

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 424**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2015 PCT/US2015/016529**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15130540**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2015 E 15708638 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 3110444**

54 Título: **Terapia de combinación para el cáncer**

30 Prioridad:

**26.02.2014 US 201461944811 P**

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

**15.03.2018**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**CHAN, EDWARD MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 659 424 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

Terapia de combinación para el cáncer

La presente invención se refiere a una combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina con un anticuerpo anti-VEGFR2 humano, preferentemente ramucirumab, y a procedimientos para el uso de la combinación para tratar ciertos trastornos, tales como cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

La presente invención se refiere al campo del tratamiento del NSCLC. El cáncer de pulmón es una de las causas más comunes de muerte por cáncer en hombres y mujeres en todo el mundo. Los dos tipos principales de cáncer de pulmón son el cáncer de pulmón de células pequeñas y el NSCLC. El cáncer de pulmón no microcítico representa aproximadamente el 80% o más de los casos de cáncer de pulmón. El tratamiento puede incluir cirugía, quimioterapia o radioterapia, así como combinaciones de estos tratamientos.

Desafortunadamente, todavía no se ha logrado una cura para el CPCNP y existe una necesidad de más terapias, y diferentes, que puedan demostrar que son efectivas en el tratamiento del CPCNP.

[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina (abemaciclib) es un inhibidor de las quinasas 4 y 6 dependientes de ciclina (CDK4/6). Abemaciclib y los procedimientos de fabricación y uso de este compuesto, incluyendo para el tratamiento del cáncer y más específicamente para el tratamiento de NSCLC se divulgan en el documento WO2010/075074. Además, se ha observado actividad clínica para el compuesto en pacientes con NSCLC.

Ramucirumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2). El Ramucirumab y los procedimientos de fabricación y de uso de este compuesto, incluyendo para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, tales como tumores sólidos y no sólidos, se divulgan en el documento WO2003/075840. Además, se ha informado también acerca de actividad clínica para ramucirumab en pacientes con NSCLC (PRNewswire " Ramucirumab Improved Survival in Second-Line Study of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer "(INDIANAPOLIS, 19 de Febrero de 2014)). El 16 de Diciembre de 2014, la F.D.A. de EE. UU. Aprobó el ramucirumab (Cyramza®) para el tratamiento del NSCLC.

En la presente memoria, se presenta una nueva combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina y ramucirumab. Aunque se han contemplado en la técnica combinaciones de inhibidores de CDK4/6 e inhibidores de VEGFR2, el presente inventor divulga en la presente memoria procedimientos de tratamiento del NSCLC mediante el uso de una nueva combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina y un anticuerpo anti-VEGFR2 como parte de un régimen de tratamiento específico que proporciona efectos terapéuticos beneficiosos mejorados y/o inesperados a partir de la actividad combinada de estos agentes terapéuticos en algunos pacientes con CPCNP en comparación con los efectos terapéuticos proporcionados por cualquiera de los agentes individualmente. El presente inventor divulga también en la presente memoria el tratamiento de NSCLC mediante el uso de una nueva combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina y ramucirumab como parte de un régimen de tratamiento específico que proporciona efectos terapéuticos beneficiosos mejorados y/o inesperados a partir de la actividad combinada de estos agentes terapéuticos en algunos pacientes con CPCNP en comparación con los efectos terapéuticos proporcionados por cualquiera de los agentes individualmente.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un tratamiento del NSCLC en un paciente, que comprende administrar a un paciente con CPCNP que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con un cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGFR2. La presente invención proporciona también un tratamiento del NSCLC en un paciente, que comprende administrar a un paciente con CPCNP que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con ramucirumab. Opcionalmente, estos tratamientos comprenden además la administración de una cantidad efectiva de uno o más agentes antitumorales seleccionados de entre el grupo que consiste en pemetrexed, gemcitabina, docetaxel, bevacizumab, carboplatino y cisplatino. Una cantidad efectiva de estos agentes antitumorales es típicamente la dosis indicada en la etiqueta de esos agentes.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente

aceptables, en combinación con una composición farmacéutica de un anticuerpo anti-VEGFR2, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, en combinación con una composición farmacéutica de ramucirumab, con uno o más más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Además, la invención proporciona un kit que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un anticuerpo anti-VEGFR2. La invención proporciona también un kit que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y ramucirumab. La invención proporciona además un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-VEGFR2, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La invención proporciona también un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, y una composición farmacéutica que comprende ramucirumab, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona además una combinación que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un anticuerpo anti-VEGFR2, para su uso simultáneo, por separado o de manera secuencial en el tratamiento de NSCLC.

La invención proporciona además una combinación que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y ramucirumab, para su uso simultáneo, por separado o de manera secuencial en el tratamiento de NSCLC.

La invención proporciona además el uso de una combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un anticuerpo anti-VEGFR2 en terapia. La invención proporciona además el uso de una combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un anticuerpo anti-VEGFR2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NSCLC.

La invención proporciona además el uso de una combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y ramucirumab en terapia. La invención proporciona además el uso de una combinación de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y ramucirumab para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NSCLC.

Otro aspecto de la presente invención es un tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico en un paciente, que comprende administrar a un paciente con cáncer de pulmón no microcítico que necesita tratamiento:

- a) ramucirumab a 10 mg/kg el día 1 de un ciclo de 21 días; y
- b) [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, a 50-200 mg PO cada 12 horas los días 1-21 de un ciclo de 21 días.

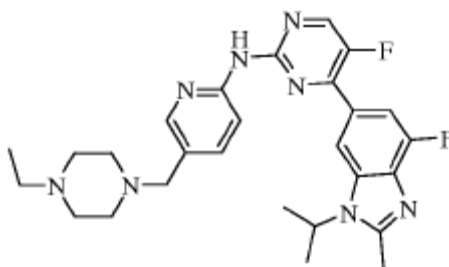
Un aspecto adicional de la presente invención proporciona:

- a) el uso de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NSCLC;
- b) el uso de ramucirumab para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NSCLC;

en el que ramucirumab se administra a 10 mg/kg IV el día 1 de un ciclo de 21 días y [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se administra a 50-200 mg PO cada 12 horas los días 1-21 de un ciclo de 21 días.

5 Como se usa en la presente memoria, el nombre del compuesto es "[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina" se divulga en el documento WO2010/075074 y se refiere al compuesto con la estructura siguiente:

10



15

El número de registro CAS de este compuesto es 1231929-97-7. El nombre genérico para el compuesto es abemaciclib. Los nombres alternativos del compuesto incluyen 2-pirimidinamina, N-[5-[(4-etil-1-piperazinil)metil]-2-piridinil]-5-fluoro-4-[4-fluoro-2-metil-1-(1-metiletil)-1H-benzimidazol-6-il]-, 1-[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, y N-(5-[(4-etilpiperazin-1-il)metil]piridin-2-il)-5-fluoro-4-(4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzimidazol-6-il)pirimidin-2-amina.

20

Como se usa en la presente memoria, el término "VEGFR2" se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 9. VEGFR2 se conoce también como KDR.

25

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo anti-VEGFR2" se refiere a un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 2, y una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 4, en la que el anticuerpo anti-VEGFR2 se une a VEGFR2 con suficiente afinidad y especificidad. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGFR2 es un anticuerpo que comprende: una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 6, y una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 8 y que se une a VEGFR2 con suficiente afinidad y especificidad. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo anti-VEGFR2 es ramucirumab. El anticuerpo seleccionado tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte para VEGFR2. Por ejemplo, el anticuerpo se unirá generalmente a VEGFR2 con un valor  $K_d$  de entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1 pM. Las afinidades de los anticuerpos pueden determinarse mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie (como el ensayo BIAcore descrito en la publicación de solicitud PCT N° WO2005/012359); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competencia (por ejemplo, un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA)), por ejemplo. En una realización,  $K_d$  se mide mediante un ensayo RIA realizado con un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab.

35

Como se usa en la presente memoria, el término "ramucirumab" conocido también como Cyramza®, IMC-1121b, número de registro CAS 947687-13-0, se refiere a un anticuerpo anti-VEGFR2 que comprende: dos cadenas ligeras, cada una de cuyas secuencias de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 6, y dos cadenas pesadas, cada una de cuyas secuencias de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 8.

40

A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por enlaces disulfuro. La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 110 aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento del antígeno mediante las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) contenidas en la misma. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante, responsable principalmente de la función efectora.

45

Como se usa en la presente memoria, la expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a cualquier fragmento de anticuerpo que retiene la capacidad de unirse a su antígeno. Dichos "fragmentos de unión a antígeno" pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc fragmentos y diacuerpos. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos una región variable. Preferentemente, un fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR). Más preferentemente, un fragmento de unión a

50

antígeno, como se usa en la presente memoria comprende una HCVR y una LCVR que confieren especificidad de unión a antígeno para VEGFR2 (es decir, un "fragmento de unión a VEGFR2").

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "región variable de cadena ligera (LCVR)" se refiere a una porción de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo que incluye secuencias de aminoácidos de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y las regiones marco (FR).

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "región variable de la cadena pesada (HCVR)" se refiere a una porción de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo que incluye secuencias de aminoácidos de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y las regiones marco (FR).

15 Como se usan en la presente memoria, las expresiones "región determinante de complementariedad" y "CDR" se refieren a los sitios de combinación de antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de los polipéptidos LC y HC de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Estas regiones particulares han sido descritas por otros autores incluyendo Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971)); Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252: 6609-6616 (1977)); Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242 (1991); Chothia, et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)); MacCallum, et al., *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996)); y North, et al., *J. Mol. Biol.*, 406, 228-256 (2011), donde las definiciones incluyen residuos de aminoácidos superpuestos o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí.

20 Las CDRs están intercalados con regiones más conservadas, denominadas regiones marco ("FR"). Cada LCVR y HCVR está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las tres CDR de la cadena ligera se conocen como "LCDR1, LCDR2 y LCDR3" y las tres CDRs de la cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3". Las CDRs contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y el posicionamiento de residuos de aminoácidos CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR son según las convenciones conocidas (por ejemplo, Kabat (1991), Chothia (1987) y/o North (2011)). En diferentes realizaciones de la invención, las FRs del anticuerpo pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse natural o artificialmente.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "DC101" se refiere a un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra VEGFR2 de ratón que puede usarse en experimentos como un sustituto en ratones para un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab. Véase, por ejemplo, Witte L., et al. *Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (F1k1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. Cancer Metastasis Rev.*, 17: 155-161, 1998; y/o Prewett M., et al., *Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. Cancer Res.*, 59: 5209-5218, 1999.

40 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGFR2 proporcionado en la presente memoria para los procedimientos de la presente invención se altera para aumentar o disminuir el grado de glicosilación del anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede realizarse de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o se eliminen uno o más sitios de glicosilación.

45 Cuando el anticuerpo anti-VEGFR2 comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido a la misma puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico, ramificado, que generalmente está unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15: 26-32 (1997)) El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenarica. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

50 En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo anti-VEGFR2 que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1% al 80%, del 1% al 65%, del 5% al 65% o del 20% al 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad media de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con relación a la suma de todas las gluco-estructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alta cantidad de manosa) según se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina situado

aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 puede estar situado también aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos aguas arriba o aguas abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente US N° 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con las variantes de anticuerpos "defucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; y Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)) Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arco. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986)); solicitud de patente US N° 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., y líneas celulares knockout, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO knockout (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)); Kanda, Y et al., Biotechnol. Bioeng., 94 (4): 680-688 (2006); y WO2003/085107).

Como se usa en la presente memoria, el término "kit" se refiere a un paquete que comprende al menos dos recipientes separados, en el que un primer recipiente contiene [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un segundo recipiente que contiene un anticuerpo VEGFR2. Como se usa en la presente memoria, el término "kit" se refiere también a un paquete que comprende al menos dos recipientes separados, en el que un primer recipiente contiene [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un segundo recipiente que contiene ramucirumab. Un "kit" puede incluir también instrucciones para administrar la totalidad o parte del contenido de estos recipientes primero y segundo a un paciente con cáncer, preferentemente un paciente con NSCLC.

Como se usan en la presente memoria, los términos "que trata", "tratar" o "tratamiento" se refieren a restringir, ralentizar, detener, reducir o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente.

Como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano.

Como se usan en la presente memoria, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en pacientes que está caracterizada típicamente por la proliferación celular no regulada. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos. Por "cáncer en etapa inicial" o "tumor en etapa inicial" se entiende un cáncer que no está avanzado o no es metastásico o está clasificado como cáncer en Etapa 0, I o II. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, NSCLC.

Una ventaja principal de los tratamientos de combinación de la invención es la capacidad de producir efectos anticancerígenos marcados en un paciente sin causar toxicidades o efectos adversos considerables, de manera que el paciente se beneficia del procedimiento de tratamiento de combinación global. La eficacia del tratamiento de combinación de la invención puede medirse por diversos criterios de valoración usados comúnmente en la evaluación de los tratamientos contra el cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, regresión tumoral, reducción del peso o del tamaño tumoral, tiempo hasta la progresión, supervivencia global, supervivencia sin progresión, tasa de respuesta global, duración de la respuesta y calidad de vida. Los agentes terapéuticos usados en la invención pueden causar la inhibición de la difusión metastásica sin contracción del tumor primario, pueden inducir contracción del tumor primario, o pueden simplemente ejercer un efecto de detención del desarrollo de un tumor (efecto tumoristático). Debido a que la invención se refiere al uso de una combinación de agentes antitumorales únicos, opcionalmente, pueden emplearse enfoques novedosos para determinar la eficacia de cualquier terapia de combinación particular de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, la medición de marcadores de angiogénesis en plasma o urinarios y medición de la respuesta mediante obtención de imágenes radiológicas.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "respuesta completa" (CR) se refiere a la desaparición de todas las lesiones objetivo. Cualquier ganglio linfático patológico (objetivo o no objetivo) debe tener una reducción en el eje corto a  $<10$  mm.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "respuesta parcial" (PR) se refiere a al menos una reducción del 30% en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, tomando como referencia la suma de los diámetros de referencia.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad progresiva" (PD) se refiere a un aumento de al menos un 20% en la suma de diámetros de las lesiones objetivo, tomando como referencia la suma más pequeña en el estudio (esta incluye la suma de referencia si es la más pequeña en el estudio). Además del aumento relativo

del 20%, la suma debe demostrar también un aumento absoluto de al menos 5 mm (Nota: la aparición de una o más lesiones nuevas se considera también progresión).

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad estable" (SD) se refiere a aquellas con una contracción no suficiente para ser calificadas como PR y con un aumento no suficiente para ser calificadas como PD, tomando como referencia los diámetros más pequeños de la suma durante el estudio.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "respuesta objetiva" (OR) se refiere a la suma de CR más PR.

El experto en la materia apreciará que los términos CR, PR, PD, SD y OR corresponden a las definiciones según RECIST v1.1, Eisenhauer y otros, European Journal of Cancer, 2009, 45, 228-247.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "tiempo hasta la progresión de la enfermedad" o "TTP" se refiere al tiempo, generalmente medido en semanas o meses, desde el momento del tratamiento inicial, hasta que el cáncer progresa o empeora. Dicha progresión puede ser evaluada por el médico experto.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "extensión del TTP" se refiere a aumentar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad en un paciente tratado con relación a i) un paciente o pariente no tratado, o ii) un paciente tratado con menos agentes que todos los agentes antitumorales en una terapia de combinación particular.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "supervivencia" se refiere al paciente que permanece vivo, e incluye la supervivencia global, así como la supervivencia sin progresión

Como se usa en el presente documento, la expresión "supervivencia global" se refiere al paciente que permanece con vida durante un período de tiempo definido, como 1 año, 5 años, etc. desde el momento del diagnóstico o del tratamiento.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "supervivencia sin progresión" se refiere a que el paciente permanece con vida, sin que el cáncer progrese o empeore.

25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "extensión de la supervivencia" significa incrementar la supervivencia global o sin progresión en un paciente tratado con relación a i) un paciente no tratado, ii) un paciente tratado con menos agentes que todos los agentes antitumorales en una terapia de combinación particular, o iii) un protocolo de tratamiento de control. La supervivencia se supervisa durante al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente seis meses, al menos aproximadamente nueve meses, o al menos aproximadamente 1 año, o al menos aproximadamente 2 años, o al menos aproximadamente 3 años, o al menos aproximadamente 4 años, o al menos aproximadamente 5 años, o al menos aproximadamente 10 años, etc., después del inicio del tratamiento o después del diagnóstico inicial de cáncer.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "tumor primario" o "cáncer primario" se refiere al cáncer original y no a una lesión metastásica situada en otro tejido, órgano o ubicación en el cuerpo del sujeto.

35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y a la cantidad o dosis de un anticuerpo anti-VEGFR2 que, tras la administración una sola dosis o múltiples dosis al paciente, proporciona una respuesta efectiva en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad efectiva" se refiere también a la cantidad o dosis de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y a la cantidad o dosis de ramucirumab, que, tras la administración una sola dosis o múltiples dosis al paciente, proporciona una respuesta efectiva en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Se entiende que una terapia de combinación de la presente invención se lleva a cabo administrando [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un anticuerpo anti-VEGFR2 de cualquier manera que proporcione niveles efectivos de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el anticuerpo anti-VEGFR2 en el cuerpo. Se entiende también que una terapia de combinación de la presente invención se lleva a cabo administrando [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con ramucirumab en cualquier manera que proporcione niveles efectivos de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y ramucirumab en el cuerpo.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "respuesta efectiva" de un paciente o "capacidad de respuesta" de un paciente al tratamiento con una combinación de agentes y expresiones similares se refieren al beneficio clínico o terapéutico impartido a un paciente tras la administración conjunta de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el anticuerpo anti-VEGFR2. Como se usa en la presente memoria, las expresiones "respuesta efectiva" de un paciente o "capacidad de respuesta" de un paciente al tratamiento con una combinación de agentes y expresiones similares se refieren también al beneficio clínico o terapéutico impartido a un paciente tras la administración conjunta de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y ramucirumab. Dicho beneficio incluye uno o más de entre: prolongar la supervivencia (incluyendo la supervivencia global y la supervivencia sin progresión); resultar en una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta completa o una respuesta parcial); o mejorar las señales o los síntomas de cáncer, etc.

Una cantidad efectiva puede ser determinada fácilmente por un especialista en diagnóstico, como un experto en la materia, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad efectiva para un paciente, el especialista en diagnóstico considera diversos factores, que incluyen, pero no se limitan a: la especie del paciente; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico implicado; el grado de implicación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es generalmente efectiva en un amplio intervalo de dosificación en la combinación de la presente invención. Por ejemplo, las dosificaciones por día están comprendidas normalmente en el intervalo de aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 400 mg/día, preferentemente de aproximadamente 200 mg/día a aproximadamente 400 mg/día, y más preferentemente de aproximadamente 300 mg/día a aproximadamente 400 mg/día. Además, un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, es generalmente efectivo en un amplio intervalo de dosificación en la combinación de la presente invención. Por ejemplo, las dosificaciones por cada ciclo de tres semanas normalmente están comprendida en el intervalo de aproximadamente 6 a 10 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 mg/kg, y más preferentemente de aproximadamente 10 mg/kg. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos indicados anteriormente para [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis más pequeñas o todavía más grandes con efectos secundarios aceptables y, por lo tanto, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar, en modo alguno, el alcance de la invención. Cuando se proporciona en combinación con un anticuerpo anti-VEGFR2, por ejemplo, durante un ciclo de 21 días, la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra diariamente en el intervalo de aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 400 mg/día y un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, se administra el primer día en el intervalo de aproximadamente 6 a 10 mg/kg. Cuando se proporcionan en combinación, por ejemplo, durante un ciclo de 21 días, la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra diariamente en el intervalo de aproximadamente 200 mg/día a aproximadamente 400 mg/día y un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, se administra el primer día en el intervalo de aproximadamente 8 a 10 mg/kg. Cuando se proporcionan en combinación, por ejemplo, durante un ciclo de 21 días, la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra diariamente en el intervalo de aproximadamente 300 mg/día a aproximadamente 400 mg/día y un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, se administra el primer día a aproximadamente 10 mg/kg.

La base libre, 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, es preferente. Sin embargo, el lector experto entenderá que 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina es capaz de formar sales. 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede reaccionar con cualquiera de entre una serie de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Dichas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); L.D. Bighley, S.M. Berge, D.C. Monkhouse, en "Encyclopedia of Pharmaceutical



Technology", Eds. J. Swarbrick y J.C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basilea, Hong Kong 1995, pp. 453-499.; S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, N° 1, Enero de 1977. Las sales de clorhidrato y mesilato son sales preferentes. La sal de mesilato es una sal especialmente preferente.

5 La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante cualquier vía que haga que el compuesto esté biodisponible. La vía de administración puede variarse de cualquier manera, limitada por las propiedades físicas de los fármacos y la conveniencia del paciente y del cuidador.  
 10 Preferentemente, la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra por vía oral. Preferentemente, las composiciones de anticuerpo anti-VEGFR2, preferentemente ramucirumab, se formulan para administración parenteral, como administración intravenosa o subcutánea. Además, la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se formula para la administración oral o parenteral, incluyendo la administración intravenosa o subcutánea. Dichas composiciones farmacéuticas y dichos procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, editor, 21ª edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

20 Como se usa en la presente memoria, la frase "en combinación con" se refiere a la administración de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un anticuerpo anti-VEGFR2 de manera simultánea. Como se usa en la presente memoria, la frase "en combinación con" se refiere también a la administración de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un anticuerpo anti-VEGFR2 de manera secuencial, en cualquier orden. Como se usa en la presente memoria, la frase "en combinación con" se refiere también a la administración de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un anticuerpo anti-VEGFR2 en cualquier combinación de los mismos. Como se usa en la presente memoria, la frase "en combinación con" se refiere también a la administración de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con ramucirumab, de manera simultánea. Como se usa en la presente memoria, la frase "en combinación con" se refiere también a la administración de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con ramucirumab, en cualquier combinación de los mismos. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina y un anticuerpo anti-VEGFR2 pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas.  
 40 La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina y ramucirumab pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse antes de la administración de un anticuerpo anti-VEGFR2. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse al mismo tiempo que la administración de un anticuerpo anti-VEGFR2. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse después de la administración de un anticuerpo anti-VEGFR2. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de un anticuerpo anti-VEGFR2 o en alguna combinación de los mismos. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse antes de la administración de ramucirumab. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse al mismo tiempo que la administración de ramucirumab. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse después de la administración de ramucirumab. La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de ramucirumab, o en alguna combinación de los mismos. Cuando se administra un anticuerpo anti-VEGFR2 a intervalos repetidos (por ejemplo, durante un ciclo de tratamiento estándar), la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse antes de cada administración de



- 2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse en una única dosis antes del ciclo de tratamiento con ramucirumab. Cuando se administra ramucirumab a intervalos repetidos (por ejemplo, durante un ciclo de tratamiento estándar), la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse en una única dosis en cualquier momento durante el ciclo del tratamiento con ramucirumab. Cuando se administra ramucirumab a intervalos repetidos (por ejemplo, durante un ciclo de tratamiento estándar), la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse en una serie de dosis antes del ciclo de tratamiento con ramucirumab. Cuando se administra ramucirumab a intervalos repetidos (por ejemplo, durante un ciclo de tratamiento estándar), la [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede administrarse en una serie de dosis después del ciclo de tratamiento con ramucirumab.
- La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica.

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención. A menos que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente memoria se nombran y se numeran usando ChemDraw® Ultra 5.0.

#### Preparación 1

##### 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina

- Se añadió 1-etilpiperazina pura (5,6 kg) a una mezcla de 6-bromo-piridin-3-carbaldehído (8,3 kg) y diclorometano (186 kg). A continuación, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (10,9 kg) en porciones y se agitó a 20-30°C durante 12 horas. La reacción se desactivó en una mezcla de diclorometano (36 kg) y una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 N (46 kg). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con diclorometano (24 X 2 kg). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (50 X 2 kg) y el disolvente se eliminó bajo vacío para proporcionar 11,5 kg del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 285 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Preparación 2

##### 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina

- Se añadió amoníaco líquido (50,0 kg) a una mezcla desgasificada de 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina (14,2 kg), óxido cuproso (200 g) y MeOH (57 kg) a T ≤ 40°C. La mezcla se calentó a 65-75°C durante la noche. Se enfrió a 20-30°C y se filtró sobre una almohadilla CELITE®. El filtrado se concentró y se añadió diclorometano (113 kg) y el pH se ajustó a 12-14 con hidróxido de sodio 2 N (23 kg), las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con diclorometano (58 X 2 kg) y las capas orgánicas se combinaron. La mezcla se filtró a través de CELITE® y se concentró. El residuo se disolvió en tolueno (9,7 kg) y se cristalizó mediante la adición de metil tert-butil éter (8,3 kg) para dar 6,0 kg del compuesto del título. Se obtuvo una purificación adicional mediante una recristalización de tolueno. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 221 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Preparación 3

##### N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina

- Se añadió trietilamina (10,05 ml) a una mezcla de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina (10,0 g), N-isopropil acetamida (9,73 g), cloruro de fosforilo (6,70 ml) en tolueno (150 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se enfrió y el disolvente se eliminó bajo vacío. El crudo se disolvió en diclorometano, se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio varias veces para eliminar todas las trazas de ácido. Se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se eliminó bajo vacío para proporcionar 14 g del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 292 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Preparación 4

##### 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

- Se añadió tert-butóxido de potasio (6,9 kg) en porciones a una solución de N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina (16,2 kg) en N-metil formamida (76 kg) mientras se mantenía la temperatura a T < 30°C. La mezcla se calentó a 70-75°C hasta que se completó como se determinó mediante HPLC. Se enfrió a 20-30°C y se desactivó añadiendo al agua (227 kg) y a continuación se extrajo con metil tert-butil éter (37 X 4 kg). Las fases

orgánicas combinadas con salmuera (49 X 2 kg) se lavaron y se concentraron a 25-30 l, se añadió n-hexano (64 kg) y la suspensión se filtró para dar 11 kg del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 272 (M+H)<sup>+</sup>.

Se obtuvo una purificación adicional disolviendo el compuesto crudo en diclorometano y filtrando a través de un gel de sílice y una almohadilla CELITE®, seguido del aislamiento de una mezcla de metil tert-butil éter/hexano.

#### 5 Preparación 5

##### 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2] dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol

Se burbujeó nitrógeno en una mezcla de 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (30,0 g), bis(pinacolato)diboro (42,15 g), triciclohexilfosfina (5,43 g), acetato de potasio (32,58 g) y dimetilsulfóxido (200 ml). Se añadió acetato de paladio (2,8 g) y se calentó en baño de aceite precalentado a 90°C durante 1 hora. Se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se filtró sobre una almohadilla CELITE®. La mezcla se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se eliminó bajo vacío. El sólido se trituró con hexano y se filtró para proporcionar 27 g del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 319 (M+H)<sup>+</sup>.

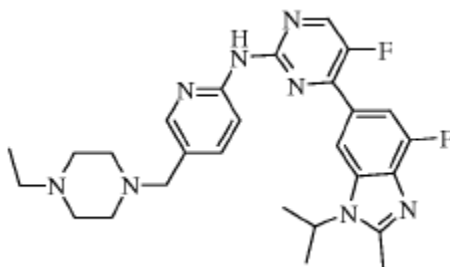
#### Preparación 6

##### 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

Se burbujeó nitrógeno en una mezcla de 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina (12,7 g), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (4,9 g), carbonato de sodio 2 M en agua (103,7 ml) y 1,2-dimetoxietano (120 ml). Se calentó en un baño de aceite precalentado a 80°C y se añadió gota a gota una solución de 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol (22 g) en 1,2-dimetoxietano (200 ml). La mezcla se agitó a 84°C durante 1 hora. Se enfrió a temperatura ambiente, se añadió acetato de etilo (800 ml) y se lavó dos veces con salmuera (100 ml). Se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó bajo vacío. Se trituró con acetonitrilo para proporcionar 14,4 g del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 323 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo de referencia 1

[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina



Se burbujeó nitrógeno en una mezcla de 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (15,9 g), 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina (10,85 g), carbonato de cesio (32,10 g), tris(dibencilidenaetona)dipaladio (1,82 g), 4,5-bis(difenilfosfina)-9,9-dimetilxanteno (2,35 g) en 1,4-dioxano (197,06 ml). La mezcla se calentó en un baño de aceite precalentado a 110°C durante 2 horas. Se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano y se filtró sobre una almohadilla CELITE®. El disolvente se eliminó bajo vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con diclorometano/metanol (2%) y a continuación diclorometano/metanol-NH<sub>3</sub> 2 M 2% para proporcionar 22,11 g del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 507 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo de referencia 1A

40 Metanosulfonato de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

Se añadió ácido metanosulfónico (63,59 ml) a una solución de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)pirimidin-2-il]-amina (17,3 g) en una mezcla de diclorometano (100 ml) y metanol (100 ml). La solución se agitó durante 1 hora y el disolvente se eliminó bajo vacío. Se trituró con metil tert-butil éter y el sólido se filtró para proporcionar 20,4 g del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 507 (M+H)<sup>+</sup>.

**Ejemplo de referencia 2**

Forma Cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

5 Se mezclaron 102,1 mg de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina amorfa con 2 ml de acetona. El sólido precipitado se aisló mediante filtración bajo vacío, produciendo una torta amarilla clara y se secó en el aparato de filtración durante 30 minutos, dando 72,1 mg de un sólido. El sólido se colocó en un horno de vacío a 100°C durante 3 horas. Los picos de XRD representativos de la Forma I se muestran en la Tabla 1.

**Ejemplo de referencia 3**

10 Forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

15 Se mezclaron 208 mg de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina amorfa con 4 ml de acetona. La suspensión se suspendió durante 2 horas a 60°C mientras se agitaba a 1.000 rpm, y a continuación el sólido se aisló mediante filtración bajo vacío, produciendo una torta amarilla clara. Se secó en el aparato de filtración durante 30 minutos, dando 112 mg de un sólido (54% de rendimiento). Se colocó en un horno de vacío a 80°C durante 3 horas. Los picos de XRD representativos de la Forma III se muestran en la Tabla 2. Las posiciones de los picos se verificaron usando un estándar externo.

Difracción de rayos X en polvo

20 Los patrones de XRD de los cristales se obtuvieron en un difractor de rayos X en polvo Bruker D8 Advance, equipado con una fuente CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ) y un detector Vantec, que funcionaba a 50 kV y 40 mA. Cada muestra se escaneó entre 4 y 40° en 2 $\theta$ , con un tamaño de paso de 0,02° en 2 $\theta$  y una velocidad de escaneo de 9,0 segundos/paso, y con una divergencia de 1 mm y ranuras de recepción y una rendija de detección de 0,1 mm. El polvo seco se empaquetó en un porta-muestras de carga superior rebajado y se obtuvo una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de formas cristalinas se recopilaron a temperatura y humedad relativa ambiente. El ruido de fondo para el cristal de Forma III se eliminó antes de la selección de picos mientras que el ruido de fondo no se eliminó para la Forma I.

30 Es bien conocido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma cristalina determinada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferente que resulta de factores tales como la morfología y el hábito del cristal. Cuando los efectos de orientación preferente están presentes, las intensidades máximas se alteran, pero las posiciones de pico características del polimorfo permanecen inalteradas. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, es bien conocido también en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma cristalina determinada, las posiciones angulares de los picos pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o en la humedad a las que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o la ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad de posición de pico de  $\pm 0,1$  en 2 $\theta$  tendrá en cuenta estas potenciales variaciones sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada.

40 La confirmación de una forma cristalina puede realizarse en base a cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de ° 2 $\theta$ ), típicamente los picos más prominentes. De esta manera, una muestra preparada de la Forma Cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se caracteriza por un patrón de XRD usando radiación CuK $\alpha$ , que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describen en la Tabla 1 dada a continuación y, en particular, tiene picos en 4,51 en combinación con uno o más de los picos seleccionados de entre el grupo que consiste en 13,09, 16,31 y 18,82; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,1 grados.

Tabla 1: Picos de difracción de rayos X en polvo de la Forma cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina.

Ángulo °2 $\theta$	valor de Angstrom	Intensidad %
4,51	19,60	100
5,89	15,00	4

ES 2 659 424 T3

8,98	9,84	1,5
11,20	7,89	2,3
12,57	7,04	1,9
13,09	6,76	7
15,93	5,56	3
16,31	5,43	4,4
17,01	5,21	1,9
18,58	4,77	3,1
18,82	4,71	3,6
20,86	4,26	1,5
21,90	4,06	2,2
23,12	3,84	2,4
23,53	3,78	3,7
26,71	3,33	2,4
26,85	3,32	2

5 Una muestra preparada de la Forma Cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se caracteriza por un patrón de XRD usando radiación CuK $\alpha$  que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describen en la Tabla 2 dada a continuación, y en particular, tiene picos en 21,29 en combinación con uno o más de los picos en 11,54, 10,91 y 12,13; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,1 grados.

Tabla 2: Picos de difracción de rayos X en polvo de la Forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina.

Ángulo °2 $\theta$	valor de Angstrom	Intensidad %
7,44	11,87	8
10,91	8,11	19
11,54	7,66	38
12,13	7,29	18
13,89	6,37	25
14,91	5,94	20
15,63	5,67	27
16,06	5,52	11
18,59	4,77	21
18,94	4,68	26
20,43	4,34	21
21,29	4,17	100

21,91	4,05	37
22,13	4,01	12
22,45	3,96	8
23,12	3,84	6
23,42	3,80	9
25,95	3,43	17
29,42	3,03	9

<sup>13</sup>C NMR de estado sólido

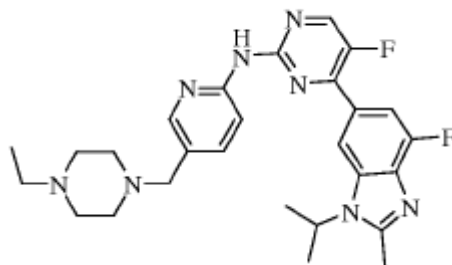
Los espectros de RMN (RMN en estado sólido o RMNES) de polarización cruzada/giro ángulo mágico (CP/MAS) se obtuvieron en un espectrómetro de RMN Bruker Avance III 400 de amplio calibre que funcionaba a frecuencias de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de 400,131 y 100,623 MHz, respectivamente, y usando una sonda Bruker de 4 mm de doble resonancia. La frecuencia MAS se estableció en 5 o 10 kHz usando un controlador Bruker MAS-II; las velocidades de giro se mantuvieron dentro de los 2 Hz del punto de ajuste. El desacoplamiento SPINAL64 a una frecuencia de nutación de protones de 100 kHz se usó para el desacoplamiento heteronuclear. Las bandas laterales giratorias se eliminaron mediante una secuencia de supresión de banda lateral total (TOSS) de cinco pulsos. El tiempo de contacto CP para transferir la magnetización desde protones a carbonos se estableció a 4 ms y se usó una rampa de potencia lineal de 93,5 a 46,9 kHz en el canal <sup>1</sup>H para mejorar la eficiencia de CP. El tiempo de adquisición se estableció a 34 ms y los espectros se adquirieron en un ancho espectral de 30 kHz con un retardo de reciclaje de 5 s. La temperatura de la muestra se reguló a 297 ± 1 K para minimizar el calentamiento por fricción causado por el giro de la muestra. Los desplazamientos químicos <sup>13</sup>C se referenciaron externamente (± 0,05 ppm) al pico <sup>13</sup>C de protón-desacoplado de tetrametilsilano puro (líquido) a través de la resonancia de alto campo de adamantina (δ = 29,5 ppm).

Una lista de picos de los cambios químicos para la Forma Cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina es la siguiente:

<sup>13</sup>C-NMR: ν(F1) (ppm) 11,7, 12,9, 20,5, 48,6, 52,5, 59,4, 108,9, 110,0, 112,7, 127,3, 129,4, 135,5, 136,4, 148,8, 150,1, 152,2, 154,5, 156,3.

**Ejemplo de referencia 4**

[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

**Forma cristalina III - Ruta B**

a. 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina

Se añadió 1-etilpiperazina pura (5,6 kg) a una mezcla de 6-bromo-piridin-3-carbaldehído (8,3 kg) y diclorometano (186 kg). A continuación, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (10,9 kg) en porciones y se agitó a 20-30°C durante 12 horas. La reacción se desactivó en una mezcla de diclorometano (36 kg) y una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 N (46 kg). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con diclorometano (24 X 2 kg). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (50 X 2 kg) y el disolvente se eliminó bajo vacío para proporcionar 11,5 kg del compuesto del título. MS (ES<sup>+</sup>): m/z = 285 (M+H)<sup>+</sup>.

b. 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina

5 Se añadió amoníaco líquido (50,0 kg) a una mezcla desgasificada de 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina (14,2 kg), óxido cuproso (200 g) y metanol (57 kg) a  $T \leq 40^\circ\text{C}$ . La mezcla se calentó a  $65-75^\circ\text{C}$  durante la noche. Se enfrió a  $20-30^\circ\text{C}$  y se filtró sobre una almohadilla CELITE®. El filtrado se concentró y se añadió diclorometano (113 kg) y el pH se ajustó a 12-14 con hidróxido de sodio 2 N (23 kg), las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con diclorometano (58 X 2 kg) y las capas orgánicas se combinaron. La mezcla se filtró a través de CELITE® y se concentró. El residuo se disolvió en tolueno (9,7 kg) y se cristalizó mediante la adición de metil tert-butil éter (8,3 kg) para dar 6,0 kg del compuesto del título. Se obtuvo una purificación adicional mediante una recristalización de tolueno. MS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z = 221$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

c. N-isopropil-acetamida

10 Se añadió carbonato de potasio (28 kg) a una solución de 2-propanamina (12 kg) en acetato de etilo (108 kg) a  $<20^\circ\text{C}$ . La mezcla se enfrió a  $5-0^\circ\text{C}$  y se añadió cloruro de acetilo (16,7 kg) a aproximadamente 2-3 kg/hora. Se agitó hasta que se completó como se detectó mediante cromatografía de gases. La reacción se desactivó con agua (0,8 kg) y la mezcla de reacción se filtró y se concentró para proporcionar 13,4 kg del compuesto del título. NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 4,06 (m, 1 H), 1,94 (s, 3 H), 1,14 (d, 6H).

15 d. N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina

20 Se añadió cloruro de fosforilo (16,0 kg) a una mezcla de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina (14,5 kg), N-isopropilacetamida (8,5 kg), trietilamina (10,6 kg) en tolueno (115 kg) a  $<20^\circ\text{C}$ . Se agitó a  $10-20^\circ\text{C}$  hasta que se completó como se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. El disolvente se eliminó bajo vacío y se añadió metil tert-butil éter (64 kg). El pH de la mezcla se ajustó con 10% de carbonato de sodio acuoso (250 kg). La mezcla se filtró y la torta se enjuagó con metil tert-butil éter (11 X 2 kg). Las fases se separaron y la capa acuosa se lavó con metil tert-butil éter (22 X 2 kg). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron, se filtraron y se lavaron con ciclohexano (0,6 kg) y se secaron para proporcionar 17,2 kg del compuesto del título. MS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z = 292$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

e. 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

25 Se añadió tert-butóxido de potasio (6,9 kg) en porciones a una solución de N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina (16,2 kg) en N-metil formamida (76 kg) mientras se mantenía la temperatura a  $T < 30^\circ\text{C}$ . La mezcla se calentó a  $70-75^\circ\text{C}$  hasta que se completó como se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se enfrió a  $20-30^\circ\text{C}$  y se desactivó añadiendo al agua (227 kg) y a continuación se extrajo con metil tert-butil éter (37 X 4 kg). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (49 X 2 kg) y se concentraron a 25-30 l, se añadió n-hexano (64 kg) y la suspensión se filtró para dar 11 kg del compuesto del título. MS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z = 272$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

Se obtuvo una purificación adicional disolviendo el compuesto crudo en diclorometano y filtrando a través de un gel de sílice y una almohadilla CELITE®, seguido del aislamiento a partir de una mezcla de metil tert-butil éter/hexano.

f. 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol

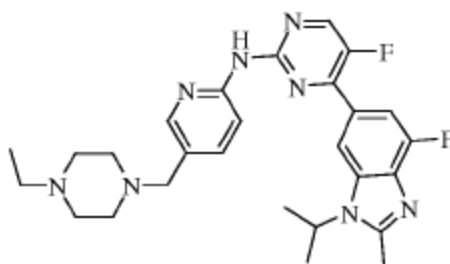
35 Se burbujeó nitrógeno en una mezcla de 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (600 g), bis(pinacolato)diboro (843 g), triciclohexilfosfina (106 g), acetato de potasio (652 g) y dimetilsulfóxido (3,6 l). Se añadió acetato de paladio (49 g) y se calentó a  $100^\circ\text{C}$  hasta que se completó como se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con agua (18 l), a continuación, se filtró para aislar el sólido. El material bruto se disolvió en 1,2-dimetoxietano (450 ml) y se filtró a través de CELITE®. El filtrado se usó directamente en la parte g.

g. 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

45 Se burbujeó nitrógeno en una mezcla de 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina (517 g), carbonato de sodio (586 g) en agua (1,7 l) y 1,2-dimetoxietano (3,4 l). Se añadió cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (4,9 g) y la reacción se calentó a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  y se añadió gota a gota una solución de 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol en 1,2-dimetoxietano de la parte f (5,1 l). La mezcla se agitó a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta que se completó como se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua fría (2,1 l,  $5^\circ\text{C}$ ). Se agitó durante 1 hora, a continuación, el sólido crudo se aisló mediante filtración. Se consiguió una purificación adicional del sólido mediante trituración con alcohol isopropílico para dar 472 g del compuesto del título. MS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z = 323$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

50 h. Forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina





5

Se burbujeó nitrógeno en una mezcla de 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (465 g), 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina (321 g), carbonato de potasio (403 g), 4,5-bis(difenilfosfina)-9,9-dimetilxanteno (17 g) en alcohol t-amílico (2,3 l). Se calentaron tris(dibencilidena)paladio (13,2 g) y la mezcla a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  hasta que se completó como se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano (1,2 l) y se filtró sobre una almohadilla CELITE®. El filtrado se extrajo con HCl 4M (2,3 l X 2). Las capas acuosas se combinaron y se mezclaron con carbón (32 g). Se filtraron a través de CELITE®, se añadió diclorometano (1,7 l) y el pH se ajustó con NaOH (28% ac., 1,5 l). La capa orgánica se recogió y la capa acuosa se lavó con diclorometano (1,7 l). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (1 l) y se secaron sobre sulfato de magnesio. Se usó un tratamiento sólido con Si-Tiol para eliminar el paladio residual y el solvente se intercambió a acetona. La suspensión se filtró y se secó para dar 605 g de producto crudo como la Forma I. Se mezclaron 605 g de la Forma I y 4,3 l de acetona seca. La suspensión se suspendió a  $56-57^\circ\text{C}$  (reflujo) durante al menos 18 horas y a continuación a temperatura ambiente durante 4 horas. El sólido se aisló mediante filtración bajo vacío, produciendo una torta de color amarillo claro. El sólido se secó en un horno de vacío a  $35^\circ\text{C}$  hasta que se obtuvo un peso constante de 570 g. Se confirmó mediante XRPD que el material era la Forma III del compuesto del título. MS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z = 507 (\text{M}+\text{H})^+$ .

Los siguientes ejemplos ilustran la mejora inesperada de la combinación de un anticuerpo anti-VEGFR2, incluyendo, pero sin limitarse a, ramucirumab (mediante el anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra VEGFR2 de ratón que puede usarse en experimentos como sustituto en ratones para ramucirumab, DC101) y [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina. La forma de sal mesilato de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se usa en algunos de los ensayos siguientes y se designa como el Compuesto A.

### 30 Ejemplo 1

Efectos antitumorales del compuesto A en combinación con DC101 en modelos de Xenoinjerto de ratón (NCI-H441 y NCI-H2122) para el cáncer de pulmón no microcítico

Información general:

Implantación y tratamiento del tumor:

35 Se cultivó la línea NSCLC humana NCI-H441 o NCI-H2122 en medio RPMI 1640 + suero fetal bovino al 10%. Se cosecharon las células sub-confluentes con tripsina y se aclararon dos veces con medio de crecimiento sin suero. Para tumores subcutáneos, el crecimiento se inició mediante inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en una mezcla 1:1 de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y Matrigel (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) en el flanco trasero de cada animal. Cuando los volúmenes de tumor promedio alcanzaron un tamaño de aproximadamente  $150-200 \text{ mm}^3$ , los animales se aleatorizaron por tamaño de tumor y peso corporal mediante técnicas de aleatorización bien conocidas en la técnica y se colocaron en sus grupos de tratamiento respectivos usando el número de animales por grupo, como se indica.

Captura de datos:

45 El tamaño del tumor y el peso corporal se capturaron usando Web Director. El volumen (V) del tumor se estimó usando la fórmula:  $V = 0,536L \times W^2$  en la que L = el mayor diámetro medido y W = el menor diámetro perpendicular. Los datos de volumen tumoral se transformaron a una escala logarítmica para igualar la varianza a lo largo del tiempo y los grupos de tratamiento. Los datos de volumen registrados se analizaron con un análisis de varianza en el tiempo de medidas repetidas dos veces y un tratamiento usando los procedimientos MIXED en el software SAS (Versión 9.3). El modelo de correlación para las medidas repetidas fue Spatial Power. Los grupos tratados se compararon en comparación con el grupo de control en cada punto de tiempo. El procedimiento MIXED se usó también por separado para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y los errores

estándar en cada punto de tiempo. Ambos análisis explicaron la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos que se produjo cuando los animales con tumores grandes se eliminaron del estudio en una etapa temprana. Se trazaron las medias ajustadas y los errores estándar para cada grupo de tratamiento en función del tiempo. Los cambios relativos en el volumen tumoral (%T/C) se calcularon usando las mediciones de volumen tumoral tomadas más cerca del último día de dosificación con el Compuesto A, mientras que el volumen tumoral inicial era el volumen registrado el primer día de la dosificación o justo un día antes. Los valores %T/C se calcularon usando la fórmula  $\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$ , en la que T = volumen tumoral medio del grupo tratado con compuesto,  $\Delta T$  = volumen tumoral medio del grupo tratado con compuesto menos el volumen tumoral medio en el día inicial, C = volumen tumoral medio del grupo de control (vehículo), y  $\Delta C$  = volumen tumoral medio del grupo de control menos el volumen tumoral medio en el día inicial. La inhibición del crecimiento tumoral se observó en aquellos casos en los que los valores calculados para %T/C eran menores que el 100% de manera que una mayor inhibición resultaba en valores más pequeños de %T/C. Si  $\Delta T$  es <0, entonces se calculó un valor de regresión tumoral en lugar de %T/C de manera que % Regresión =  $100 \times \Delta T/T_{inicial}$  de manera que  $T_{inicial}$  = la media principal o general del volumen tumoral para todos los grupos de tratamiento. Cualquier valor negativo para %T/C enumerado es un valor para % Regresión.

Se evaluó la eficacia antitumoral de la combinación de DC101 y el Compuesto A midiendo el volumen tumoral mediante mediciones de calibre tridimensional dos veces por semana durante el transcurso del estudio. El peso corporal se midió dos veces por semana durante el transcurso del estudio, como un indicador general de la tolerabilidad.

Formulaciones para el Compuesto A y DC101: El Compuesto A se formuló semanalmente en 1% de hidroxietilcelulosa (HEC) en tampón fosfato (PB) 25 mM a un pH de 2 y se almacenó a 4°C. Se solubilizó DC101 en solución salina tamponada con fosfato y se almacenó a 4°C.

Grupo de control: a los animales en el grupo de control se les administraron ambos vehículos usados para el Compuesto A y DC101 según los mismos programas para cada compuesto, respectivamente.

Para los grupos de monoterapia, los animales se trataron con el compuesto deseado según las indicaciones y con el vehículo para el compuesto que no estaba siendo dosificado siguiendo el programa para el compuesto no dosificado.

#### Tumores de Xenoinjerto NCI-H441

##### Estudio 1:

##### Compuesto de monoterapia A

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra (n = 8) con tumores de xenoinjerto NCI-H441 con el Compuesto A mediante sonda oral una vez al día durante 28 días a una dosis de 50 o 100 mg/kg usando 0,2 ml/dosis. El Compuesto A se administró comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 15 después de la implantación del tumor) y el tratamiento se terminó 28 días después (el día 42). El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

Resultados: El tratamiento con 50 o 100 mg/kg de Compuesto A resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral. El porcentaje medio de regresión observado el día 42 del estudio fue del -8,1% para la dosis de 50 mg/kg y del -22,8% para la dosis de 100 mg/kg. Se determinó que estos valores eran estadísticamente significativos (p <0,001) en comparación con el control. El volumen tumoral relativo al final del período de tratamiento indicó que el tratamiento con 50 mg/kg de monoterapia con el compuesto A resultó en una respuesta parcial en 6/8 animales y una enfermedad estable en 2/8 animales. Se observó una respuesta parcial en todos los ratones (8/8) tratados con 100 mg/kg de la monoterapia con el Compuesto A. No se observaron problemas de tolerabilidad significativos con el agente único del tratamiento con el Compuesto A: la pérdida de peso corporal máxima relativa fue del 4,7% para la dosis de 100 mg/kg y del 2,7% para la dosis de 50 mg/kg. La pérdida de peso corporal se midió como el cambio porcentual con relación a los pesos corporales medios registrados al inicio (día 14) versus el último día de tratamiento (día 42).

##### Monoterapia DC101

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra (n=8) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H441 con DC101 dos veces por semana durante cuatro semanas mediante inyección intraperitoneal a dosis de 10, 20 o 40 mg/kg. Se administró DC101 comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 15 después de la implantación del tumor) y terminando el día 39. El

volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

Resultados: El tratamiento con 10, 20 o 40 mg/kg de DC101 resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Los cambios en el volumen tumoral (%T/C) observados al final del período de dosificación (día 42) fueron del 25,6%, 10,4% y 9,0% para dosis de 10, 20 y 40 mg/kg, respectivamente. Se observó una inhibición del crecimiento estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) de los tumores de xenoinjerto NCI-H441 en comparación con el grupo de control con vehículo ( $p < 0,001$ ) para todos los grupos tratados con DC101. El tratamiento con un solo agente con DC101 resultó en una tendencia dependiente de la dosis con respecto a la frecuencia de la enfermedad estable y respuestas parciales de manera que la frecuencia combinada para enfermedad estable y para la respuesta parcial fue de 2/8, 5/8 y 6/8 en los grupos tratados con 10, 20 y 40 mg/kg, respectivamente. No hubo problemas de tolerabilidad significativos con ninguno de los tratamientos con agente único con DC101: la pérdida de peso corporal relativa máxima fue del 1,3% para la dosis de 10 mg/kg, del 1,5% para la dosis de 20 mg/kg y del 0,5% para la dosis de 40 mg/kg. La pérdida de peso corporal se midió como el cambio porcentual de los pesos corporales medios registrados al inicio (día 14) versus el último día de tratamiento (día 42).

#### 15 Combinación con el Compuesto A y DC101

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra ( $n = 8$ ) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H441 con Compuesto A mediante sonda oral una vez al día durante 28 días a una dosis de 50 mg/kg usando 0,2 ml/dosis y se inyectó intraperitonealmente DC101 dos veces por semana a una dosis de 20 mg/kg. Ambos se administraron comenzando el día 15 después de la implantación del tumor, terminando el tratamiento con el Compuesto A el día 42 y el tratamiento con DC101 el día 39. El volumen tumoral se midió dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento y medir el peso corporal.

Resultados: El tratamiento de combinación con 50 mg/kg de Compuesto A y 20 mg/kg de DC101 resultó en una mejora en la eficacia antitumoral en comparación con cada uno de los grupos de monoterapia. El volumen tumoral al final del período de dosificación (día 42) mostró una regresión del 42,9% (es decir, %T/C = -42,9%) en el grupo de combinación en comparación con una regresión del 8,1% en el grupo tratado con 50 mg/kg de Compuesto A solo y un %T/C observado del 10,4% en el grupo tratado con 20 mg/kg de DC101 solo. La diferencia en la eficacia antitumoral entre cada grupo de monoterapia en comparación con el grupo de combinación era estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). El tratamiento de combinación resultó en una respuesta parcial en 8/8 de los animales tratados. Por el contrario, solo 2/8 animales mostraron una respuesta parcial a la monoterapia con DC101, tres animales mostraron enfermedad estable (3/8) y tres animales mostraron enfermedad progresiva (3/8). 6/8 animales mostraron una respuesta parcial a la monoterapia con Compuesto A y 2 animales mostraron una enfermedad estable (2/8). Para la terapia de combinación, hubo un aumento en la frecuencia de animales con respuesta parcial (8/8), así como un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en la magnitud de la regresión (5/8 animales que recibieron terapia de combinación tenían tasas de regresión mejores que la mejor respuesta observada en el grupo tratado con agente único de Compuesto A (50 mg/kg)). No se observaron cambios estadísticamente significativos en la tolerabilidad con relación a la monoterapia o los controles con el tratamiento de combinación. Específicamente, la pérdida de peso corporal relativa máxima en el grupo de combinación fue del 3,0% en comparación con el 2,7% para la monoterapia del tratamiento con el Compuesto A y el 1,5% para el tratamiento con monoterapia con DC101. La pérdida de peso corporal se midió como el cambio porcentual de los pesos corporales medios registrados al inicio (día 14) versus el último día de tratamiento (día 42).

#### Estudio 2:

##### Compuesto de monoterapia A

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra ( $n = 7$ ) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H441 con Compuesto A mediante sonda oral (PO) una vez al día durante 28 días a una dosis de 50 o 75 mg/kg usando 0,2 ml/dosis. El Compuesto A se administró comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 36 después de la implantación del tumor) y terminando el tratamiento 28 días después (el día 63). El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

Resultados: Al final del período de dosificación (Día 67) los xenoinjertos NCI-H441 tratados con 50 o 75 mg/kg de Compuesto A resultaron en una inhibición significativa del crecimiento tumoral. El tratamiento de 50 mg/kg mostró un %T/C del 7,0% mientras que el tratamiento de 75 mg/kg resultó en una regresión del -4,8%, en comparación con los controles con vehículo. Se determinó que estos valores eran estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ) en comparación con el control. El volumen tumoral relativo al final del período de tratamiento indicó que la monoterapia con 50 o 75 mg/kg de Compuesto A resultó en una tendencia dependiente de la dosis con relación a

la frecuencia de enfermedad estable y respuestas parciales de manera que la frecuencia combinada para enfermedad estable y la respuesta parcial era 4/7 y 6/7 respectivamente. 2/7 y 3/7 de los ratones alcanzaron la regresión completa para las monoterapias con Compuesto A de 50 mg/kg y 75 mg/kg. La pérdida de peso corporal relativa máxima fue del 5,5% y del 5,1% para las monoterapias con Compuesto A de 50 y 75 mg/kg, que no fue estadísticamente diferente de los animales de control.

#### Monoterapia DC101

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra (n = 7) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H441 con DC101 dos veces por semana durante cuatro semanas mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 20 mg/kg. Se administró DC101 comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 36 después de la implantación del tumor). El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante el período de tratamiento.

Resultados: El tratamiento con 20 mg/kg de DC101 resultó también en una inhibición significativa del crecimiento tumoral con un %T/C del 5,6% en comparación con los controles con vehículo. Se determinó que estos valores eran estadísticamente significativos (p <0,001) en comparación con el control. El volumen tumoral relativo al final del período de tratamiento indicó que la monoterapia con DC101 resultó en 2/6 ratones con enfermedad progresiva, 2/6 con enfermedad estable y 2/6 ratones consiguiendo una respuesta parcial. La pérdida de peso corporal relativa máxima fue del 3,9% para la monoterapia con DC101, que no fue estadísticamente diferente de los animales de control.

#### Combinación de compuesto A y DC101

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra (n = 7) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H441 con Compuesto A mediante sonda oral una vez al día durante 28 días con una dosis de 50 mg/kg o 75 mg/kg usando 0,2 ml/dosis y se inyectó intraperitonealmente DC101 dos veces a la semana a una dosis de 20 mg/kg. Ambos se administraron comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 36 después de la implantación del tumor) y terminando el tratamiento el día 63. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

El tratamiento de combinación con 20 mg/kg de DC101 y el Compuesto A mostró una eficacia antitumoral que era significativamente mejor que cualquiera de los grupos de monoterapia en los que los tratamientos de combinación que incluían 50 o 75 mg/kg de Compuesto A resultaron en regresiones tumorales de -48,6% y -38,9%, respectivamente. Estos efectos sobre el crecimiento del tumor fueron estadísticamente significativos cuando se compararon con el grupo de control con vehículo (p <0,001), así como con sus respectivos grupos de monoterapia. En particular, cuando se comparó con la monoterapia con DC101, la combinación con 50 o 75 mg/kg fue estadísticamente significativa con p <0,001 y p = 0,033, respectivamente; cuando se compararon con sus respectivos grupos de monoterapia con Compuesto A, los tratamientos de combinación con 50 y 75 mg/kg fueron también estadísticamente significativos con p <0,001 y p = 0,006, respectivamente.

Las mediciones del volumen tumoral relativo al final del período de tratamiento indicaron que la terapia de combinación con DC101 con 50 o 75 mg/kg del Compuesto A resultó en una tasa de control de la enfermedad del 100%, en la que 7/7 ratones de cada grupo tenían enfermedad estable o consiguieron una respuesta parcial. Esto muestra una mejora significativa en la respuesta en comparación con la monoterapia con DC101 o con el Compuesto A, donde las tasas de control de la enfermedad (enfermedad estable + respuesta parcial) observadas fueron 4/7, 6/7 y 4/6 para la monoterapia con 50 mg/kg del Compuesto A, 75 mg/kg de Compuesto A y 20 mg/kg de DC101, respectivamente.

Los cambios en el peso corporal relativo en los grupos de combinación no fueron estadísticamente diferentes de los grupos de control o de monoterapia.

#### Tumores de xenoinjerto NCI-H2122

##### Compuesto de monoterapia A

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra (n = 8) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H2122 con Compuesto A mediante sonda oral (PO) una vez al día durante 28 días a una dosis de 50 o 75 mg/kg usando 0,2 ml/dosis. El Compuesto A se administró comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 16 después de la implantación del tumor) y terminando el tratamiento el día 43. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

Resultados: Al final del período de dosificación (día 45) los xenoinjertos NCI-H2122 tratados con 50 o con 75 mg/kg de Compuesto A resultaron en una inhibición significativa del crecimiento tumoral con un %T/C del 64,3% y del 37,3% respectivamente, en comparación con los controles con vehículo. Se determinó que estos valores eran estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ) en comparación con el control. Los cambios en el peso corporal relativo en los grupos que recibieron el Compuesto A no fueron estadísticamente diferentes del grupo de control.

#### Monoterapia DC101

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra ( $n = 8$ ) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H2122 con DC101 mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 20 mg/kg. Se administró DC101 comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 16 después de la implantación del tumor) y se continuó dos veces por semana durante cuatro semanas. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

Resultados: El tratamiento con 20 mg/kg de DC101 resultó también en una inhibición significativa del crecimiento tumoral con un %T/C del 45,7% en comparación con los controles con vehículo. Se determinó que este valor era estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en comparación con el control. El cambio en el peso corporal relativo en el grupo que recibió DC101 no fue estadísticamente diferente del grupo de control.

#### Combinación con el Compuesto A y DC101

Se trataron ratones atímicos desnudos Hsd hembra ( $n = 8$ ) que portaban tumores de xenoinjerto NCI-H2122 con Compuesto A mediante sonda oral (PO) una vez al día durante 28 días a una dosis de 50 o 75 mg/kg usando 0,2 ml/dosis y se inyectó intraperitonealmente DC101 dos veces a la semana a una dosis de 20 mg/kg. Ambos se administraron comenzando después de que los volúmenes tumorales medios alcanzaran un tamaño de aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup> (día 16 después de la implantación del tumor) y terminando el tratamiento el día 43. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana durante la duración del período de tratamiento.

Resultados: El tratamiento de combinación con 20 mg/kg de DC101 y el Compuesto A mostró una eficacia antitumoral significativamente mejor que cualquiera de los grupos de monoterapia en los que los tratamientos de combinación que incluían 50 o 75 mg/kg de Compuesto A resultaron en un %T/C del 20,7% y del 9,3% respectivamente. Estos efectos sobre el crecimiento tumoral fueron estadísticamente significativos cuando se compararon con el grupo de control con vehículo ( $p < 0,001$ ), así como cuando se compararon con sus respectivos grupos de monoterapia del Compuesto A ( $p < 0,001$ ). Cuando se comparó con la monoterapia con DC101, la combinación con 50 o 75 mg/kg fue estadísticamente significativa con  $p = 0,002$  y  $p < 0,001$  respectivamente. El volumen tumoral relativo al final del período de tratamiento indicó que la terapia de combinación con DC101 y 50 o 75 mg/kg de Compuesto A resultó en una tendencia dependiente de la dosis con relación a la frecuencia de enfermedad estable y respuestas parciales de manera que la frecuencia combinada de enfermedad estable y respuesta parcial fue de 4/8 y 7/8 respectivamente. Los cambios en el peso corporal relativo en los grupos de combinación no fueron estadísticamente diferentes de los grupos de control o de monoterapia.

En general, en los 3 estudios diferentes, se observó una eficacia antitumoral significativa después de la monoterapia tanto con DC101 como con el Compuesto A, con mejoras estadísticamente significativas en la eficacia resultantes de la terapia de combinación. Las mediciones de peso corporal tomadas a lo largo del transcurso de los 3 estudios indicaron que ninguno de los tratamientos, incluyendo los tratamientos de combinación, tuvieron un impacto negativo significativo sobre la tolerabilidad.

## **Ejemplo 2**

Combinaciones de tratamiento con Ramucirumab y anti-CDK4/6 reducen la proliferación de células endoteliales

La reducción *in vitro* de la proliferación de células endoteliales se midió mediante un ensayo *in vitro* basado en células. El ensayo se usó para medir el efecto del Compuesto A y ramucirumab sobre la proliferación de células endoteliales.

Se cultivaron células HUVEC (Lonza #C2519A) en medio Lonza EBM2 (Lonza #CC-3156) complementado con SINGLEQUOTS™ (Lonza #CC-4176) y 2% de suero fetal bovino (SFB). Se cultivaron células fibroblásticas asociadas a cáncer de pulmón (CAF) en medio basal de fibroblastos Lonza (FBM) (Lonza #CC-3131) complementado con SINGLEQUOTS™ (Lonza #CC-4126) y 10% de SFB (Hyclone #SH30611.02).

Se hidrató 1 gramo de microperlas Cytodex 3 revestidas con dextrano (Sigma #C3275) en 50 ml de PBS (HyClone #SH30264.02) durante al menos 3 horas a temperatura ambiente y se colocaron en un agitador de balanceo durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó, las perlas se lavaron 3x con PBS y se volvieron a suspender en

50 ml de PBS. Se colocaron en una botella de vidrio siliconado y autoclave durante 15 minutos a 120°C y se almacenaron a 4°C.

5 El día del ensayo, las perlas se mezclaron suavemente y se transfirieron 1,2 ml de perlas a un tubo de 50 ml (Falcon, #352098), y se permitió que se asentaran de manera natural. El PBS se aspiró y las perlas se lavaron con 20 ml de medio basal endotelial completo precalentado 2 (EBM2). Se permitió que las perlas se sedimentaran, se aspiró suavemente el medio y se añadió 15 ml de EBM2 completo.

10 Las células HUVEC se recogieron de los matraces de cultivo, se aclararon con PBS y se añadió y se aspiró TrypLE (Gibco #126051-010) en cuanto las células se redondearon. Se volvieron a suspender suavemente las células HUVEC en 20 ml de medio completo, se determinó el recuento de células viables y se añadió una suspensión de  $2,5 \times 10^7$  células a las perlas, hasta un volumen final de 24 ml. Se colocó el tubo tumbado a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas, y se invirtió suavemente varias veces cada 20 minutos. Las perlas y la suspensión celular se transfirieron a 2 ml/matraz en 12 matraces T75 (Nunc #156499). El tubo se enjuagó con 20 ml de medio y se distribuyó por igual entre los 12 frascos. Los medios se completaron hasta 10 ml y los matraces se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche.

15 El medio que contenía HUVEC/perlas se pipeteó desde 2 matraces T75 hacia arriba y hacia abajo varias veces para liberar HUVEC/perlas desde el matraz. La solución se transfirió a un tubo de 50 ml y los matraces se lavaron con 5 ml de medio y se transfirieron al mismo tubo. Se permitió que las perlas se asentaran y se mezcló adicionalmente 2 veces con EBM2 fresco usando una pipeta de 1 ml para separar las perlas según fuese necesario. Se volvieron a suspender las perlas en 2x15 ml de solución de fibrinógeno, que consistía en 50 ml de fibrinógeno a 2 mg/ml (Sigma #F4883), complementado con 1,875 µl de Aprotinina a 4U/ml (concentración final de 0,15 unidades/ml) (Sigma #A3428). Filtrado estéril con un filtro de 0,22 micrómetros.

20 Las células CAF de los matraces T150 se recogieron, se enjuagaron con PBS y se añadió y se aspiró TrypLE (Gibco #126051-010) en cuanto las células se redondearon. Se añadió 2 ml de medio completo (EBM2 complementado con SINGLEQUOTS™ y 2% de SFB) y se determinó el recuento de células viables y se añadieron células a  $4 \times 10^4$  células/ml a la solución de fibrinógeno.

30 Se añadieron 12 µl de trombina (Sigma #T4393-100 unidades) hasta una concentración final de 0,6 unidades/0,5 ml de solución de coágulo a placas de fondo de vidrio de 24 pocillos (In Vitro Scientific #P24-1.5H-N). Se añadieron rápidamente 0,5 ml de suspensión de fibrinógeno-perla/CAF a cada pocillo para permitir el mezclado y prevenir la formación de burbujas. Las placas se colocaron en la campana durante 20 minutos para coagular sin perturbaciones y, a continuación, las placas se movieron a una incubadora (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) durante 20 minutos. Se añadieron, gota a gota, 0,5 ml de medio completo a cada pocillo para evitar la interrupción del coágulo. Se añadió ramucirumab a una concentración de 10 µg/ml a cada pocillo. Se añadió el Compuesto A a los pocillos que contenían ramucirumab a concentraciones de 3, 10, 30, 100 y 500 nM. Los compuestos se diluyeron en serie en dimetilsulfóxido y a continuación se transfirieron a la placa de ensayo de manera que la concentración final del dimetilsulfóxido en el ensayo fuese del 0,05%. Las placas se incubaron a 37°C en 2% de CO<sub>2</sub>. El día 4 después del tratamiento, el medio se reemplazó con medios frescos y tratamientos.

40 El día 7 después del tratamiento, los pocillos se fijaron durante la noche a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4% (Electron Microscopy Sciences #15710). Las placas se lavaron con 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (HyClone SH30264.01, Lote N° AVJ79791) y se permeabilizaron con 0,5% de TRITON™ X-100/PBS (Sigma #T9284) durante 10 minutos a 4°C. Las placas se enjuagaron 3X durante 10-15 minutos cada una con 1 ml de glicina/DPBS (Bio-Rad #161-0718) y se bloquearon durante la noche con 0,5 ml por pocillo de tampón IF que consistía en 0,1% de BSA, 0,2% de TRITON™ X-100, 0,05% de Tween-20 en DPBS + 10% de suero de cabra (Invitrogen #16210). El tampón se retiró y las placas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios, anticuerpo de oveja dirigido contra CD31 humano (1:100) (R&D Systems #BAF806) y anti-α-actina de músculo liso, Cy3 (1:200) (Sigma #C6198) en el tampón anterior. Los pocillos se enjuagaron 3X durante 20 minutos cada uno con tampón IF a temperatura ambiente con balanceo suave. Se añadió anticuerpo de burro contra IgC de oveja Alexa Fluor 488 (H+L) (1:200) (Molecular Probes #A-11015) en tampón de incubación y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se enjuagaron como se ha indicado anteriormente, y se incubaron en 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:10000) (Invitrogen #D1306) en DPBS durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se enjuagaron con DPBS durante 5 minutos. Se añadieron 0,5 ml de DPBS y las placas se escanearon en CELLINSIGHT™ (Thermal Science) usando el Objetivo 2X. El ensayo de detección de neuritas CELLINSIGHT™ se usó para obtener imágenes y cuantificar la proliferación de células endoteliales. Los datos se analizaron estadísticamente usando JMP 9 (SAS, 9.0.3).

55 Cada experimento representa la media de triplicados que se expresa como medias geométricas y pueden calcularse intervalos de confianza del 95%. El porcentaje de reducción se calculó con la fórmula ((ramucirumab tratado con control)/(control con ramucirumab)) \* 100.

Los resultados sugieren que la adición de Compuesto A a ramucirumab, se sumó, de una manera dependiente de la dosis, a los efectos antivasculares de ramucirumab. El compuesto A en combinación con ramucirumab redujo la magnitud de la proliferación endotelial en un 42,5% (p <0,0034) y en un 50% (p <0,0007) a 300 nM y 500 nM, respectivamente, en comparación con el tratamiento con ramucirumab solo.

5 **Ejemplo 3**

Un estudio de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina en combinación con Ramucirumab para pacientes con NSCLC en etapa IV

Diseño del estudio

10 Este estudio es un estudio multicéntrico, no aleatorizado, abierto, con escalado de dosis, de Fase 1b, de dosificación oral de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina a 100 mg, 150 mg o 200 mg cada 12 (± 3) horas en los días 1 a 21 de un ciclo de 21 días en combinación con ramucirumab administrado a 10 mg/kg durante una infusión IV de 60 minutos seguida de un período de observación de 1 hora el día 1 de un ciclo de 21 días para pacientes con NSCLC en etapa IV.

15 Objetivos del estudio

El objetivo principal de este estudio es evaluar la seguridad y la tolerabilidad de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina cuando se administra por vía oral en combinación con ramucirumab a pacientes con NSCLC en etapa IV usando Common Terminology Criteria for Adverse Events (criterios de terminología común para eventos adversos) (CTCAE versión 4.0, NCI 2009).

25 Los objetivos secundarios del estudio son documentar la actividad antitumoral de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina cuando se administra en combinación con ramucirumab; determinar la farmacocinética (PK) de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina cuando se administra en combinación con ramucirumab; y caracterizar los cambios en el dolor indicado por el paciente y en los síntomas relacionados con la enfermedad recopilados mediante MD Anderson Symptom Inventory-Lung Cancer (Inventario de síntomas MD Anderson-Cáncer de pulmón) (MDASI-LC).

Fármacos de ensayo

30 La [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se administra como cápsulas de 100 mg, 150 mg o 200 mg para administración oral.

Se permitirá la eventualidad de una reducción de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina a 100 mg por vía oral cada 12 horas en los días 1 a 21 de un ciclo de 21 días.

35 Ramucirumab se suministra en una solución estéril, sin conservantes, para la infusión de ramucirumab formulada en una solución acuosa a una concentración de 10 mg/kg (vial de 500 mg/50 ml). El tampón contiene histidina 10 mM, cloruro de sodio 75 mM, glicina 133 mM y 0,01% de polisorbato 80, pH 6,0. Ramucirumab se suministra en viales de vidrio con un volumen nominal de 50 ml, de un solo uso.

40 La primera dosis de ramucirumab depende del peso corporal inicial del paciente en kilogramos. Las dosis posteriores de ramucirumab deben calcularse de nuevo si hay un cambio ≥10% (aumento o disminución) en el peso corporal desde el último cálculo de la dosis; las dosis posteriores pueden volverse a calcular si hay un <10% de cambio (aumento o disminución) en el peso corporal desde el último cálculo de la dosis.

Los datos preliminares acerca de los pacientes evaluables de un ensayo clínico en curso se presentan en la Tabla 3.

<b>Tabla 3</b>						
<b>abemaciclib (mg)</b>	<b>Pacient e</b>	<b>Día de estudio de evaluación de respuesta</b>	<b>Respuesta objetivo</b>	<b>Respuesta general</b>	<b>Estado EGFR</b>	<b>Estado mutación KRAS</b>
150	1	172	PR	PR	Negativo	Positivo

ES 2 659 424 T3

	2	36	NDR	PD	NDR	NDR
	3	37	SD	SD	Negativo	NDR
200	4	42	SD	SD	Negativo	Positivo
	5	41	SD	SD	Positivo	NDR
	6	86	PD	PD	Negativo	Negativo
	7	44	PR	PR	NDR	NDR
	8	84	NDR	SD	NDR	NDR
<p>PR es respuesta parcial;  SD es enfermedad estable;  PD es enfermedad progresiva;  NDR no se informaron datos.</p>						

Aunque los datos preliminares anteriores acerca de pacientes evaluables revelan dos pacientes con enfermedad progresiva, revelan además cuatro pacientes con enfermedad estable y dos pacientes con respuesta parcial.



**LISTADO DE SECUENCIAS**

**<SEC ID Nº: 1; ADN; humano>**

5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTATAGGAGA  
CAGAGTCACCATCACTTGTTCGGGCGAGTCAGGGTATTGACAACTGGTTAG  
GCTGGTATCAGCAGAAACCTGGGAAAAGCCCTAAACTCCTGATCTACGAT  
GCATCCAATTTGGACACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAGTGGATC  
TGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAAGCTGAAGATTTTG  
CAGTTTATTTCTGTCAACAGGCTAAAAGCTTTTCCTCCCACTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGACATCAA

**<SEC ID Nº: 2; PRT1; humano>**

10

DIQMTQSPSSVSASIGDRVITICRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYD  
ASNLDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISLQAEDFAVYFCQQAQAFPPFTFGG  
GTKVDIK

**<SEC ID Nº: 3; ADN; humano>**

15

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTC  
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCA  
TGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCC  
ATTAGTAGTAGTAGTAGTTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCG  
ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGA  
ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCACA  
GATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGC

**<SEC ID Nº: 4; PRT1; humano>**

20

EVQLVQSGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVSS  
ISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVT  
DAFDIWQGTMTVSS

**<SEQ ID NO: 5; ADN; humano>**

25

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTATAGGAGA  
CAGAGTCACCATCACTTGTTCGGGCGAGTCAGGGTATTGACAACTGGTTAG  
GCTGGTATCAGCAGAAACCTGGGAAAAGCCCTAAACTCCTGATCTACGAT  
GCATCCAATTTGGACACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAGTGGATC  
TGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAAGCTGAAGATTTTG  
CAGTTTATTTCTGTCAACAGGCTAAAAGCTTTTCCTCCCACTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGACATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT  
CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT  
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG  
GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA  
CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG  
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGC  
CTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

30

**<SEQ ID NO: 6; PRT1; humano>**

35

DIQMTQSPSSVSASIGDRVITICRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYD  
ASNLDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISLQAEDFAVYFCQQAQAFPPFTFGG  
GTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKV  
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO: 7; ADN; humano>

5  
 10  
 15  
 GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGT  
 CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCA  
 TGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCC  
 ATTAGTAGTAGTAGTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCG  
 ATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGA  
 ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCACA  
 GATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGC  
 TAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA  
 CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC  
 GAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA  
 CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG  
 TGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC  
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAA  
 ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCC  
 TGGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA  
 CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC  
 ATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT  
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA  
 GTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA  
 CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG  
 CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCT  
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG  
 GGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC  
 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

<SEQ ID NO: 8; PRT1; humano>

20  
 25  
 EVQLVQSGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSS  
 ISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVT  
 DAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICN  
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

<SEQ ID NO: 9; PRT1; humano>

30  
 35  
 A SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDL  
 WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD  
 YRSPFIASVS DQHGVMVYITE NKNKTIVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD  
 SKKGFITPSY MISYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSF SHGIELSVGD  
 KLVLNCTART ELNVGIDFNW EYPSKHKQHK KLVNRDLKIQ SGSEMKKFLS TLTIDGVIRS  
 DQGLYITCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYPPP  
 EIKWKYNGIF LESNHTIKAG HVLTIIMEVSE RDTGNYTVIL TNFISKEKQS HVVSLVVKVF  
 PQIGEKSLIS PVDSYQYGTI QTLICTVYAI PPPHHIHWWY QLEEECANEP SQAVSVTNPY  
 PCEENRSVED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC EAVNKVGRGE  
 RVISFHVTRG PEITLQPDMD PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGPPQ LPIHVGELPT  
 PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVVRQLT  
 VLERVAPTIT GNLENQTTISI GESIEVSCTA SGNPPFQIMW FKDNETLVED SGIVLKDGNR  
 NLTIRRVKKE DEGLYTCQAC SVLGCAKVEA FFIIEGAQEK TNLEI IILVG TAVIAMFFWL  
 LLVILLRVTK RANGGELKTG YLSIVMDPDE LPLDEHCEBL PYDASKWEFF RDRCLKLGPPL  
 GRGAFGQVIE ADAFGIDKTA TCRIVAVKML KEGATHSEHR ALMSELKILI HIGHHLNVVN  
 LLGACTKPGG PLMVIVEFCK FGNLSTYLRS KRNEFVPHYK KGARFRQGD YVGAIPVDLK  
 RRLDSITSSQ SSASSGFVEE KSLSDVEEEE APEDLYKDFL TLEHLICYSF QVAKGMEFLA  
 SRKCIHRDLA ARNILLSEKN VVKICDFGLA RDIYKDPDYV RKG DARLFLK WMAFETIFDR

ES 2 659 424 T3

VYTIQSDVWS FGVLLWEIFS LGASPYPGVK IDEEFCRRLK EGTRMRAPDY TPPEMYQTML  
DCWHGEPQRS PTFSELVEHL GNLLQANAQQ DGKDYIVLPI SETLSMEEDS GLSLPTSPVS  
CMEEEEVCDP KFHYDNTAGI SQYLQNSKRK SRPVSVKTFE DIPLEEPEVK VIPDDNQDTS  
GMVLASEELK TLEDRTKLSF SFGGMVPSKS RESVASEGSN QTSQYQSGYH SDDTDTTVYS  
SEEAELLKLI EIGVQTGSTA QILQPDSTT LSSPPV

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Eli Lilly and Company

<120> Terapia de combinación para el cáncer

<130> X20246

10

<150> 61/944811

<151> 26/02/2014

<160> 9

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 321

20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

25

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggattgac aactggtag gctggtatca gcagaaacct 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctacgat gcatccaatt tggacacagg ggtcccatca 180

aggttcagtg gaagtggatc tgggacatat tttactctca ccatcagtag cctgcaagct 240

gaagattttg cagtttattt ctgtcaacag gctaaagctt ttcctcccac tttcggcgga 300

30

gggaccaagg tggacatcaa a 321

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

ES 2 659 424 T3

<400> 2

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

<210> 3

<211> 348

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

	gaggtccagc	tggtgcagtc	tgggggaggc	ctggtcaagc	ctgggggggc	cctgagactc	60
25	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatagca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
	ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctcatcc	attagtagta	gtagtagtta	catatactac	180
	gcagactcag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
	ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagtcaca	300
30	gatgcttttg	atatctgggg	ccaagggaca	atggtcaccg	tctcaagc	348	

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

ES 2 659 424 T3

<400> 4

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

20 <210> 5

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <400> 5

	gacatccaga	tgaccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctataggaga	cagagtcacc	60
	atcacttgtc	ggcgagtc	gggtattgac	aactggttag	gctggtatca	gcagaaacct	120
	gggaaagccc	ctaaactcct	gatctacgat	gcatccaatt	tggacacagg	ggtcccatca	180
30	aggttcagtg	gaagtggatc	tgggacatat	tttactctca	ccatcagtag	cctgcaagct	240
	gaagattttg	cagtttattt	ctgtcaacag	gctaaagctt	ttcctcccac	tttcggcgga	300
	gggaccaagg	tggacatcaa	acgaactgtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcga	360
	tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgtttgtg	gcctgctgaa	taacttctat	420
	cccagagagg	caaagtaca	gtggaaggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
35	gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540

ES 2 659 424 T3

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 6

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

ES 2 659 424 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

5

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 7

<211> 1338

10

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

15

gaggtccagc tgggtgcagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180

gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagtcaca 300

20

gatgcttttg atatctgggg ccaagggaca atgggtcaccg tctcaagcgc tagcaccaag 360

ggcccatcgg tcctccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420

ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtogtg gaactcaggc 480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540

25

ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 600

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780

30

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccactctcaa agccaaaggg 1020

35

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1080

ES 2 659 424 T3

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagcc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200  
 ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260  
 5 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320  
 tccctgtccc cgggtaaa 1338

<210> 8

<211> 446

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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



ES 2 659 424 T3

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175  
 5 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190  
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205  
 10 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 15 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 20 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 25 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 30 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 35 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

ES 2 659 424 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

5

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 9

<211> 1337

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

15

Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser  
 1 5 10 15

Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile  
 20 25 30

Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln  
 35 40 45

20

Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu  
 50 55 60

Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly  
 65 70 75 80

25

Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr  
 85 90 95

Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp  
 100 105 110

Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val  
 115 120 125

30

Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp  
 145 150 155 160

Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala  
 165 170 175

35

ES 2 659 424 T3

Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser Tyr Gln Ser  
 180 185 190  
 Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val  
 195 200 205  
 5  
 Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val  
 210 215 220  
 Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn  
 225 230 235 240  
 10  
 Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg  
 245 250 255  
 Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr  
 260 265 270  
 15  
 Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys  
 275 280 285  
 Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg  
 290 295 300  
 20  
 Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu  
 325 330 335  
 25  
 Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu  
 340 345 350  
 Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu  
 355 360 365  
 Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro  
 370 375 380  
 30  
 Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr  
 405 410 415  
 35  
 Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro  
 420 425 430

ES 2 659 424 T3

Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala  
 435 440 445  
 Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu  
 450 455 460  
 5  
 Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val  
 465 470 475 480  
 Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser  
 485 490 495  
 10  
 Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu  
 500 505 510  
 Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val  
 515 520 525  
 15  
 Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu  
 530 535 540  
 Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu  
 545 550 555 560  
 20  
 Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val  
 565 570 575  
 Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys  
 580 585 590  
 Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met  
 595 600 605  
 25  
 Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu  
 610 615 620  
 Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu  
 625 630 635 640  
 30  
 Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn  
 645 650 655  
 Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser  
 660 665 670  
 35  
 Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu

## ES 2 659 424 T3

		675					680						685				
		Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Asn	Arg	Asn	Leu	Thr
		690						695					700				
5		Ile	Arg	Arg	Val	Arg	Lys	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala
		705					710					715					720
		Cys	Ser	Val	Leu	Gly	Cys	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Phe	Phe	Ile	Ile	Glu
						725					730					735	
		Gly	Ala	Gln	Glu	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Thr
10					740					745					750		
		Ala	Val	Ile	Ala	Met	Phe	Phe	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Ile	Ile	Leu	Arg
				755					760					765			
		Thr	Val	Lys	Arg	Ala	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Lys	Thr	Gly	Tyr	Leu	Ser
15								775						780			
		Ile	Val	Met	Asp	Pro	Asp	Glu	Leu	Pro	Leu	Asp	Glu	His	Cys	Glu	Arg
		785					790						795				800
		Leu	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ser	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Arg	Leu	Lys
						805					810						815
20		Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Gln	Val	Ile	Glu	Ala
						820				825						830	
		Asp	Ala	Phe	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr	Ala	Thr	Cys	Arg	Thr	Val	Ala	Val
										840					845		
25		Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Thr	His	Ser	Glu	His	Arg	Ala	Leu	Met
								855							860		
		Ser	Glu	Leu	Lys	Ile	Leu	Ile	His	Ile	Gly	His	His	Leu	Asn	Val	Val
		865					870						875				880
		Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Lys	Pro	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Val	Ile
						885						890					895
		Val	Glu	Phe	Cys	Lys	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Tyr	Leu	Arg	Ser	Lys
						900						905				910	
		Arg	Asn	Glu	Phe	Val	Pro	Tyr	Lys	Thr	Lys	Gly	Ala	Arg	Phe	Arg	Gln
35																	
				915					920						925		

ES 2 659 424 T3

Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys Arg Arg Leu  
 930 935 940  
 Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Val Glu  
 945 950 955 960  
 5  
 Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro Glu Asp Leu  
 965 970 975  
 Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln  
 980 985 990  
 10  
 Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg  
 995 1000 1005  
 Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val  
 1010 1015 1020  
 15  
 Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro  
 1025 1030 1035  
 Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met  
 1040 1045 1050  
 20  
 Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp  
 1055 1060 1065  
 Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly  
 1070 1075 1080  
 Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg  
 1085 1090 1095  
 25  
 Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr  
 1100 1105 1110  
 Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro  
 1115 1120 1125  
 30  
 Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn  
 1130 1135 1140  
 Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val  
 1145 1150 1155  
 35  
 Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu  
 1160 1165 1170

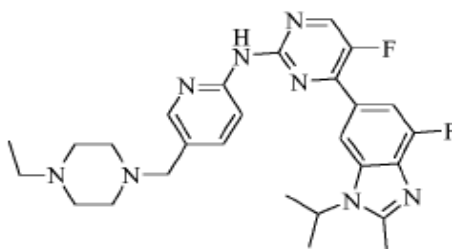
ES 2 659 424 T3

Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu Glu Glu Glu Val  
 1175 1180 1185  
  
 Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala Gly Ile Ser Gln  
 1190 1195 1200  
 5  
 Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro Val Ser Val Lys  
 1205 1210 1215  
 Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu Val Lys Val Ile  
 1220 1225 1230  
 10  
 Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu Ala Ser Glu  
 1235 1240 1245  
 Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro Ser Phe  
 1250 1255 1260  
 15  
 Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser Glu  
 1265 1270 1275  
 Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp  
 1280 1285 1290  
 20  
 Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu  
 1295 1300 1305  
 Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile  
 1310 1315 1320  
 25  
 Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val  
 1325 1330 1335

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

5

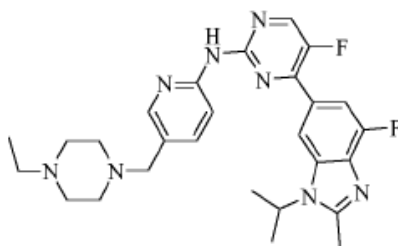


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico en combinación con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 2, y una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 4, en el que el anticuerpo se une a VEGFR2.

10

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto es

15



3. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 6, y una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 8 y el anticuerpo se une a VEGFR2.

20

4. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es ramucirumab.

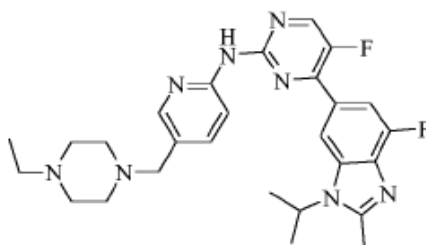
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que el compuesto o sal del mismo se administra a una dosis de entre aproximadamente 100 mg/día y aproximadamente 400 mg/día y ramucirumab se administra una vez cada tres semanas a una dosis de entre aproximadamente 6 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg.

25

6. Compuesto para su uso según la reivindicación 5, en el que el compuesto o sal del mismo se administra por vía oral y ramucirumab se administra por vía intravenosa.

7. Kit que comprende un compuesto de la fórmula:

30



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 2, y una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 4, en el que el anticuerpo se une a VEGFR2.

35

8. Kit según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 6, y una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es la proporcionada en la SEC ID N°: 8 y el anticuerpo se une a VEGFR2.

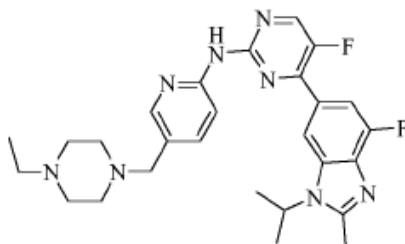
40



9. Kit según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es ramucirumab.

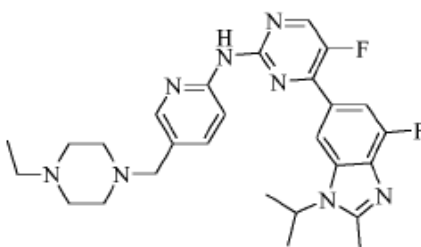
10. Kit según la reivindicación 9, en el que el compuesto es

5



11. Kit, que comprende una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la fórmula:

10



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, y una composición farmacéutica que comprende ramucirumab, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

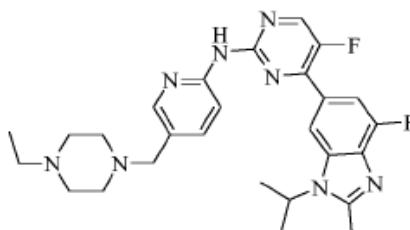
12. Una combinación que comprende [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un anticuerpo anti-VEGFR2 para su uso simultáneo, por separado o de manera secuencial en el tratamiento de NSCLC.

20

13. Combinación según la reivindicación 12, en la que el anticuerpo anti-VEGFR2 es ramucirumab.

14. Un compuesto de la fórmula:

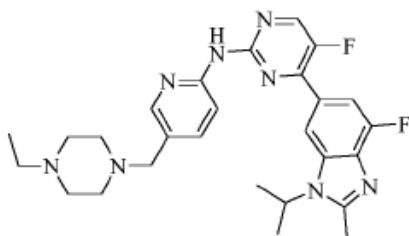
25



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con ramucirumab.

15. Un compuesto de la fórmula:

30



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con ramucirumab para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico.

35