

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 990**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 31/385 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 33/24 (2009.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009** **E 15166232 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 2947098**

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

30 Prioridad:

20.07.2009 US 226910 P

30.07.2009 US 462168

30.07.2009 WO PCT/US2009/052209

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

24.06.2020

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)

Route 206 and Province Line Road

Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

LEE, FRANCIS, Y. y

JURE-KUNKEL, MARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 768 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de anticuerpos anti-CTLA4 con gemcitabina para el tratamiento sinérgico de enfermedades proliferativas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a los campos de oncología y regímenes terapéuticos mejorados.

Antecedentes de la invención

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

15 Debido a la gran diversidad de cánceres observados actualmente, se han desarrollado numerosos agentes anticancerígenos para destruir el cáncer dentro del cuerpo. Estos compuestos se administran a pacientes con cáncer con el objeto de destruir o inhibir de otro modo el crecimiento de células malignas mientras dejan las células normales, sanas sin molestias. Los agentes anticancerígenos se han clasificado según su mecanismo de acción.

20 Un tipo de producto quimioterapéutico se denomina complejo de coordinación de metales. Se cree que este tipo de productos quimioterapéuticos forman predominantemente reticulaciones de ADN intercatenarios en los núcleos de las células, evitando así la replicación celular. Como resultado, el crecimiento tumoral se reprime inicialmente y después se invierte. Otro tipo de producto quimioterapéutico se denomina agente alquilante. Estos compuestos funcionan insertando composiciones o moléculas extrañas en el ADN de las células cancerosas en división. Como resultado de estos restos extraños, se interrumpen las funciones normales de las células cancerosas y se evita la proliferación. Otro tipo de producto quimioterapéutico es un agente antineoplásico. Este tipo de agente previene, mata o bloquea el crecimiento y la propagación de las células cancerosas. Aún otros tipos de agentes anticancerígenos incluyen inhibidores de la aromastasa no esteroideos, agentes alquilantes bifuncionales, etc.

30 La quimioinmunoterapia, la combinación de agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, es un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer que combina los efectos de agentes que atacan directamente a las células tumorales que producen necrosis o apoptosis de células tumorales, y agentes que modulan las respuestas inmunes del hospedador al tumor. Los agentes quimioterapéuticos podrían mejorar el efecto de la inmunoterapia al generar antígenos tumorales que serán presentados por las células presentadoras de antígenos creando una vacuna de células tumorales "polivalentes" y distorsionando la arquitectura tumoral, facilitando así la penetración de los agentes inmunoterapéuticos, así como la población inmune expandida.

40 El ipilimumab es un anticuerpo humano anti CTLA-4 humano que bloquea la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86 expresados en las células presentadoras de antígeno y, por lo tanto, bloqueando la regulación negativa de las respuestas inmunes provocadas por la interacción de estas moléculas. Ya que el ipilimumab no reconoce el CTLA-4 de ratón, se usó un anticuerpo anti-ratón CTLA-4 (clon UC10-4F10) en los estudios presentados en este punto para investigar el efecto del bloqueo de CTLA-4 con agentes quimioterapéuticos.

45 El Dasatinib (SPRYCEL®) se usa comúnmente para el tratamiento de muchos tipos de cáncer y representa una clase atractiva de agentes para combinar con el bloqueo de CTLA-4.

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

55 Los análogos de nucleósidos, tales como la gemcitabina, también se usan comúnmente para el tratamiento de muchos tipos de cáncer. La gemcitabina es un análogo de nucleósido antimetabolito (2',2'-difluorodeoxicidina) que se activa después de la fosforilación intracelular por la desoxicidina quinasa, ya que solo sus formas de di y trifosfato poseen actividad citotóxica. Específicamente, la forma trifosfato compite con la desoxicidina trifosfato para su incorporación al ADN como base inactiva, y la forma difosfato inhibe la ribonucleótido reductasa, una enzima que es esencial para la síntesis normal de ADN.

60 La gemcitabina se ha estudiado en una amplia diversidad de tumores malignos, tanto como agente único como en combinación con otros fármacos citotóxicos. Además está aprobado en muchos países para el tratamiento de diversas neoplasias en el hombre, incluyendo cáncer pancreático, de ovario, de pulmón no microcítico, carcinoma de vejiga y mama. Su uso terapéutico en estos tumores también está respaldado por un perfil de toxicidad favorable.

65 Otro mecanismo común de inhibición de las células cancerosas es inducir roturas de ADN bicatenario. Tales roturas de ADN matan específicamente a las células que se dividen rápidamente tales como las células cancerosas. El etopósido es un medicamento contra el cáncer que induce la rotura de las cadenas en el ADN celular al inhibir la

religión de la topoisomerasa II (topoII) de las moléculas de ADN escindidas. Aunque la escisión del ADN por topoisomerasa II siempre produce roturas de ADN bicatenario (DSB) ligadas a topoisomerasa II, la acción del etopósido también da como resultado roturas monocatenarias (SSB), dado que la religación de los dos filamentos se inhibe independientemente por el etopósido.

5 El documento WO 2007/113648 describe el tratamiento del cáncer, donde un anticuerpo anti-CTLA4, tales como ipilimumab (también denominado MDX-010) y CP-675.206 (también denominado 11.2.1. y ticilimumab), se administra en combinación con un agente terapéutico tales como la gemcitabina.

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

15 Los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, tales como dasatinib, con un inhibidor anti-CTLA-4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas. Además, los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un agente estabilizador de microtubulina, tales como paclitaxel, con un inhibidor anti-CTLA-4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas. Además, los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un análogo de nucleósido, tales como la gemcitabina, con un inhibidor anti-CTLA-4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas. Adicionalmente, los presentes inventores han descubierto por primera vez el beneficio sinérgico de combinar un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como etopósido, con un inhibidor anti-CTLA-4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas. Es un objeto de la invención proporcionar regímenes combinados de tratamiento quimioterapéutico efectivos en donde uno o más de los siguientes: un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, un agente estabilizador de micro tubulina, un análogo de nucleósido, o un agente inductor de doble cadena de ADN se combina con uno o más agentes anti-CTLA4 para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y monoclóhidrato de 2-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, para su uso en un método sinérgico para el tratamiento de un cáncer seleccionado de fibrosarcoma, carcinoma de pulmón, metástasis pulmonar y carcinoma de colon, que comprende administrar a una especie de mamífero que lo necesita una cantidad sinérgica, terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CTLA-4 con monoclóhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β).

35 En un aspecto, el cáncer es uno o más tumores refractarios. En otro aspecto más, el anticuerpo CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab.

40 Los anticuerpos anti-CTLA4 adecuados, incluyen anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-CTLA4 humanos, anticuerpos anti-CTLA4 de ratón, anticuerpos anti-CTLA4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA4 humanizados, anticuerpos monoclonales anti-CTLA4, anticuerpos policlonales anti-CTLA4, anticuerpos quiméricos anti-CTLA4, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, adnectinas anti-CTLA4, anticuerpos anti-dominio CTLA4, fragmentos de cadena simple anti-CTLA4, fragmentos de cadena pesada anti-CTLA4, fragmentos de cadena ligera anti-CTLA4, los anticuerpos desvelados en la publicación PCT n.º WO 2001/014424, los anticuerpos desvelados en la publicación PCT n.º WO 2004/035607, los anticuerpos desvelados en la Publicación de EE.UU. N.º 2005/0201994 y los anticuerpos desvelados en la Patente Europea otorgada N.º EP 1212422 BI. Se describen anticuerpos CTLA-4 adicionales en las patentes de EE.UU. N.º 5.811.097, 5.855.887, 6.051.227 y 6.984.720; en las publicaciones PCT N.º WO 01/14424 y WO 00/37504; y en las publicaciones de EE.UU. N.º 2002/0039581 y 2002/086014. Otros anticuerpos anti-CTLA-4 que pueden usarse incluyen, por ejemplo, aquellos divulgados en: documento WO 98/42752; Patentes de EE.UU. N.º 6.682.736 y 6.207.156; Hurwitz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(17): 10067-10071 (1998); Camacho et al., *J. Clin. Oncology*, 22(145):Resumen N.º 2505 (2004) (anticuerpo CP-675206); Mokyr et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998) y las patentes de EE.UU. N.º 5.977.318, 6.682.736, 7.109.003 y 7.132.281.

55 Cada una de estas referencias describe anticuerpos CTLA-4. Un anticuerpo clínico CTLA-4 preferido es el anticuerpo monoclonal humano 10D1 (también denominado MDX-010 e ipilimumab y disponible en Medarex, Inc., Bloomsbury, NJ) se desvela en el documento WO 01/14424.

Breve descripción de los dibujos

60 La FIGURA 1A-1B ilustra los resultados que muestran que el tratamiento concurrente con mAb CTLA-4 y dasatinib produjo efectos sinérgicos en el modelo de tumor de fibrosarcoma SA1N. Dasatinib se administró diariamente durante 11 días ("A") o durante 15 días siguiendo un programa intermitente (5 días sí/2 días de descanso) ("B").

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

65 La FIGURA 3A-3C ilustra los resultados que muestran que el tratamiento con dasatinib aumenta la actividad citolítica del mAb CTLA-4. Los ratones con tumores de colon CT26 subcutáneos se trataron con dasatinib (30 mg/kg, q1dx14, dos veces al día, los días 4-18 después de la implantación de células tumorales), CTLA-4 mAb (20

mg/kg, q4dx3, los días 4, 8, 12 después de la implantación de células tumorales) o la combinación de ambos agentes. Dos (A), 7 (B) y 14 (C) días después del tratamiento final, los ratones (n = 5/grupo) fueron inyectados con esplenocitos singénicos marcados con CFSE pulsados con péptidos específicos de CT26 (AH-1). Dieciocho horas después, se aislaron los esplenocitos y se determinó la actividad citolítica midiendo la proporción de células marcadas con CFSE (CFSE alto = péptido pulsado, CFSE bajo = no pulsado). La combinación de dasatinib y CTLA-4 mostró una mejora de la lisis de esplenocitos pulsados con péptidos que alcanzó significación estadística en el día 14 (p = 0,055).

La FIGURA 4A-4B ilustra los resultados que muestran que el tratamiento combinatorio con dasatinib y mAb CTLA-4 da como resultado un aumento en la proporción de células T activadas CD 8 (CD8+CD69+, Células T efectoras) sobre A) células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+, Células T supresoras) y B) células T CD4+ activadas en ganglios linfáticos que drenan el tumor (TDLN). Los ratones con tumores de colon CT26 subcutáneos se trataron con dasatinib (30 mg/kg, q1dx14, dos veces al día, los días 4-18 después de la implantación de células tumorales), CTLA-4 mAb (20 mg/kg, q4dx3, los días 4, 8, 12 después de la implantación de células tumorales) o la combinación de ambos agentes. Se recogieron TDLN 2 días después del tratamiento final y se sometieron a caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo.

La FIGURA 5 ilustra que el tratamiento concurrente con SPRYCEL® y CTLA-4 mAb produjo efectos mejorados en un modelo de tumor P815. SPRYCEL® se administró P.O. en los días 9-13, 16-20, 23-27 después de la implantación del tumor, mientras que el mAb anti-CTLA-4 se administró IP los días 10, 14 y 18.

La FIGURA 6 muestra que la actividad de bloqueo de CTLA-4 no fue abolida por el tratamiento concurrente con etopósido, paclitaxel o gemcitabina.

La FIGURA 7 muestra que el mAb de bloqueo de CTLA-4 en combinación con gemcitabina produjo efectos sinérgicos. Los ratones que lograron una respuesta completa ("CR") rechazaron un segundo redesafío con células CT-26 vivas, lo que sugiere que este tratamiento combinado provocó una respuesta inmune de memoria.

La FIGURA 8 muestra que el mAb de bloqueo CTLA-4 en combinación con etopósido produjo efectos sinérgicos.

La FIGURA 9 muestra que el mAb de bloqueo de CTLA-4 en combinación con agente o agentes estabilizadores de microtúbulos produjo un efecto sinérgico.

La FIGURA 10 muestra el orden en el que se administran la combinación CTLA-4 que bloquea el mAb y el agente quimioterapéutico que tiene relevancia para inhibir la proliferación. Como se muestra, la administración conjunta de gemcitabina junto con el mAb de bloqueo CTLA-4 mostró el mayor efecto antiproliferativo en comparación con la administración secuencial.

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

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

La FIGURA 13 muestra que gemcitabina modula la composición de las células inmunes en los ganglios linfáticos que drenan el tumor.

La FIGURA 14 muestra la expresión modulada de gemcitabina + bloqueo de CTLA-4 de genes implicados en la regulación inmunológica.

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y monoclóhidrato de 2-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, para su uso en un método sinérgico para el tratamiento de una enfermedad antiproliferativa, cáncer seleccionado de fibrosarcoma, carcinoma de pulmón, metástasis pulmonar y carcinoma de colon, que comprende administrar a una especie de mamífero que lo necesita una cantidad sinérgica, terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CTLA-4 con monoclóhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β).

La activación óptima de las células T requiere la interacción entre el receptor de las células T y el antígeno específico (Bretscher, P. et al., *Science*, 169:1042-1049 (1970)) (la primera señal) y el compromiso de los receptores coestimuladores en la superficie de la célula T con ligandos coestimuladores expresados por la célula presentadora de antígeno (APC) (la segunda señal). El fallo de la célula T para recibir una segunda señal puede conducir a la anergia clonal (Schwartz, R.H., *Science*, 248:1349-1356 (1990)). Dos receptores coestimuladores de células T importantes son CD28 y el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, CD152) cuyos ligandos en APC son B7-1 y B7-2 (Linsley, P.S. et al., *J. Exp. Med.*, 173:721-730 (1991); Linsley, P.S. et al., *J. Exp. Med.*, 174:561-569 (1991)). Aunque CD28 y CTLA-4 son miembros estrechamente relacionados de la superfamilia de Ig (Brunet, J.F. et al., *Nature*, 328:267-270 (1987)), funcionan antagonicamente. CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T (Gross, J.A. et al., *J. Immunol.*, 149:380-388 (1992)) y tras la unión con B7-1 o B7-2, mejora la señal del receptor de péptido de células T-MHC para promover la activación de células T, proliferación y producción de IL-2 (Linsley, P.S. et al., *J. Exp. Med.*, 173:721-730 (1991); Alegre, M.L. et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 1(3):220-228 (dic. 2001)). CTLA-4 no se encuentra en las células T en reposo pero se regula positivamente durante 2-3 días después de la activación de las células T (Lindsten, T. et al., *J. Immunol.*, 151:3489-3499 (1993); Walunas, T.L. et al., *Immunity*, 1, 405-413 (1994)). CTLA-4 también se une a B7-1 y B7-2 pero con mayor afinidad que CD28 (Linsley, P.S. et al., *Immunity*, 1:793-801 (1994)) y antagoniza la activación de células T, interfiere con la producción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 e interrumpe la progresión del ciclo celular de las células T activadas (Walunas, T.L. et al., *J. Exp. Med.*, 183:2541-2550 (1996); Krummel, M.F. et al., *J. Exp. Med.*, 183:2533-2540 (1996); Brunner, M.C. et al., *J. Immunol.*, 162:5813-

5820 (1999); Greenwald, R.J. et al., *Eur. J. Immunol.*, 32:366-373 (2002)). La respuesta global de las células T está determinada por la integración de todas las señales, estimulantes e inhibitorias.

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

La quimioinmunoterapia, la combinación de agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, es un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer que combina los efectos de agentes que atacan directamente a las células tumorales que producen necrosis o apoptosis de células tumorales, y agentes que modulan las respuestas inmunes del hospedador al tumor. Los agentes quimioterapéuticos podrían mejorar el efecto de la inmunoterapia al generar antígenos tumorales que serán presentados por las células presentadoras de antígenos creando una vacuna de células tumorales "polivalentes" y distorsionando la arquitectura tumoral, facilitando así la penetración de los agentes inmunoterapéuticos, así como la población inmune expandida.

Los antimetabolitos (incluyendo antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): Metotrexato, 5-fluorouracilo, Floxuridina, Citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, Fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

En la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento sinérgico de tumores cancerosos seleccionados de fibrosarcoma, carcinoma de pulmón, metástasis pulmonar y carcinoma de colon. Ventajosamente, la sinergia reduce el desarrollo de tumores, reduce la carga tumoral o produce regresión tumoral en un hospedador mamífero.

La combinación de un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina con al menos un anticuerpo anti-CTLA4, también puede incluir la adición de un agente citotóxico antiproliferativo solo o en combinación con radioterapia.

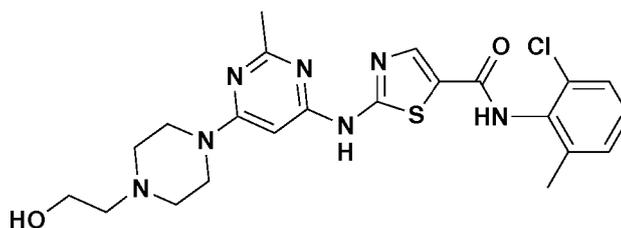
Otros agentes citotóxicos antiproliferativos son navelbena, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

Las combinaciones para el uso médico de la presente invención también pueden usarse junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad particular contra la afección que se está tratando. La frase "radioterapia" incluye rayos X o rayos gamma que se administran desde una fuente externamente aplicada tales como un haz o mediante la implantación de pequeñas fuentes radiactivas.

Como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contenido indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un péptido" incluye una combinación de dos o más péptidos, y similares.

"Aproximadamente" como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tales como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados.

Tal como se conoce en la técnica, dasatinib también se conoce como N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y describe un compuesto que tiene la siguiente estructura (I):



(I)

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

Tal como se conoce en la técnica, Ipilimumab se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y es una IgG_{1k} completamente humana anticuerpo derivado de ratones transgénicos que tienen genes humanos que codifican cadenas pesadas y ligeras para generar un repertorio funcional humano. También puede denominarse el ipilimumab mediante su registro CAS N.º 477202-00-9 y se describe como anticuerpo 10DI en la publicación PCT No. WO 01/14424. Específicamente, Ipilimumab describe un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CTLA4, que comprende una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 1, y que comprende una región de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2. Las composiciones farmacéuticas de ipilimumab incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden ipilimumab y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Se proporcionan ejemplos de una composición farmacéutica que comprende ipilimumab en la publicación PCT n.º WO 2007/067959. Impilimumab puede administrarse por vía intravenosa.

Región variable de la cadena ligera para Impilimumab:

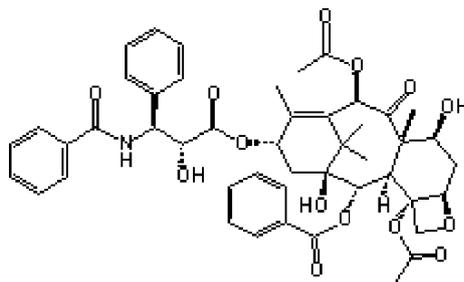
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSPWTFGQGTKVEIK
 (SEQ ID NO:1)

Región variable de cadena pesada para Impilimumab:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS
 YDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLG
 PFDYWGQGLTVVSS (SEQ ID NO:2)

Como se observa en otra parte en el presente documento, la administración de uno o más anticuerpos anti-CTLA4 puede administrarse sola o en combinación con un antígeno peptídico (por ejemplo, gp100), además de un agente antiproliferativo desvelado en el presente documento. Un ejemplo no limitante de un antígeno peptídico sería un péptido gp100 que comprende, o que consiste alternativamente en, la secuencia seleccionada del grupo que consiste en: IMDQVPFSV (SEQ ID NO: 3) e YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 4). Tal péptido puede administrarse por vía oral, o preferentemente mediante inyección s.c. a 1 mg emulsionado en adyuvante de Freund incompleto (IFA) inyectado s.c. en una extremidad, y 1 mg del mismo péptido o uno diferente emulsionado en IFA puede inyectarse en otra extremidad.

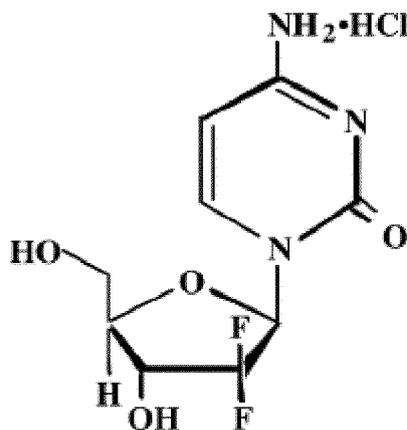
Tal como se conoce en la técnica, paclitaxel se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (II):



(II).

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

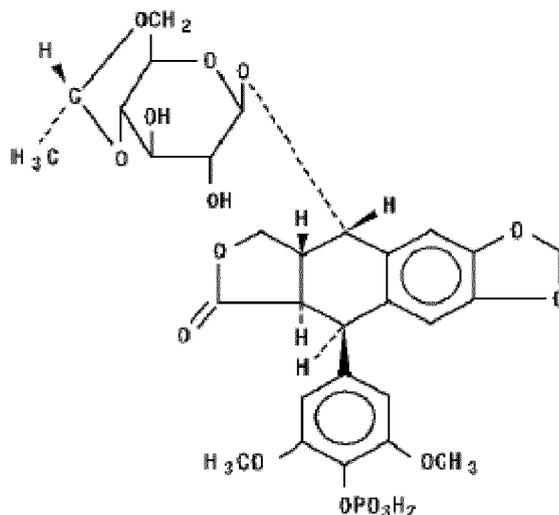
Tal como se conoce en la técnica, gemcitabina se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (III):



(III).

El compuesto (III) también puede denominarse monoclóhidrato de 2'-desoxi-2', 2'-difluorocitidina (isómero β) de acuerdo con la nomenclatura IUPAC. El uso del término "2'-desoxi-2', 2'-difluorocitidina monoclóhidrato (isómero β)" abarca (a menos que se indique lo contrario) solvatos (incluidos los hidratos) y formas polimórficas del compuesto (III) o sus sales. Las composiciones farmacéuticas de 2'-desoxi-2', 2'-difluorocitidina monoclóhidrato (isómero β) y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende monoclóhidrato de 2'-desoxi-2', 2'-difluorocitidina (isómero β) es GEMZAR® (gemcitabina HCl). GEMZAR® comprende monoclóhidrato de 2'-desoxi-2', 2'-difluorocitidina (isómero β) como principio activo, para infusión intravenosa que incluye ingredientes inactivos en forma estéril para uso intravenoso únicamente. Los viales de GEMZAR® contienen 200 mg o 1 g de gemcitabina HCl (expresado como base libre) formulado con manitol (200 mg o 1 g, respectivamente) y acetato sódico (12,5 mg o 62,5 mg, respectivamente) como un polvo liofilizado estéril. Es posible que se haya añadido ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico para ajustar el pH.

Tal como se conoce en la técnica, etopósido se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (IV):



(III).

- 5 El compuesto (IV) también puede denominarse 4'-desmetilepodoxiloxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-β-D-glucopiranosido], 4'-(fosfato de dihidrógeno) de acuerdo con la nomenclatura IUPAC. Uso del término "4'-desmetilepodoxiloxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-β-D-glucopiranosido], 4'-(fosfato de dihidrógeno)" abarca (a menos que se indique lo contrario) solvatos (incluyendo hidratos) y formas polimórficas del compuesto (IV) o sus sales. Las composiciones farmacéuticas de 4'-desmetilepodoxiloxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-β-D-glucopiranosido], 4'-(fosfato de dihidrógeno) y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende 4'-desmetilepodoxiloxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-β-D-glucopiranosido], 4'-(fosfato de dihidrógeno) es ETOPOPHOS (fosfato de etopósido). ETOPOPHOS comprende 4'-desmetilepodoxiloxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-β-D-glucopiranosido], 4'-(fosfato de dihidrógeno) como principio activo, para infusión intravenosa, incluyendo ingredientes inactivos en forma estéril para uso intravenoso únicamente, en viales monodosis que contienen fosfato de etopósido equivalente a 100 mg de etopósido, 32,7 mg de citrato sódico USP y 300 mg de dextrano 40.

Los agentes antiproliferativos adecuados incluyen taxanos, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL®), docetaxel, discodermolida (DDM), dictioestatina (DCT), pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona B1, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]-deshidrodesoxiepotilona B, C2,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A C6-C8 en puente, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discoderomolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, BMS-310705, ABJ-789, XAA296A (discoderomolida), TZX-1027 (soblidotina), ILX-651 (tasidotina clorhidrato), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hemicasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, inmunoconjugados de maitansinoide (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didemetil-(+)-discodermolidas y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizadores de la microtubulina conocidos en la técnica.

30 La frase "inhibidor de la proteína tirosina quinasa" pretende referirse a agentes que inhiben uno o más miembros de la familia de la proteína tirosina quinasa. Algunos ejemplos no limitantes de inhibidores de la proteína tirosina quinasa incluyen dasatinib, imatinib, nilotinib, PD 180970, GGP76030, AP23464, SKI 606, NS-187 y/o AZD0530. Dichos inhibidores de la proteína tirosina quinasa pueden administrarse solos o en combinación con otras moléculas, tales como los inhibidores de T3151.

35 La frase "agente modulador de microtubulina" pretende referirse a agentes que estabilizan la microtubulina o desestabilizan la síntesis y/o polimerización de microtubulina.

40 Como se hace referencia en el presente documento, el al menos un agente antiproliferativo puede ser un agente que afecta a los microtúbulos. Un agente que afecta a los microtúbulos interfiere con la mitosis celular y es bien conocido en la técnica por su actividad citotóxica antiproliferativa. Los agentes que afectan a los microtúbulos incluyen alocolicina (NSC 406042), Halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolostatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (TAXOL®, NSC 125973), derivados de TAXOL® (por ejemplo, derivados (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina NSC 361792), tritil cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574),

epotilonas naturales y sintéticas, incluyendo epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, desoxiepotilona A, desoxiepotilona B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7-11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17 oxabicyclo [14.1.0]heptadecan-5,9-diona (desvelado en la Patente de EE.UU. 6.262.094, publicada el 17 de julio de 2001), [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminometil)-4-tiazolil]-1-metiletienil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4-17-dioxabicyclo[14.1.0]-heptadecan-5,9-diona (desvelado en el documento USSN 09/506.481 presentado el 17 de febrero de 2000 y los ejemplos 7 y 8 en el presente documento) y derivados de los mismos; y otros agentes disruptores de microtúbulos. Algunos agentes antineoplásicos adicionales incluyen, discodermolida (véase Service, *Science*, 274:2009 (1996)) estramustina, nocodazol, MAP4 y similares. También se describen ejemplos de tales agentes en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Bulinski, *J. Cell Sci.*, 110:3055-3064 (1997); Panda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:10560-10564 (1997); Muhlradt, *Cancer Res.*, 57:3344-3346 (1997); Nicolaou, *Nature*, 387:268-272 (1997); Vasquez, *Mol. Biol. Cell.*, 8:973-985 (1997); Panda, *J. Biol. Chem.*, 271:29807-29812 (1996).

En los casos en que es deseable hacer que las células proliferativas de forma aberrante permanezcan quiescentes junto con o antes del tratamiento con los métodos quimioterapéuticos, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17a-Etinilestradiol, Dietilestilbestrol, Testosterona, Prednisona, Fluoximasterona, Propionato de dromostanolona, Testolactona, Megestrolacetato, Metilprednisolona, Metil-testosterona, Prednisolona, Triamcinolona, Clortrianiseno, Hidroxiprogesterona, Aminoglutetimida, Estramustina, Medroxiprogesteronaacetato, Leuprolida, Flutamida, Toremifeno, ZOLADEX® también pueden administrarse al paciente.

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

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

Como se ha mencionado, ciertos agentes antiproliferativos son agentes antiangiogénicos y antivascuales y, mediante la interrupción del flujo de sangre a tumores sólidos, hace que las células cancerosas estén inactivas al privarlas de nutrición. La castración, que también hace que los carcinomas dependientes de andrógenos no sean proliferativos, también puede utilizarse. La inanición por medios distintos a la interrupción quirúrgica del flujo sanguíneo es otro ejemplo de un agente citostático. Una clase particularmente preferida de agentes citostáticos antivascuales son las combretastatinas. Otros ejemplos de agentes citostáticos incluyen inhibidores de MET quinasa, Inhibidores de la quinasa MAP, inhibidores de tirosina quinasas no receptoras y receptoras, inhibidores de la señalización de integrina e inhibidores de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina. Un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, un agente estabilizador de microtubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como etopósido, pueden administrarse en combinación o combinaciones sinérgicas con al menos un modulador de la vía coestimuladora, particularmente un agente anti-CTLA4, para el tratamiento y prevención de un trastorno proliferativo, además de un trastorno asociado a BCR-ABL, un trastorno mutante asociado a BCR-ABL y/o un trastorno asociado a proteína tirosina quinasa, un trastorno asociado a la presencia de una mutación BCR-ABL resistente a imatinib, una mutación BCR-ABL resistente a dasatinib, CML, CML resistente a imatinib y/o CML intolerante a imatinib.

El término "BCR-ABL" como se usa en el presente documento incluye tanto BCR-ABL de tipo silvestre como mutante.

Los "trastornos asociados a BCR-ABL" son aquellos trastornos que resultan de la actividad de BCR-ABL, incluyendo actividad de BCR-ABL mutante, y/o que se alivian mediante la inhibición de BCR-ABL, incluyendo la expresión y/o actividad de BCR-ABL mutante. Una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 produce la proteína de fusión oncogénica BCR-ABL. La frase "trastornos asociados a BCR-ABL" incluye "trastornos asociados a BCR-ABL mutantes".

Los trastornos incluyen, por ejemplo, leucemias, incluyendo, por ejemplo, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfoblástica aguda cromosómica Filadelfia positiva (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, asésino natural senonasal, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado a la mastocitosis. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como la mastocitosis cutánea difusa,

mastocitoma solitario en humanos, así como mastocitoma canino y algunos subtipos raros tales como mastocitosis ampollosa, eritrodérmica y teleangiectática, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tales como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado a mastocitosis y leucemia de mastocitos. También se incluyen diversos cánceres adicionales dentro del alcance de los trastornos asociados a la proteína tirosina quinasa, que incluyen, por ejemplo, los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides, testículos, particularmente seminomas testiculares y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores estromales gastrointestinales ("GIST"); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, tricoleucemia y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas refractarios a quimioterapia y sarcoma de Kaposi. En determinadas realizaciones preferidas, el trastorno es leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma o tumores sólidos. En determinadas realizaciones preferidas, la leucemia es leucemia mieloide crónica (CML), Ph+ ALL, AML, CML resistente a imatinib, CML intolerante a imatinib, CML acelerada, CML en fase de explosión linfoide.

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

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, asesino natural senonasal, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfocítica crónica (CML).

"Leucemia" se refiere a enfermedades malignas progresivas de los órganos formadores de sangre y generalmente se caracteriza por una proliferación distorsionada y el desarrollo de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. La leucemia se clasifica en general clínicamente dependiendo de (1) la duración y el carácter de la enfermedad -- aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mieloidea (mielógena), linfoidea (linfógena) o monocítica; y (3) el aumento o no aumento en el número de células anómalas en la sangre -- leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemias incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, leucemia aleucémica, leucemia leucocitémica, leucemia basofílica, leucemia de citoblastos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, tricoleucemia, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia blastocítica, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia mieloide granulocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia blastocítica, leucemia subleucémica y leucemia celular indiferenciada.

Un "BCR-ABL mutante" abarca una tirosina quinasa BCR-ABL con una secuencia de aminoácidos que difiere de la tirosina quinasa BCR-ABL de tipo silvestre por una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido en la posición 507 de la SEQ ID NO: 2 con otro aminoácido daría como resultado una tirosina quinasa BCR-ABL mutante.

El "trastorno asociado a BCR-ABL mutante" se usa para describir un trastorno asociado a BCR-ABL en el cual las células implicadas en dicho trastorno son o se vuelven resistentes al tratamiento con un inhibidor de quinasa usado para tratar dicho trastorno como resultado de una mutación en BCR-ABL. Por ejemplo, un compuesto inhibidor de la quinasa puede usarse para tratar una afección cancerosa, cuyo compuesto inhibe la actividad de BCR-ABL de tipo silvestre que inhibirá la proliferación y/o inducirá la apoptosis de las células cancerosas. Con el tiempo, puede introducirse una mutación en el gen que codifica la quinasa BCR-ABL, que puede alterar la secuencia de aminoácidos de la quinasa BCR-ABL y hacer que las células cancerosas se vuelvan resistentes, o al menos parcialmente resistentes, al tratamiento con el compuesto. Como alternativa, una mutación puede ya estar presente dentro del gen que codifica la quinasa BCR-ABL, genéticamente o bien como consecuencia de un evento oncogénico, independiente

del tratamiento con un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, lo cual puede ser un factor que resulta en la propensión de estas células a diferenciarse en un estado canceroso o proliferativo, y también hace que estas células sean menos sensibles al tratamiento con un inhibidor de la proteína tirosina quinasa. Se espera que tales situaciones resulten, bien directa o indirectamente, en un "trastorno asociado a la quinasa BCR-ABL mutante" y el tratamiento de dicha afección requerirá un compuesto que sea al menos parcialmente eficaz contra el BCR-ABL mutante, preferentemente contra BCR-ABL de tipo salvaje y el BCR-ABL mutante. En el caso en que un individuo desarrolle al menos una resistencia parcial al inhibidor de la quinasa imatinib, el trastorno asociado a BCR-ABL mutante es uno que resulta de una mutación BCR-ABL resistente a imatinib, o una mutación BCR-ABL resistente a inhibidor de proteína tirosina quinasa. Análogamente, en el caso de que un individuo desarrolle al menos una resistencia parcial al inhibidor de quinasa N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, el trastorno asociado a BCR-ABL mutante es uno que resulta de una mutación BCR-ABL resistente a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una mutación BCR-ABL resistente a inhibidor de proteína tirosina quinasa. Los presentes inventores descubrieron que después del tratamiento con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, ciertos individuos desarrollaron mutaciones E507G. En el presente documento se describen métodos para tratar trastornos asociados a BCR-ABL mutantes y métodos para identificar si un individuo tiene un trastorno asociado a BCR-ABL mutante.

Los "trastornos asociados a la proteína tirosina quinasa" de particular interés en el presente documento son aquellos trastornos que resultan, al menos en parte, de actividad aberrante de SRC o BCR-ABL (TS o mutante) y/o que se alivian mediante la inhibición de SRC o BCR-ABL (TS o mutante) a los que se denominan en el presente documento "trastornos asociados a SRC", "cáncer asociado a SRC" o "trastornos asociados a BCR-ABL", "cáncer asociado a BCR-ABL"

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

"Mutación BCR-ABL resistente a dasatinib" se refiere a una mutación específica en la secuencia de aminoácidos de BCR-ABL que confiere a las células que expresan dicha mutación al menos una resistencia parcial al tratamiento con dasatinib. Como se discute en el presente documento tales mutaciones pueden incluir mutaciones en la posición T315I, T315A, F317I, F317I y E507G de BCR-ABL. Las mutaciones adicionales de BCR-ABL resistentes a dasatinib también pueden incluir otras mutaciones de BCR-ABL descritas en otra parte del presente documento.

"CML resistente a Imatinib" se refiere a una CML en la que las células implicadas en CML son resistentes al tratamiento con imatinib. Generalmente es el resultado de una mutación en BCR-ABL.

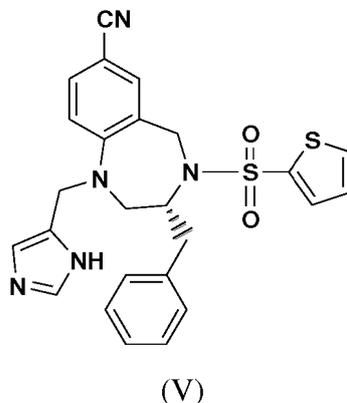
"CML intolerante a imatinib" se refiere a una CML en la cual el individuo que tiene la CML es intolerante al tratamiento con imatinib, es decir, los efectos secundarios tóxicos y/o perjudiciales del imatinib superan cualquier efecto terapéuticamente beneficioso.

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

Un "inhibidor de farnisil transferasa" puede ser cualquier compuesto o molécula que inhiba la farnisil transferasa. El

inhibidor de farnilsil transferasa puede tener la fórmula (II), (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-carbonitrilo, sal de clorhidrato. El compuesto de fórmula (V) es un inhibidor de FT citotóxico que se sabe que destruye preferentemente las células cancerosas no proliferantes. El compuesto de fórmula (V) puede ser además útil para matar células madre.

5



(V)

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

10

La frase "proteína tirosina quinasa" como se usa en el presente documento incluye enzimas que catalizan la transferencia del fosfato terminal de trifosfato de adenosina (ATP) a restos de tirosina en sustratos de proteínas. Algunos ejemplos no limitantes de tirosina quinasa incluyen receptores de tirosina quinasa tales como EGFR (por ejemplo, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-II1R, IRR (receptor relacionado con el receptor de insulina), PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, CSF-1R, FGFR 1-4, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, LTK (tirosina quinasa de leucocito), ALK (linfoma quinasa anaplásica), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3 y RTK 106; y tirosina quinasa no receptoras tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK. Un experto en la materia conocerá otras tirosina quinasa receptoras y/o no receptoras que pueden marcarse como diana usando los inhibidores descritos en el presente documento.

15

20

25

30

35

La frase "inhibidor de tirosina quinasa" incluye cualquiera de diversos agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de tirosina quinasa receptoras y/o no receptoras. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los inhibidores de tirosina quinasa generalmente inhiben las tirosina quinasa diana al unirse al sitio de unión a ATP de la enzima. Algunos ejemplos de inhibidores de la tirosina quinasa incluyen gefitinib (IRESSA®), sunitinib (SUTENT®; SU11248), erlotinib (TARCEVA®; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (GLEEVEC®; STI571), dasatinib (BMS-354825), leflunomida (SU101), vandetanib (ZACTIMA®; ZD6474), nilotinib, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Algunos inhibidores adicionales de tirosina quinasa se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.618.829, 5.639.757, 5.728.868, 5.804.396, 6.100.254, 6.127.374, 6.245.759, 6.306.874, 6.313.138, 6.316.444, 6.329.380, 6.344.459, 6.420.382, 6.479.512, 6.498.165, 6.544.988, 6.562.818, 6.586.423, 6.586.424, 6.740.665, 6.794.393, 6.875.767, 6.927.293 y 6.958.340. Un experto en la materia conocerá otros inhibidores de la tirosina quinasa.

Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Además, su administración se describe en la bibliografía convencional.

40

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

45

Las composiciones pueden comprender además uno o más ingrediente o ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables tales como alumbre, estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes aromatizantes, adyuvantes y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral o parenteral, incluyendo vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

50

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

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

5 Además, a las composiciones orales pueden añadirse agentes edulcorantes y/o aromatizantes. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, normalmente se usan soluciones estériles del principio o principios activos y el pH de las soluciones deberá ajustarse y tamponarse de forma adecuada. Para uso intravenoso, se controlará la concentración total del soluto o solutos con el fin de convertir en isotónica la preparación.

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

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

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

También se describen preparaciones sólidas destinadas a la conversión, rápidamente antes de su uso, a preparaciones líquidas para administración oral o parenteral, se describen en el presente documento. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

25 El modulador de la vía coestimuladora, preferentemente un agente anti-CTLA4, descrito en el presente documento también puede administrarse por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tomar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o reservorio como son convencionales en la técnica para esta finalidad.

30 Si se formula como una dosis fija, los principios activos de las composiciones de combinación farmacéutica se emplean dentro de los intervalos de dosificación descritos a continuación. Como alternativa, el modulador de la vía coestimuladora y el inhibidor de la proteína tirosina quinasa pueden administrarse por separado en los intervalos de dosificación descritos a continuación. El modulador de la vía coestimuladora se administra en el intervalo de dosificación descrito a continuación siguiendo a o simultáneamente con la administración del inhibidor de la proteína tirosina quinasa en el intervalo de dosificación descrito a continuación.

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

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

40 Si bien esta tabla proporciona intervalos de dosificación a modo de ejemplo del inhibidor de la proteína tirosina quinasa, preferentemente SPRYCEL®, un modulador de la vía del coestimulador, preferentemente anticuerpo anti-CTLA4, y/o agentes de vacuna contra el cáncer, al formular las composiciones farmacéuticas, el clínico puede utilizar las dosis preferidas según lo justifique la condición del paciente que está siendo tratado. El anticuerpo anti-CTLA4 puede administrarse preferentemente a aproximadamente 0,3 - 10 mg/kg, o la dosis máxima tolerada. En una realización, se

45 administra una dosis de anticuerpo CTLA-4 aproximadamente cada tres semanas. Como alternativa, el anticuerpo CTLA-4 puede administrarse mediante un régimen de dosificación progresivo que incluye administrar una primera dosificación de anticuerpo CTLA-4 a aproximadamente 3 mg/kg, una segunda dosificación de anticuerpo CTLA-4 a aproximadamente 5 mg/kg y una tercera dosis de anticuerpo CTLA-4 a aproximadamente 9 mg/kg.

50 ¹ Cada combinación enumerada en el presente documento incluye opcionalmente la administración de una vacuna anticancerígena desde aproximadamente 0,001-100 mg.

De manera análoga, el inhibidor de la proteína tirosina quinasa, preferentemente SPRYCEL®, puede administrarse preferentemente a aproximadamente 2 veces por día a 70 mg. Alternativamente, puede dosificarse a, por ejemplo, aproximadamente 50, aproximadamente 70, aproximadamente 90, aproximadamente 100, 110 o 120 BID o 100, 140

o 180 una vez al día, o la dosis máxima tolerada. La dosis de un inhibidor de la proteína tirosina quinasa puede depender de varios factores, incluyendo el estadio de la enfermedad, la presencia de una o más mutaciones en la proteína tirosina quinasa marcada como diana, mutaciones BCR-ABL, etc. La dosis específica que debe administrarse basándose en la presencia de uno o más de tales factores está dentro de la experiencia del experto.

5 De manera análoga, el etopósido puede administrarse preferentemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 900 mg por día. El etopósido está disponible para infusión intravenosa como un liofilizado estéril en viales de dosis única que contienen fosfato de etopósido equivalente a 100 mg de etopósido, 32,7 mg de citrato sódico USP y 300 mg de dextrano 40. Como alternativa, puede dosificarse a, por ejemplo, aproximadamente 50,
10 aproximadamente 70, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800 o aproximadamente 900 diariamente o la dosis máxima tolerada.

15 De manera análoga, la gemcitabina puede administrarse preferentemente de aproximadamente 200 mg/m a aproximadamente 1250 mg/m por día por vía intravenosa durante una infusión de 30 a 90 minutos. La gemcitabina está disponible para perfusión intravenosa que contiene de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1250 mg de gemcitabina HCl (expresada como base libre) formulada con manitol (200 mg o 1 g, respectivamente) y acetato sódico (12,5 mg o 62,5 mg, respectivamente) como un polvo liofilizado estéril. Como alternativa, puede dosificarse a, por ejemplo, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300,
20 aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 1100, aproximadamente 1200 o aproximadamente 1250 diariamente o la dosis máxima tolerada.

25 Las combinaciones para el uso médico de la presente invención también pueden usarse junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad particular contra la afección que se está tratando.

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

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

Además, la presente invención proporciona un régimen de dosificación creciente, que incluye administrar una dosis cada vez mayor de anticuerpo CTLA-4 aproximadamente cada seis semanas.

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

La dosis real empleada puede variar dependiendo de los requisitos del paciente y la gravedad de la afección que se está tratando. La determinación de la dosificación adecuada para una situación particular está dentro de los conocimientos de la técnica. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas por debajo de la dosis óptima del compuesto. En lo sucesivo, la dosificación se aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. Por conveniencia, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día si se desea. También puede usarse terapia intermitente (por ejemplo, una semana de cada tres semanas o tres de cada cuatro semanas).

55 En el contexto del uso médico de la presente invención, otros agentes usados en la modulación del crecimiento tumoral o metástasis en un entorno clínico, tales como antieméticos, también pueden administrarse según se desee.

60 Las combinaciones para el uso médico de la presente invención también pueden administrarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su particular utilidad contra la afección que se está tratando. Alternativamente, las combinaciones para el uso médico de la presente invención pueden usarse secuencialmente con agente o agentes farmacéuticamente aceptables conocidos cuando una formulación de combinación múltiple es inapropiada.

65 El agente o agentes quimioterapéuticos y/o la radioterapia pueden administrarse de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Será evidente para aquellos expertos en la materia que la administración

del agente o agentes quimioterapéuticos y/o la radioterapia pueden variarse en función de la enfermedad que se esté tratando y los efectos conocidos del agente o agentes quimioterapéuticos y/o la radioterapia sobre dicha enfermedad. También, de acuerdo con los conocimientos del clínico experto, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, cantidades de dosificaciones y tiempos de administración) pueden variarse en vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados (es decir, agente o agentes anti-CTLA4 e inhibidor de proteína tirosina quinasa) en el paciente, y en vista de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

Un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, tales como dasatinib, un agente estabilizador de microtubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como el etopósido puede administrarse simultánea o secuencialmente (antes o después) con un agente anti-CTLA4. Por tanto, no es necesario que los agentes terapéuticos anti-CTLA4 y un agente estabilizador de microtubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como etopósido se administren simultánea o esencialmente de manera simultánea. La ventaja de una administración simultánea o esencialmente simultánea o secuencial (antes o después) está dentro de la determinación del médico experto.

Las combinaciones adicionales también abarcadas por la presente invención, incluyen, gemcitabina + cisplatino + ipilimumab. Se desvelan combinaciones adicionales que incluyen ipilimumab + carboplatino + paclitaxel; ipilimumab + etopósido + cisplatino o carboplatino; ipilimumab + pem (cisPlatino, etopósido y mitomicina) + cisplatino. Estas combinaciones pueden administrarse secuencialmente (antes o después de la otra), al mismo tiempo, o en cualquier orden recomendado por un médico cualificado.

También, en general, un agente estabilizador de microtubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como el etopósido y el agente o agentes anti-CTLA4 no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica y pueden, debido a diferentes características físicas y químicas, tener que ser administrados por diferentes vías.

Si es un agente estabilizante de micro tubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como el etopósido y el agente o agentes anti-CTLA4 no se administran simultánea o esencialmente de forma simultánea, después el orden inicial de administración de un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, tales como dasatinib, un agente estabilizador de micro tubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como el etopósido y el agente o agentes anti-CTLA4 pueden variar. Por tanto, por ejemplo, un agente estabilizador de micro tubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como etopósido puede administrarse primero seguido de la administración del agente o agentes anti-CTLA4; o el agente o agentes anti-CTLA4 pueden administrarse primero seguido de la administración de un inhibidor de proteína tirosina quinasa, un agente estabilizador de micro tubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como etopósido. Esta administración alternativa puede repetirse durante un solo protocolo de tratamiento. La determinación del orden de administración y el número de repeticiones de administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento, está bien dentro del conocimiento del médico experto después de la evaluación de la enfermedad que se está tratando y la condición del paciente.

Por tanto, de acuerdo con la experiencia y el conocimiento, el médico practicante puede modificar cada protocolo para la administración de un componente (agente terapéutico - es decir, un inhibidor de la proteína tirosina quinasa, tales como dasatinib, un agente estabilizador de microtubulina, tales como paclitaxel; un análogo de nucleósido, tales como gemcitabina; o un agente inductor de doble cadena de ADN, tales como etopósido, agente o agentes anti-CTLA4), del tratamiento de acuerdo con las necesidades individuales del paciente, a medida que avanza el tratamiento.

El clínico tratante, al juzgar si el tratamiento es efectivo a la dosis administrada, considerará el bienestar general del paciente, así como signos más definidos, como el alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, inhibición del crecimiento tumoral, contracción real del tumor o inhibición de metástasis. El tamaño del tumor puede medirse mediante métodos convencionales tales como estudios radiológicos, por ejemplo, CAT o escaneo RMI y las mediciones sucesivas pueden usarse para juzgar si el crecimiento del tumor se ha retrasado o incluso revertido. El alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad tales como el dolor, y la mejora de la condición general también pueden usarse para ayudar a juzgar la eficacia del tratamiento.

Como se hace referencia en otro lugar en el presente documento, la dosis óptima para el inhibidor de la proteína tirosina quinasa puede depender de varios factores, incluyendo pero limitado a la presencia de una o más mutaciones en el inhibidor de la proteína tirosina quinasa dirigida y/o en BCR-ABL.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un inhibidor de una quinasa BCR-ABL mutante puede ser una función de la mutación presente. Por ejemplo, Shah et al. desvelan que las líneas celulares con ciertas mutaciones en BCR-ABL quinasa son más sensibles a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que las líneas celulares con diferentes mutaciones de quinasa BCR-ABL. Por ejemplo, las células que comprenden una mutación F317L en la quinasa BCR-ABL pueden requerir una concentración tres a cinco veces

mayor de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que las líneas celulares que expresan una mutación F317I. Un experto en la materia apreciará la diferencia en la sensibilidad de las células mutantes de la quinasa BCR-ABL y determinará una dosis terapéuticamente eficaz en consecuencia.

5 Algunos ejemplos de dosis terapéuticamente eficaces de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que puede estar justificada en función de la sensibilidad relativa de los mutantes de quinasa BCR-ABL a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida en comparación con la quinasa BCR-ABL de tipo silvestre puede determinarse usando diversos ensayos bioquímicos *in vitro* incluyendo proliferación celular, fosforilación de tirosina BCR-ABL, fosforilación del sustrato peptídico y/o ensayos de autofosforilación. Por ejemplo, las dosis aproximadas terapéuticamente eficaces de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida pueden calcularse basándose en la multiplicación de la dosis típica con el cambio de sensibilidad en uno cualquiera o más de estos ensayos para cada mutante de quinasa BCR-ABL. O'Hare et al. (*Cancer Res.*, 65(11):4500-4505 (2005)) realizaron un análisis de la sensibilidad relativa de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con varios mutantes de quinasa BCR-ABL clínicamente relevantes. Por ejemplo, el mutante E255V tuvo un cambio de veces de "1" en el ensayo de quinasa GST-Abl, mientras que este mismo mutante tuvo un cambio de veces de "14" en el ensayo de proliferación celular. Por tanto, una dosis terapéuticamente relevante de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para pacientes que albergan esta mutación podría variar, por ejemplo, en cualquier lugar de 1 a 14 veces mayor que la dosis típica. En consecuencia, las dosis terapéuticamente relevantes de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para cualquiera de los mutantes de quinasa BCR-ABL pueden ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 300 veces superiores a la dosis prescrita. Como alternativa, las dosis terapéuticamente relevantes de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida pueden ser, por ejemplo, 0,9x, 0,8x, 0,7x, 0,6x, 0,5x, 0,4x, 0,3x, 0,2x, 0,1x, 0,09x, 0,08x, 0,07x, 0,06x, 0,05x, 0,04x, 0,03x, 0,02x o 0,01x de la dosis prescrita.

Según O'Hare et al., el mutante M244V tuvo un cambio de veces de "1,3" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "1,1" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante G250E tuvo un cambio de veces de "0,5" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "3" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante Q252H tuvo un cambio de veces de "4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante Y253F tuvo un cambio de veces de "0,6" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "4" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante Y253H tuvo un cambio de veces de "3" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "2" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante E255K tuvo un cambio de veces de "0,3" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "2" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "7" en el ensayo de proliferación celular; el mutante F317L tuvo un cambio de veces de "1,5" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "1,4" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "9" en el ensayo de proliferación celular; el mutante M351T tuvo un cambio de veces de "0,2" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "2" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "1,4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante F359V tuvo un cambio de veces de "0,8" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "2" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "3" en el ensayo de proliferación celular; el mutante H396R tuvo un cambio de veces de "1,3" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio de veces de "3" en el ensayo de autofosforilación y un cambio de veces de "2" en el ensayo de proliferación celular.

Para los pacientes que albergan la mutación T315I, ya sea solo o en combinación con otra mutación BCR-ABF desvelada en el presente documento, la administración de dosis más altas de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o combinaciones de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un agente estabilizador de tubulina (por ejemplo, pacitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un inhibidor de farnilsil transferasa; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y otro inhibidor de la proteína tirosina quinasa; cualquier otra combinación desvelada en el presente documento; un régimen de frecuencia de dosificación aumentada de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida; y cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprenda N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida desvelada en el presente documento, puede estar justificada. Como alternativa, las combinaciones de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con un inhibidor de T315I también pueden estar justificadas.

Los regímenes de dosificación que implican N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida se describen en el número el documento EE.UU. N.º de serie 10/395.503, presentado el 24 de marzo de 2003; y *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004, Volumen 104: Resumen 20,

"Hematologic and Cytogenetic Responses in imatinib-Resistant Accelerated and Blast Phase Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients Treated with the Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide: Results from a Phase I Dose Escalation Study", por Moshe Talpaz et al.

5 Composiciones adicionales anti-CTLA4

Un anticuerpo anti-CTLA4 preferido para el uso médico de la presente invención es el anticuerpo anti-CTLA4 ipilimumab. La presente invención abarca otros anticuerpos y fragmentos anti-CTLA4 que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido, fragmento de polipéptido, o variante de CTLA4, y/o un epítipo de CTLA4 (según lo determinado por inmunoensayos bien conocidos en la técnica para analizar la unión específica de antígeno-anticuerpo). Los anticuerpos incluyen policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina para el uso médico de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Por otro lado, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) pretende incluir moléculas intactas, así como, fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂ fragmentos) que son capaces de unirse específicamente a la proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal o la planta, y puede tener una unión de tejido menos específica que un anticuerpo intacto (Wahl et al., *J. Nucl. Med.*, 24:316-325 (1983)). Por tanto, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de un FAB u otra biblioteca de expresión de inmunoglobulina. Por otro lado, los anticuerpos anti-CTLA4 incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados.

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

Las adnectinas desveladas pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos en las Publicaciones de EE.UU. de propiedad conjunta 2007/0082365 y 2008/0139791.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. N.º 4.946.778; Bird, *Science*, 242:423-442 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., *Nature*, 334:544-554(1989)) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de la cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido monocatenario. Pueden usarse también técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science*, 242:1038-1041 (1988)).

La expresión recombinante de un anticuerpo anti-CTLA4, o fragmento, derivado o análogo del mismo, (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un anticuerpo monocatenario), requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Una vez que un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo anti-CTLA4 o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo (que contiene preferentemente el dominio variable de la cadena pesada o ligera), se ha obtenido, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo anti-CTLA4 puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo y las señales de control de la transcripción y la traducción adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por tanto, los vectores replicables comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-CTLA4, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unida operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de EE.UU. N.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo anti-CTLA4. Por tanto, las células hospedadoras contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-CTLA4, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla, unido operativamente a un promotor heterólogo. Para la expresión de anticuerpos bicatenarios, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera pueden coexpresarse en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

Puede usarse diversos sistemas vectoriales de expresión en el hospedador para expresar las moléculas de anticuerpo anti-CTLA4. Dichos sistemas de expresión en el hospedador representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias que codifican los nucleótidos adecuados, expresar una molécula de anticuerpo in situ. Estos incluyen microorganismos tales como las bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). Preferentemente, células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tales como un elemento promotor mayor del gen temprano intermedio procedente del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos (Foecking et al., *Gene*, 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology*, 8:2 (1990)).

En sistemas bacterianos, puede seleccionarse de forma ventajosa una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto de la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden desearse vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.*, 2:1791 (1983)), en el cual la secuencia que codifica el anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región que codifica lac Z de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109 (1985); Van Heeke et al., *J. Biol. Chem.*, 24:5503-5509 (1989)); y similares. Pueden usarse también vectores pGEX para expresar los polipéptido extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de una matriz de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa de la trombina o de la proteasa del factor Xa de tal manera que el producto del gen diana clonado puede liberarse del resto GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo anti-CTLA4 puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. A continuación, puede insertarse este gen quimérico en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) da como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados, (por ejemplo, véase Logan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:355-359 (1984)). Para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpos insertadas también pueden ser necesarias señales de inicio específicas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de toda la inserción. Estas señales de control de la traducción exógenas y los codones de inicio pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bitter et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516-544(1987)).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posterior a la traducción de las proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3,

WI38, y en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y la línea celular normal de la glándula mamaria tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresen de manera estable la molécula de anticuerpo anti-CTLA4. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN extraño, pueden dejarse crecer las células diseñadas por ingeniería durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación, cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a la vez, puedan clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar mediante ingeniería genética líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas estirpes de células modificadas mediante ingeniería pueden ser particularmente útiles en la exploración y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo anti-CTLA4.

Puede usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., *Cell*, 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202 (1992)) y la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., *Cell*, 22:817 (1980)) pueden emplearse los genes en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, puede usarse la resistencia antimetabolitos como la base de selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 *Clinical Pharmacy*, 12(7):488-505 (1993); Wu et al., *Biotherapy*, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260:926-932 (1993); y Morgan et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-217 (1993); *TIB TECH*, 11(5):155-215 (mayo de 1993)); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., *Gene*, 30:147 (1984)). Pueden aplicarse procedimientos habitualmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar los clones de células recombinantes necesarios y dichos procedimientos se describen en, por ejemplo, Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al., eds., *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981).

Pueden aumentarse los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo anti-CTLA4 mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington et al., "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" en *DNA Cloning*, Vol. 3, Academic Press, NY (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada se asocia al gen del anticuerpo, aumentará también la producción del anticuerpo (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:257 (1983)).

La célula hospedadora puede transfectarse simultáneamente con dos vectores de expresión, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un solo vector que codifica y es capaz de expresar, polipéptidos de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature*, 322:52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2197 (1980)). Las secuencias de codificación de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que un animal ha producido una molécula de anticuerpo, sintetizado químicamente, o expresado recombinantemente, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio de iones, de afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y cromatografía en columna de exclusión por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica normalizada para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos anti-CTLA4 o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritos en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

Se describen además composiciones que comprenden polipéptidos o conjugados con dominios de anticuerpos anti-CTLA4 distintos de las regiones variables. Por ejemplo, los polipéptidos pueden fusionarse o conjugarse con una región Fc del anticuerpo, o una porción de la misma. La porción de anticuerpo anti-CTLA4 fusionada a un polipéptido puede comprender la región constante, la región bisagra, el dominio CH1, el dominio CH2 y el dominio CH3 o cualquier combinación de dominios enteros o porciones de los mismos. Los polipéptidos también pueden estar fusionados o conjugados a las porciones de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones Fc fusionadas

a los polipéptidos pueden formar dímeros a través de enlaces disulfuro entre las porciones Fc. Pueden prepararse formas multiméricas superiores fusionando los polipéptidos a porciones de IgA e IgM. Los métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos a porciones de anticuerpos se conocen en la materia. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las Publicaciones PCT N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10535-10539 (1991); Zheng et al., *J. Immunol.*, 154:5590-5600 (1995); y Vil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:11337-11341(1992).

Además, un anticuerpo anti-CTLA4 o fragmento del mismo pueden conjugarse a un resto terapéutico tales como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa, tales como, por ejemplo, ²¹³Bi. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, los agentes terapéuticos o restos de fármacos no se consideran limitados a los agentes terapéuticos químicos convencionales. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tales como el factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (véase la publicación PCT N.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación PCT N.º WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGI (véase la publicación PCT N.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

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

Como alternativa, un anticuerpo anti-CTLA4 puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe por Segal en la Patente de EE.UU. N.º 4.676.980.

Un anticuerpo anti-CTLA4, con o sin un resto terapéutico conjugado a él, puede administrarse solo o combinado con factor o factores citotóxicos y/o citocina o citocinas para su uso como un producto terapéutico.

También se desvela en el presente documento la creación de anticuerpos sintéticos dirigidos contra los polipéptidos descritos en el presente documento. Un ejemplo de anticuerpos sintéticos se describe en Radrizzani, M., et al., *Medicina* (Aires), 59(6):753-758, (1999)). Recientemente, se ha descrito una nueva clase de anticuerpos sintéticos y se denominan polímeros con impresión molecular (MIP) (Semorex, Inc.). Los anticuerpos, péptidos y enzimas se usan a menudo como elementos de reconocimiento molecular en sensores químicos y biológicos. Sin embargo, su falta de estabilidad y mecanismos de transducción de señales limitan su uso como dispositivos de detección. Los polímeros impresos molecularmente (MIP) son capaces de imitar la función de los receptores biológicos pero con menos restricciones de estabilidad. Dichos polímeros proporcionan alta sensibilidad y selectividad mientras mantienen una excelente estabilidad térmica y mecánica. Los MIP tienen la capacidad de unirse a moléculas pequeñas y dirigirse a moléculas como los productos orgánicos y las proteínas con una potencia igual o mayor que la de los anticuerpos naturales. Estos "súper" MIP tienen mayores afinidades por su diana y, por lo tanto, requieren concentraciones más bajas para una unión efectiva.

Durante la síntesis, los MIP se imprimen para tener un tamaño complementario, forma, carga y grupos funcionales de la diana seleccionada usando la propia molécula diana (tales como un polipéptido, anticuerpo, etc.), o una sustancia

que tiene una estructura muy similar, como su "impresión" o "plantilla". Los MIP pueden derivatizarse con los mismos reactivos proporcionados a los anticuerpos. Por ejemplo, los "súper" MIP fluorescentes pueden recubrirse sobre perlas o pocillos para su uso en separaciones o ensayos altamente sensibles, o para su uso en la detección de proteínas de alto rendimiento.

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

10 Los oligonucleótidos antisentido pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los ARN bicatenarios pueden diseñarse basándose en las enseñanzas de Paddison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99:1443-1448 (2002); y las Publicaciones PCT N.º WO 01/29058 y WO 99/32619.

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

20 Por ejemplo, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden ser ARN bicatenario y de entre aproximadamente 25 y 400 nucleótidos de longitud, y complementarias a la secuencia de nucleótidos codificante de CTLA4. Dichas moléculas de ARNi pueden ser aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 45 y aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En este contexto, el término "aproximadamente" se interpreta como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos más largos en la dirección 5' o 3', o en ambas.

25 Como alternativa, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden tomar la forma de moléculas de ARNi bicatenario descritas por Kreuzer en las patentes europeas N.º EP 1144639 y EP 1214945. Específicamente, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden ser ARN bicatenario que es complementario a la región codificante de CTLA4 y tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 49 nucleótidos y preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. En este contexto, el término "aproximadamente" se interpreta como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más largos en la dirección 5' o 3' o ambas. Dichas moléculas anti-CTLA-4 pueden estabilizarse por enlace químico de las cadenas de ARN individuales.

30 Como alternativa, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden tomar la forma de moléculas de ARNi bicatenario descritas por Tuschl en la Patente europea N.º EP 1309726. Específicamente, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden ser ARN bicatenario que es complementario a la región codificante de CTLA4, y tiene entre aproximadamente 21 y aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, y tienen extremos romos o contienen uno o más salientes en el extremo 5' o el extremo 3' de una o ambas de las cadenas siendo cada saliente de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos de longitud. Los extremos de cada cadena pueden modificarse por fosforilación, hidroxilación u otras modificaciones. Además, los enlaces internucleotídicos de uno o más de los nucleótidos pueden modificarse y pueden contener 2'-OH. En este contexto, el término "aproximadamente" se interpreta como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más largos en la dirección 5' o 3' o ambas. Dichas moléculas anti-CTLA-4 pueden estabilizarse por enlace químico de las cadenas de ARN individuales.

35 Como alternativa, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden tomar la forma de moléculas de ARNi bicatenario descritas por Tuschl en las patentes de EE.UU. N.º 7.056.704 y 7.078.196. Específicamente, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden ser ARN bicatenario que es complementario a la región codificante de CTLA4, y tiene entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y tienen extremos romos o contienen uno o más salientes en el extremo 5' o el extremo 3' de una o ambas de las cadenas siendo cada saliente de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 o más nucleótidos de longitud. Los extremos de cada cadena pueden modificarse por fosforilación, hidroxilación u otras modificaciones. Además, los enlaces internucleotídicos de uno o más de los nucleótidos pueden modificarse y pueden contener 2'-OH. En este contexto, el término "aproximadamente" se interpreta como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más largos en la dirección 5' o 3' o ambas. Dichas moléculas anti-CTLA-4 pueden estabilizarse por enlace químico de las cadenas de ARN individuales.

40 Como alternativa, las moléculas de ARNi anti-CTLA4 pueden tomar la forma de moléculas de ARN descritas por Crooke en las Patentes de EE.UU. N.º 5.898.031, 6.107.094, 7.432.249 y 7.432.250 y la Solicitud Europea N.º EP 0928290. Específicamente, las moléculas anti-CTLA4 pueden ser ARN monocatenario, que contiene un primer segmento que tiene al menos una subunidad de ribofuranosil nucleósido que se modifica para mejorar la afinidad de unión de dicho compuesto a la diana de ARN preseleccionado cuando se compara con la afinidad de unión de un oligoribonucleótido no modificado a la diana de ARN; y un segundo segmento que comprende al menos cuatro subunidades de ribofuranosilo nucleósido consecutivas que tienen restos 2'-hidroxilo sobre el mismo; dichas subunidades de nucleósidos de dicho compuesto oligomérico están conectadas por enlaces internucleosídicos que se modifican para estabilizar dichos enlaces de la degradación en comparación con los enlaces de fosfodiéster. Preferentemente, tales

moléculas de ARN tienen aproximadamente 15 a 25 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 17 a aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Preferentemente tales moléculas son competentes para activar una enzima ARNasa bicatenaria para efectuar la escisión del ARN de CTLA4. En este contexto, el término "aproximadamente" se interpreta como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos más largos en la dirección 5' o 3' o ambas. Dichas moléculas anti-CTLA-4 pueden estabilizarse por enlace químico de las cadenas de ARN individuales.

Los reactivos de ARNip son útiles para inhibir la expresión de polinucleótidos y pueden tener efectividad terapéutica. Se conocen varios métodos en la técnica para el tratamiento terapéutico de trastornos mediante la administración de reactivos de ARNip. Uno de estos métodos se describe por Tiscornia et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(4):1844-1848 (2003)); WO 04/09769 presentada el 18 de julio de 2003; y Reich, S.J et al., *Mol. Vis.*, 9:210-216 (30 de mayo de 2003).

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

Ejemplos

EJEMPLO 1: MÉTODO DE EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASA CON UN MODULADOR DE VÍA COESTIMULADORA EN EL CRECIMIENTO DEL TUMOR EN TRES MODELOS DE TUMOR MURINO

El efecto de dasatinib sobre la función inmunológica ha sido objeto de investigaciones recientes. Algunos informes demostraron que *in vitro*, el dasatinib (concentraciones de 10-50 nM), inhibe la función de las células T, medido por la inhibición de la secreción de citocinas y la desgranulación (Weischel et al., 2008) que se postuló ser el resultado de la inhibición de Lck. Otros informes demostraron que dasatinib produjo un bloqueo de la activación de células T (Schade et al., 2007). Sin embargo, el tratamiento con dasatinib también podría tener efectos inmunomoduladores basados en su potente inhibición de STAT3, lo que puede dar como resultado la maduración de las células dendríticas y la modulación de las respuestas de las células T (Yu, H. et al., 2007) y la sensibilidad diferencial de los efectores T y las células reguladoras T a la inhibición de la señalización de las células T (Siggs et al., 2007). Adicionalmente, se han detectado linfocitos granulares grandes en derrames pleurales de pacientes tratados con dasatinib, y de interés, todos estos pacientes tenían al menos un alelo HLA-A2 (Mustojski et al., 2008). Se hipotetiza que la infiltración de LGL podría ser el resultado de la inmunestimulación. Por tanto, hubo interés en determinar si se podía lograr una potenciación de la respuesta inmune antitumoral mediante la combinación de un mAb bloqueador de CTLA-4 y dasatinib en modelos en los que dasatinib tenía un efecto mínimo.

Los estudios de efectividad se realizaron en 3 modelos: fibrosarcoma SA1N, carcinoma de colon CT26 y carcinoma de pulmón M109. Los primeros 2 modelos son sensibles al efecto del bloqueo de CTLA-4, mientras que dasatinib mostró actividad antitumoral modesta en el modelo SA1N pero actividad mínima contra los modelos CT 26 y M109. Como se muestra en la FIGURA 1A-1B y la FIGURA 2 los tratamientos simultáneos con CTLA-4 mAb + dasatinib dieron como resultado efectos sinérgicos. Se observó sinergia cuando se administró dasatinib a 30 mg/kg, ya sea en un régimen de dosificación diario o siguiendo un programa intermitente (5 días sí/2 días de descanso). No se observó sinergia en el modelo tumoral M109.

Se realizaron estudios adicionales en el modelo de tumor CT26 para determinar si el efecto de la combinación se debió a una expansión de las células T citotóxicas y para determinar si los tratamientos estaban alterando la composición de las células inmunes en los ganglios linfáticos que drenan el tumor. Se observó un aumento de la actividad citolítica en animales tratados con el tratamiento combinado en comparación con los animales tratados con tratamientos únicos (FIGURA 3A-3C). Adicionalmente, cuando se midió la proporción de células T efectoras/células T reguladoras (población supresora), el tratamiento combinado y el grupo tratado con dasatinib mostraron una relación mejorada, indicando un mayor número de células T efectoras que las células T reguladoras. Basándose en los resultados obtenidos en el modelo CT-26, es probable que la adición de dasatinib a la terapia con CTLA-4 reduzca el número de células T reguladoras al tiempo que expande el porcentaje de células efectoras T, lo que da como resultado una mejora de la respuesta inmunológica antitumoral provocada por la monoterapia anti-CTLA-4.

EJEMPLO 2: MÉTODO DE EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASA CON UN MODULADOR DE VÍA COESTIMULADORA EN EL CRECIMIENTO DEL TUMOR EN UN MODELO DE TUMOR MURINO DE MASTOCITOMA P815

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

SPRYCEL® mostró modesta actividad antitumoral en el modelo P815. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento simultáneo con CTLA-4 mAb + SPRYCEL® produjo efectos sinérgicos. Se observó sinergia cuando se administró SPRYCEL® a 30 mg/kg, ya sea en un régimen de dosificación diaria o siguiendo un programa intermitente (5 días sí/2

días de descanso).

Estos resultados fueron consistentes con los resultados observados en los modelos tumorales SA1N y CT26 (véanse las Figuras 1A-B y 2) y confirma que la administración de un inhibidor de la proteína tirosina quinasa en combinación con un anticuerpo CTLA-4 da como resultado una reducción sinérgica en la proliferación tumoral.

EJEMPLO 3: MÉTODO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL BLOQUEO DE ANTIGENO-4 DE LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) SOLO O COMBINADO CON PACLITAXEL (PAC), ETOPÓSIDO (ETO), O GEMCITABINA (GEM) EN MODELOS MURINOS

Para determinar si la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 (CTLA-4 mAb) es sinérgica o inhibida por la adición de agentes quimioterapéuticos, CTLA-4 mAb se evaluó solo y en combinación con Pac, Eto o Gem en modelos de tumor murinos. Los modelos de carcinoma de pulmón M109, fibrosarcoma SA1N y carcinoma de colon CT26 se eligieron en función de la diferente sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos y el bloqueo de CTLA-4.

Todos los compuestos fueron probados a su dosis y horario óptimos. Cuando se usa en combinación, CTLA-4 mAb se inició un día después de la primera dosis de quimioterapia. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral y el número de días para alcanzar el tamaño del tumor diana se usaron para evaluar la efectividad. La actividad antitumoral se calificó como: regresión completa (CR; tumor no palpable para ≥ 2 evaluaciones) o regresión parcial (PR; reducción del 50 % en el volumen del tumor para ≥ 2 evaluaciones). La sinergia se definió como la actividad antitumoral significativamente superior ($p < 0,05$) a la actividad de la monoterapia con cada agente.

En el modelo de tumor subcutáneo M109, que es insensible al bloqueo de CTLA-4 y moderadamente sensible a Pac, Eto y Gem, la sinergia límite fue evidente con la combinación de mAb CTLA-4 y Pac, mientras que no se observó efecto con Eto. La monoterapia con gem no produjo actividad antitumoral M109 significativa; sin embargo, la combinación de Gem con CTLA-4 mAb dio como resultado sinergia. En el modelo de metástasis pulmonar M109, se detectó sinergia para el mAb CTLA-4 combinado con Eto, se encontró sinergia límite con Gem, y Pac no mejoró la actividad.

El fibrosarcoma SA1N es sensible al bloqueo de CTLA-4 y las tres quimioterapias. Pac, Eto y Gem mejoraron la actividad de mAb CTLA-4 en este modelo, pero la sinergia solo se observó con Eto. CTLA-4 mAb y Pac fueron ineficaces contra los tumores de carcinoma de colon CT26 establecidos, pero sinérgicos cuando la carga tumoral fue mínima. Tanto Eto como Gem fueron eficaces como agentes únicos en este modelo y la actividad de ambos se sinergizó significativamente por el mAb CTLA-4.

En resumen, la adición de CTLA-4 mAb a Eto, Gem o Pac dio como resultado actividades sinérgicas dependientes del modelo. Se observó sinergia independientemente de la inmunogenicidad del tumor y solo cuando al menos una de las terapias estaba activa. Todos los regímenes de combinación fueron bien tolerados y las quimioterapias no parecían inhibir la actividad de mAb CTLA-4 en el modelo de tumor SA1N. De particular importancia, se observó sinergia en tumores que no responden al mAb CTLA-4 solo, sugiriendo que los agentes quimioterapéuticos podrían haber inducido la muerte celular inmunogénica. Estos hallazgos brindan apoyo para la evaluación de combinaciones de quimioinmunoterapia en ensayos clínicos. Los datos para las combinaciones en cada modelo murino se resumen individualmente en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 4: MÉTODO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL BLOQUEO DE ANTIGENO-4 DE LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) SOLO O COMBINADO CON PACLITAXEL (PAC), ETOPÓSIDO (ETO), O GEMCITABINA (GEM) EN UN MODELO DE TUMOR MURINO M109 SUBCUTÁNEO

El efecto de Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 se evaluaron en un modelo de tumor de carcinoma de pulmón M109 subcutáneo para establecer la efectividad de cada combinación de tratamiento.

Los tumores M109 son insensibles al bloqueo de CTLA-4 y moderadamente sensibles a Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina. La combinación de CTLA-4 + Paclitaxel produjo una mayor actividad antitumoral en comparación con cada agente solo, mientras que no se observó mejora con Etopósido. Por otro lado, a pesar de que la gemcitabina como agente único no produjo actividad antitumoral significativa, la Gemcitabina más el mAb CTLA-4 produjeron efectos sinérgicos (Tabla 1).

TABLA 1

Actividad antitumoral de mAb CTLA-4 en combinación con Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina en el modelo de tumor subcutáneo de carcinoma de pulmón M109							
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Horario (días de estudio)	% TGI (promedio)	T-C (1000 mm ³)	PR	RC	Resultado
CTLA-4 mAb (clon UC10)	20	8,12,16	0	0	0	0	
Paclitaxel	24	7,11,15	45	5	0	0	
Paclitaxel + CTLA-4 mAb	24 20	7,11,15 8,12,16	62	8	0	0	Sinergia límite
Etopósido	50	7,14,21	59	9	0	0	
Etopósido	50	7,14,21	65	11	0	0	
+ CTLA-4 mAb	20	8,12,16	32	2,2	0	0	
Gemcitabina	120	7,11,15					
Gemcitabina + CTLA-4 mAb	120 20	14,18,22 8,12,16	62	11	0	0	Sinergia
TVDT = 5,4 días							

5 EJEMPLO 5: MÉTODO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL BLOQUEO DE ANTIGENO-4 DE LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) SOLO O COMBINADO CON PACLITAXEL (PAC), ETOPÓSIDO (ETO), O GEMCITABINA (GEM) EN UN MODELO DE TUMOR MURINO DE METÁSTASIS DE PULMÓN EXPERIMENTAL M109

10 El efecto de Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 se evaluaron en un modelo de tumor de metástasis de pulmón M109 experimental para establecer la efectividad de cada combinación de tratamiento.

En el modelo de metástasis pulmonar M109, Etopósido y el mAb CTLA-4 mostraron actividad sinérgica, mientras que la combinación con Gemcitabina fue sinérgica límite (Tabla 2).

15 TABLA 2

Efecto del mAb CTLA-4 en combinación con agentes quimioterapéuticos en el modelo de carcinoma pulmonar M109 de metástasis pulmonar experimental				
	Dosis (mg/kg)	Horario (días de estudio)	Tiempo medio de supervivencia (días)	Efecto de combinación
Vehículo control			32	
CTLA-4 mAb	20	5,9,13	33	
Gemcitabina	150	4,8,12	42	
Gemcitabina + CTLA-4 mAb	150 20	4,8,12 5,9,13	47	Sinergia límite
Etopósido	50	4,11,18	34	
Etopósido + CTLA-4 mAb	50 20	4,11,18 5,9,13	43	Sinergia
Paclitaxel	24	4, 8, 12	38	
Paclitaxel + CTLA-4 mAb	24 20	4, 8, 12 5, 9, 13	39	

20 EJEMPLO 6: MÉTODO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL BLOQUEO DE ANTIGENO-4 DE LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) SOLO O COMBINADO CON PACLITAXEL (PAC), ETOPÓSIDO (ETO), O GEMCITABINA (GEM) EN UN MODELO DE TUMOR MURINO SUBCUTÁNEO DE FIBROSARCOMA SA1N

El efecto de Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 se evaluaron en un modelo de tumor murino subcutáneo de fibrosarcoma SA1N para establecer la efectividad de cada combinación de tratamiento.

25 SA1N es una línea tumoral inmunogénica sensible a CTLA-4 mAb y quimioterapia. Mientras que los 3 agentes quimioterapéuticos probados mejoraron la actividad del CTLA-4 mAb, la sinergia solo se observó con Etopósido (Tabla 3).

TABLA 3

Actividad antitumoral de mAb CTLA-4 en combinación con Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina en el modelo de tumor subcutáneo de fibrosarcoma SA1N							
Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Horario (días de estudio)	% TGI (Promedio D 20-48)	T-C (1000 mm ³)	PR	RC	Resultado
CTLA-4 mAb (clon UC10)	10	15,19,23	81	23	1/8	1/8	
Paclitaxel	24	14,18,22	65	13	0/8	0/8	
Paclitaxel	24	14,18,22	97	29	2/8	1/8	
+ CTLA-4 mAb	10	15,19,23					
Etopósido	40	14,21,28	88	14	1/8	0/8	
Etopósido + CTLA-4 mAb	40 10	14,21,28 15,19,23	112	>50	2/7	5/7	Sinergia
Gemcitabina	120	14,18,22	68	11	0/8	0/8	
Gemcitabina + CTLA-4 mAb	120 10	14,18,22 15,19,23	94	23	0/7	2/7	
TVDT = 8,2 (1000 mm ³)							

5 EJEMPLO 7: MÉTODO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL BLOQUEO DE ANTIGENO-4 DE LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) SOLO O COMBINADO CON PACLITAXEL (PAC), ETOPÓSIDO (ETO), O GEMCITABINA (GEM) EN UN MODELO DE TUMOR MURINO DE CARCINOMA DE COLON CT26

El efecto de Paclitaxel, Etopósido y Gemcitabina en combinación con el bloqueo de CTLA-4 se evaluaron en un modelo de tumor murino de carcinoma de colon CT26 para establecer la efectividad de cada combinación de tratamiento.

10 CTLA-4 y Paclitaxel son terapias ineficaces contra los tumores de carcinoma de colon CT26; su combinación fue ineficaz contra tumores establecidos, pero sinérgica contra la carga tumoral mínima. Como se muestra en la Tabla 4, tanto Etopósido como Gemcitabina fueron eficaces como agentes únicos, pero su actividad se potenciaba significativamente por la adición de CTL-4 mAb.

15 TABLA 4

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

En resumen, la adición de CTLA-4 mAb a agentes quimioterapéuticos tales como Etopósido, Gemcitabina, Paclitaxel e Ixabepilona, dio como resultado actividad sinérgica en múltiples modelos tumorales. Todos los regímenes combinados fueron bien tolerados. Cabe observar que, se observó sinergia en tumores que no respondieron a CTLA-4 solo, lo que sugiere que los agentes quimioterapéuticos podrían haber inducido la muerte celular inmunogénica. Gemcitabina, etopósido, paclitaxel e ixabepilona como monoterapia parecen inducir una firma y modulación inmunogénica de la respuesta inmunológica. De forma importante, los resultados sugieren, que, debido a su corta vida media, estos agentes no afectarán la función efectora de las células T. Además, la sinergia de gemcitabina, etopósido, paclitaxel e ixabepilona en combinación con el bloqueo de CTLA-4 pueden observarse en entornos donde el agente quimioterapéutico no induce regresión. Al menos para gemcitabina, el momento de la administración fue crítico para el efecto sinérgico siendo solamente eficaz el tratamiento concurrente con gemcitabina. Estos resultados sugieren que la administración conjunta de agentes quimioterapéuticos con inhibición de CTLA-4 puede ser óptima para el efecto sinérgico. Por último, los ratones con respuesta completa ("CR") pudieron rechazar un rediseño de tumor, sugiriendo

que la generación de una respuesta inmune de memoria no se vio disminuida por los agentes quimioterapéuticos.

5 En conclusión, estos hallazgos proporcionan evidencia de que la combinación de agentes quimioterapéuticos y un mAb bloqueador de CTLA-4 homólogo de ipilimumab provoca efectos antitumorales eficaces y duraderos, y que la investigación de ipilimumab en combinación con un agente quimioterapéutico en ensayos clínicos está justificada.

10 Quedará claro que la invención puede llevarse a la práctica de otra manera que la descrita particularmente en la descripción y ejemplos anteriores. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company

15 <120> COMBINACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-CTLA4 CON DIVERSOS REGÍMENES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO SINÉRGICO DE ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS

<130> M/52523-EP-DIV2

20 <140> EP 09749268.0
<141> 29/10/2009

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

25 <150> US 12/462168
<151> 30/07/2009

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

<160> 4

35 <170> PatentIn versión 3.5

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

40 <400> 1

ES 2 768 990 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 118

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 768 990 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<400> 3

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 10 1 5

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

<400> 4

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CTLA-4 y monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en un método para el tratamiento de un cáncer seleccionado de fibrosarcoma, carcinoma de pulmón, metástasis pulmonar y carcinoma de colon, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad sinérgica, terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CTLA-4 con monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β).
2. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona del grupo que consiste en: ipilimumab y tremelimumab.
3. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab.
4. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método es para el tratamiento de tumores refractarios.
5. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, se administran antes de la administración del anticuerpo anti-CTLA-4.
6. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, se administran esencialmente de manera simultánea.
7. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho tratamiento contra el cáncer comprende además un agente citotóxico antiproliferativo bien solo o en combinación con radioterapia.
8. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab y dicho agente citotóxico antiproliferativo es cisplatino.
9. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra a una dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg.
10. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, se administran a una dosis de aproximadamente 200 mg (expresada como base libre).
11. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran a una dosis de aproximadamente 1 g (expresado como base libre).
12. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, se administran por infusión IV.
13. El anticuerpo anti-CTLA-4 y el monoclórhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra aproximadamente una vez cada tres semanas.

FIG. 1A

SA1N #11

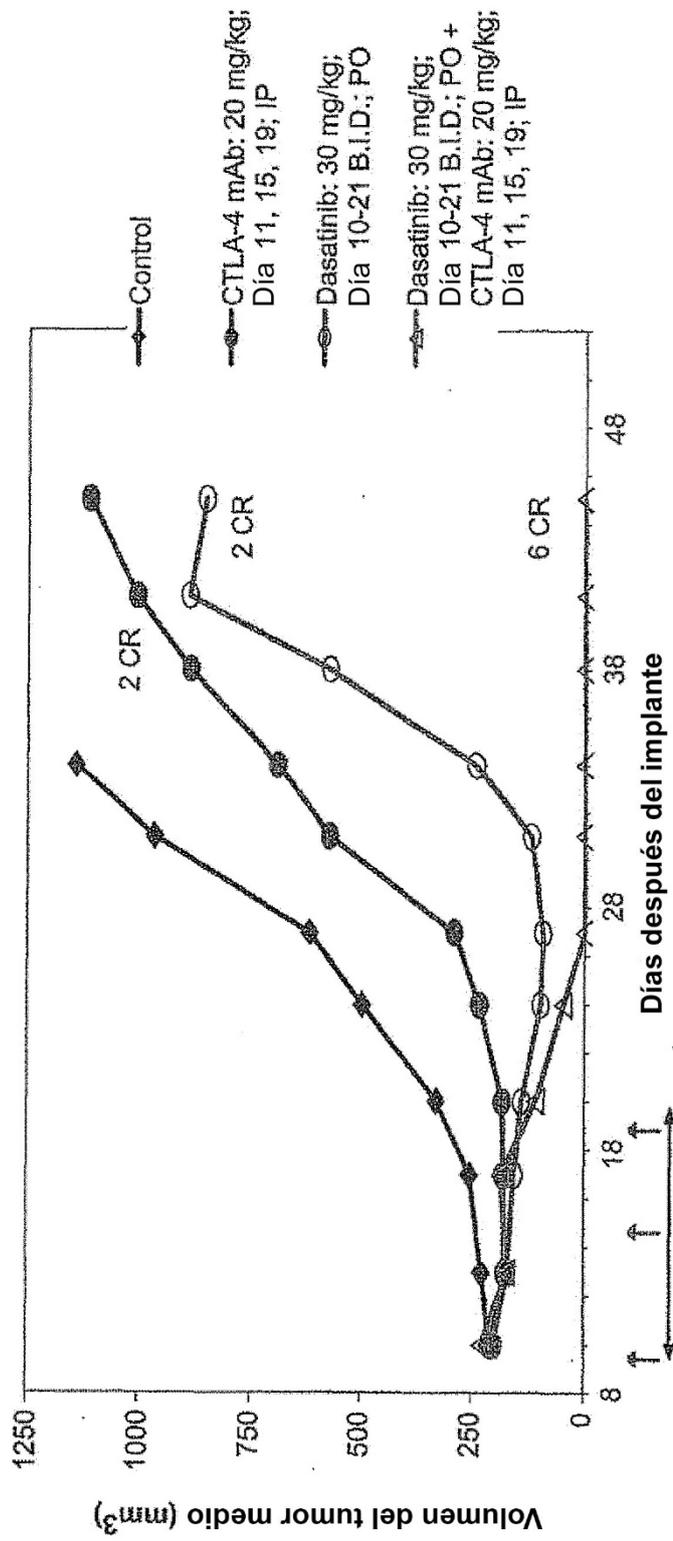


FIG. 1B

SA1N #19

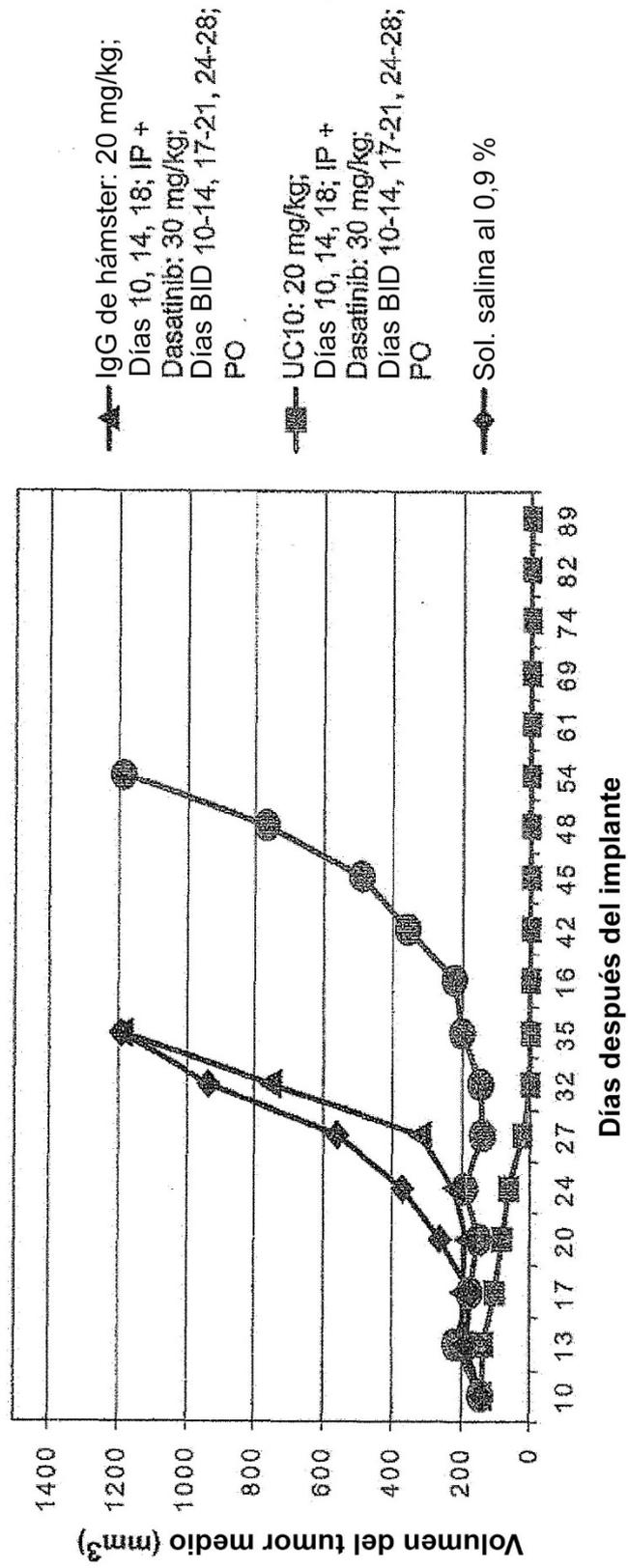


FIG. 2

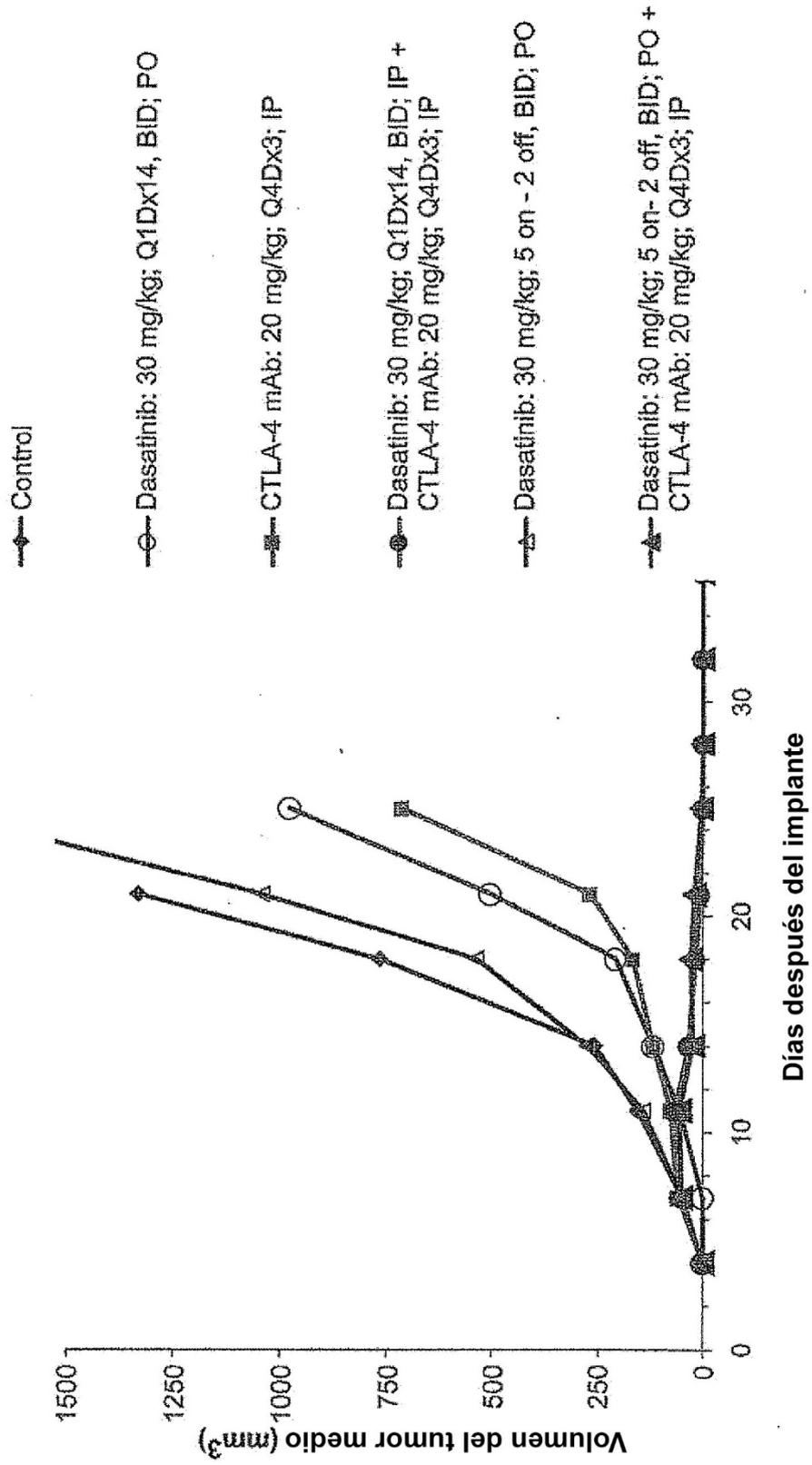


FIG. 3A

día 2

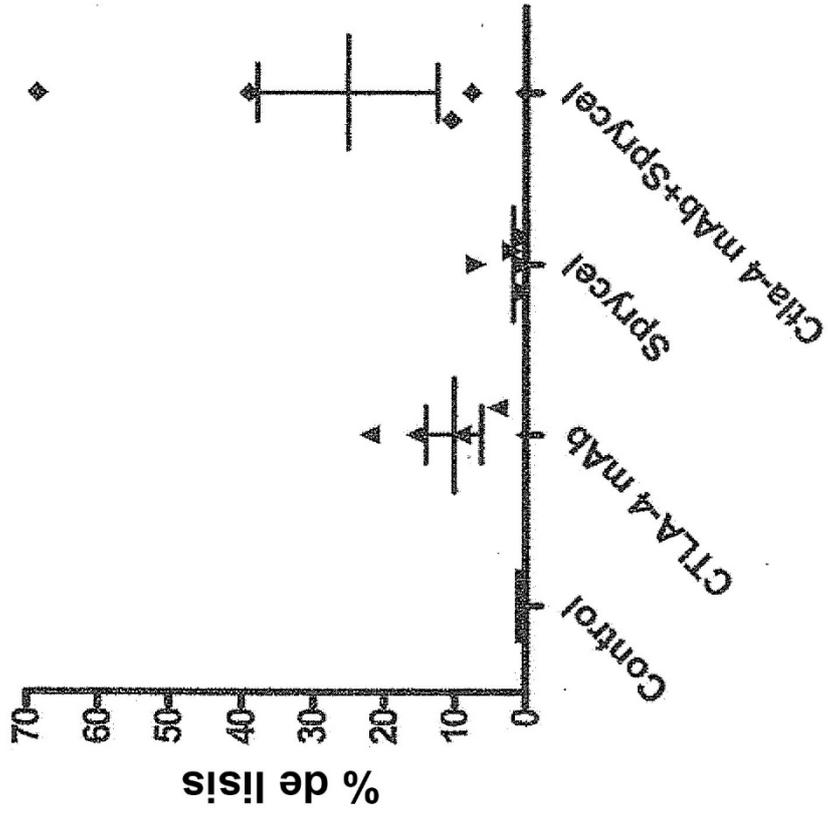


FIG. 3B

Día 7

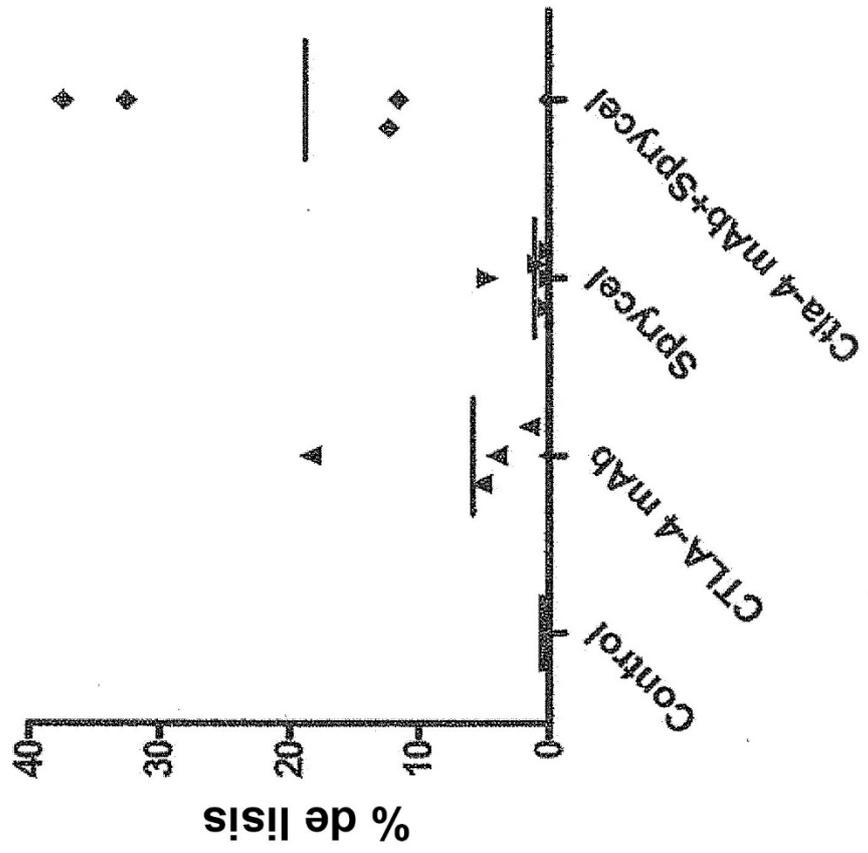


FIG. 3C

Día 14

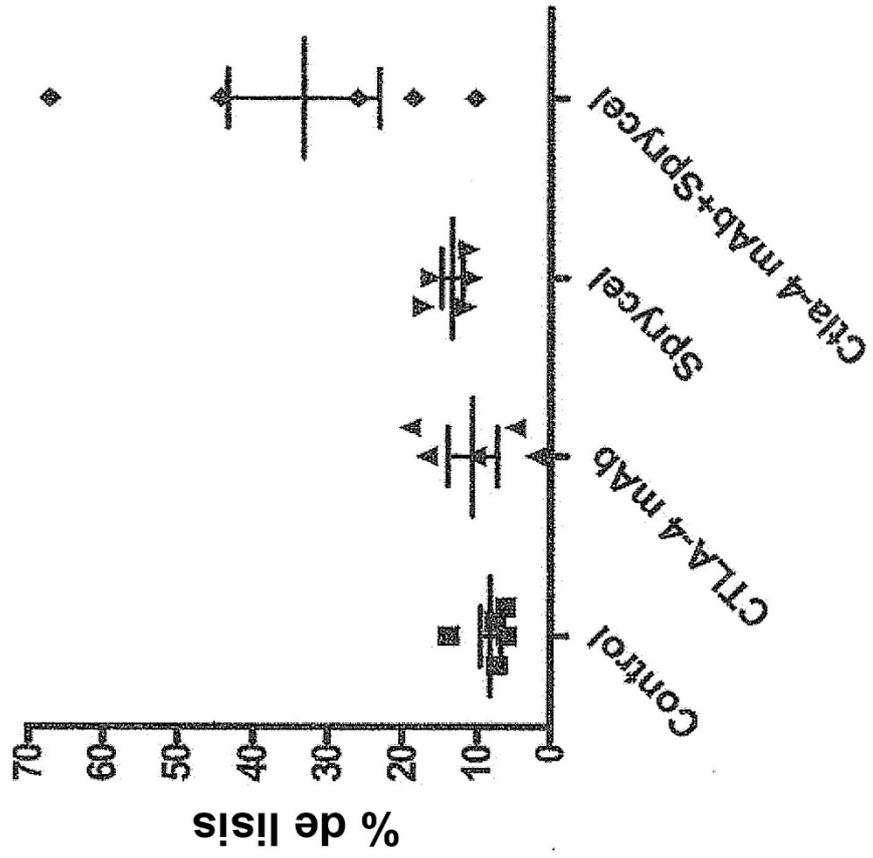
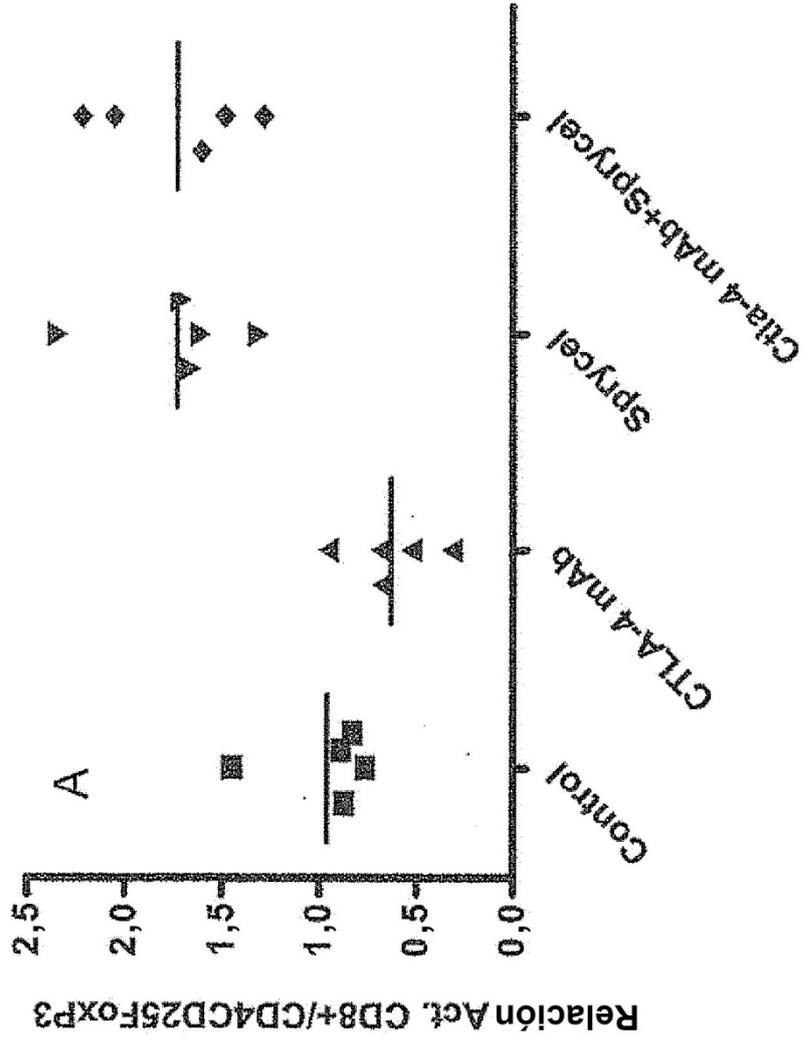
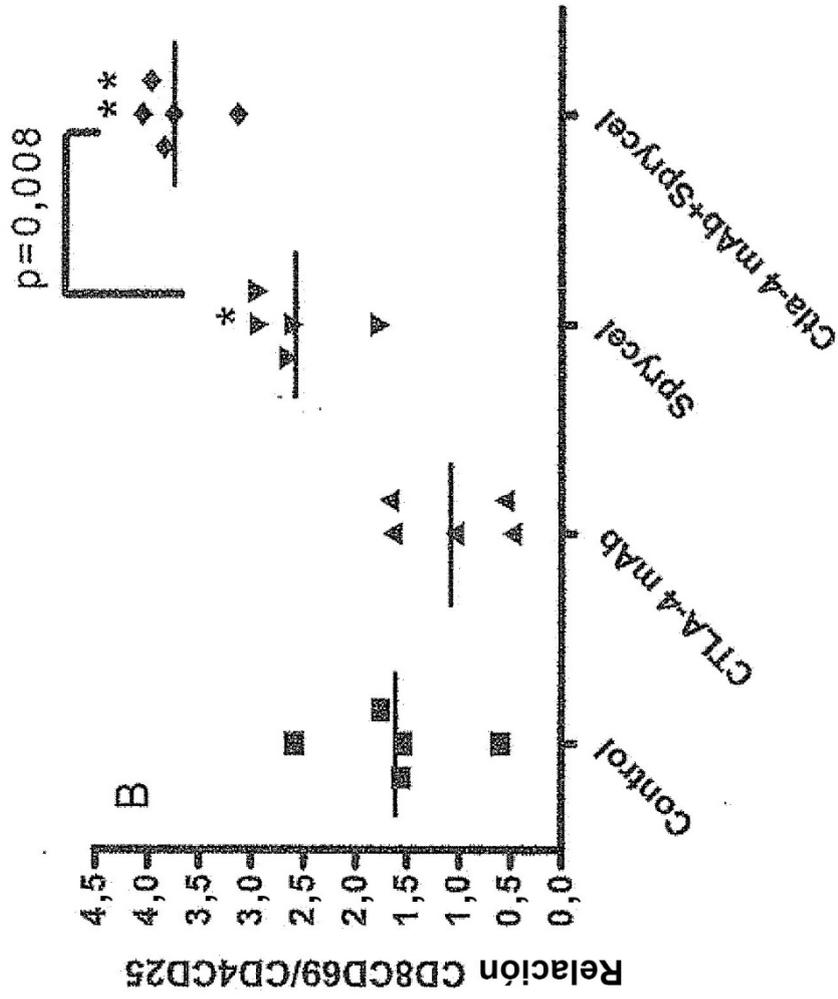


FIG. 4A



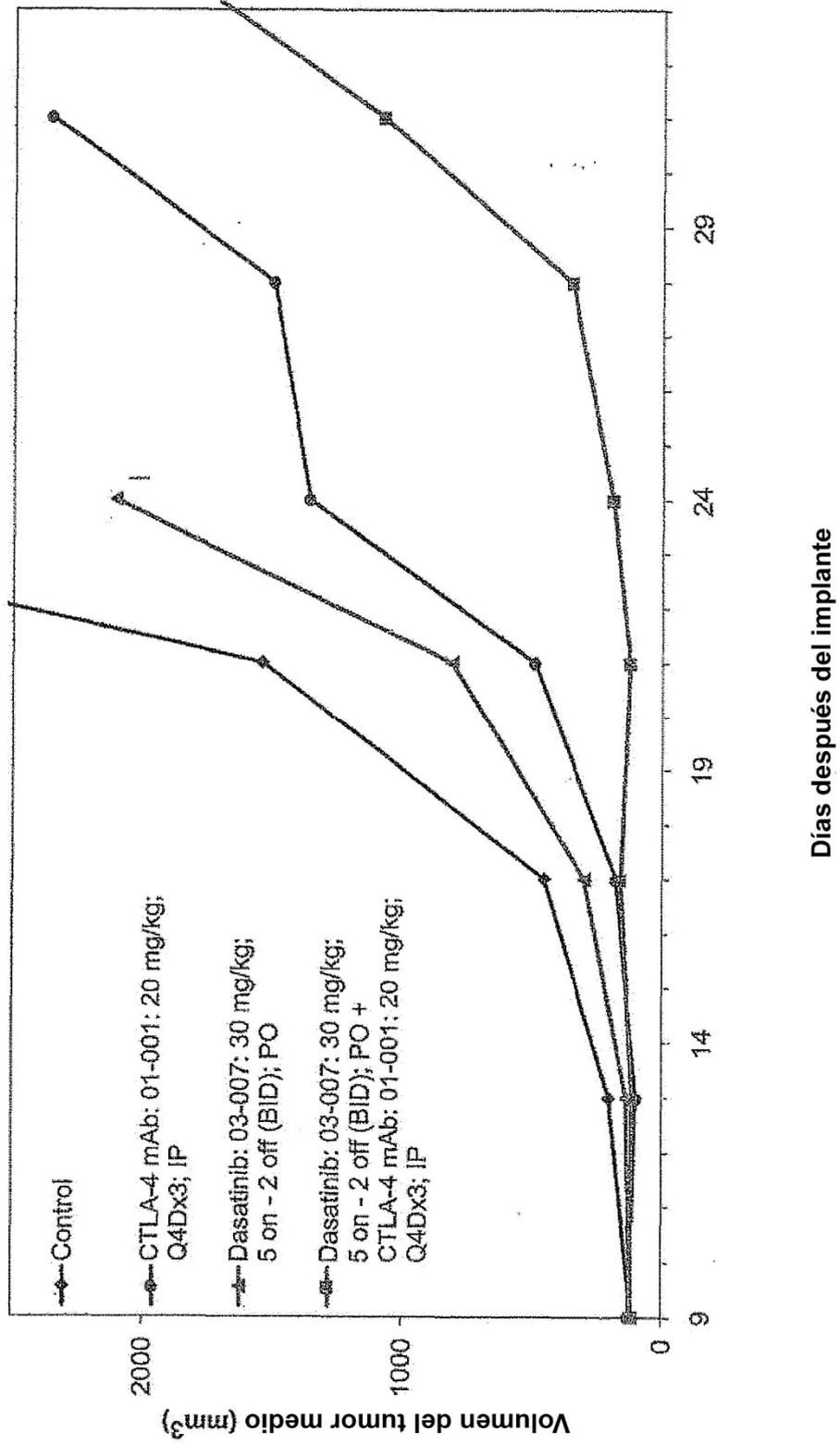
* $p < 0,05$ frente a control y CTLA-4 mAb

FIG. 4B



* p < 0,05 frente a control
 ** p < 0,01 frente a control

FIG. 5



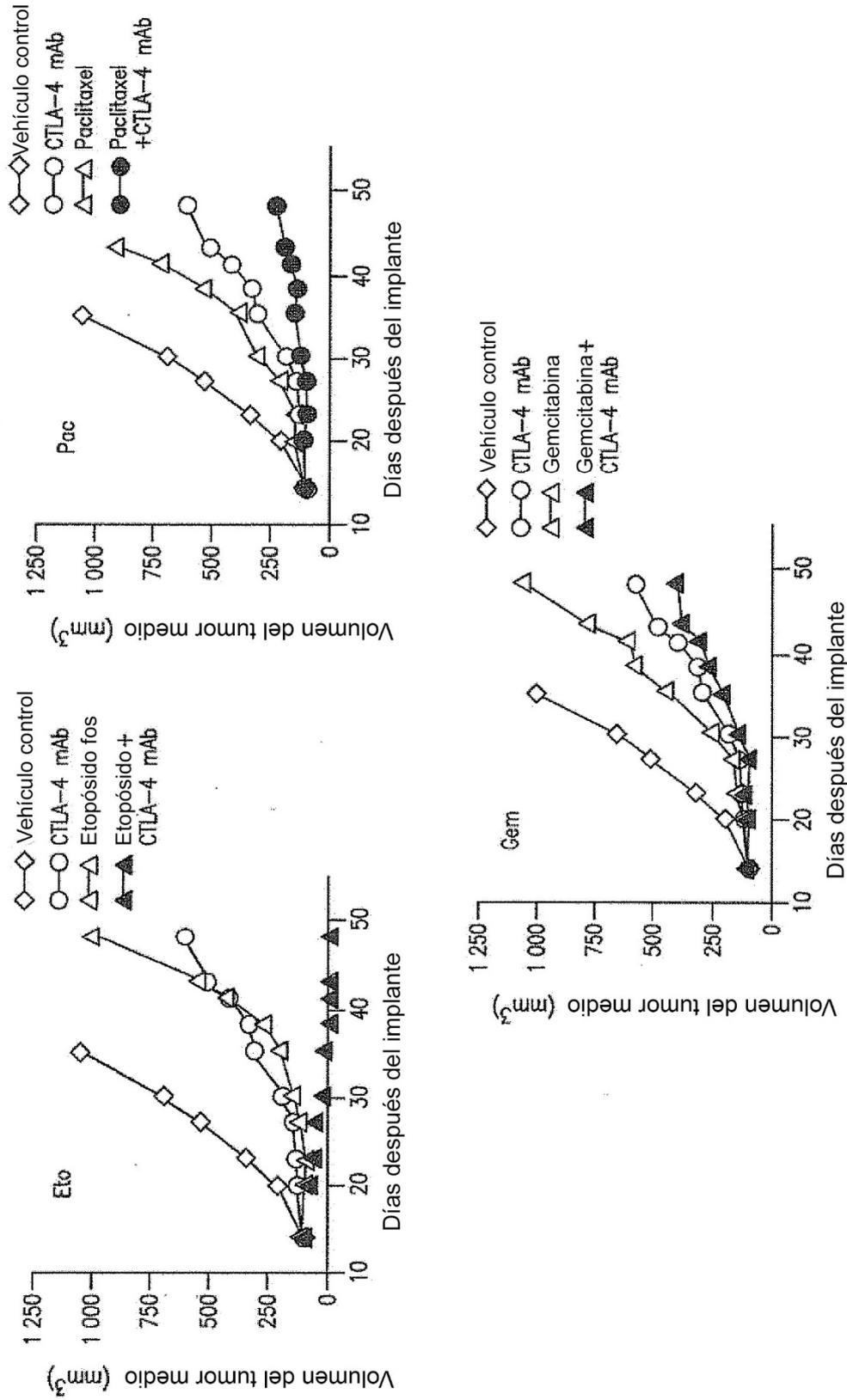


FIG. 6

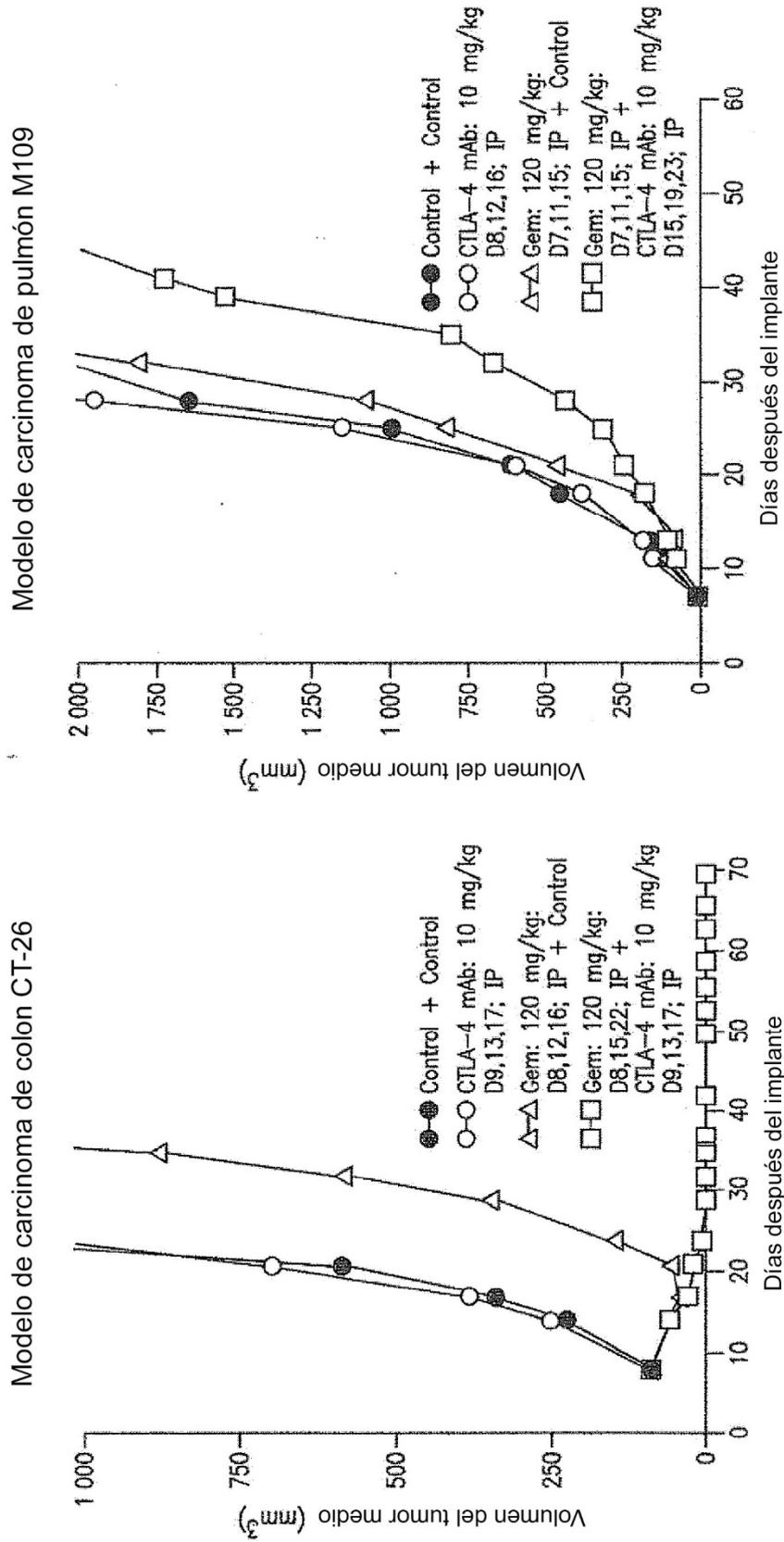


FIG. 7

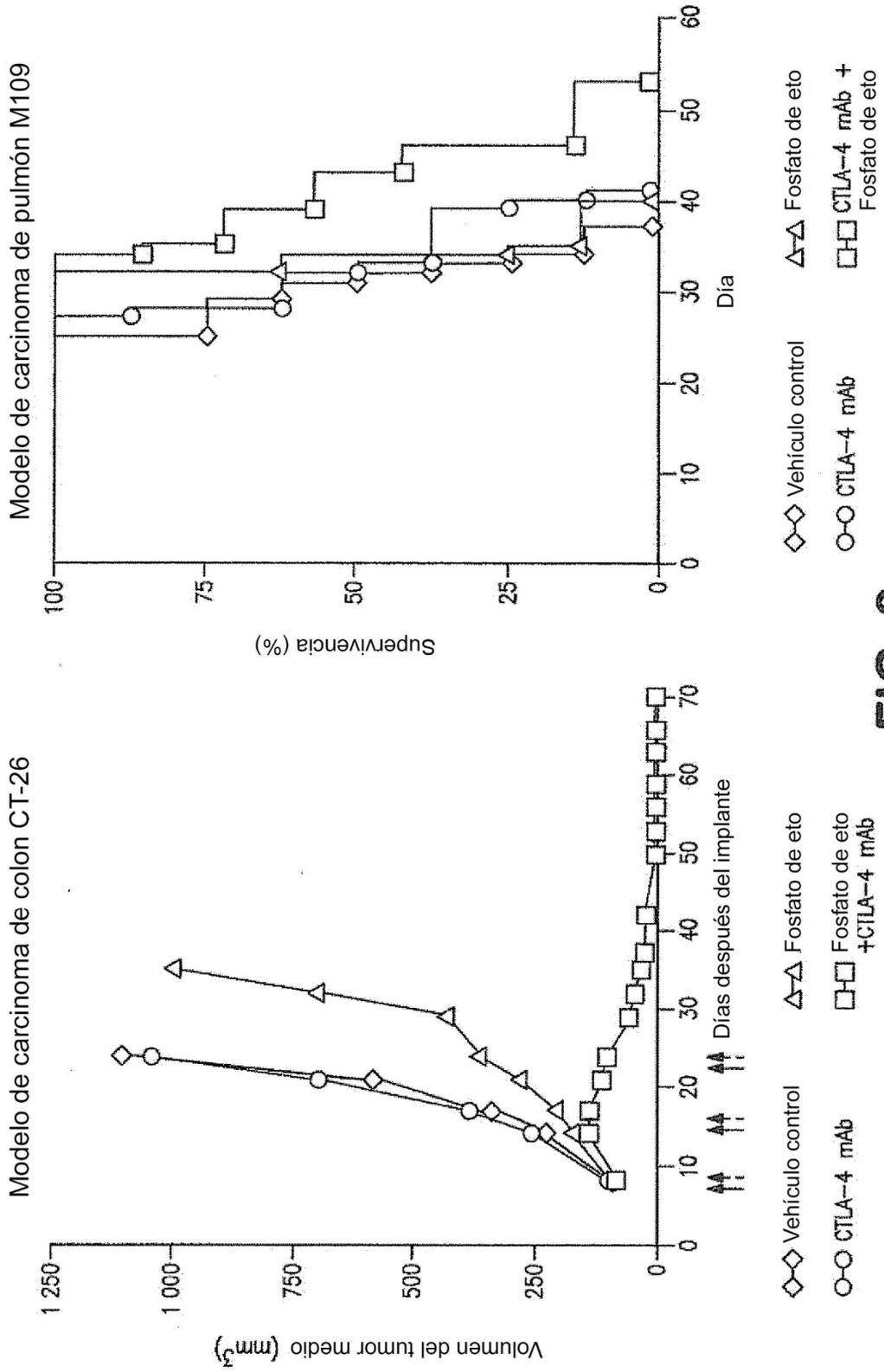


FIG. 8

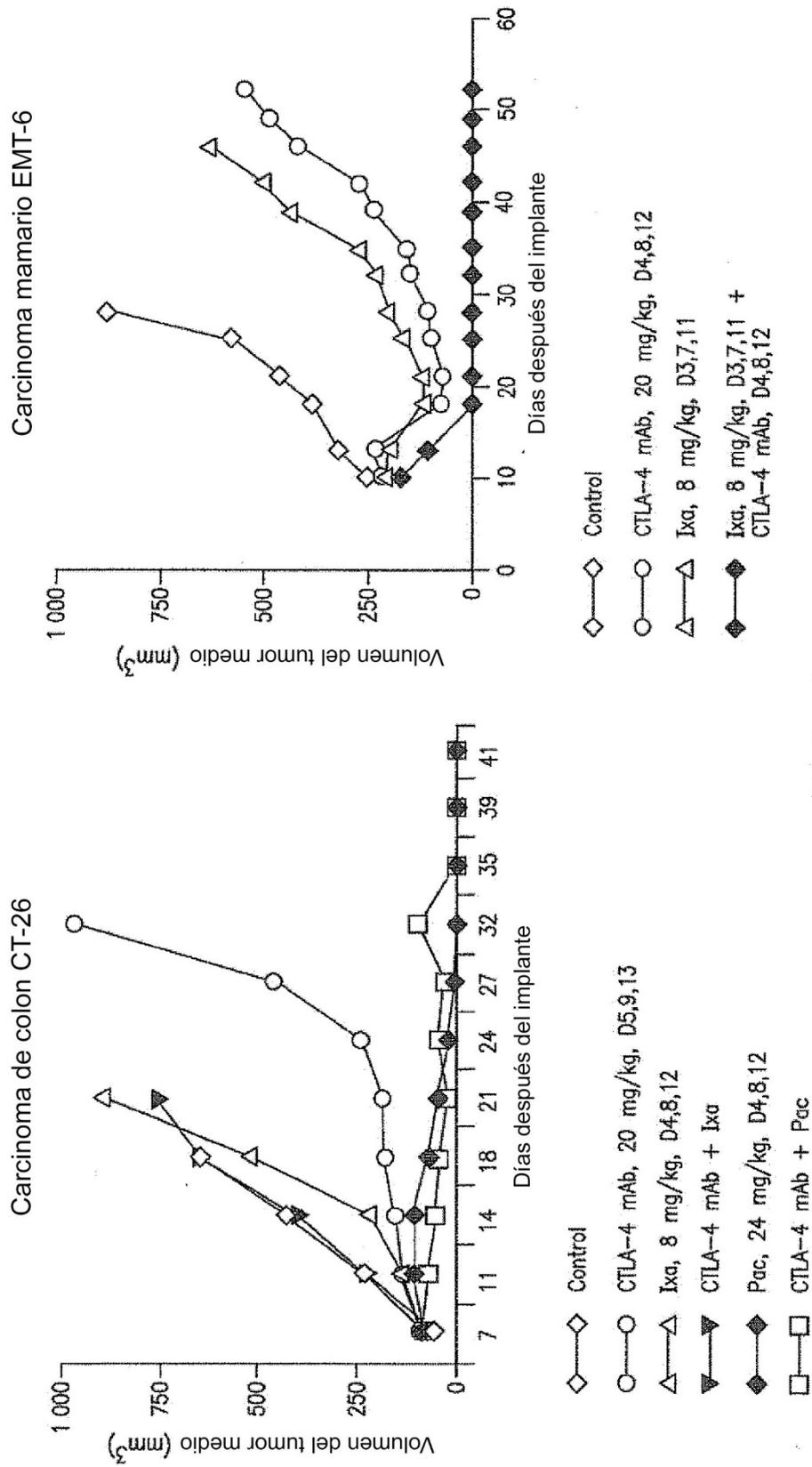


FIG. 9

Modelo de carcinoma de colon CT-26

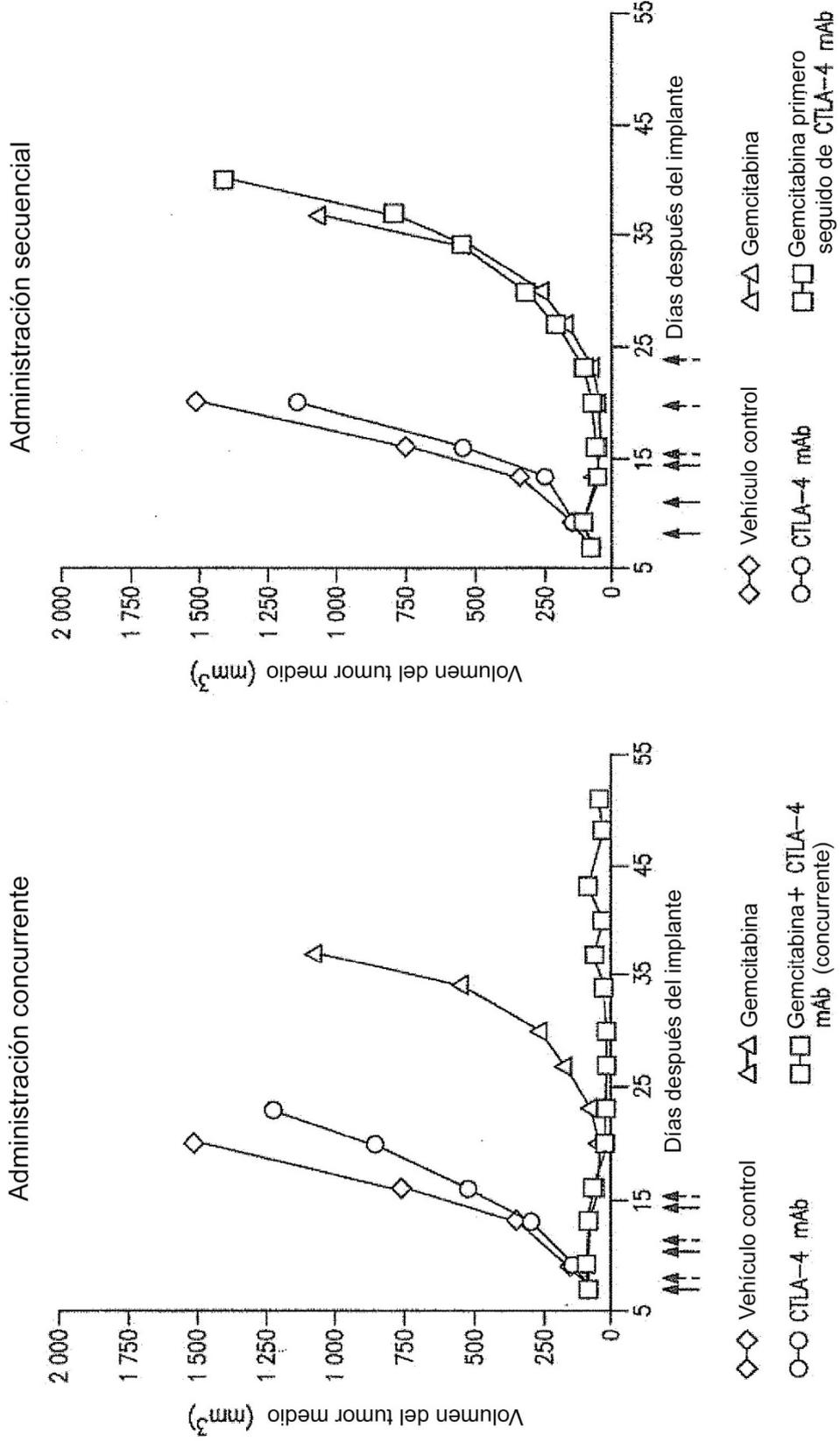


FIG. 10

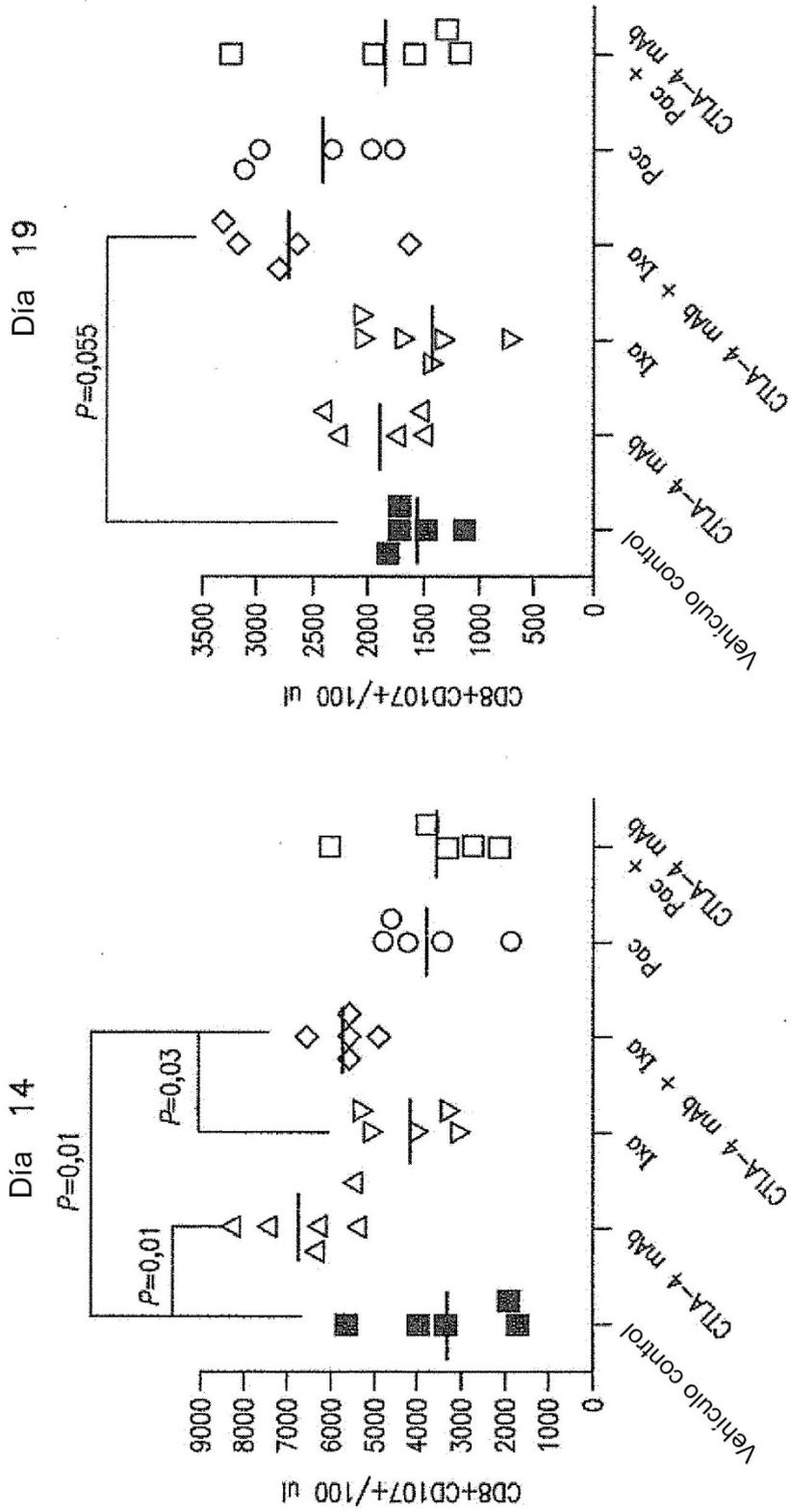


FIG. 11

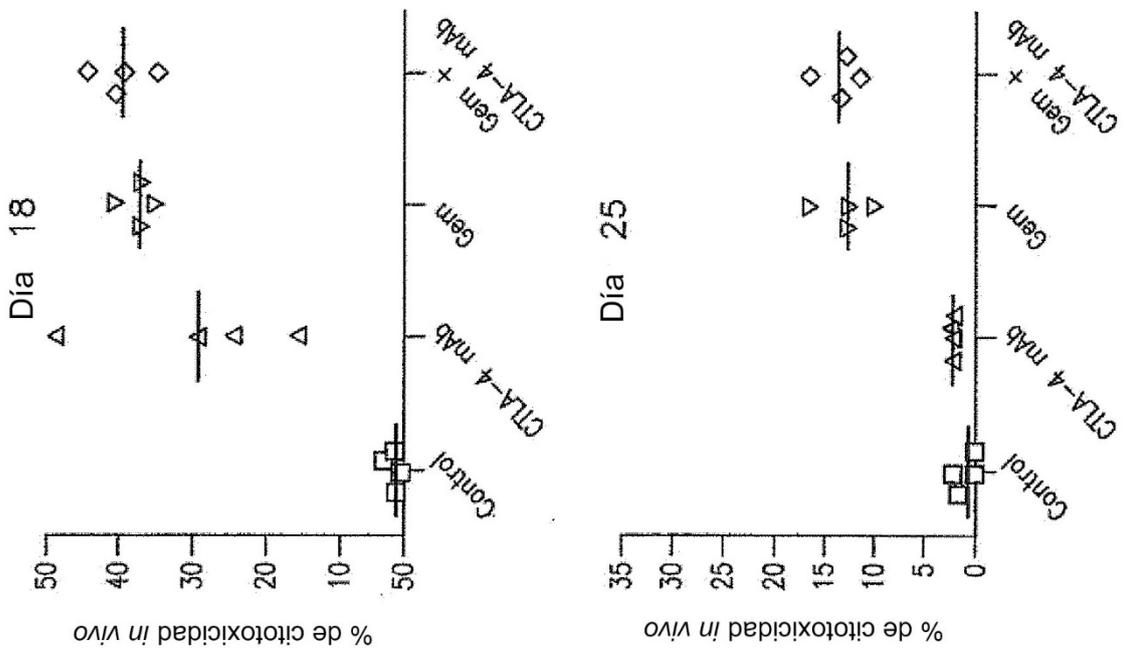
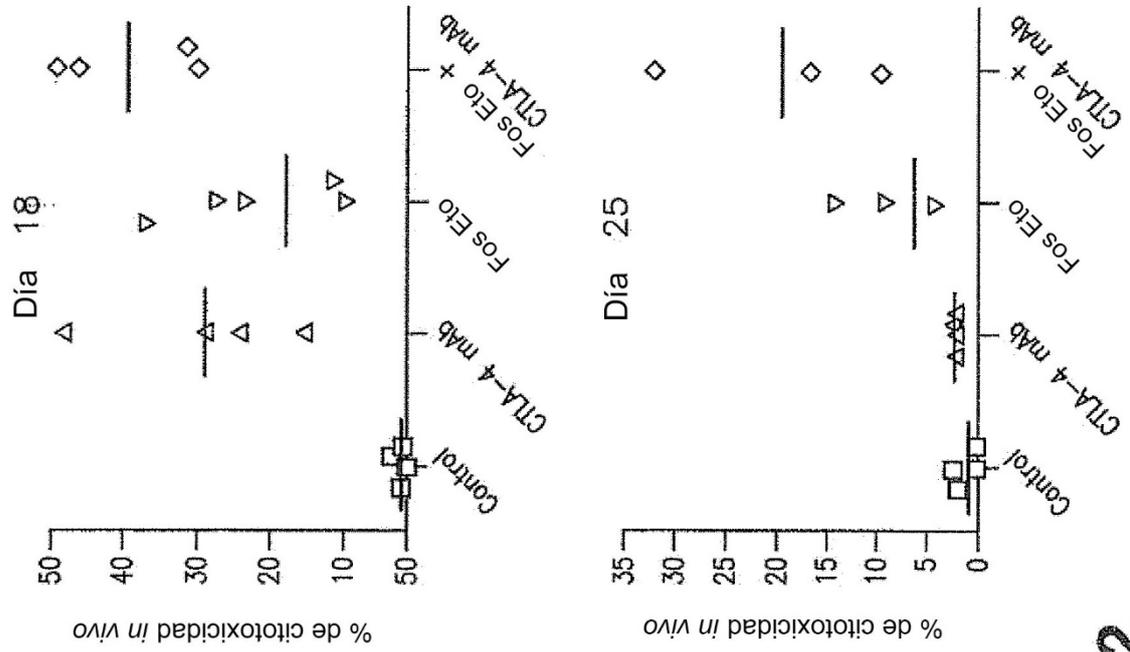


FIG. 12

Efecto en el porcentaje de células inmunológicas en ganglios linfáticos de drenaje tumoral			
Día 17			
	CTLA-4 mAb (D8,12,16)	Gemcitabina (D7,11,15)	Gemcitabina + CTLA-4 mAb
CD4+ CD69+ (células T CD4+ activadas)	Aumento (P=0,001)	Sin efecto	Aumento (P=0,004)
CD8+ CD69+ (células T CD8+ activadas)	Sin efecto	Sin efecto	Aumento (P=0,004)
CD4+ CD25+ FoxP3+ (células T reg)	Aumento (P=0,002)	Disminución (P=0,01)	Sin efecto
CD11b+Gr1+ (células supresoras derivadas mieloides)	Sin efecto	Sin efecto	Disminución (P=0,01)

FIG. 13

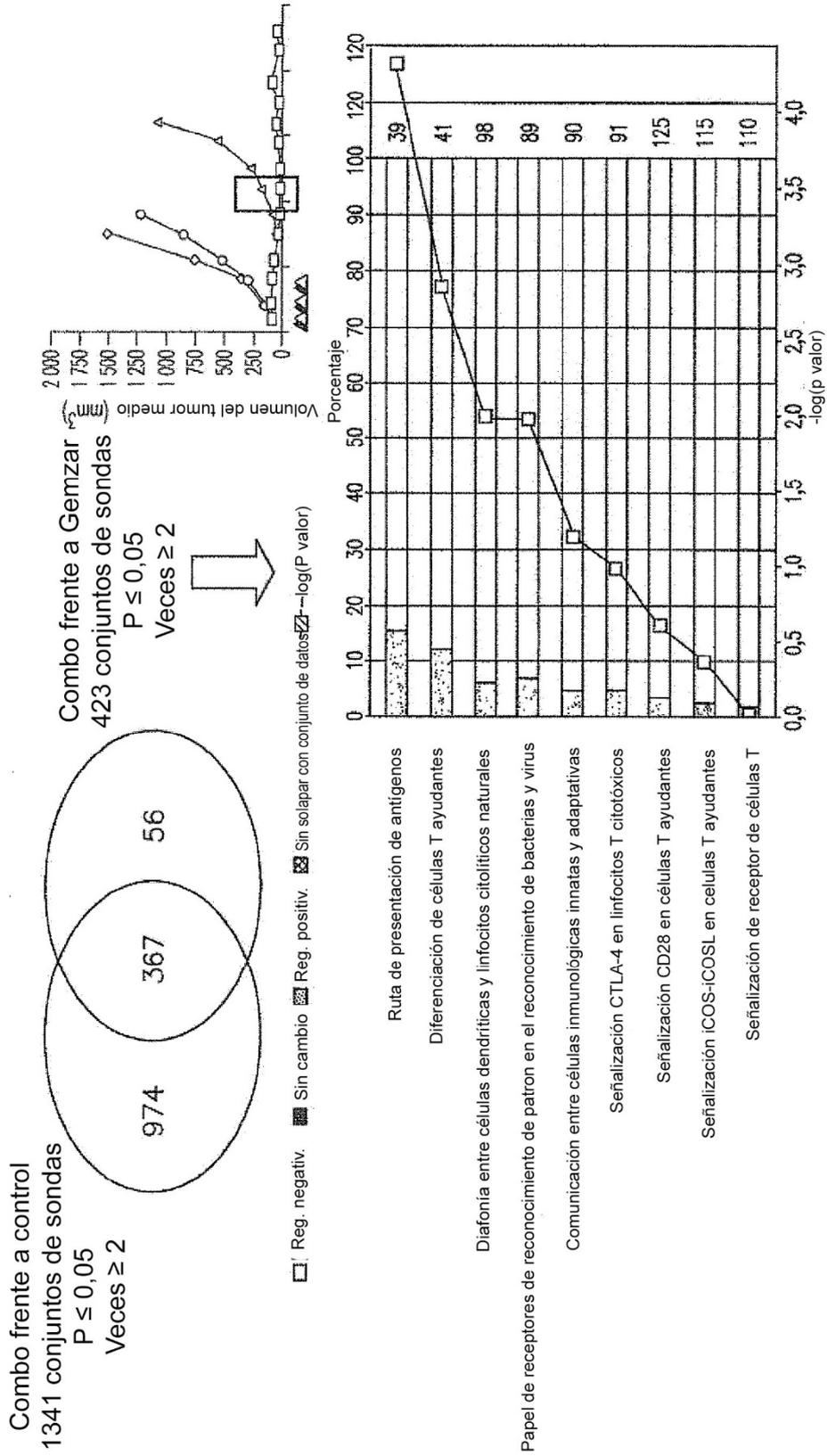


FIG. 14