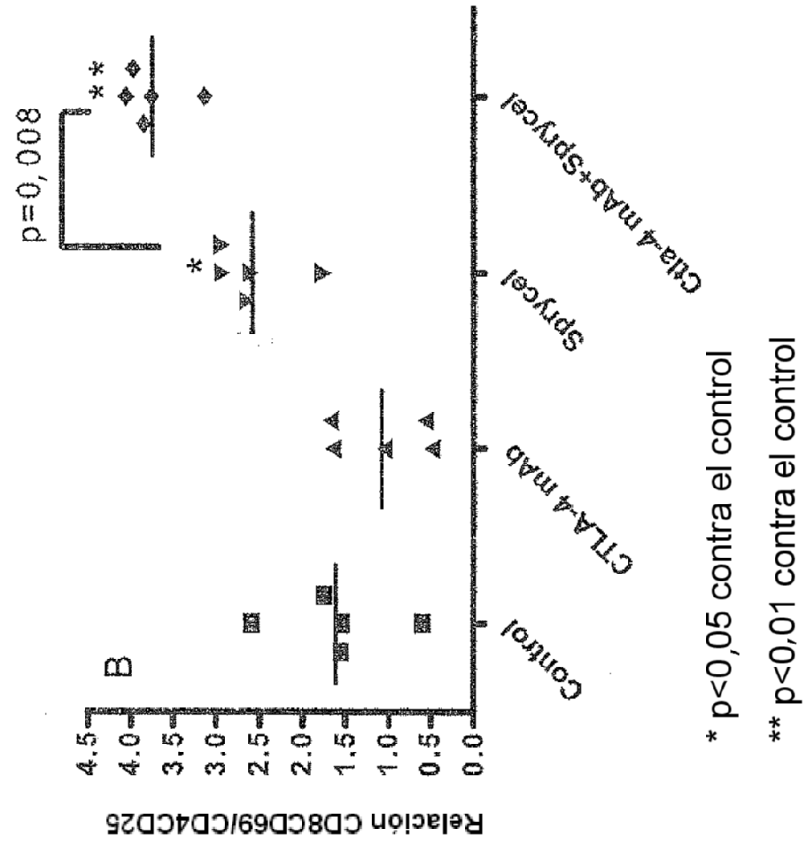
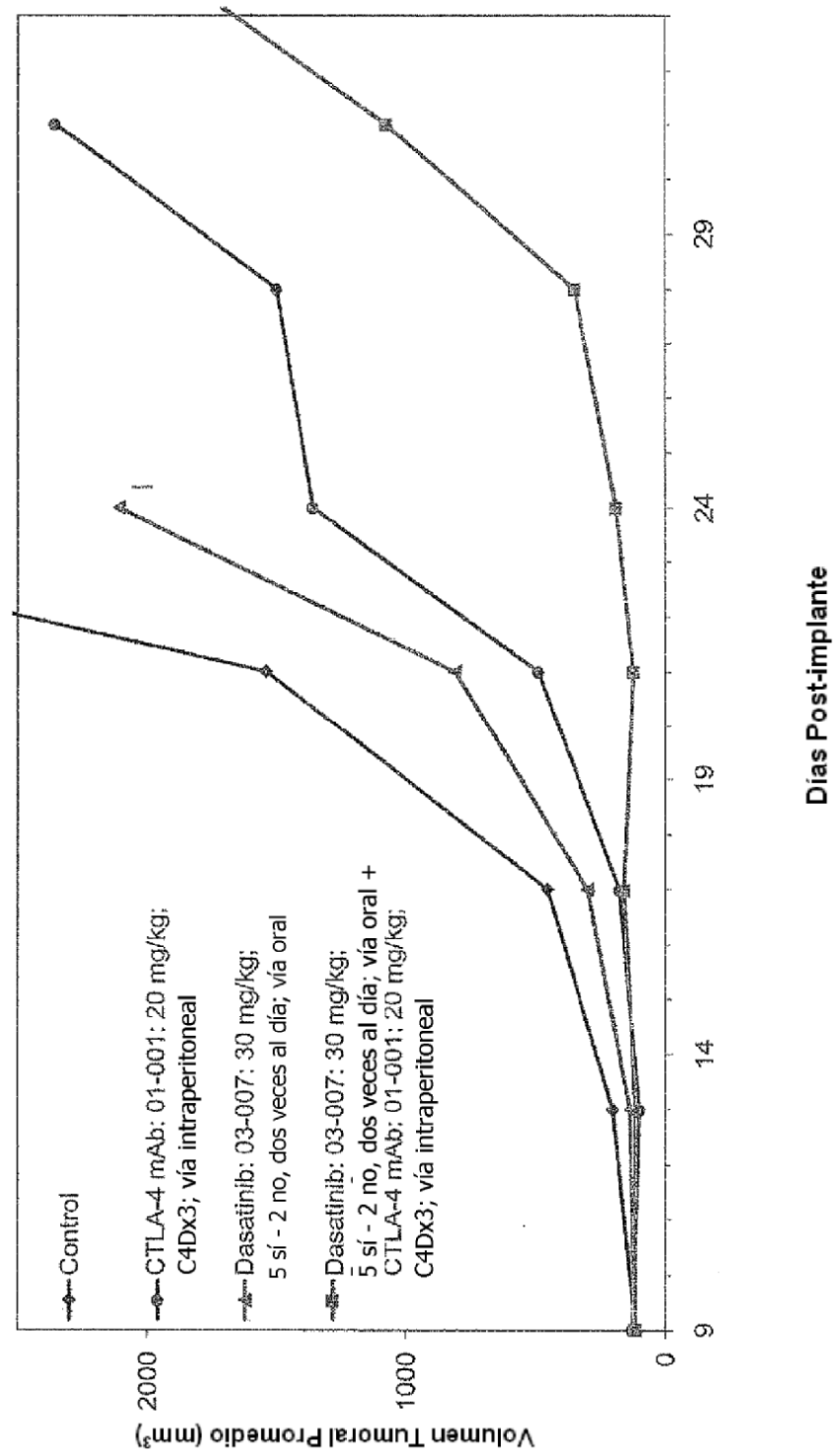


FIG. 5



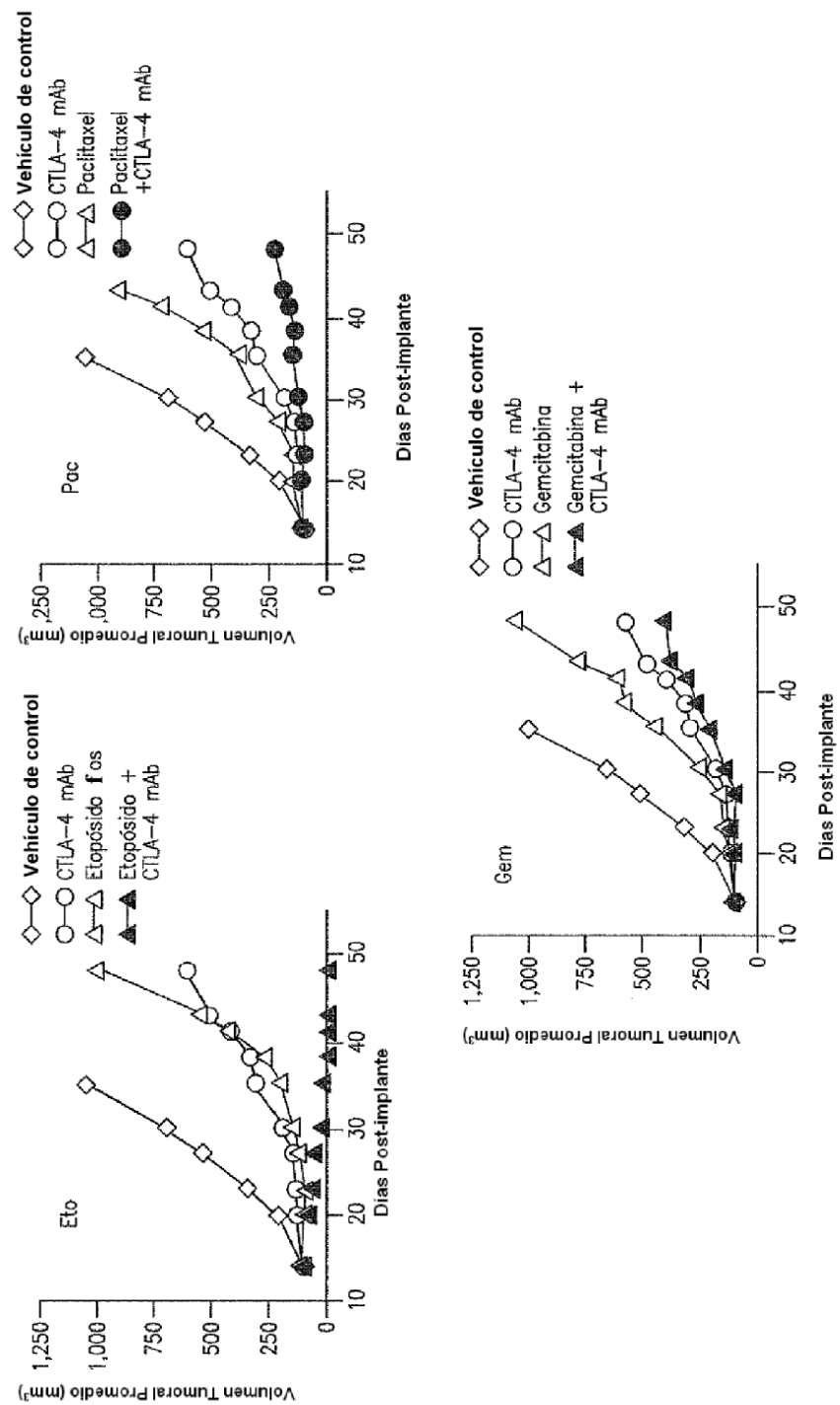


FIG. 6

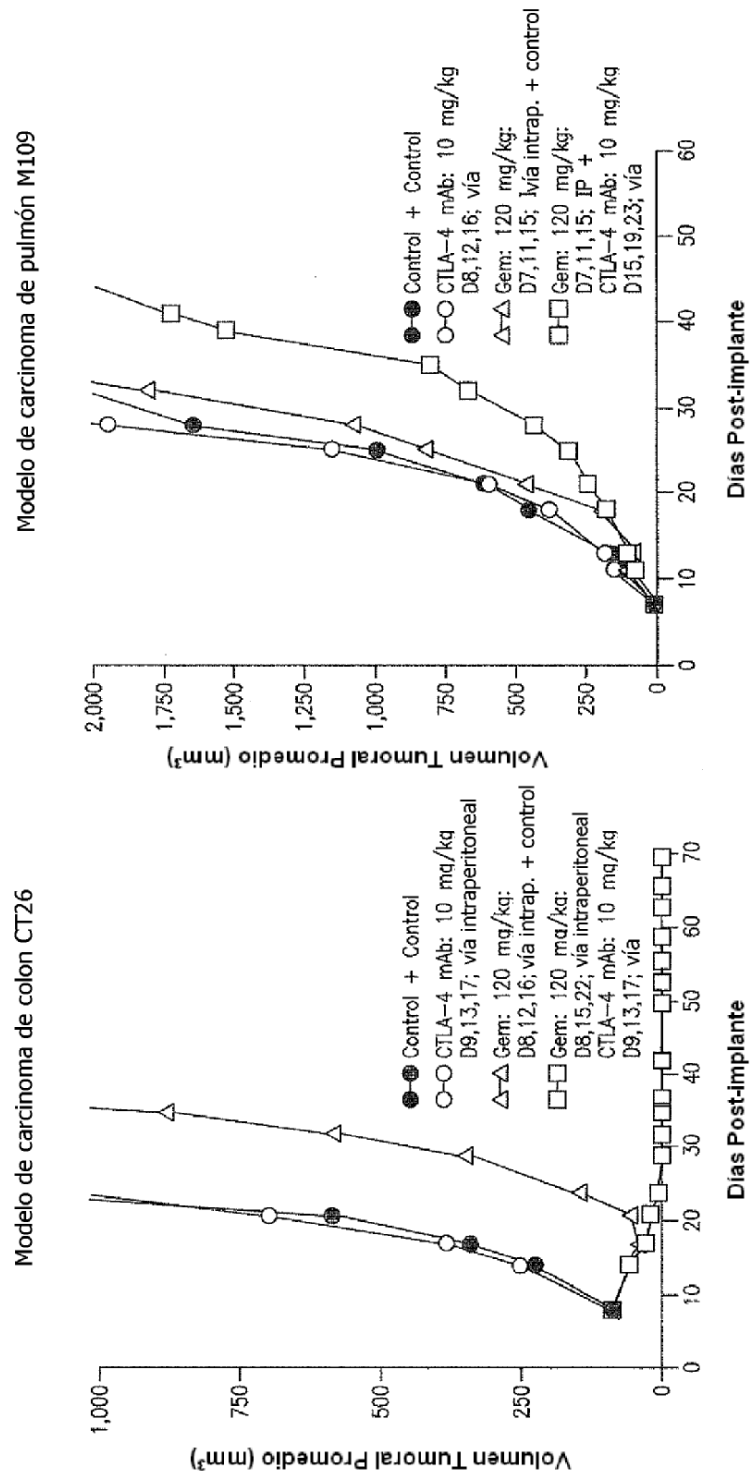
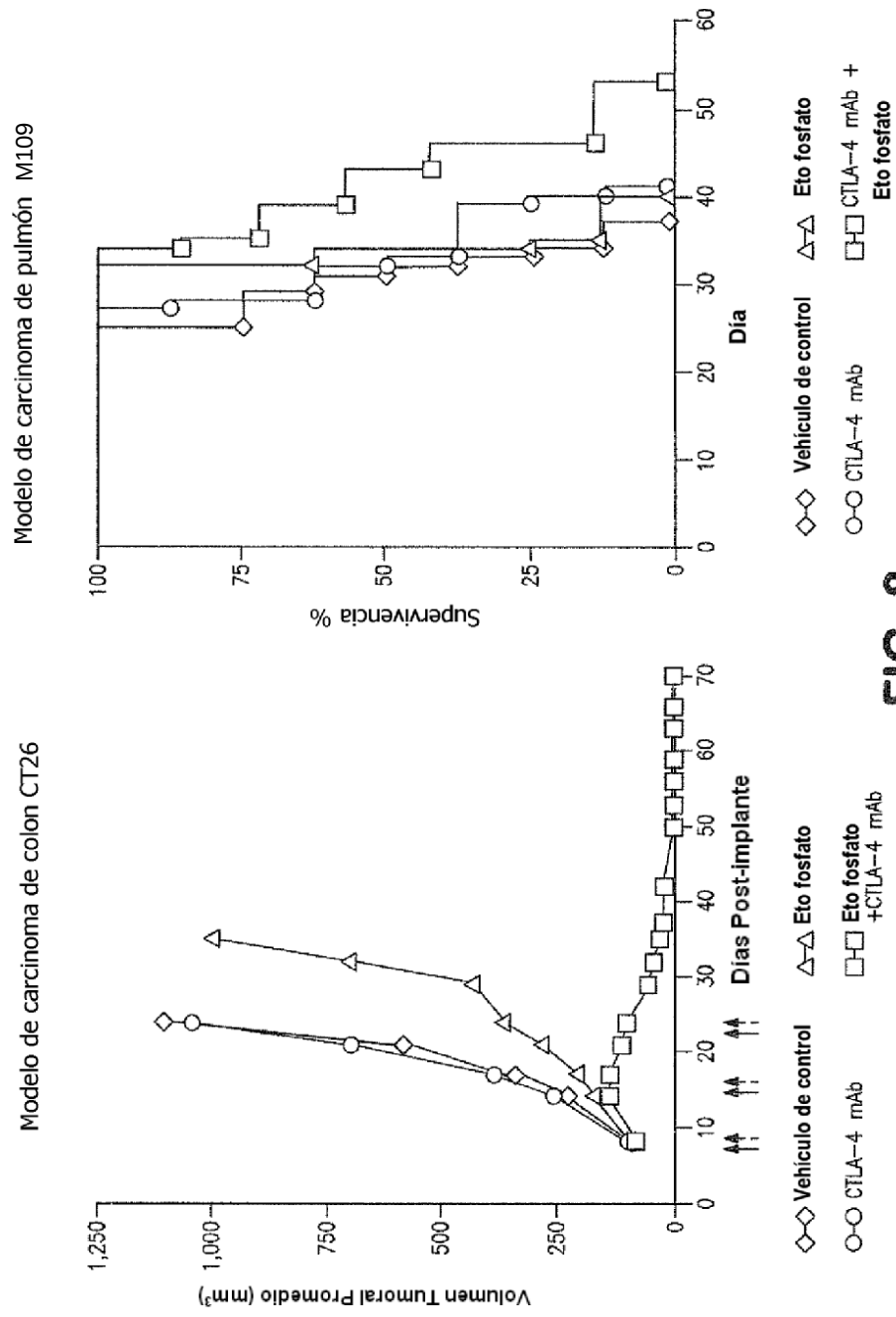


FIG. 7



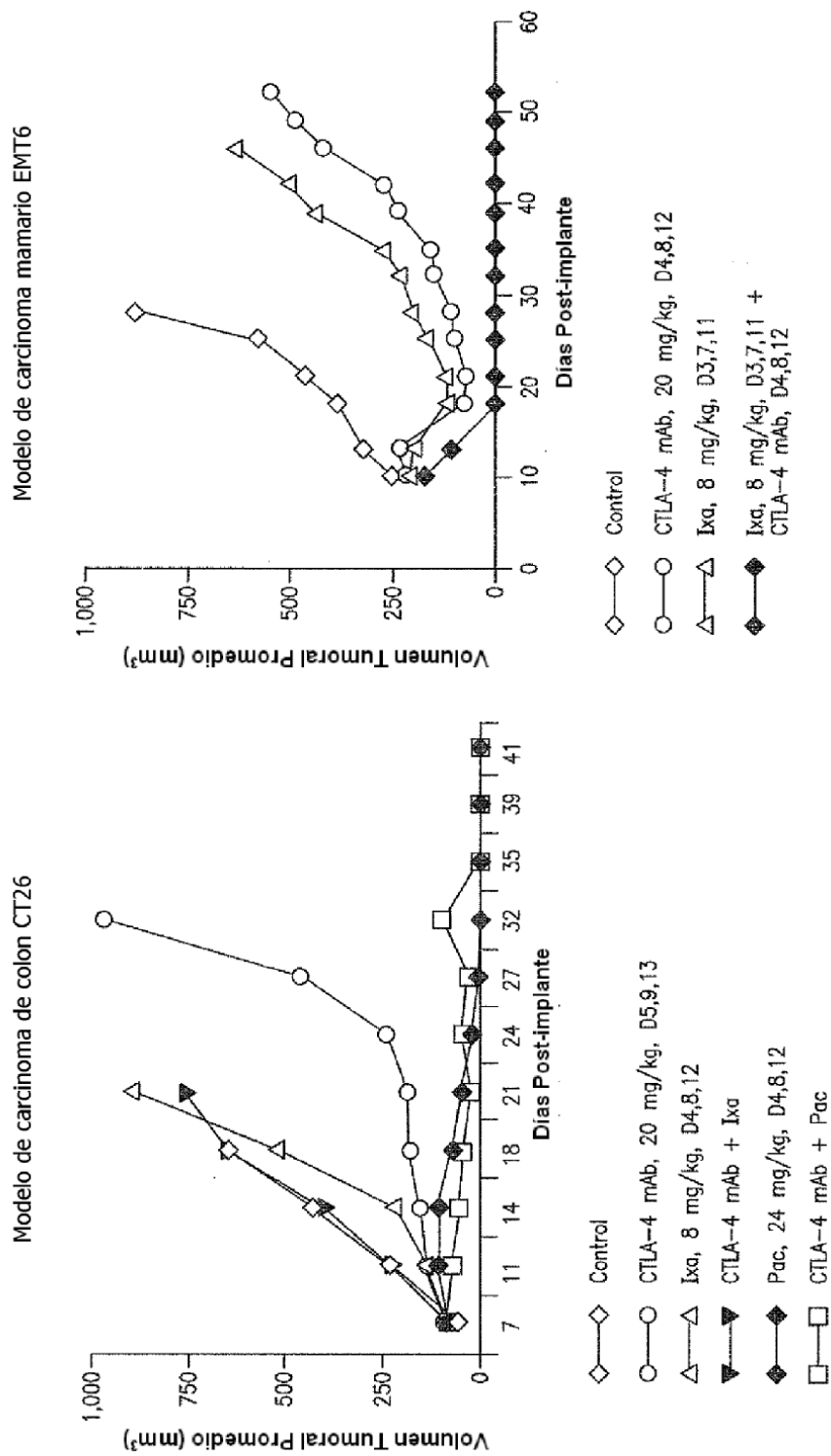


FIG. 9

Modelo de carcinoma de colon CT26

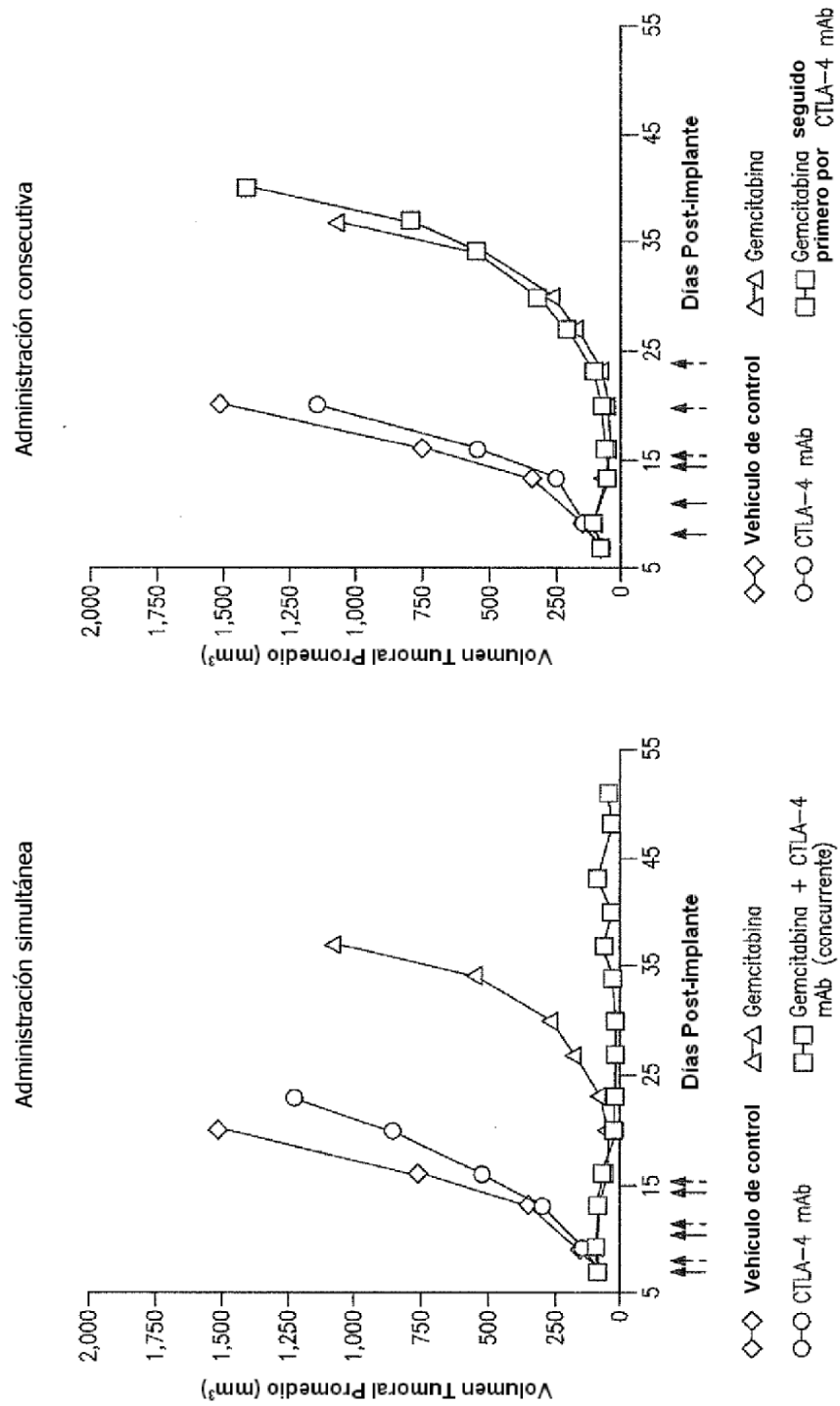


FIG. 10

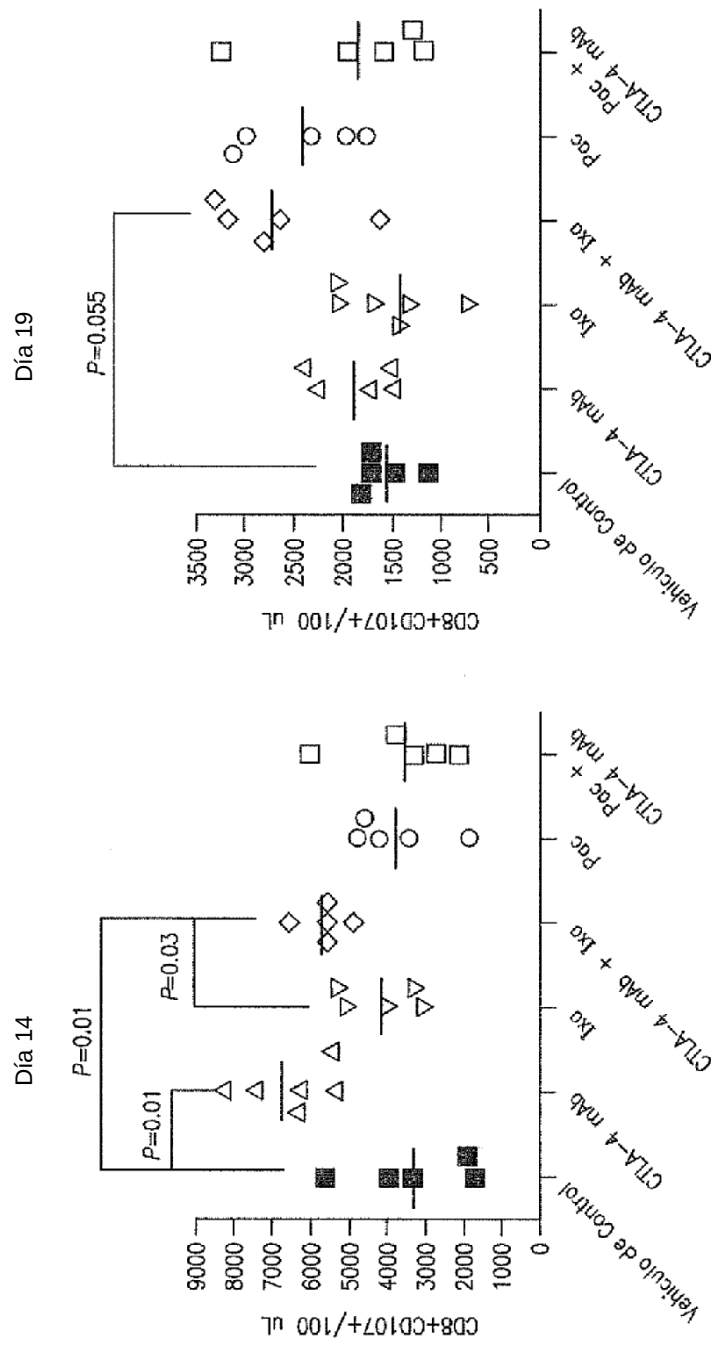
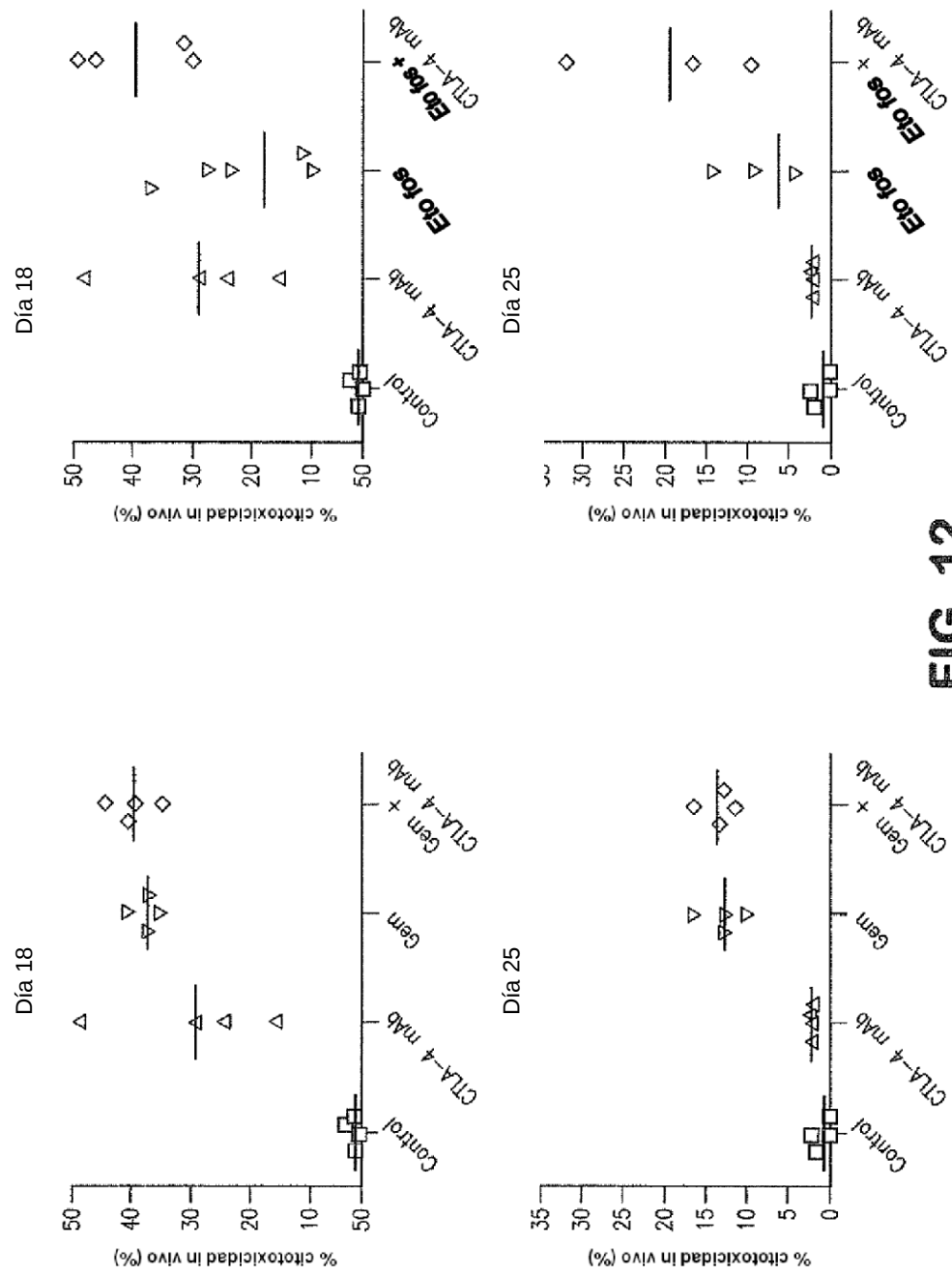


FIG. 11



Efecto sobre el porcentaje de células inmunitarias en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor Día 17				
	CTLA-4 mAb (D8,12,16)	Gemcitabina (D7,11,15)	Gemcitabina + CTLA-4 mAb	
CD4+ CD69+ (CD4 activado+células T)	Aumento (P=0,001)	Sin efecto	Aumento (P=0,004)	
CD8+ CD69+ (CD8 activado+células T)	Sin efecto	Sin efecto	Aumento (P=0,004)	
CD4+ CD25+ FoxP3+ (células reguladoras T)	Aumento (P=0,002)	Descenso (P=0,01)	Sin efecto	
CD11b+Gr1+ (células supresoras obtenidas de mieloide)	Sin efecto	Sin efecto	Descenso (P=0,01)	

FIG. 13

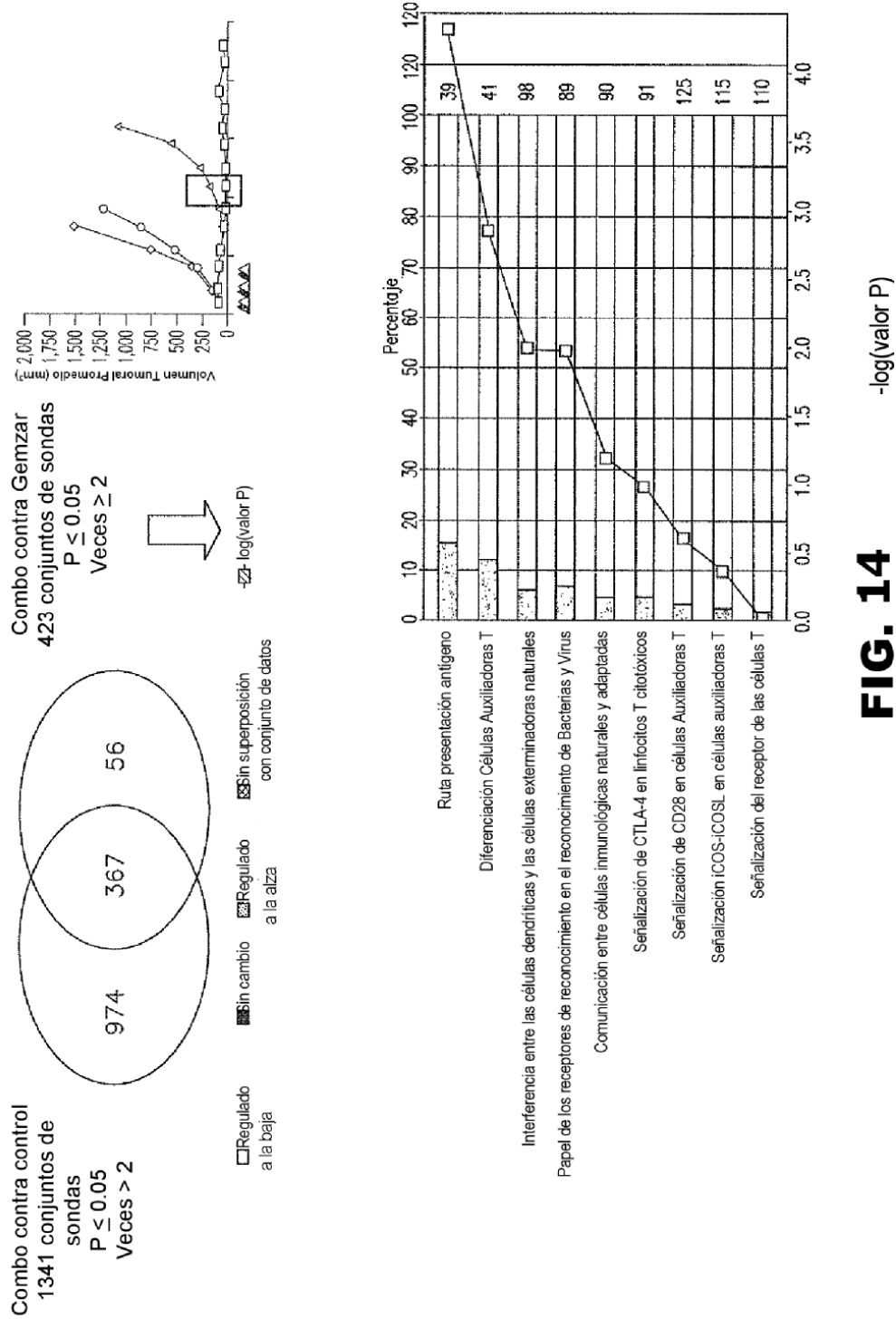


FIG. 14