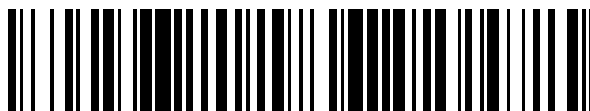


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 665**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2014** **PCT/US2014/039686**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14193898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2014** **E 14805105 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3003316**

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

30 Prioridad:

31.05.2013 US 201361829472 P

04.09.2013 US 201361873476 P

21.04.2014 US 201461981906 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2021

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (50.0%)

126 East Lincoln Avenue

Rahway, NJ 07065-0907, US y

NOVARTIS PHARMA AG (50.0%)

72 Inventor/es:

HOOS, AXEL;

ORFORD, KEITH, W.;

CHUN, PATRICK;

SRIRAM, VENKATARAMAN;

PINHEIRO, ELAINE, M. y

EBBINGHAUS, SCOT, W.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 822 665 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

Terapias de combinación para el cáncer

- 5 La invención se limita a la materia objeto definida en las reivindicaciones adjuntas; la siguiente descripción se limita a esta limitación.

Campo de la invención

- 10 La presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento del cáncer en un mamífero y a combinaciones útiles en dicho tratamiento. En particular, el método se refiere a una nueva combinación que comprende un inhibidor de B-Raf, particularmente N-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable y/o el inhibidor de MEK N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o un solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un antagonista de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo anti PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-ligando de PD o fragmento de unión a antígeno del mismo); a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos y a métodos de uso de dichas combinaciones y composiciones en el tratamiento de afecciones en las que la inhibición de MEK y/o la inhibición de B-Raf y/o la inhibición de PD-L1 y/o PD-L2 endógena de la unión de PD-1 es beneficiosa, por ejemplo, cáncer.

Antecedentes de la invención

- 25 El tratamiento eficaz de los trastornos hiperproliferativos, incluido el cáncer, es un objetivo continuo en el campo de la oncología. Generalmente, el cáncer es el resultado de la desregulación de los procesos normales que controlan la división celular, la diferenciación y la muerte celular apoptótica y se caracteriza por la proliferación de células malignas que tienen el potencial de crecimiento ilimitado, expansión local y metástasis sistémica. La desregulación de los procesos normales incluye anomalías en las vías de transducción de señales y respuesta a factores que difieren de los que se encuentran en las células normales.

- 30 Una gran familia importante de enzimas es la familia de enzimas de las proteínas cinasas. En la actualidad, hay aproximadamente 500 proteínas cinasas conocidas diferentes. Las proteínas cinasas sirven para catalizar la fosforilación de una cadena lateral de aminoácidos en varias proteínas mediante la transferencia del γ -fosfato del complejo ATP-Mg²⁺ a dicha cadena lateral de aminoácidos. Estas enzimas controlan la mayoría de los procesos de señalización dentro de las células, controlando así la función, el crecimiento, la diferenciación y la destrucción (apoptosis) celular a través de la fosforilación reversible de los grupos hidroxilo de los restos de serina, treonina y tirosina en las proteínas.

- 40 Los estudios han demostrado que las proteínas cinasas son reguladores clave de muchas funciones celulares, incluida la transducción de señales, la regulación de la transcripción, la motilidad celular y la división celular. También se ha demostrado que varios oncogenes codifican proteínas cinasas, lo que sugiere que las cinasas juegan un papel en la oncogénesis. Estos procesos están sumamente regulados, a menudo mediante vías complejas entrelazadas en las que cada cinasa estará a su vez regulada por una o más cinasas. En consecuencia, una actividad aberrante o inapropiada de la proteína cinasa puede contribuir al aumento de estados patológicos asociados con dicha actividad aberrante de la cinasa, incluidos los trastornos proliferativos benignos y malignos, así como las enfermedades resultantes de la activación inapropiada de los sistemas inmunitario y nervioso. Debido a su relevancia fisiológica, variedad y ubicuidad, las proteínas cinasas se han convertido en una de las familias de enzimas más importantes y ampliamente estudiadas en la investigación bioquímica y médica.

- 50 La familia de enzimas de las proteínas cinasas se clasifica normalmente en dos subfamilias principales: proteínas tirosina cinasas y proteínas serina/treonina cinasas, teniendo en cuenta el resto de aminoácido que fosforilan. Las proteínas serina/treonina cinasas (PSTK, por las siglas del inglés *protein serine/threonine kinases*), incluyen proteínas cinasas dependientes de AMP cíclico y GMP cíclico, proteínas cinasas dependientes de calcio y fosfolípidos, proteínas cinasas dependientes de calcio y calmodulina, caseína cinasas, proteínas cinasas del ciclo de división celular y otras. Estas cinasas suelen ser citoplasmáticas o están asociadas con las fracciones de partículas de las células, posiblemente anclando proteínas. La actividad aberrante de las proteínas serina/treonina cinasas se ha implicado, o se sospecha que está implicada, en diversas patologías tales como artritis reumatoide, psoriasis, choque séptico, descalcificación, muchos cánceres y otras enfermedades proliferativas. Por consiguiente, las serina/treonina cinasas y las vías de transducción de señales de las que forman parte, son dianas importantes para el diseño de fármacos. Las tirosina cinasas fosforilan restos de tirosina. Las tirosina cinasas juegan un papel igualmente importante en la regulación celular. Estas cinasas incluyen varios receptores para moléculas tales como factores de crecimiento y hormonas, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el receptor de insulina, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y otros. Los estudios han indicado que muchas tirosina cinasas son proteínas transmembrana con sus dominios receptores ubicados en el exterior de la célula y sus dominios cinasa en el interior. También se está trabajando mucho para identificar moduladores de tirosina cinasas.

Las tirosina cinasas receptoras (RTK, siglas del inglés *Receptor Tyrosine Kinases*) catalizan la fosforilación de ciertos restos de aminoácidos tirosílicos en varias proteínas, incluidas ellas mismas, que controlan el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular.

5 Etapas posteriores de las diversas RTK se encuentran en varias vías de señalización, entre ellas la vía de la cinasa Ras-Raf-MEK-ERK. Actualmente se entiende que la activación de las proteínas Ras GTPasa en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, citocinas, etc. estimula la fosforilación y la activación de las cinasas Raf. Después, estas cinasas fosforilan y activan las proteínas cinasas intracelulares MEK1 y MEK2, que a su vez fosforilan y activan otras proteínas cinasas, ERK1 y 2. Esta vía de señalización, también conocida como vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, siglas de inglés *mitogen-activated protein kinase*) o cascada citoplasmática, actúa como mediadora en las respuestas celulares a las señales de crecimiento. La función principal de esta vía es relacionar la actividad receptora en la membrana celular con la modificación de dianas citoplasmáticas o nucleares que controlan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular.

15 La activación constitutiva de esta vía es suficiente para inducir la transformación celular. La activación mal regulada de la vía de la cinasa MAP, debido a una activación aberrante de la tirosina cinasa receptora, a mutaciones de Ras o a mutaciones de Raf, se ha encontrado con frecuencia en cánceres humanos y representa un factor importante que determina el control del crecimiento anómalo. En las neoplasias humanas, las mutaciones de Ras son comunes, habiéndose identificado en aproximadamente el 30 % de los cánceres. La familia Ras de proteínas GTPasa (proteínas que convierten el trifosfato de guanosa en difosfato de guanosa) envía señales de los receptores del factor de crecimiento activado a los compañeros intracelulares posteriores. Entre las dianas reclutadas por Ras activo unido a la membrana destaca la familia Raf de proteínas serina/treonina cinasas. La familia Raf está compuesta por tres cinasas relacionadas (A-, B y C-Raf) que actúan como efectores posteriores de Ras. La activación de Raf mediada por Ras a su vez desencadena la activación de MEK1 y MEK2 (MAP/ERK cinasas 1 y 2), que a su vez fosforilan ERK1 y ERK2 (cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares) en la tirosina-185 y en la treonina-183. ERK1 y ERK2 activadas se trasladan y se acumulan en el núcleo, donde pueden fosforilar una variedad de sustratos, incluidos los factores de transcripción que controlan el crecimiento y la supervivencia celular. Dada la importancia de la vía Ras/Raf/MEK/ERK en el desarrollo de cánceres humanos, los constituyentes de cinasa de la cascada de señalización, se están incorporando como dianas potencialmente importantes para la modulación de la progresión de la enfermedad en el cáncer y de otras enfermedades proliferativas.

MEK1 y MEK2 son miembros de una familia más grande de cinasas de especificidad dual (MEK1-7) que fosforilan restos de treonina y tirosina de varias cinasas MAP. MEK1 y MEK2 están codificadas por genes distintos, pero comparten una alta homología (80 %) tanto dentro de los dominios de cinasa catalítica C-terminal como en la mayor parte de la región reguladora N-terminal. No se han encontrado formas oncogénicas de MEK1 y MEK2 en cánceres humanos, pero se ha demostrado que la activación constitutiva de MEK da como resultado la transformación celular. Además de Raf, MEK también puede activarse mediante otros oncogenes. Hasta el momento, los únicos sustratos conocidos de MEK1 y MEK2 son ERK1 y ERK2. Esta especificidad de sustrato inusual, además de la capacidad única de fosforilar restos de tirosina y treonina, coloca a MEK1 y MEK2 en un punto crítico en la cascada de transducción de señales que permite que estas proteínas MEK integren muchas señales extracelulares en la vía de la MAPK.

Por consiguiente, se ha reconocido que un inhibidor de una proteína de la vía de la cinasa MAPK (por ejemplo, MEK) debería tener valor como agente antiproliferativo, proapoptótico y antiinvasivo para su uso en la contención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas o invasivas.

Por otra parte, también se sabe que un compuesto que tiene actividad inhibidora de MEK induce eficazmente la inhibición de la actividad de ERK1/2 y la supresión de la proliferación celular (The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, N.º 4, págs. 2686-2692, 2001), y se espera que el compuesto muestre efectos sobre enfermedades causadas por una proliferación celular no deseable, tal como tumorigénesis y/o cáncer. Se han identificado mutaciones en varias Ras GTPasas y la cinasa B-Raf que pueden conducir a una activación sostenida y constitutiva de la vía de la MAPK, dando como resultado en última instancia una mayor división y supervivencia celular. Estas mutaciones se han relacionado fuertemente con el establecimiento, el desarrollo y la progresión de una amplia gama de cánceres humanos. Por ejemplo, en melanoma, más del 80 % de las mutaciones de BRAF provocan una sustitución del aminoácido glutamato (E) por valina (V) en la posición 600 (V600E) de la proteína BRAF, mientras que aproximadamente el 3-20 % de las mutaciones del melanoma son una sustitución de la lisina (K) por la valina en la posición 600 (V600K) (Gorden *et al.*, Cancer Res (2003) 63:3955-3957; Houben *et al.*, J Carcinog (2004) 3:6; Kumar *et al.*, Clin Cancer Res. (2003) 9:3362-3368; Libra *et al.*, Cell Cycle (2005) 4:1382-1384; Omholt *et al.* Clin Cancer Res (2003) 9:6483-6488. El papel biológico de las cinasas Raf, y específicamente el de B-Raf, en la transducción de señales, se describe en Davies, H., *et al.*, Nature (2002) 9:1-6; Garnett, M.J. y Marais, R., Cancer Cell (2004) 6:313-319; Zebisch, A. y Troppmair, J., Cell. Mol. Life Sci. (2006) 63:1314-1330; Midgley, R.S. y Kerr, D.J., Crit. Rev. Onc/Hematol. (2002) 44:109-120; Smith, R.A., *et al.*, Curr. Top. Med. Chem. (2006) 6:1071-1089; and Downward, J., Nat. Rev. Cancer (2003) 3:11-22.

Se han encontrado mutaciones naturales de la cinasa B-Raf que activan la señalización de la vía de la MAPK en un gran porcentaje de melanomas humanos (Davies (2002) citado anteriormente) y en cánceres tiroideos (Cohen *et al*

J. Nat. Cancer Inst. (2003) 95(8) 625-627 and Kimura et al Cancer Res. (2003) 63(7) 1454-1457), así como en frecuencias más bajas, pero aún significativas, en los siguientes:

adenocarcinoma de Barret (Garnett *et al.*, Cancer Cell (2004) 6 313-319 and Sommerer et al Oncogene (2004) 23(2) 554-558), carcinomas de las vías biliares (Zebisch *et al.*, Cell. Mol. Life Sci. (2006) 63 1314-1330), cáncer de mama (Davies (2002) citado anteriormente), cáncer cervicouterino (Moreno-Bueno et al Clin. Cancer Res. (2006) 12(12) 3865-3866), colangiocarcinoma (Tannapfel et al Gut (2003) 52(5) 706-712), tumores del sistema nervioso central, incluyendo tumores primarios del SNC tales como glioblastomas, astrocitomas y ependimomas (Knobbe et al Acta Neuropathol. (Berl.) (2004) 108(6) 467-470, Davies (2002) citado anteriormente y Garnett *et al.*, Cancer Cell (2004) citado anteriormente) y tumores secundarios del SNC (es decir, metástasis en el sistema nervioso central de tumores que se originan fuera del sistema nervioso central), cáncer colorrectal, incluido el carcinoma de colon del intestino grueso (Yuen et al Cancer Res. (2002) 62(22) 6451-6455, Davies (2002) citado anteriormente y Zebisch et al., Cell. Mol. Life Sci. (2006), cáncer gástrico (Lee et al Oncogene (2003) 22 (44) 6942-6945), carcinoma de cabeza y cuello, incluyendo carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (Cohen et al J. Nat. Cancer Inst. (2003) 95 (8) 625-627 y Weber et al Oncogene (2003) 22 (30) 4757-4759), cánceres hematológicos incluyendo leucemias (Garnett *et al.*, Cancer Cell (2004) citado anteriormente, particularmente leucemia linfoblástica aguda (Garnett *et al.*, Cancer Cell (2004) citado anteriormente y Gustafsson et al Leukemia (2005) 19 (2) 310-312), leucemia mielógena aguda (LMA) (Lee et al Leukemia (2004) 18(1) 170-172, y Christiansen et al Leukemia (2005) 19(12) 2232-2240), síndromes mielodisplásicos (Christiansen et al Leukemia (2005) citado anteriormente) y leucemia mielógena crónica (Mizuchi et al Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 326(3) 645-651); Linfoma de Hodgkin (Figl et al Arch. Dermatol. (2007) 143(4) 495-499), linfoma no Hodgkin (Lee et al Br. J. Cancer (2003) 89(10) 1958-1960), leucemia megacarioblástica (Eychene et al Oncogene (1995) 10(6) 1159-1165) y mieloma múltiple (Ng et al Br. J. Haematol. (2003) 123(4) 637-645), carcinoma hepatocelular (Garnett *et al.*, Cancer Cell (2004), cáncer de pulmón (Brose et al Cancer Res. (2002) 62(23) 6997-7000, Cohen et al J. Nat. Cancer Inst. (2003) citado anteriormente y Davies (2002) citado anteriormente), incluido el cáncer microcítico de pulmón (Pardo et al EMBO J. (2006) 25 (13) 3078-3088) y el cáncer no microcítico de pulmón (Davies (2002) citado anteriormente), cáncer de ovario (Russell y McCluggage J. Pathol. (2004) 203(2) 617-619 y Davies (2002) citado anteriormente), cáncer endometrial (Garnett *et al.*, Cancer Cell (2004) citado anteriormente y Moreno-Bueno et al Clin. Cancer Res. (2006) citado anteriormente), cáncer pancreático (Ishimura et al Cancer Lett. (2003) 199(2) 169-173), adenoma hipofisario (De Martino et al J. Endocrinol. Invest. (2007) 30(1) RC1-3), cáncer de próstata (Cho et al Int. J. Cancer (2006) 119(8) 1858-1862), cáncer renal (Nagy et al Int. J. Cancer (2003) 106(6) 980-981), sarcoma (Davies (2002) citado anteriormente), y cánceres de piel (Rodríguez-Viciano et al Science (2006) 311(5765) 1287-1290 y Davies (2002) citado anteriormente). La sobreexpresión de c-Raf se ha relacionado con LMA (Zebisch *et al.*, Cancer Res. (2006) 66(7) 3401-3408 y Zebisch (Cell. Mol. Life Sci. (2006)) y eritroleucemia (Zebisch *et al.*, Cell. Mol. Life Sci. (2006)).

Gracias al papel desempeñado por las cinasas de la familia Raf en estos cánceres y a los estudios exploradores con una gama de agentes preclínicos y terapéuticos, incluyendo uno dirigido selectivamente a la inhibición de la actividad de la cinasa B-Raf (King AJ, *et al.*, (2006) Cancer Res. 66: 11100-11105), se acepta generalmente que los inhibidores de una o más cinasas de la familia Raf serán útiles para el tratamiento de dichos cánceres u otras afecciones asociadas con la cinasa Raf.

La mutación de B-Raf también se ha visto implicada en otras afecciones, incluido el síndrome cardio-facio-cutáneo (Rodríguez-Viciano et al Science (2006) 311 (5765) 1287-1290) y la enfermedad renal poliquística (Nagao et al Kidney Int. (2003) 63(2) 427-437).

La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) es un receptor transmembrana tipo I de 50-55 kDa originalmente identificado por hibridación sustractiva de una línea de linfocitos T de ratón que experimenta apoptosis (Ishida *et al.*, 1992, Embo J. 11:3887-95). Un miembro de la familia de genes CD28, PD-1, se expresa en células de linaje mieloide y en linfocitos T y B (Greenwald *et al.*, 2005, Annu. Rev. Immunol. 23:515-48; Sharpe *et al.*, 2007, Nat. Immunol. 8:239-45).

En las patentes de Estados Unidos N.º 6.808.710 y 7.101.550, expedidas por C. Wood y G. Freeman el 26 de octubre de 2004 y el 5 de septiembre de 2006, respectivamente, se desvelan métodos para intentar modular una respuesta inmunitaria activando o inhibiendo la señalización del receptor de PD-1 utilizando, por ejemplo, un anticuerpo que se une a PD-1.

Teniendo en cuenta la observación de que en el momento de la sensibilización, el bloqueo de las señales inhibitoras de PD-1 disminuye la reactividad de las células inmunitarias, en la patente de Estados Unidos N.º 7.029.674, expedida el 18 de abril de 2006 por B. Carreño y J. Leonard, se desvelan métodos para disminuir la activación de una célula inmunitaria poniendo en contacto la célula con un agente que inhibe la señalización de PD-1. Adicionalmente, en las patentes de Estados Unidos N.º 7.595.048 y 8.168.179 se desvelan métodos para tratar el cáncer con anticuerpos anti-PD-1.

La vía de PD-1 ha sido objeto de considerable interés para los investigadores que desarrollan terapias para tratar el melanoma y otros tipos de tumores. El receptor de PD-1 se expresa en la superficie de linfocitos T activados y se une a ligandos en la superficie de células presentadoras de antígenos (PD-L1 y PD-L2), una interacción que modula la respuesta inmunitaria. Muchas células cancerosas expresan altos niveles de PD-L1 en su superficie, lo que hace

que los linfocitos T se desactiven a través de la interacción de las PD-L1 con PD-1, haciéndolos incapaces de generar una respuesta antitumoral.

PD-1 modula negativamente la activación de linfocitos T, y esta función inhibidora está relacionada con un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, siglas del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) de su dominio citoplasmático (Greenwald *et al.*, citado anteriormente; Parry *et al.*, 2005, Mol. Cell. Biol. 25:9543-53). La alteración de esta función inhibidora de PD-1 puede conducir a la autoinmunidad. Por ejemplo, En ratones C57B1/6 la genosupresión de PD-1 conduce a un síndrome lúpico, mientras que en ratones BALB/c conduce al desarrollo de miocardiopatía dilatada (Nishimura *et al.*, 1999, Immunity 11:141-51; Okazaki *et al.*, 2003, Nat. Med. 9:1477-83). En seres humanos, un polimorfismo mononucleotídico en el locus del gen que codifica a PD-1 está asociado con una mayor incidencia de lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo 1, artritis reumatoide y progresión de esclerosis múltiple. El escenario inverso también puede ser perjudicial. Las señales negativas sostenidas por PD-1 se han implicado en disfunciones de linfocitos T en muchas situaciones patológicas, tales como la evasión inmunitaria de tumores e infecciones víricas crónicas.

La inmunidad antitumoral del hospedador se ve afectada principalmente por linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por las siglas del inglés *tumor-infiltrating lymphocytes*) (Galore *et al.*, 2006, Science 313:1960-4). Múltiples líneas de evidencia han indicado que los TIL están sujetos a la regulación inhibidora de PD-1. En primer lugar, la expresión de PD-L1 se confirma en muchas líneas tumorales de ser humano y de ratón y la expresión puede regularse positivamente además mediante IFN- γ *in vitro* (Dong *et al.*, 2002, Nat. Med. 8:793-800). En segundo lugar, la expresión de PD-L1 por células tumorales se ha asociado directamente con su resistencia *in vitro* a la lisis por linfocitos T antitumorales (Dong *et al.*, citado anteriormente; Blank *et al.*, 2004, Cancer Res. 64:1140-5). En tercer lugar, ratones con genosupresión de PD-1 son resistentes a exposición tumoral (Iwai *et al.*, 2005, Int. Immunol. 17:133-44) y los linfocitos T de ratones con genosupresión de PD-1 son sumamente eficaces en cuanto al rechazo de tumores cuando se transfieren de manera adoptiva a ratones portadores de tumores (Blank *et al.*, citado anteriormente). En cuarto lugar, el bloqueo de las señales inhibidoras de PD-1 por un anticuerpo monoclonal puede potenciar la inmunidad antitumoral del hospedador en ratones (Iwai *et al.*, citado anteriormente; Hirano *et al.*, 2005, Cancer Res. 65:1089-96). En quinto lugar, los altos grados de expresión de PD-L1 en tumores (detectados por tinción inmunohistoquímica) se asocian con un mal pronóstico para muchos tipos de cáncer humano (Hamanishi *et al.*, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5).

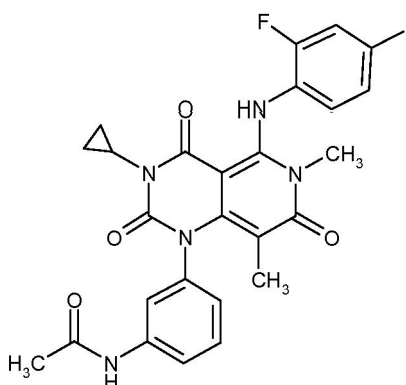
Aunque ha habido muchos avances recientes en el tratamiento del cáncer, sigue existiendo la necesidad de encontrar un tratamiento más eficaz y/o mejorado de un individuo que padece los efectos del cáncer. La presente invención aborda esta necesidad.

Sumario de la invención

La divulgación actual está dirigida a una combinación de un inhibidor de B-Raf y/o un inhibidor de MEK y un anticuerpo anti-PD-1 en el tratamiento del cáncer.

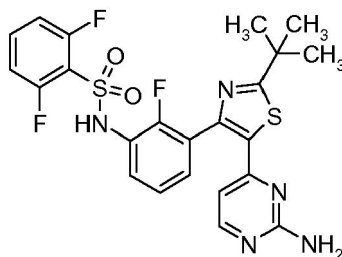
La presente divulgación está dirigida a una combinación de agentes terapéuticos que es ventajosa sobre el tratamiento con cada agente cuando se administra solo y ventajosa sobre el tratamiento con una combinación de un inhibidor de MEK y un inhibidor de B-RAF. En particular, se describe la combinación de fármacos que incluye el inhibidor de B-Raf *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable y/o el inhibidor de MEK *N*-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o un solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un antagonista de PD-1 (por ejemplo, MK-3475).

El inhibidor de MEK de la invención está representado por el compuesto de estructura (I):



o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable (denominado en conjunto en el presente documento "Compuesto A"),

El inhibidor de B-Raf de la invención está representado por el compuesto de estructura (II):



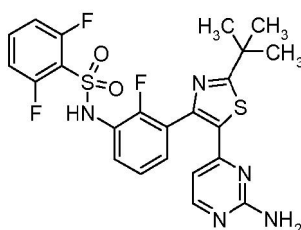
o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable (denominado en conjunto en el presente documento "Compuesto B").

El antagonista de PD-1 según la presente divulgación inhibe la unión de PD-L1 con PD-1, y preferentemente también inhibe la unión de PD-L2 con PD-1. Preferentemente, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 y bloquea la unión de PD-L1 con PD-1. En una realización particularmente preferida, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 que se une a PD-1 y bloquea la unión de PD-L1 y PD-L2 con PD-1.

Nivolumab, que también se conoce como BMS-936558 y MDX1106, es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que se une a PD-1 y está diseñado para el tratamiento del cáncer por Bristol-Myers Squibb y Ono Pharmaceuticals.

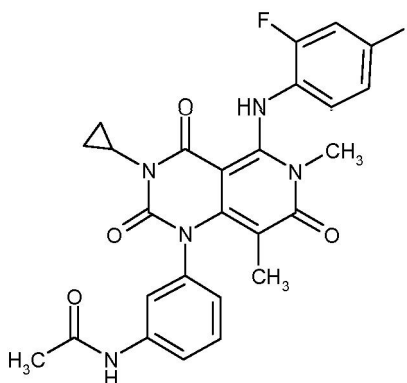
MK-3475, que antes se conocía como lambrolizumab, es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD-1 y está siendo desarrollado por Merck and Co para el tratamiento del cáncer.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende un anticuerpo anti-PD-1 humano y un Compuesto A y un Compuesto B, en donde: el Compuesto B es un compuesto de estructura (II)



(II)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



(I)

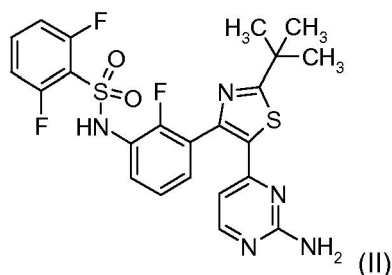
o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, y en donde el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

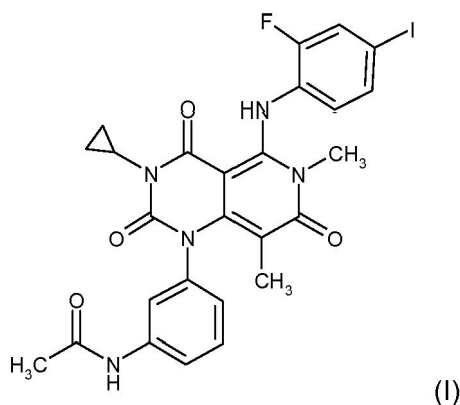
En otro aspecto de la invención, se proporciona una combinación que comprende un anticuerpo anti-PD-1 humano y un Compuesto A y un Compuesto B, en donde el Compuesto B es *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida metanosulfonato; y el Compuesto A es *N*-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida dimetil sulfóxido (solvato).

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende un anticuerpo anti-PD-1 humano y un compuesto A y un compuesto B para su uso en terapia, en donde:

el Compuesto B es un compuesto de estructura (II):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):

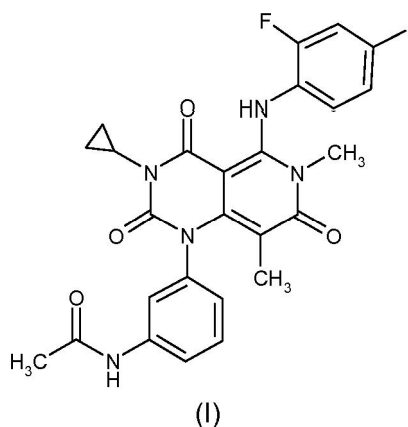


o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

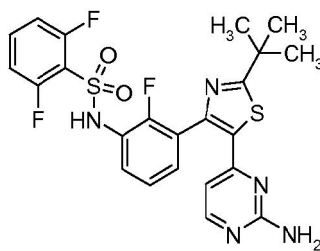
En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el antagonista de PD-1 en la combinación es un anticuerpo anti-PD-1 humano y la combinación es para su uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano. En realizaciones más preferidas, el cáncer es melanoma.

En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, la combinación comprende cada uno de los compuestos A y B, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 humano y la combinación es para su uso en el tratamiento de un ser humano con melanoma avanzado o metastásico que da positivo para una mutación de BRAF V600.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 humano para tratar un cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende un Compuesto A y/o un Compuesto B junto con un diluyente o un transportador farmacéuticamente aceptable, y en donde el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



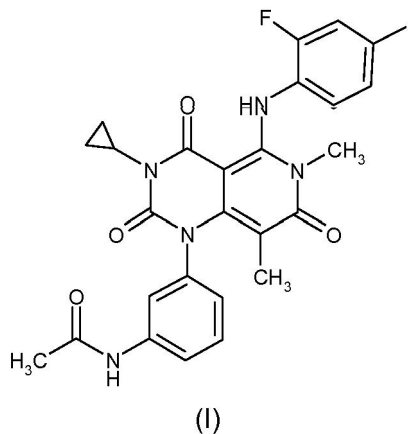
o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; y
el compuesto B es un compuesto de estructura (II):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una
cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que
comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

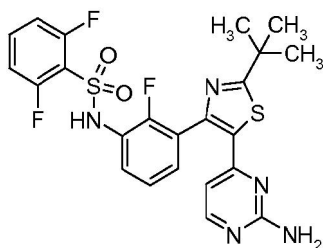
En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención comprende cada uno de los compuestos A y
B, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y el
cáncer es un melanoma avanzado que da positivo para una mutación de BRAF V600.

En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un
anticuerpo anti-PD-1 humano junto con un diluyente o un transportador farmacéuticamente aceptable para su uso en
una terapia de combinación para tratar un cáncer, en donde la terapia de combinación comprende la composición
farmacéutica y un Compuesto A y un Compuesto B, en donde el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):

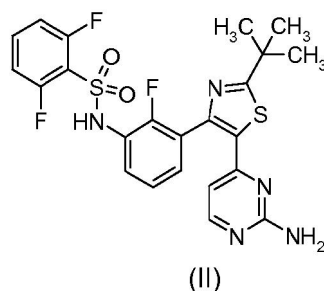


o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; y
en donde el Compuesto B es un compuesto de estructura (II):

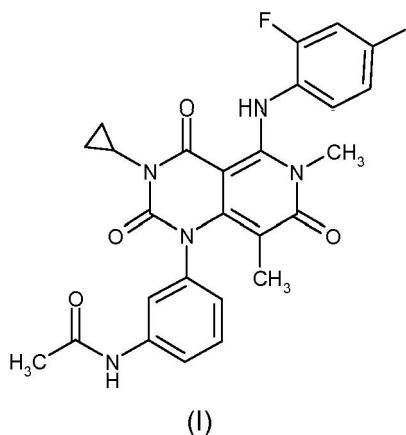
el Compuesto B es un compuesto de estructura (II)

Cc1ccc(F)cc1Nc2c(C)c(=O)n(C)c3c2c(=O)n(c3=O)C4=CC=CC=C4NC(=O)C

el Compuesto B es un compuesto de estructura (II):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y
el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un ser humano que lo necesite que comprende administrar al ser humano una terapia de combinación, donde la terapia de combinación comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de PD-1 y uno o ambos de una cantidad terapéuticamente eficaz de un Compuesto A y una cantidad terapéuticamente eficaz de un Compuesto B, en donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 humano, el Compuesto B es *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable y el Compuesto A es *N*-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4, 6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o un solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un ser humano que lo necesite que comprende administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de una terapia de combinación que comprende un antagonista de PD-1 y uno o ambos de un Compuesto A y un Compuesto B, en donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 humano El compuesto B es *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida metanosulfonato, y el Compuesto A es solvato de *N*-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida dimetil sulfóxido.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un mamífero que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la invención en donde la combinación se administra dentro de un período específico y durante un período de tiempo.

En algunas realizaciones, un método de tratamiento de la invención comprende tratar a un ser humano diagnosticado de melanoma avanzado que da positivo para una mutación de BRAF V600 y la terapia de combinación administrada comprende cada uno de Compuesto A y Compuesto B, y un anticuerpo anti-PD-1 humano.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el cáncer da positivo para la expresión de PD-L1 (en inglés *Programmed Death-ligand 1*, ligando 1 de muerte programada) humano, el antagonista de PD-1 es MK-3475, el Compuesto A es trametinib y el Compuesto B es dabrafenib.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 muestra secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 ejemplar útil en la presente invención (SEQ ID NO: 1-6).

La FIGURA 2 muestra secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera y cadena pesada de otro anticuerpo monoclonal anti-PD-1 ejemplar útil en la presente invención (SEQ ID NO: 7-12).

La FIGURA 3 muestra secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y de la cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 ejemplar útil en la presente invención (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14).

La FIGURA 4 muestra secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera alternativas de un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 ejemplar útil en la presente invención (SEQ ID NO: 15-17).

La FIGURA 5 muestra secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras alternativas de un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 ejemplar útil en la presente invención (SEQ ID NO: 18-20).

La FIGURA 6 muestra secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de MK-3475 (SEQ ID NO. 21 y 22, respectivamente).

La FIGURA 7 muestra secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de nivolumab (SEQ ID NO. 23 y 24, respectivamente).

La FIGURA 8 compara, en ratones portadores de tumores, el efecto antitumoral de la terapia de combinación con un anticuerpo murino anti-PD-1 de ratón y trametinib frente a la monoterapia con cualquiera de los agentes solo, mostrando la FIG. 8A el volumen tumoral medio durante varios días a lo largo del tratamiento con un isotipo de anticuerpo + vehículo (Control), el Ab (anticuerpo) murino anti-PD-1 (Anti-PD-1), trametinib, o la administración simultánea de trametinib y Anti-PD-1, y mostrando la FIG. 8B los valores del volumen tumoral de ratones individuales en cada grupo de tratamiento el primer día de tratamiento (gráfico de la izquierda, día 0) o después de 23 días de tratamiento (gráfico de la derecha, día 23).

Descripción detallada de la invención

ABREVIATURAS

A lo largo de la descripción detallada y en los ejemplos de la invención, se utilizarán las siguientes abreviaturas:

DVD	Una dosis dos veces al día
CDR	Región determinante de la complementariedad
CHO	Ovario de hámster chino
SSE	Supervivencia sin enfermedad
TLD	Toxicidad limitante de la dosis
FFPE	Fijado con formol, incluido en parafina
FR	Región marco conservada
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
DMT	Dosis máxima tolerada
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute
RG	Respuesta Global
SG	Supervivencia Global
EP	Enfermedad Progresiva
SSP	Supervivencia Sin Progresión
RP	Respuesta Parcial
C2S	Una dosis cada dos semanas
C3S	Una dosis cada tres semanas
UVD	Una dosis al día
RECIST	Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos
EE	Enfermedad Estable
VH	Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
VK	Región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina

II. DEFINICIONES

Para que la invención se entienda más fácilmente, a continuación se definen específicamente algunos términos técnicos y científicos. A menos que se defina específicamente en otra parte de este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

Como se usa en el presente documento, así como en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras tales como "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen sus referencias en plural correspondientes, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

"Administración" y "tratamiento", aplicado a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o líquido biológico, se refiere al contacto de una composición o agente farmacéutico, terapéutico, de diagnóstico, exógeno, con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o líquido biológico. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un líquido, donde el líquido está en contacto con la célula. Por "administración" y "tratamiento" también se entiende los tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, por medio de un reactivo, un diagnóstico, un compuesto de unión, o por otra célula. El término "sujeto" incluye cualquier organismo, preferentemente un animal, más preferentemente un mamífero (por ejemplo, una rata, un ratón, un perro, un gato, un conejo) y, más preferentemente, un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que presente la actividad biológica o de unión deseada. Por tanto, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, completamente humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos camelizados de dominio único. Los "anticuerpos precursores" son anticuerpos obtenidos por la exposición de un sistema inmunitario a un antígeno antes de la modificación de los anticuerpos para un uso previsto, como la humanización de un anticuerpo para su uso como agente terapéutico humano.

En general, la unidad estructural del anticuerpo monoclonal básico comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal de la cadena pesada puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Por otro lado, las cadenas pesadas humanas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo, tal como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, en líneas generales, Fundamental Immunology capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por tanto, en general, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son, en general, los mismos.

Normalmente, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que se encuentran dentro de regiones marco relativamente conservadas (FR). Las CDR suelen estar alineadas por las regiones marco conservadas, lo que permite la unión a un epítipo específico. En general, desde el N-terminal al C-terminal, los dominios variables de las cadenas ligera y pesada comprenden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Generalmente, la asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5ª ed.; NIH Publ. N.º 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, *et al.*, (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, *et al.*, (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 o Chothia, *et al.*, (1989) Nature 342:878-883.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en el dominio variable de cadena ligera y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en el dominio variable de cadena pesada). Véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (que definen las regiones CDR de un anticuerpo por secuencia); véase también Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 (que definen las regiones CDR de un anticuerpo por estructura). Como se usa en el presente documento, la expresión restos de la región "marco conservada" o "FR", se refiere a los restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable definidos en el presente documento como restos de CDR.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, es decir, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que conservan una o más regiones CDR. Los ejemplos de fragmentos de unión de anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; dímeros; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocaténarias, por ejemplo, sc-Fv; nanocuerpos y anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un anticuerpo que "se une específicamente a" una proteína diana especificada, es un anticuerpo que presenta unión preferencial con esa diana en comparación con otras proteínas, pero esta especificidad no requiere una

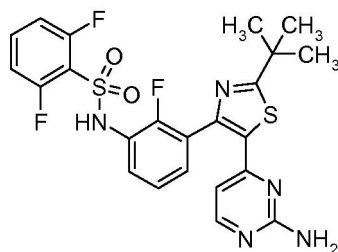
especificidad de unión absoluta. Un anticuerpo se considera "específico" para su diana prevista si su unión es determinante de la presencia de la proteína diana en una muestra, por ejemplo, sin producir resultados no deseados como falsos positivos. Los anticuerpos, o fragmentos de unión de los mismos, útiles en la presente invención, se unirán a la proteína diana con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor, y lo más preferentemente al menos 100 veces mayor, que la afinidad con proteínas no diana. Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido *que comprende* una secuencia de aminoácidos determinada, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una molécula de PD-1 humana madura o PD-L1 humana, si se une a polipéptidos que comprenden esa secuencia pero no se une a proteínas que carecen de esa secuencia. Un anticuerpo que se une específicamente a una proteína diana humana especificada preferentemente se refiere a un anticuerpo que se une a esa proteína diana con una K_D de $1 \times 10^{-7} M$ o menor, más preferentemente de $5 \times 10^{-8} M$ o menor, más preferentemente de $1 \times 10^{-8} M$ o menor, más preferentemente de $5 \times 10^{-9} M$ o menor. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizando resonancia de plasmón superficial.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en un anticuerpo procedente de una especie particular (por ejemplo, ser humano) o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en un anticuerpo procedente de otra especie (por ejemplo, ratón) o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

"Anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de hidratos de carbono murinas si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma procedente de una célula de ratón. De manera similar, "anticuerpo de ratón" o "anticuerpo de rata" se refieren a un anticuerpo que comprende solo secuencias de inmunoglobulina de ratón o rata, respectivamente.

la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. El prefijo "hum", "hu" o "h", se añade a las denominaciones de los clones de los anticuerpos cuando sea necesario para distinguir los anticuerpos humanizados de los anticuerpos de roedores precursores. Generalmente, las formas humanizadas de los anticuerpos de roedores comprenderán las mismas secuencias de CDR que las de los anticuerpos de roedores precursores, aunque se pueden incluir determinadas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado o por otras razones.

Como se usa en el presente documento, el inhibidor de B-Raf *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil]-2,6-difluorobencenosulfonamida o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable, está representado por un compuesto de estructura (II):



(II)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Por conveniencia, el grupo de posibles compuestos y sales se denomina en conjunto Compuesto B, lo que significa que la referencia al Compuesto B se referirá a cualquier del compuesto o sal del mismo farmacéuticamente aceptable en la alternativa. Un inhibidor de B-Raf particularmente preferido para su uso en cualquiera de los aspectos de la invención, es el mesilato de dabrafenib, que se conoce con el nombre comercial TAFINLAR®. Las cápsulas de TAFINLAR (dabrafenib) se suministran como cápsulas de 50 mg y 75 mg para administración oral y contienen los siguientes principios inactivos: dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio y celulosa microcristalina.

La expresión mutación BRAF V600, significa una sustitución de glutamato (E) por valina en la posición 600 (V600E)

y/o una sustitución de lisina (K) por valina en la posición 600 (V600K). Dar positivo para una mutación BRAF V600 significa la detección de la presencia de una o ambas sustituciones, y dar negativo para una mutación BRAF V600 significa la ausencia de ambas sustituciones. Para detectar mutaciones BRAF V600E y V600K, bioMérieux SA comercializa un kit de diagnóstico *in vitro* (DIV) con el nombre comercial THxID™ BRAF disponible en el comercio.

"Agente bioterapéutico" significa una molécula biológica, tal como un anticuerpo o una proteína de fusión, que bloquea la señalización del ligando/receptor en cualquier vía biológica que dé soporte al mantenimiento y/o al crecimiento del tumor o que suprima la respuesta inmunitaria antitumoral.

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno", se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma escamocelular, mieloma, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiple, cáncer (tubo) gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervicouterino, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres particularmente preferidos que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención, dan positivo para la expresión de PD-L1 y dan positivo para una mutación BRAF V600 (en realizaciones que incluyen un Compuesto B) o negativo para una mutación BRAF V600 (en realizaciones que no incluyen un Compuesto B). Como se usa en el presente documento, melanoma avanzado se refiere melanoma irresecable en estadio III y melanoma metastásico se refiere melanoma en estadio IV.

Como se usa en el presente documento, "CDR" o "las CRD", significa la(s) región(es) determinante(s) de la complementariedad en una región variable de inmunoglobulina, definida(s) utilizando el sistema de numeración de Kabat, a menos que se indique lo contrario.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunas clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación: agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de cinasas, alcaloides vegetales venenosos para el huso (mitótico), antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, fotosensibilizadores, antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (MSRE), antiprogesteronas, reguladores negativos de receptores de estrógenos (RNRE), antagonistas de receptores de estrógenos, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, antiandrógenos, inhibidores de aromatasa, inhibidores de EGFR, inhibidores de VEGF, oligonucleótidos antisentido que inhiben la expresión de genes implicados en la proliferación celular anormal o el crecimiento tumoral anómalos. Los agentes quimioterapéuticos útiles en los métodos de tratamiento de la presente invención incluyen agentes citostáticos y/o citotóxicos.

"Chothia", como se usa en el presente documento, significa un sistema de numeración de anticuerpos descrito en Al-Lazikani *et al.*, JMB 273:927-948 (1997).

"Combinación de la invención" y "terapia de combinación de la invención" se refiere a una combinación de un antagonista de PD-1 y un inhibidor de BRAF, convenientemente el compuesto B, y un inhibidor de MEK, convenientemente el Compuesto A.

"Variantes modificadas de manera conservativa" o "sustitución conservativa", se refiere a sustituciones de aminoácidos en una proteína por otros aminoácidos que tienen características similares (por ejemplo, carga, tamaño de cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofilia), conformación y rigidez de la cadena principal, etc.), de manera que los cambios se puedan realizar con frecuencia sin alterar la actividad biológica u otra propiedad deseada de la proteína, tales como afinidad y/o especificidad antigénica. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson *et al.* (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 (4ª Ed.)). Además, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos estructural o funcionalmente similares alteren la actividad biológica. En la Tabla 1 a continuación se exponen sustituciones conservativas ejemplares.

TABLA 1. Sustituciones conservativas de aminoácidos ejemplares

Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln

(continuación)

Resto original	Sustitución conservativa
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Las expresiones "consiste esencialmente en", o variaciones tales como "consta esencialmente de" o "se compone esencialmente de", tal como se usan a lo largo la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos enumerado y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos enumerados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificados. Como un ejemplo no limitante, un antagonista de PD-1 que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos enumerada también puede incluir uno o más aminoácidos, incluyendo sustituciones de uno o más restos de aminoácidos, que no afectan materialmente a las propiedades del compuesto de unión.

La expresión "anticuerpo monoclonal anti-PD-L de diagnóstico" significa un mAb que se une específicamente a la forma madura del PD-L designado (PD-L1 o PDL2) que se expresa en la superficie de ciertas células de mamífero. Un PD-L maduro carece de la secuencia líder presecretora, también denominada péptido líder. En el presente documento, las expresiones "PD-L" y "PD-L maduro" se utilizan indistintamente y se entenderá que significa que son la misma molécula a menos que se indique lo contrario o resulte muy obvio según el contexto.

Como se usa en el presente documento, un mAb anti-PD-L1 humano de diagnóstico se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PD-L1 humano maduro. Una molécula de PD-L1 humana madura consta de los aminoácidos 19-290 de la siguiente secuencia:

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME
 DKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG
 GADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
 TTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHL
 VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:25).

Los anticuerpos 20C3 y 22C3 son ejemplos específicos de mAb de diagnóstico anti-PD-L1 humano útiles como mAb de diagnóstico para la detección inmunohistoquímica (IHQ) de la expresión de PD-L1 en secciones de tejido tumoral fijadas con formol e incluidas en parafina (FFPE), que se describen en la solicitud de patente internacional en trámite PCT/US13/075932, presentada el 18 de diciembre de 2013. Otro mAb anti-PD-L1 humano que se ha informado que es útil para la detección IHQ de la expresión de PD-L1 en secciones de tejido FFPE (Chen, B.J. *et al.*, Clin Cancer Res 19: 3462-3473 (2013)) es un mAb de conejo anti-PD-L1 humano, disponible al público, de Sino Biological, Inc. (Beijing, P.R. China; Número de catálogo 10084-R015).

La expresión "región marco conservada" o "FR, del inglés *Framework Region*", como se usa en el presente documento, significa las regiones variables de inmunoglobulina excluyendo las regiones CDR.

"Homología" se refiere a la similitud de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas cuando están alineadas de manera óptima. Cuando en las dos secuencias comparadas una posición está ocupada por la misma subunidad monomérica de aminoácido, por ejemplo, si en una CDR de cadena ligera una posición de dos Ab diferentes está ocupada por alanina, entonces los dos Ab son homólogos en cuanto a esa posición. El porcentaje de homología es el número de posiciones homólogas compartidas por las dos secuencias dividido entre el número total de posiciones comparadas x100. Por ejemplo, si en dos secuencias, 8 de 10 posiciones coinciden o son homólogas cuando las secuencias están alineadas de manera óptima, entonces las dos secuencias son 80 % homólogas. Generalmente, la comparación se hace cuando dos secuencias se alinean para proporcionar el máximo porcentaje de homología. Por ejemplo, la comparación puede realizarse mediante un algoritmo BLAST en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias respectivas en toda la longitud de las secuencias de

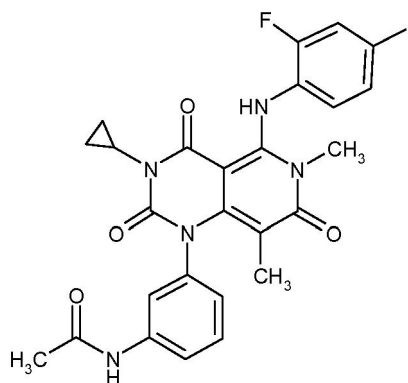
referencia respectivas.

Las siguientes referencias bibliográficas se refieren a algoritmos BLAST que se utilizan frecuentemente para análisis de secuencias: BLAST ALGORITHMS: Altschul, S.F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins" in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, supl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), págs. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships" in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, supl. 3. " M.O. Dayhoff (ed.), págs. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments" in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) págs. 1-14, Plenum, Nueva York.

las expresiones "anticuerpo aislado" y "fragmento de anticuerpo aislado" se refieren al estado de purificación y en tal contexto significa que la molécula nombrada carece sustancialmente de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales, tales como residuos celulares y medios de crecimiento. Generalmente, el término "aislado" no pretende referirse a una ausencia completa de dicho material o a una ausencia de agua, tampones o sales, a menos que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión como se describe en el presente documento.

"Kabat", como se usa en el presente documento, significa un sistema de alineación y numeración de inmunoglobulinas liderado por Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

Como se usa en el presente documento, el inhibidor de MEK N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o un solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, está representado por un compuesto de estructura (I):



(I)

o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable. Por conveniencia, el grupo de posibles compuestos y sales o solvatos se denomina en conjunto Compuesto A, lo que significa que la referencia al Compuesto A se referirá a cualquiera del compuesto o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la alternativa. Dependiendo de la convención para la nomenclatura, el compuesto de fórmula (I) también puede denominarse correctamente N-{3-[3-ciclopropil-5-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidropirido[4,3-d]pirimidin-1(2H)-il]fenil} acetamida. Un inhibidor de MEK particularmente preferido para su uso en cualquiera de los aspectos de la invención, es el dimetilsulfóxido de trametinib, que se conoce con el nombre comercial MEKINIST™. Los comprimidos de MEKINIST (trametinib) se suministran como comprimidos de 0,5 mg, 1 mg y 2 mg para administración oral. El núcleo de los comprimidos de MEKINIST contiene los principios inactivos de dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, hipromelosa, estearato de magnesio (fuente vegetal), manitol, celulosa microcristalina, sodio y lauril sulfato, y el recubrimiento de los comprimidos de MEKINIST contiene los principios inactivos de hipromelosa, óxido de hierro rojo (comprimidos de 2 mg), óxido de hierro amarillo (comprimidos de 0,5 mg), polietilenglicol, polisorbato 80 (comprimidos de 2 mg) y dióxido de titanio.

"Anticuerpo monoclonal" o "mAb" o "Mab", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de

anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpo que comprenden la población son idénticas en cuanto a la secuencia de aminoácidos excepto por posibles mutaciones naturales que puede haber en pequeñas cantidades. En cambio, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales incluyen normalmente una multitud de anticuerpos diferentes que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, particularmente en sus CDR, que a menudo son específicas para diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975) Nature 256: 495 o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de fagotecas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) Nature 352: 624-628 y en Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo. Véase también Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier sujeto individual para el que se desea la terapia o que está participando en un ensayo clínico, estudio epidemiológico o utilizado como control, incluidos pacientes humanos o mamíferos tratados por un veterinario, tales como ganado, caballos, perros y gatos.

"Antagonista de PD-1" significa cualquier compuesto químico o molécula biológica que bloquea la unión de PD-L1, expresado en una célula cancerosa, con PD-1, expresada en una célula inmunitaria (linfocito T, linfocito B o linfocito NKT) y preferentemente también bloquea la unión de PD-L2, expresado en una célula cancerosa, con PD-1, expresada en células inmunitarias. Los nombres alternativos o sinónimos de PD-1 y sus ligandos incluyen: PDCD1, PD1, CD279 y SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 y B7-H para PD-L1; y PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btcd y CD273 para PD-L2. En cualquier realización de los aspectos o realizaciones de la presente invención en la que se va a tratar a un individuo humano, el antagonista de PD-1 bloquea la unión de PD-L1 humano con PD-1 humana, y preferentemente bloquea la unión de PD-L1 y PD-L2 humano con PD-1 humana. Las secuencias de aminoácidos de PD-1 humana se pueden encontrar en el NCBI Locus N.º: NP_005009. Las secuencias de aminoácidos de PD-L1 y PD-L2 humanos se pueden encontrar en el NCBI Locus N.º: NP_054862 y NP_079515, respectivamente.

Los antagonistas de PD-1 de acuerdo con la presente divulgación, incluyen un anticuerpo monoclonal (mAb), o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 o a PD-L1, y preferentemente se une específicamente a PD-1 humana o PD-L1 humana. El mAb puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante de IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv.

En los documentos US7488802, US7521051, US8008449, US8354509, US8168757, WO2004/004771, WO2004/072286, WO2004/056875 y US2011/0271358, se describen ejemplos de mAb que se unen a PD-1 humana.

Los mAb anti-PD-1 humana específicos, útiles como antagonista de PD-1 en cualquiera de los aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen: MK-3475, un mAb de IgG4 humanizado con la estructura descrita en la Información sobre medicamentos de la OMS, Vol. 27, N.º 2, páginas 161-162 (2013) y que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera mostradas en la Figura 6; Otros ejemplos de acuerdo con la presente divulgación incluyen nivolumab, un mAb de IgG4 humano con la estructura descrita en la Información sobre medicamentos de la OMS, Vol. 27, N.º 1, páginas 68-69 (2013) y que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera mostradas en la Figura 7; los anticuerpos humanizados h409A11, h409A16 y h409A17, que se describen en el documento WO2008/156712 y AMP-514, que está desarrollando Medimmune.

Otros antagonistas de PD-1 de acuerdo con la presente divulgación incluyen una inmunoadhesina que se une específicamente a PD-1, y preferentemente se une específicamente a PD-1 humana, por ejemplo, una proteína de fusión que contiene la parte extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante tal como una región Fc de una molécula de inmunoglobulina. En los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342 se describen ejemplos de moléculas de inmunoadhesión que se unen específicamente a PD-1. Las proteínas de fusión específicas incluyen AMP-224 (también conocida como B7-DCIg), que es una proteína de fusión PD-L2-FC y se une a PD-1 humana.

De acuerdo con la presente invención, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal, que se une a PD-1 humana y comprende: una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

La Tabla 2 a continuación proporciona una lista de las secuencias de aminoácidos de mAb anti-PD-1 ejemplares y las secuencias se muestran en las Figuras 1-5.

Tabla 2. Anticuerpos anti-PD-1 humanos ejemplares	
A. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hPD-1.08A en el documento WO2008/156712	
CDRL1	SEQ ID NO:1
CDRL2	SEQ ID NO:2
CDRL3	SEQ ID NO:3
CDRH1	SEQ ID NO:4
CDRH2	SEQ ID NO:5
CDRH3	SEQ ID NO:6
B. Comprende las CDR de cadena ligera y pesada de hPD-1.09A en el documento WO2008/156712	
CDRL1	SEQ ID NO:7
CDRL2	SEQ ID NO:8
CDRL3	SEQ ID NO:9
CDRH1	SEQ ID NO:10
CDRH2	SEQ ID NO:11
CDRH3	SEQ ID NO:12
C. Comprende la región variable de la cadena pesada de h109A madura y una de las regiones variables de la cadena ligera de K09A madura en el documento WO2008/156712	
RV de cadena pesada	SEQ ID NO:13
RV de cadena ligera	SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17
D. Comprende la cadena pesada de 409 madura y una de las cadenas ligeras de K09A maduras en WO2008/156712	
Cadena pesada	SEQ ID NO:14
Cadena ligera	SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20

La expresión "PD-L1" o "PD-L2", como se usa en el presente documento, significa cualquier nivel de expresión detectable de la proteína PD-L designada en la superficie celular, o del ARNm de PD-L designado dentro de una célula o tejido. La expresión de la proteína PD-L puede detectarse con un anticuerpo contra PD-L de diagnóstico en un ensayo de IHQ de una sección de tejido tumoral o mediante citometría de flujo. Como alternativa, la expresión de la proteína PD-L por las células tumorales puede detectarse mediante imágenes de PET (siglas del inglés *Positron Emission Tomography* (tomografía de emisión positrónica), utilizando un agente de unión (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un affibody y similares) que se une específicamente a la diana de PD-L deseada, por ejemplo, PD-L1 o PD-L2. Las técnicas para detectar y medir la expresión de ARNm de PD-L incluyen RT-PCR y RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Se han descrito varias estrategias para cuantificar la expresión de la proteína PD-L1 en ensayos de IHQ de secciones de tejido tumoral. Véase, por ejemplo, Thompson, R. H., *et al.*, PNAS 101 (49): 17174-17179 (2004); Thompson, R. H. *et al.*, Cancer Res. 66:3381-3385 (2006); Gadiot, J., *et al.*, Cancer 117:2192-2201 (2011); Taube, J. M. *et al.*, Sci Transl Med 4, 127ra37 (2012); y Toplian, S. L. *et al.*, New Eng. J Med. 366 (26): 2443-2454 (2012).

Un enfoque emplea un criterio de valoración binario simple de positivo o negativo para la expresión de PD-L1, definiéndose un resultado positivo en términos del porcentaje de células tumorales que presenten pruebas histológicas de tinción de la membrana de la superficie celular. Una sección de tejido tumoral se cuenta como positiva para la expresión de PD-L1 en al menos el 1 %, y preferentemente el 5 % del total de células tumorales.

En otro enfoque, la expresión de PD-L1 en la sección de tejido tumoral se cuantifica tanto en las células tumorales como en las células inmunitarias infiltrantes, que comprenden predominantemente linfocitos. El porcentaje de células tumorales y de células inmunitarias infiltrantes que presentan tinción de membrana se cuantifica por separado como <5 %, de 5 a 9 %, y después en incrementos de 10 % hasta 100 %. Para las células tumorales, la expresión de PD-L1 se cuenta como negativa si la puntuación es <5 % y positiva si la puntuación es ≥ 5 %. La expresión de PD-L1 en el infiltrado inmunitario se informa como una medida semicuantitativa denominada puntuación de inflamación ajustada (AIS, por las siglas del inglés *Adjusted Inflammation Score*), que se determina multiplicando el porcentaje de células con tinción en la membrana por la intensidad del infiltrado, que se clasifica como ninguno (0), leve (puntuación de 1, linfocitos escasos), moderada (puntuación de 2, infiltración focal del tumor por agregados linfohistiocíticos) o grave (puntuación de 3, infiltración difusa). Una sección de tejido tumoral se cuenta como positiva para la expresión de PD-L1 por infiltrados inmunitarios si la AIS es ≥ 5.

El nivel de expresión de ARNm de PD-L puede compararse con los niveles de expresión de ARNm de uno o más genes de referencia que se utilizan con frecuencia en la RT-PCR cuantitativa, tales como ubiquitina C.

En algunas realizaciones, se determina que un nivel de expresión de PD-L1 (proteína y/o ARNm) por células malignas y/o células inmunitarias infiltrantes dentro de un tumor está "sobreexpresado" o "elevado" teniendo en cuenta la comparación con el nivel de expresión de PD-L1 (proteína y/o ARNm) mediante un control apropiado. Por ejemplo, un nivel de expresión de ARNm o proteína PD-L1 de control puede ser el nivel cuantificado en células no malignas del mismo tipo o en una sección de un tejido normal correspondiente. En algunas realizaciones preferidas, se determina que la expresión de PD-L1 en una muestra de tumor es elevada si la proteína PD-L1 (y/o el ARNm de PD-L1) en la muestra es al menos un 10 %, 20 % o 30 % más que en el control.

"Criterios de respuesta RECIST 1.1", como se usa en el presente documento, significa las definiciones expuestas en Eisenhauer *et al.*, E.A. *et al.*, Eur. J Cancer 45: 228-247 (2009) para lesiones diana o lesiones no diana, según sea apropiado, teniendo en cuenta el contexto en el que se mida la respuesta.

"Respuesta sostenida" significa un efecto terapéutico sostenido después del cese del tratamiento con un agente terapéutico, o una terapia de combinación descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la respuesta sostenida tiene una duración que es al menos la igual que la duración del tratamiento, o al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3 veces mayor que la duración del tratamiento.

"Sección de tejido" se refiere a una sola parte o fragmento de una muestra de tejido, por ejemplo, un trozo fino de tejido cortado de una muestra de un tejido normal o de un tumor.

"Tratar" un cáncer, como se usa en el presente documento, significa administrar una combinación de la invención a un sujeto que tiene un cáncer, o al que se le diagnosticado un cáncer, para obtener al menos un efecto terapéutico positivo, tal como, por ejemplo, reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, reducir la tasa de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos o la tasa de metástasis tumoral o el crecimiento tumoral. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer pueden medirse de diversas formas (Véase, W. A. Weber, J. Nucl. Med. 50:1S-10S (2009)). Por ejemplo, con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, de acuerdo con los estándares del NCI, un T/C ≤ 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C < 10 % se considera un alto nivel de actividad antitumoral, siendo T/C (%) = volumen tumoral medio del tratado/volumen tumoral medio del control x 100. En algunas realizaciones, el tratamiento obtenido mediante una combinación de la invención es cualquiera de RP, RC, RG, SSP, SSE y SG. SSP, también conocido como "tiempo que transcurre hasta la progresión del tumor", indica el periodo de tiempo durante y después del tratamiento en el que el cáncer no crece, e incluye la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado una RC o una RP, así como la cantidad de tiempo en la que los pacientes han experimentado EE. La SSE se refiere al periodo de tiempo durante y después del tratamiento en el que el paciente permanece sin enfermedad. La SG se refiere a una prolongación de la esperanza de vida en comparación con individuos o pacientes sin tratamiento previo o no tratados. En algunas realizaciones preferidas, la respuesta a una combinación de la invención es cualquiera de RP, RC, SSP, SSE, RG o SG que se evalúa utilizando los criterios de respuesta RECIST 1.1. El régimen de tratamiento para que una combinación de la invención sea eficaz para tratar a un paciente con cáncer puede variar según factores tales como la patología, la edad y el peso del paciente, y la capacidad de la terapia para suscitar una respuesta contra el cáncer en el sujeto. Aunque es posible que una realización de cualquiera de los aspectos de la invención no sea eficaz para obtener un efecto terapéutico positivo en todos los sujetos, debe hacerlo en un número estadísticamente significativo de sujetos según lo determinado por cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba de la t de Student, la prueba de χ^2 , la prueba de la U según Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba de la H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

Las expresiones "régimen de tratamiento", "protocolo de dosificación" y régimen de dosificación, se utilizan indistintamente para referirse a la dosis y al momento de la administración de cada agente terapéutico en una combinación de la invención.

"Tumor" o "neoplasia", aplicado a un sujeto diagnosticado de un cáncer o que se sospecha que tiene un cáncer, se refiere a una neoplasia o masa tisular maligna o potencialmente maligna de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasias secundarias. Un tumor sólido es un crecimiento anómalo o una masa de tejido anómala que habitualmente no contiene quistes o zonas líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman. Son ejemplos de tumores sólidos los sarcomas, carcinomas y linfomas. Generalmente, las leucemias (cánceres de la sangre) no forman tumores sólidos (National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms).

"Carga tumoral", también denominada "peso tumoral", se refiere a la cantidad total de material tumoral distribuida por todo el cuerpo. La carga tumoral se refiere al número total de células cancerosas o al tamaño total del tumor o de los tumores, por todo el cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos y la médula ósea. La carga tumoral puede determinarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones del tumor o de los tumores después extirparlos del sujeto, por ejemplo, usando calibradores, o dentro del cuerpo usando técnicas de obtención de imágenes, por ejemplo, ultrasonido, gammagrafía ósea, tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM).

La expresión "tamaño del tumor" se refiere al tamaño total del tumor que puede medirse como la longitud y anchura de un tumor. El tamaño del tumor puede determinarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones del tumor o de los tumores después extirparlos del sujeto, por ejemplo, usando calibradores, o dentro del cuerpo usando técnicas de obtención de imágenes, por ejemplo, gammagrafía ósea, ultrasonido, TC o RM.

"Regiones variables" o "región V", como se usa en el presente documento, significa el segmento de cadenas de IgG cuya secuencia es variable entre diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el resto 109 de Kabat en la cadena ligera y hasta el 113 en la cadena pesada.

III. COMBINACIONES, COMPOSICIONES, USOS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de combinaciones de la invención es ventajosa frente a los compuestos individuales que las componen en tanto que las combinaciones proporcionan una o más de las siguientes propiedades mejoradas cuando se compara con la administración individual de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que la compone: i) un mayor efecto anticanceroso que el agente individual más activo, ii) actividad anticancerosa sinérgica o altamente sinérgica, iii) un protocolo de dosificación que proporciona una actividad anticancerosa potenciada con un perfil de efectos secundarios reducido, iv) una reducción en el perfil de efectos tóxicos, v) un aumento en la ventana terapéutica o vi) un aumento en la biodisponibilidad de uno o ambos compuestos que la componen.

Los Compuestos A y/o B pueden contener uno o más átomos quirales, o pueden ser de otro modo capaces de existir como enantiómeros. Por consiguiente, los compuestos de esta invención incluyen mezclas de enantiómeros así como enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente enriquecidas. También, se entiende que todos los tautómeros y mezclas de tautómeros están incluidas dentro del alcance del Compuesto A y el Compuesto B.

También, se entiende que los compuestos A y B pueden presentarse, por separado o conjuntamente, como solvatos. Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto (en esta invención, compuestos de fórmula (I) o (II) o una sal de los mismos y un disolvente. Dichos disolventes, para los fines de la invención no pueden interferir con la actividad biológica del soluto. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, metanol, dimetilsulfóxido, etanol y ácido acético. En una realización, el disolvente usado es un disolvente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el disolvente usado es agua.

Los Compuestos A y B pueden tener la capacidad de cristalizar en más de una forma, una característica, que se conoce como polimorfismo, y se entiende que tales formas polimórficas ("polimorfos") están dentro del alcance de los Compuestos A y B. El polimorfismo generalmente ocurre como una respuesta a cambios en la temperatura o presión, o ambas, y también puede ser el resultado de variaciones en el proceso de cristalización. Los polimorfos pueden distinguirse por diversas características físicas conocidas en la técnica, tales como patrones de difracción de rayos X, solubilidad y punto de fusión.

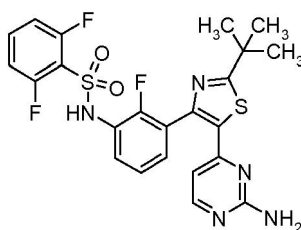
Se divulga y reivindica que el Compuesto A, junto con sales farmacéuticamente aceptables y solvatos del mismo, es útil como un inhibidor de la actividad de MEK, particularmente en el tratamiento del cáncer, en la Solicitud Internacional N.º PCT/JP2005/011082, que tiene una fecha de presentación internacional del 10 de junio de 2005; la Publicación Internacional Número WO 2005/121142 y una Publicación Internacional con fecha del 22 de diciembre de 2005, el Compuesto A es el compuesto del Ejemplo 4-1. El Compuesto A se puede preparar como se describe en la Solicitud Internacional N.º PCT/JP2005/011082. El Compuesto A se puede preparar como se describe en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º US 2006/0014768, publicada el 19 de enero de 2006.

Convenientemente, el Compuesto A está en forma de un solvato de dimetilsulfóxido. Convenientemente, el Compuesto A está en forma de una sal de sodio. Convenientemente, el Compuesto A está en forma de un solvato seleccionado de: hidrato, ácido acético, etanol, nitrometano, clorobenceno, 1-pentano, alcohol isopropílico, etilenglicol y 3-metil-1-butanol. Estos solvatos y formas de sal pueden ser preparados por un experto en la materia a partir de la descripción en la Solicitud Internacional N.º PCT/JP2005/011082 o la Publicación de Patente de EE. UU. N.º US 2006/0014768.

Se divulga y reivindica que el Compuesto B, junto con las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, es útil como un inhibidor de la actividad de BRaf, particularmente en el tratamiento de cáncer, en la solicitud de patente PCT, PCT/US09/42682. El Compuesto B se implementa mediante los Ejemplos 58a a 58e de la solicitud. La solicitud PCT se publicó el 12 de noviembre de 2009 como publicación WO2009/137391.

De manera más particular, el Compuesto B se puede preparar de acuerdo con los métodos a continuación:

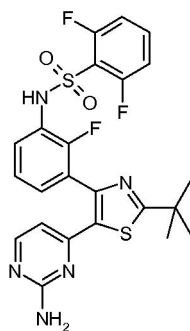
Método 1: Compuesto B (primera forma cristalina) - *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida



Una suspensión de *N*-{3-[5-(2-cloro-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (196 mg, 0,364 mmol) y amoníaco en metanol 7 M (8 ml, 56,0 mmol) se calentó en un tubo cerrado herméticamente a 90 °C durante 24 h. La reacción se diluyó con DCM y se añadió gel de sílice y se concentró. El producto en bruto se cromatografió sobre gel de sílice eluyendo con 100 % DCM hasta 1:1 [DCM:(EtOAc:MeOH 9:1)]. Las fracciones limpias se concentraron para producir el producto en bruto. El producto en bruto se volvió a purificar por HPLC de fase inversa (un gradiente de acetonitrilo:agua con 0.1 % de TFA en ambos). Las fracciones limpias combinadas se concentraron y después se dividieron entre DCM y NaHCO₃ saturado. La capa de DCM se separó y se secó sobre Na₂SO₄. Se obtuvo el compuesto del título, *N*-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (94 mg, rendimiento del 47 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10,83 (s, 1 H), 7,93 (d, J = 5,2 Hz, 1 H), 7,55 - 7,70 (m, 1 H), 7,35 - 7,43 (m, 1 H), 7,31 (t, J = 6,3 Hz, 1 H), 7,14 - 7,27 (m, 3 H), 6,70 (s, 2 H), 5,79 (d, J = 5,13 Hz, 1 H), 1,35 (s, 9 H). EM (IEN): 519,9 [M+H]⁺.

Método 2: El Compuesto B (forma cristalina alternativa) - *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida 19,6 mg de *N*-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (se puede preparar de acuerdo con el ejemplo 58a) se combinó con 500 l de acetato de etilo en un vial de 2 ml a temperatura ambiente. La suspensión se sometió a un ciclo de temperatura entre 0-40 °C durante 48 h. La suspensión resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y los sólidos se recogieron por filtración al vacío. Los sólidos se analizaron por análisis Raman, PXRD, DSC/TGA, que indicaron una forma cristalina diferente de la forma cristalina resultante del Ejemplo 58a, anterior.

Método 3: Compuesto B (forma cristalina alternativa, lote grande) - *N*-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida



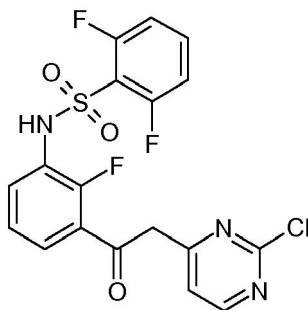
EtapA: 3-[[[(2,6-Difluorofenil)sulfonyl]amino]-2-fluorobenzoato de metilo



Se cargó 3-amino-2-fluorobenzoato de metilo (50 g, 1 equiv.) al reactor seguido de diclorometano (250 ml, 5 vol). Los contenidos se agitaron y se enfrió a ~15 °C y se añadió piridina (26,2 ml, 1,1 equiv.). Después de la adición de la piridina, los contenidos del reactor se ajustaron a ~15 °C y se inició la adición de cloruro de 2,6-difluorobencenosulfonyl (39,7 ml, 1,0 equiv.) mediante un embudo de adición. La temperatura durante la adición se mantuvo a <25 °C. Después de que se completara la adición, los contenidos del reactor se calentaron a 20-25 °C y se mantuvieron durante una noche. Se añadió acetato de etilo (150 ml) y el diclorometano se retiró por destilación. Una vez completada la destilación, la mezcla de reacción se diluyó entonces una vez más con acetato de etilo (5 vol)

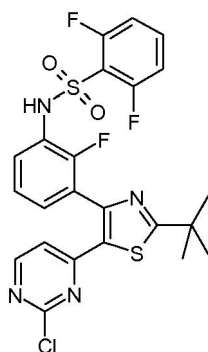
y se concentró. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (10 vol) y agua (4 vol) y los contenidos se calentaron a 50-55 °C con agitación hasta que se disolvieron todos los sólidos. Las capas sedimentaron y se separaron. La capa orgánica se diluyó con agua (4 vol) y los contenidos se calentaron a 50-55° durante 20-30 min. Las capas sedimentaron y después se separaron y la capa de acetato de etilo se evaporó a presión reducida hasta ~3 volúmenes. Se añadió acetato de etilo (5 vol.) y, de nuevo, se evaporó a presión reducida hasta ~3 volúmenes. Se añadió después ciclohexano (9 vol) al reactor y los contenidos se calentaron a reflujo durante 30 min y después se enfriaron a 0 °C. Los sólidos se filtraron y se enjuagaron con ciclohexano (2 x 100 ml). Los sólidos se secaron al aire durante una noche para obtener 3-[[[(2,6-difluorofenil)sulfonyl]amino]-2-fluorobenzoato de metilo (94,1 g, 91 %).

10 Etapa B: *N*-{3-[(2-cloro-4-pirimidinil)acetil]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida



15 3-[[[(2,6-Difluorofenil)sulfonyl]amino]-2-fluorobenzoato de metilo (490 g, 1 equiv.), preparado de manera general de acuerdo con la Etapa A, anterior, se disolvió en THF (2,45 l, 5 volúmenes) y se agitó y se enfrió a 0-3 °C. Se cargó una solución 1 M de bis(trimetilsilil)amiduro de litio en THF (5,25 l, 3,7 equiv.) a la mezcla de reacción seguido de la adición de 2-cloro-4-metilpirimidina (238 g, 1,3 equiv.) en THF (2,45 l, 5 volúmenes). Después, la reacción se agitó durante 1 h. La reacción se interrumpió con HCl 4,5 M (3,92 l, 8 volúmenes). La capa acuosa (capa inferior) se retiró y descartó. La capa orgánica se concentró a presión reducida hasta ~2 l. Se añadió IPAC (acetato de isopropilo) (2,45 l) a la mezcla de reacción que después se concentró a ~2 l. Se añadieron IPAC (0,5 l) y MTBE (2,45 l) y se agitaron durante una noche en atmósfera de N₂. Los sólidos se filtraron. Los sólidos y el filtrado madre se volvieron a añadir todos juntos y se agitaron durante varias horas. Los sólidos se filtraron y se lavaron con MTBE (~5 vol). Los sólidos se pusieron en un horno de vacío a 50 °C durante una noche. Los sólidos se secaron en un horno de vacío a 30 °C durante el fin de semana para obtener *N*-{3-[(2-cloro-4-pirimidinil)acetil]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (479 g, 72 %).

Etapa C: *N*-{3-[5-(2-cloro-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida



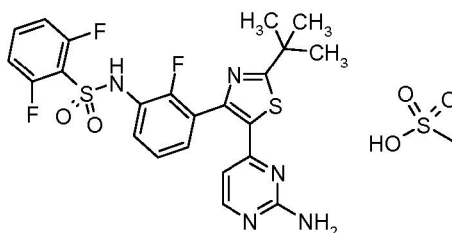
30 A un recipiente del reactor se le cargó *N*-{3-[(2-cloro-4-pirimidinil)acetil]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (30 g, 1 equiv.) seguido de diclorometano (300 ml). La suspensión de reacción se enfrió a ~10 °C y se añadió *N*-bromo-succinimida ("NBS") (12,09 g, 1 equiv.) en 3 porciones aproximadamente iguales, agitando durante 10-15 minutos entre cada adición. Después de la adición final de NBS, la mezcla de reacción se calentó a ~20 °C y se agitó durante 45 min. Después se añadió agua (5 vol) al recipiente de reacción y la mezcla se agitó y después se separaron las capas. Se añadió agua (5 vol) de nuevo a la capa de diclorometano y la mezcla se agitó y se separaron las capas. Las capas de diclorometano se concentraron a ~120 ml. Se añadió acetato de etilo (7 vol) a la mezcla de reacción y se concentró a ~120 ml. Después se añadió dimetilacetamida (270 ml) a la mezcla de reacción y se enfrió a ~10 °C. Se añadió 2,2-dimetilpropanotioamida (1,3 g, 0,5 equiv.) en 2 porciones iguales a los contenidos del reactor con agitación durante ~5 minutos entre las adiciones. La reacción se calentó a 20-25 °C. Después de 45 min, los contenidos del recipiente se calentaron a 75 °C y se mantuvieron durante 1,75 horas. La mezcla de reacción se enfrió después a 5 °C y se cargó agua (270 ml) lentamente manteniendo la temperatura por debajo de 30 °C. Después se cargó acetato de etilo (4 vol) y la mezcla se agitó y se separaron las capas. Se cargó de nuevo acetato de etilo (7 vol) a la capa acuosa y los contenidos se agitaron y separaron. Se cargó de nuevo

acetato de etilo (7 vol) a la capa acuosa y los contenidos se agitaron y separaron. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (4 vol) 4 veces y se agitaron durante una noche a 20-25 °C. Las capas orgánicas después se concentraron con calor y al vacío hasta 120 ml. Los contenidos del recipiente se calentaron después a 50 °C y se añadieron lentamente heptanos (120 ml). Después de la adición de los heptanos, los contenidos del

Etapa D: N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida

En un reactor a presión de 3,79 l (1 gal), una mezcla de N-{3-[5-(2-cloro-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (120 g) preparada de acuerdo con la Etapa C, anterior, e hidróxido de amonio (28-30 %, 2,4 l, 20 vol) se calentó en el reactor a presión cerrado herméticamente a 98-103 °C y se agitó a esta temperatura durante 2 horas. La reacción se enfrió lentamente a temperatura ambiente (20 °C) y se agitó durante una noche. Los sólidos se filtraron y se lavaron con la cantidad mínima de aguas madre y se secaron al vacío. Los sólidos se añadieron a una mezcla de EtOAc (15 vol)/agua (2 vol) y se calentaron hasta su disolución completa a 60-70 °C y la capa acuosa se retiró y descartó. La capa de EtOAc se cargó con agua (1 vol) y se neutralizó con HCl ac. a ~pH 5,4-5,5 y se añadió agua (1 vol). La capa acuosa se retiró y descartó a 60-70 °C. La capa orgánica se lavó con agua (1 vol) a 60-70 °C y la capa acuosa se retiró y descartó. La capa orgánica se filtró a 60 °C y se concentró a 3 volúmenes. Se cargó EtOAc (6 vol) a la mezcla y se calentó y se agitó a 72 °C durante 10 min, después se enfrió a 20 °C y se agitó durante una noche. El EtOAc se retiró por destilación al vacío para concentrar la mezcla de reacción a ~3 volúmenes. La mezcla de reacción se mantuvo a ~65-70 °C durante ~30 mins. Los cristales de producto que tienen la misma forma cristalina que aquellos preparados en el Ejemplo 58b (y preparables por el procedimiento del Ejemplo 58b), anterior, se cargaron en una solución de heptanos. Se añadió heptano (9 vol) lentamente a 65-70 °C. La suspensión se agitó a 65-70 °C durante 2-3 horas y después se enfrió lentamente a 0-5 °C. El producto se filtró, se lavó con EtOAc/heptano (3/1 v/v, 4 vol) y se secó a 45 °C al vacío para obtener N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (102,3 g, 88 %).

Método 4: Compuesto B (sal mesilato) - N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida metanosulfonato



A una solución de N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (204 mg, 0,393 mmol) en isopropanol (2 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (0,131 ml, 0,393 mmol) y la solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se formó un precipitado blanco y la suspensión se filtró y se enjuagó con éter dietílico para dar el producto del título en forma de un sólido cristalino de color blanco (210 mg, rendimiento del 83 %). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10,85 (s, 1 H) 7,92 - 8,05 (m, 1 H) 7,56 - 7,72 (m, 1 H) 6,91 - 7,50 (m, 7 H) 5,83 - 5,98 (m, 1 H) 2,18 - 2,32 (m, 3 H) 1,36 (s, 9 H). EM (IEN): 520,0 [M+H]⁺.

Método 5: Compuesto B (realización alternativa de sal mesilato) - N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida metanosulfonato

N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida (que se puede preparar de acuerdo con el ejemplo 58a) (2,37 g, 4,56 mmol) se combinó con acetonitrilo filtrado previamente (5,25 vol, 12,4 ml). Se añadió una solución filtrada previamente de ácido mésico (1,1 equiv., 5,02 mmol, 0,48 g) en H₂O (0,75 equiv., 1,78 ml) a 20 °C. La temperatura de la mezcla resultante se elevó a 50-60 °C mientras se mantenía una velocidad de agitación baja. Una vez que la temperatura de la mezcla alcanzó los 50-60 °C, se añadió una suspensión de siembra de N-{3-[5-(2-amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobencenosulfonamida metanosulfonato (1,0 %p/p suspendido en 0,2 vol de acetonitrilo filtrado previamente), y la mezcla se envejeció mientras se agitaba a una velocidad suficientemente rápida como para evitar que los sólidos sedimenten a 50-60 °C durante 2 h. Después, la mezcla se enfrió a 0-5 °C a 0,25 °C/min y se mantuvo a 0-5 °C durante 6 h. La mezcla se filtró y la torta húmeda se lavó dos veces con acetonitrilo filtrado previamente. El primer lavado consistió en 14,2 ml (6 vol) de acetonitrilo filtrado previamente y el segundo lavado consistió en 9,5 ml (4 vol) de acetonitrilo filtrado previamente. El sólido húmedo se secó a 50 °C al vacío, produciendo 2,39 g (rendimiento del

85,1 %) de producto.

Normalmente, las sales de la presente invención son sales farmacéuticamente aceptables. Las sales abarcadas en la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de esta invención. Las sales de los compuestos de la presente invención pueden comprender sales de adición de ácidos derivadas de un nitrógeno o un sustituyente en un compuesto de la presente invención. Las sales representativas incluyen las siguientes sales: acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, bromuro de metilo, nitrato de metilo, sulfato de metilo, maleato monopotásico, mucato, napsilato, nitrato, N-metilglucamina, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, potasio, salicilato, sodio, estearato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teocato, tosilato, trietyoduro, trimetilamonio y valerato. Otras sales, que no son farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de compuestos de esta invención y estas forman un aspecto adicional de la invención. Las sales las puede preparar fácilmente un experto en la materia.

Aunque es posible que, para su uso en terapia, los compuestos A y B pueden administrarse como el producto químico en bruto, es posible presentar el principio activo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas, que incluyen un Compuesto A y/o un Compuesto B, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los Compuestos A y B son como se han descrito anteriormente. Los vehículos, diluyente(s) o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación, susceptibles de formulación farmacéutica, y no perjudiciales para el destinatario de los mismos. De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona también un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que incluye mezclar un Compuesto A y/o un Compuesto B, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales elementos de las composiciones farmacéuticas utilizadas pueden presentarse en combinaciones farmacéuticas diferentes o formularse juntos en una sola composición farmacéutica. Por consiguiente, la invención también proporciona una combinación de composiciones farmacéuticas una de las cuales incluye el Compuesto A y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, y una composición farmacéutica que contiene el Compuesto B y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Puede usarse una composición farmacéutica que comprenda el Compuesto A y/o el Compuesto B en combinación con una composición farmacéutica que comprenda el antagonista de PD-1. De manera similar, en una combinación de la invención, cada uno de los agentes puede formularse como composiciones farmacéuticas distintas para su uso en combinación entre sí.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en formas farmacéuticas unitarias que contengan una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Como saben los expertos en la materia, la cantidad de principio activo por dosis dependerá de la afección que se esté tratando, de la vía de administración y de la edad, el peso y estado del paciente. Son composiciones de dosificaciones unitarias preferidas las que contienen una dosis o subdosis diaria, o una fracción adecuada de la misma, de un principio activo. Por otro lado, dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Los compuestos A y B pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada. Las vías adecuadas incluyen la oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con el estado del receptor de la combinación y el cáncer a tratar. También se apreciará que cada uno de los agentes administrados, puede administrarse a través de la misma vía o a través de vías diferentes y que los Compuestos A y B pueden combinarse entre sí o en composiciones farmacéuticas distintas.

En una combinación de la invención, cualquier agente bioterapéutico, tal como un anticuerpo anti-PD-1, puede administrarse por vía parenteral, incluso por perfusión intravenosa (IV) e inyección subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el constituyente farmacológico activo puede combinarse con un transportador inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan desmenuzando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un transportador farmacéutico triturado de forma similar, tal como un hidrato de carbono comestible, tal como, por ejemplo, almidón o manitol. También puede haber agentes saborizantes, conservantes, dispersantes y colorantes.

Las cápsulas se elaboran preparando una mezcla en polvo, como se describió anteriormente, y rellenando envolturas de gelatina formadas. Antes de la operación de relleno, a la mezcla en polvo pueden añadirse emolientes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido. Se puede añadir también un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

Por otra parte, cuando se desee o sea necesario, también pueden añadirse aglutinantes, lubricantes, disgregantes y colorantes adecuados para la granulación, la mezcla en polvo puede procesarse a través de la compresora y el resultado son lingotes imperfectamente formados separados en gránulos. Los gránulos pueden lubricarse e incorporarse a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas farmacéutica incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o aglomerando, añadiendo un lubricante y disgregante y ejerciendo presión en los comprimidos. Una mezcla en polvo se prepara mezclando el compuesto, desmenuzado convenientemente, con un diluyente o una base, como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante, tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, una solución retardante tal como parafina, un acelerador de la resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo puede granularse humedeciéndola con un aglutinante, tal como un jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y haciendo que pase a través de un tamiz. Como alternativa, para impedir la adherencia a los troqueles formadores de los comprimidos, se añade ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. A continuación, la mezcla lubricada se comprime formando comprimidos. Los compuestos de la presente invención también pueden combinarse con un transportador inerte fluido y comprimirse en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o aglomeración. Se puede proporcionar un revestimiento protector transparente u opaco que consiste en un revestimiento sellador de goma laca, un revestimiento de azúcar o material polimérico, y un revestimiento de cera pulida. Se pueden añadir colorantes a estos revestimientos para distinguir las diferentes dosificaciones unitarias.

Se pueden preparar fluidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires en una forma farmacéutica unitaria de tal manera que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Se pueden preparar jarabes disolviendo el compuesto en una solución acuosa convenientemente saborizada, mientras que los elixires se preparan utilizando un vehículo alcohólico no tóxico. Se pueden formular suspensiones dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También pueden añadirse solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de sorbitol polioxietilenado, conservantes, aditivos saborizantes tales como aceite de menta o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Cuando sea adecuado, las composiciones para administración oral pueden microencapsularse. La composición también puede prepararse para prolongar o mantener la liberación, tal como, por ejemplo, recubriendo o incluyendo el material en partículas en polímeros, cera o similares.

Los agentes para su uso de acuerdo con la presente invención, también pueden administrarse en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los agentes para su uso de acuerdo con la presente invención también pueden suministrarse utilizando anticuerpos monoclonales como transportadores individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos también pueden acoplarse con polímeros solubles como transportadores farmacológicos direccionables. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamidafenol o polietilenoxydopolilisina sustituidos con restos de palmitoilo. Por otro lado, los compuestos pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr una liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches individuales destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el principio activo puede suministrarse desde el parche mediante iontoforesis como se describe en líneas generales en Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986).

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.

Para los tratamientos oculares o de otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el principio activo

puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el principio activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o como una base de agua en aceite.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas oculares incluyen colirios, en donde el principio activo se disuelve o suspende en un transportador adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, grageas y enjuagues bucales.

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden presentarse como supositorios o como enemas.

15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en donde el transportador es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros, que se administra aspirándolo por la nariz, es decir, por inhalación rápida a través de las fosas nasales, a partir de un envase que contiene el polvo y que se sujeta cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en donde el transportador es un líquido, para su administración como pulverizador nasal o gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleaginosas del principio activo.

20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen polvos finos o vahos de partículas finas que pueden generarse por medio de varios tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados de dosis medida.

25 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o composiciones pulverizadoras.

30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles, para inyección, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en envases monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados y pueden conservarse en un estado criodesecado (liofilizado) que solo requiere la adición del transportador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. A partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles, pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea.

35 Cuando el antagonista de PD-1 es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a PD-1 o a PD-L1, el antagonista puede producirse en células CHO utilizando un cultivo celular convencional y después aislarse utilizando tecnologías convencionales de recuperación/purificación. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1 como antagonista de PD-1, puede proporcionarse como una formulación líquida o prepararse reconstituyendo un polvo liofilizado con agua estéril para inyección antes de su uso. En el documento WO 2012/135408 se describe la preparación de medicamentos líquidos y liofilizados que comprenden MK-3475 que son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, se proporciona un medicamento que comprende MK-3475 en un vial de vidrio que contiene aproximadamente 50 mg de MK-3475.

40 Debe entenderse que además de los principios particularmente mencionados anteriormente, las composiciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

45 Los compuestos A y B pueden emplearse en combinación de acuerdo con la invención mediante la administración simultánea en una composición farmacéutica unitaria que incluya ambos compuestos. Como alternativa, la combinación puede administrarse por separado en composiciones farmacéuticas distintas, incluyendo cada una de ellas uno de los compuestos A y B de una manera secuencial en donde, por ejemplo, primero se administre el compuesto A o el compuesto B y después el otro. Dicha administración secuencial puede estar próxima en el tiempo (por ejemplo, simultáneamente) o remota en el tiempo. Por otro lado, carece de importancia si los compuestos se administran en la misma forma farmacéutica, por ejemplo, un compuesto puede administrarse por vía tópica y el otro compuesto puede administrarse por vía oral. Convenientemente, ambos compuestos se administran por vía oral.

50 Por tanto, en una realización, una o más dosis de Compuesto A se administran simultáneamente o por separado con una o más dosis de Compuesto B y una o más dosis de un antagonista de PD-1.

En una realización, se administran múltiples dosis de Compuesto A simultáneamente o por separado con múltiples dosis de Compuesto B y múltiples dosis de MK-3475 o de un fragmento de unión a antígeno del mismo.

65 En una realización, se administran múltiples dosis de Compuesto A simultáneamente o por separado con una dosis de Compuesto B y una dosis de nivolumab o de un fragmento de unión a antígeno del mismo o de MK-3475 o de un

fragmento de unión a antígeno del mismo.

En todas las realizaciones anteriores, el compuesto A, el compuesto B o el antagonista de PD-1 puede administrarse en primer lugar.

Las combinaciones pueden presentarse como un kit de combinación. La expresión "kit de combinación" o "kit de partes", como se usa en el presente documento, quiere decir composición o composiciones farmacéuticas que se utilizan para administrar el Compuesto B y el Compuesto A, y el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con un protocolo de dosificación de la invención. Cuando los compuestos A, B y un anticuerpo anti-PD-1, se administran simultáneamente, el kit de combinación puede contener el Compuesto A y el Compuesto B en una sola composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas distintas, tal como un comprimido, y MK-3475 en un vial. Cuando los compuestos A y B no se administran simultáneamente, el kit de combinación puede contener el Compuesto B y/o el Compuesto A en composiciones farmacéuticas distintas y otra composición farmacéutica que comprenda MK-3475 donde el Compuesto B y/o el Compuesto A están en un solo envase o el Compuesto B y/o el Compuesto A están en composiciones farmacéuticas distintas en envases distintos.

En una realización, se proporcionan kits de combinación en donde dicho compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, se proporciona en forma de comprimido adecuado para administración oral. En una realización, se proporcionan kits de combinación en donde dicho compuesto de Fórmula II o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, se proporciona en forma de comprimido adecuado para administración oral. En una realización, se proporcionan kits de combinación en donde dicho anticuerpo anti-PD-1 se formula para administración intravenosa IV. En una realización, se proporcionan kits de combinación en donde dicho anticuerpo anti-PD-1 se formula para administración subcutánea.

En un aspecto, se proporciona un kit de piezas que comprende los siguientes constituyentes: Compuesto A junto con un adyuvante, diluyentes o transportador farmacéuticamente aceptable; Compuesto B en asociación con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable; y un anticuerpo anti-PD-1 en asociación con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención, el kit de piezas comprende los siguientes constituyentes:

el Compuesto B en asociación con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable; y/o el Compuesto A junto con un adyuvante, diluyentes o transportador farmacéuticamente aceptable; y un anticuerpo anti-PD-1, en donde los constituyentes se proporcionan en una forma que es adecuada para la administración secuencial, por separado y/o simultánea.

En una realización, el kit de piezas comprende: un primer recipiente que comprende el Compuesto B junto con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable; y/o un segundo recipiente que comprende el Compuesto A junto con un adyuvante, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable, y un tercer recipiente que comprende MK-3475 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

El kit de combinación puede proporcionarse también con instrucciones, tales como instrucciones de dosificación y administración. Dichas instrucciones de dosificación y administración pueden ser como las que se proporcionan a un médico, por ejemplo, mediante una etiqueta de un medicamento, o pueden ser como las que proporciona un médico, tal como las instrucciones a un paciente.

La expresión "dosis inicial", como se usa en el presente documento, se entenderá que significa un régimen de corta duración o de una sola dosis de Compuesto B o Compuesto A o de un anticuerpo anti-PD-1, que tiene una dosificación más alta que la dosis de mantenimiento administrada al sujeto, por ejemplo, para aumentar rápidamente el nivel de concentración en sangre del fármaco. Convenientemente, un régimen de corta duración para su uso en el presente documento será de: 1 a 14 días; convenientemente de 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente durante tres días; convenientemente durante dos días; convenientemente durante un día. En algunas realizaciones, la "dosis inicial" puede aumentar la concentración en sangre del fármaco hasta un nivel terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la "dosis inicial" puede aumentar la concentración en sangre del fármaco hasta un nivel terapéuticamente eficaz junto con una dosis de mantenimiento del fármaco. La "dosis inicial" del Compuesto A y/o el Compuesto B se puede administrar una vez al día, o más de una vez al día (por ejemplo, hasta 4 veces al día). Convenientemente, la "dosis inicial" del Compuesto A y/o el Compuesto B se administrará una vez al día. Convenientemente, la dosis inicial será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces; convenientemente de 2 a 5 veces; convenientemente 2 veces; convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente, la dosis inicial se administrará durante 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente durante 1 día; convenientemente durante 2 días; convenientemente durante 3 días, seguido de un protocolo de dosificación de mantenimiento.

Se entenderá que la expresión "dosis de mantenimiento", como se usa en el presente documento, significa una dosis

que se administra en serie (por ejemplo; al menos dos veces), y que está destinada a elevar lentamente los niveles de concentración en sangre del compuesto hasta un nivel terapéuticamente eficaz, o a mantener dicho nivel terapéuticamente eficaz. La dosis de mantenimiento para el Compuesto A y/o el Compuesto B, se administra generalmente una vez al día y la dosis diaria de la dosis de mantenimiento es menor que la dosis diaria total de la dosis inicial.

Convenientemente, las combinaciones de la presente invención se administran en un "período especificado".

Por la expresión "período especificado" y derivados de la misma, como se usa en el presente documento, se entiende el intervalo de tiempo que transcurre entre la administración del primer compuesto de la combinación y el último compuesto de la combinación. Por ejemplo, si primero se administra el compuesto A, después el compuesto B y por último un anticuerpo anti-PD-1, el intervalo de tiempo que transcurre entre la administración del Compuesto A y el anticuerpo anti-PD-1 es el período especificado. Cuando un constituyente de la invención se administra más de una vez al día, el período especificado se calcula teniendo en cuenta la primera administración de cada constituyente en un día específico. Todas las administraciones de un compuesto de la invención, que sean posteriores a la primera durante un día específico, no se consideran al calcular el período específico.

Convenientemente, si el compuesto A, opcionalmente el Compuesto B, y un anticuerpo anti-PD-1, se administran en un "período especificado" y no se administran simultáneamente, ambos se administran en aproximadamente 24 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 24 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 12 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 12 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 11 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 11 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 10 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 10 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 9 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 9 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 8 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 8 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 7 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 7 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 6 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 6 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 5 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 5 horas; convenientemente, se administrarán en aproximadamente 4 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 4 horas; convenientemente, se administrarán con aproximadamente 3 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 3 horas; convenientemente, se administrarán con aproximadamente 2 horas de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 2 horas; convenientemente, se administrarán con aproximadamente 1 hora de diferencia entre sí y, en este caso, el período especificado será de aproximadamente 1 hora y se considera que es una administración simultánea.

Convenientemente, cuando la combinación de la invención se administra durante un "período especificado", los compuestos se coadministrarán durante un "período de tiempo".

Cuando en el presente documento se utiliza la expresión "periodo de tiempo" y derivados de la misma, con respecto al Compuesto B y/o al Compuesto A, significa que el Compuesto A y opcionalmente el Compuesto B, se administran durante un número indicado de días consecutivos, seguido opcionalmente de un número de días consecutivos en los que se administra solo uno de los compuestos constituyentes.

Cuando en el presente documento se utiliza la expresión "periodo de tiempo" y derivados de la misma, con respecto a un anticuerpo anti-PD-1 o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, significa que el anticuerpo anti-PD-1 se administra una vez a la semana durante un número indicado de semanas consecutivas.

Con respecto a la administración durante un "período especificado":

Convenientemente, el compuesto A, opcionalmente el Compuesto B y un anticuerpo anti-PD-1, se administrarán en un período especificado durante al menos un día, y en este caso, el periodo de tiempo será de al menos un día; convenientemente, durante el ciclo de tratamiento, el compuesto A, opcionalmente el compuesto B y el anticuerpo anti-PD-1, se administrarán en un período especificado durante al menos 3 días consecutivos, en donde el anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse opcionalmente una vez durante este período y, en este caso, el periodo de tiempo será de al menos 3 días; convenientemente, durante el ciclo de tratamiento, el compuesto A, opcionalmente el Compuesto B y un anticuerpo anti-PD-1, se administrarán en un período especificado durante al menos 5 días consecutivos, en donde el anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse opcionalmente una vez durante este período y, en este caso, el periodo de tiempo será de al menos 5 días; convenientemente, durante el ciclo de tratamiento, el compuesto A, opcionalmente el Compuesto B y un anticuerpo anti-PD-1, se administrarán en un período especificado durante al menos 7 días consecutivos, en donde el anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse opcionalmente una vez durante este período y, en este caso, el periodo de tiempo será de al menos 7 días; convenientemente, durante el ciclo de tratamiento, el compuesto A, opcionalmente el Compuesto B y un anticuerpo

anti-PD-1, se administrarán en un período especificado durante al menos 14 días consecutivos, en donde el anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse opcionalmente una vez a la semana durante este período y, en este caso, el periodo de tiempo será de al menos 14 días; convenientemente, durante el ciclo de tratamiento, el Compuesto A, opcionalmente el Compuesto B y un anticuerpo anti-PD-1, se administrarán en un período especificado durante al menos 28 días consecutivos, en donde el anti-PD-1 puede administrarse opcionalmente una vez a la semana durante este período y, en este caso, el periodo de tiempo será de al menos 28 días.

Convenientemente, si los constituyentes no se administran durante un "período especificado", se administran secuencialmente. La expresión "administración secuencial", y derivados de la misma, como se usa en el presente documento, significa que el primer constituyente de la combinación de Compuesto A, opcionalmente Compuesto B o un anticuerpo anti-PD-1, se administran durante dos o más días consecutivos, seguido de la administración de un segundo constituyente en la combinación durante dos o más días consecutivos, seguido después de la administración del último constituyente de la combinación durante dos o más días consecutivos. Además, en este caso se contempla un descanso farmacológico utilizado entre la administración secuencial del Compuesto A, opcionalmente del Compuesto B y un anticuerpo anti-PD-1. Como se usa en el presente documento, un descanso farmacológico es un período de días después de la administración secuencial de uno de Compuesto A, opcionalmente Compuesto B y un anticuerpo anti-PD-1 y antes de la administración del otro constituyente de la invención. Convenientemente, descanso farmacológico será un período de días seleccionado de: 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días y 14 días.

Respecto a la administración secuencial:

Convenientemente, el Compuesto B se administrará primero en la secuencia, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 1 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 1 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 1 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 1 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas.

Convenientemente, el Compuesto A se administrará primero en la secuencia, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1. Convenientemente, el Compuesto A se administra durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto A se administra durante 1 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B durante 1 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto A se administra durante 1 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B durante 1 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto A se administra durante 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B durante 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas. Convenientemente, el Compuesto A se administra durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas.

Convenientemente, un anticuerpo anti-PD-1 se administrará primero en la secuencia, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A. Convenientemente, se administra un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1-10 semanas, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración opcional del Compuesto B durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso

anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 1 a 14 días consecutivos. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 14 días consecutivos. Convenientemente, el Compuesto B se administra durante 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 una vez a la semana durante 1 a 10 semanas, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del Compuesto A durante 7 días consecutivos.

Se entiende que una administración de "período especificado" y una administración "secuencial" pueden ir seguidas de una dosificación repetida o pueden ir seguidas de un protocolo de dosificación alternativo, y un descanso farmacológico puede preceder a la dosificación repetida o al protocolo de dosificación alternativo.

Convenientemente, la cantidad de Compuesto A (teniendo en cuenta el peso de la cantidad sin sal/sin solvato) administrada como parte de la combinación de acuerdo con la presente invención, será una cantidad seleccionada de aproximadamente 0,125 mg a aproximadamente 10 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 9 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 8 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 8 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 7 mg; convenientemente, la cantidad será de aproximadamente 5 mg. Por consiguiente, la cantidad de Compuesto A administrada como parte de la combinación de acuerdo con la presente invención, será una cantidad seleccionada de aproximadamente 0,125 mg a aproximadamente 10 mg. Por ejemplo, la cantidad de Compuesto A administrada como parte de la combinación de acuerdo con la presente invención, puede ser de 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 3,5 mg, 4 mg, 4,5 mg, 5 mg, 5,5 mg, 6 mg, 6,5 mg, 7 mg, 7,5 mg, 8 mg, 8,5 mg, 9 mg, 9,5 mg, 10 mg.

Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto A se administra de 1 a 4 veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto A se administra dos veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto A se administra una vez al día. Convenientemente, la administración del compuesto A comenzará como una dosis inicial. Convenientemente, la dosis inicial será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces; convenientemente de 2 a 5 veces; convenientemente 2 veces; convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente, la dosis inicial se administrará de 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente durante 1 día; convenientemente durante 2 días; convenientemente durante 3 días, seguido de un protocolo de dosificación de mantenimiento.

Convenientemente, la cantidad de Compuesto B (teniendo en cuenta el peso de la cantidad sin sal/sin solvato) administrada opcionalmente como parte de la combinación de acuerdo con la presente invención, será una cantidad seleccionada de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 600 mg. Convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 300 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 280 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 260 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 240 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 220 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 90 mg a aproximadamente 210 mg; convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 100 mg y aproximadamente 200 mg, convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 110 mg y aproximadamente 190 mg, convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 120 mg y aproximadamente 180 mg, convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 130 mg y aproximadamente 170 mg, convenientemente, la cantidad se seleccionará de aproximadamente 140 mg y aproximadamente 160 mg, convenientemente, la cantidad será de 150 mg. Por consiguiente, la cantidad de Compuesto B administrada como parte de la combinación según la presente invención, será una cantidad seleccionada de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg. Por ejemplo, la cantidad de Compuesto B administrada como parte de la combinación de acuerdo con la presente invención, se selecciona adecuadamente de 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg, 140 mg, 145 mg, 150 mg, 155 mg, 160 mg, 165 mg, 170 mg, 175 mg, 180 mg, 185 mg, 190 mg, 195 mg, 200 mg, 205 mg, 210 mg, 215 mg, 220 mg, 225 mg, 230 mg, 235 mg, 240 mg, 245 mg, 250 mg, 255 mg, 260 mg, 265 mg, 270 mg, 275 mg, 280 mg, 285 mg, 290 mg, 295 mg y 300 mg. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto B se administra de 1 a 4 veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto B se administra dos veces al día. Convenientemente, el compuesto B se administra dos veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto B se administra una vez al día.

Convenientemente, la administración del compuesto B comenzará como una dosis inicial. Convenientemente, la dosis inicial será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces;

convenientemente de 2 a 5 veces; convenientemente 2 veces; convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente, la dosis inicial se administrará de 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente durante 1 día; convenientemente durante 2 días; convenientemente durante 3 días, seguido de un protocolo de dosificación de mantenimiento.

Un anticuerpo anti-PD-1 se administra a una cantidad de dosificación de aproximadamente 50 mg/m²/semana a aproximadamente 700 mg/m²/semana; convenientemente, de 100 mg/m²/semana a aproximadamente 600 mg/m²/semana; convenientemente, de 200 mg/m²/semana a aproximadamente 500 mg/m²/semana o a una dosis de 1,2, 3, 5 o 10 mg/kg a intervalos de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días) o de aproximadamente 21 días ($\pm$ 2 días) o de aproximadamente 30 días ($\pm$ 2 días) durante todo el ciclo de tratamiento.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 se administra una vez a la semana, siendo la cantidad de administración inicial de 400 mg/m²/semana a aproximadamente 500 mg/m²/semana y siendo la cantidad de cada administración posterior de 200 mg/m²/semana a 300 mg/m²/semana. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3,0 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. Los anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención, pueden formularse para administración intravenosa y/o administración subcutánea. Las dosis pueden administrarse diariamente, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas y/o mensualmente.

La presente invención también proporciona un medicamento que comprende un antagonista de PD-1, como se describió anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando el antagonista de PD-1 es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un mAAb, el antagonista puede producirse en células CHO utilizando tecnologías convencionales de cultivo celular y recuperación/purificación.

En algunas realizaciones, un medicamento que, como antagonista de PD-1, comprende un anticuerpo anti-PD-1, puede proporcionarse como una formulación líquida o prepararse reconstituyendo un polvo liofilizado con agua estéril para inyección antes de su uso. En el documento WO 2012/135408 se describe la preparación de medicamentos líquidos y liofilizados que comprenden MK-3475 que son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, se proporciona un medicamento que comprende MK-3475 en un vial de vidrio que contiene aproximadamente 50 mg de MK-3475.

Una realización de la presente invención proporciona una combinación de Compuesto A, administrado una vez al día; Compuesto B, administrado opcionalmente una o dos veces al día; y MK-3475 administrado de acuerdo con el protocolo mencionado anteriormente, durante un período de al menos 8 semanas, convenientemente, durante un período de al menos 4 semanas, convenientemente, durante un período de al menos 2 semanas, convenientemente durante un período de al menos 10 días, convenientemente durante un período de al menos 7 días, convenientemente, los tres compuestos se administran el primer día de cada período de 7 días.

Una realización de la presente invención proporciona una combinación de Compuesto A, administrado una vez al día; Compuesto B, administrado opcionalmente una o dos veces al día; y nivolumab administrado de acuerdo con el protocolo mencionado anteriormente, durante un período de al menos 8 semanas, convenientemente, durante un período de al menos 4 semanas, convenientemente, durante un período de al menos 2 semanas, convenientemente durante un período de al menos 10 días, convenientemente durante un período de al menos 7 días, convenientemente, los tres compuestos se administran el primer día de cada período de 7 días.

Como se usa en el presente documento, todas las cantidades especificadas para el Compuesto A y el Compuesto B, se indican como la cantidad de compuesto sin sal o desalinizado.

En algunas realizaciones de cualquiera de las composiciones farmacéuticas, combinaciones, kits de combinación, usos y métodos de tratamiento anteriores, el compuesto A se administra una vez al día en un comprimido de 2 mg de MEKINIST (trametinib), El compuesto B se administra dos veces al día en dos cápsulas de 75 mg o tres de 50 mg de TANIFLAR (dabrafenib) y el antagonista de PD-1 es MK-3475, que se administra mediante perfusión intravenosa una vez cada tres semanas a una dosis de 2 mg/kg o una vez cada 2 semanas a una dosis de 10 mg/kg.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Se cree que las combinaciones y terapias de combinación de la invención, tienen utilidad en trastornos en los que la inhibición de BRAF y/o MEK y/o la mejora de la respuesta inmunitaria a través del bloqueo de la señal inhibidora de PD-1, resulta ser beneficiosa.

Por tanto, la presente invención también proporciona una combinación de la invención, para su uso en terapia, particularmente en el tratamiento de trastornos en los que la inhibición de BRAF y/o MEK y/o la mejora de la respuesta inmunitaria bloqueando la señalización inhibidora de PD-1, resulta ser beneficiosa, particularmente cáncer.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno en donde la inhibición de BRAF y/o MEK y/o la mejora de la respuesta inmunitaria bloqueando la señalización inhibidora de PD-1 resulta ser beneficiosa, que comprende administrar una combinación de la invención.

- 5 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona la combinación de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno en donde la inhibición de BRAF y/o MEK y/o la mejora de la respuesta inmunitaria bloqueando la señalización inhibidora de PD-1 resulta ser beneficiosa.

10 Normalmente, el trastorno es un cáncer, de tal manera que la inhibición de BRAF y/o MEK y/o la mejora de la respuesta inmunitaria bloqueando la señalización inhibidora de PD-1 tiene un efecto beneficioso. Los ejemplos de cánceres que son adecuados para el tratamiento con la combinación de la invención incluyen, pero sin limitación, formas primarias y metastásicas de cáncer de cabeza y cuello, mama, pulmón, colon, ovario y próstata. Convenientemente, el cáncer se selecciona de los siguientes cánceres: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, mama, mama inflamatorio, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, endodimoma, meduloblastoma, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, hígado, melanoma, ovárico, pancreático, próstata, sarcoma, osteosarcoma, tumor óseo de células gigantes, tiroideo, leucemia linfoblástica de linfocitos T, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, LMA, leucemia neutrofílica crónica, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, plasmacitoma, leucemia inmunoblástica de células grandes, leucemia de células del manto, mieloma múltiple, leucemia megacarioblástica, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma linfoblástico de linfocitos T, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, cáncer vulvar, cáncer cervicouterino, cáncer endometrial, cáncer renal, mesotelioma, cáncer esofágico, cáncer de las glándulas salivales, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de nasofaringe, cáncer bucal, cáncer de boca, GIST (tumor del estroma gastrointestinal) y cáncer testicular.

Adicionalmente, los ejemplos de un cáncer a tratar incluyen adenocarcinoma de Barret; carcinomas del conducto biliar; cáncer de mama; cáncer cervicouterino; colangiocarcinoma; tumores del sistema nervioso central, incluidos tumores primarios del SNC, tales como glioblastomas, astrocitomas (por ejemplo, glioblastoma multiforme) y endodimomas, y tumores secundarios del SNC (es decir, metástasis al sistema nervioso central de tumores que se originan fuera del sistema nervioso central); cáncer colorrectal, incluyendo carcinoma de colon del intestino grueso; cáncer gástrico; carcinoma de cabeza y cuello, incluyendo carcinoma escamocelular de cabeza y cuello; cánceres hematológicos, incluyendo leucemias y linfomas tales como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos, leucemia mielógena crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia megacarioblástica, mieloma múltiple y eritroleucemia; carcinoma hepatocelular; cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de ovario; cáncer endometrial; cáncer pancreático; adenoma hipofisario; cáncer de próstata; cáncer renal; sarcoma; cánceres de piel incluyendo melanomas; y cánceres tiroideos.

40 Convenientemente, la presente invención se refiere a un método para tratar o disminuir la gravedad de un cáncer seleccionado de los siguientes: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, mama, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, hígado, melanoma, ovárico, pancreático, próstata, sarcoma y tiroides.

45 Convenientemente, la presente invención se refiere a un método para tratar o disminuir la gravedad de un cáncer seleccionado de cáncer de ovario, mama, pancreático y prostático.

Convenientemente, la presente invención se refiere a un método para tratar o disminuir la gravedad de síndromes precancerosos en un mamífero, incluyendo un ser humano, en donde el síndrome precanceroso se selecciona de: neoplasia intraepitelial cervicouterina, gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), síndrome mielodisplásico, anemia aplásica, lesiones cervicouterinas, nevos cutáneos (pre-melanoma), neoplasia (intraductal) prostática intraepitelial (NIP), carcinoma ductal *in situ* (CDIS), pólipos de colon y hepatitis o cirrosis grave.

55 Convenientemente, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la disminución de la gravedad de un cáncer que es natural o mutante para Raf y KRAS y natural o mutante para PI3K/Pten. Esto incluye a pacientes con un cáncer que es natural tanto para Raf como para KRAS y PI3K/Pten, mutante para Raf, KRAS y PI3K/Pten, mutante para Raf y natural para KRAS y PI3K/Pten y natural para Raf y KRAS y mutante para PI3K/Pten.

60 El término "natural", como se entiende en la técnica, se refiere a una secuencia de polipéptidos o de polinucleótidos que se produce en una población nativa, sin modificación genética. Como también se entiende en la técnica, un "mutante" incluye una secuencia de polipéptidos o de polinucleótidos que tiene al menos una modificación de un aminoácido o ácido nucleico en comparación con el aminoácido o ácido nucleico correspondiente encontrado en un polipéptido o polinucleótido natural, respectivamente. En el término mutante se incluye polimorfismo mononucleotídico (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) en donde existe una diferencia de un solo par de bases en la secuencia de una cadena de ácido nucleico en comparación con la cadena de ácido nucleico más

frecuentemente encontrada (natural). Convenientemente, cuando el cáncer es natural para Raf o natural para BRAF o da negativo para una mutación BRAF V600, solo se administra el Compuesto A y un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y el Compuesto B no se administra.

- 5 Los cánceres que son naturales o mutantes para Raf, naturales o mutantes para PI3K/Pten, y naturales o mutantes, se identifican mediante métodos conocidos.

10 Por ejemplo, a través de técnicas de secuenciación y amplificación de ADN y de detección de ADN y ARN, pueden identificarse células tumorales naturales o mutantes de Raf o PI3K/PTEN, incluyendo, pero sin limitación, inmunoelctrotransferencia de tipo Northern y Southern, respectivamente, y/o diversas tecnologías basadas en genochip y matrices. Los polipéptidos de naturales y mutantes pueden detectarse mediante una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitación, técnicas de inmunodiagnóstico tales como ELISA, inmunoelctrotransferencia de tipo Western o inmunocitoquímica. Convenientemente, pueden utilizarse métodos de polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) y/o PCR. Liu, Q et al; Human Mutation 23:426-436 (2004).

15 En una realización preferida, a un paciente con melanoma avanzado o metastásico que da positivo para una mutación BRAF V600, se le administra una combinación de: (i) MK-3475 a una dosis de 1 mg/kg C3S, 2 mg/kg C3S o 10 mg/kg C2S; (ii) dabrafenib a una dosis de 100 DVD o 150 DVD y (iii) trametinib a una dosis de 1 mg o 2 mg UVD.

20 En otra realización preferida, a un paciente con melanoma avanzado o metastásico que da negativo para una mutación BRAF V600, se le administra una combinación de: (i) MK-3475, a una dosis de 2 mg/kg C3S o 10 mg/kg C2S y trametinib a una dosis de 1 mg UVD o 2 mg UVD.

25 En otra realización preferida adicional, a un paciente con melanoma avanzado o metastásico que da positivo para una mutación BRAF V600, se le administra una combinación de: (i) MK-3475 a una dosis de 1 mg/kg C3S, 2 mg/kg C3S o 10 mg/kg C2S y dabrafenib a una dosis de 100 mg DVD o 150 DVD.

30 En cualquiera de las realizaciones preferidas anteriores, las dosis de partida preferidas son: MK-3475 a 2 mg/kg C3S, dabrafenib a 150 mg DVD y trametinib a 2 mg UVD. Si el paciente experimenta un acontecimiento adverso relacionado con el inhibidor de cinasa durante el tratamiento con la combinación, la dosis de dabrafenib y/o trametinib se reduce preferentemente hasta la mitad de la dosis de partida. Si el paciente experimenta un acontecimiento adverso relacionado con el sistema inmunitario durante el tratamiento con la combinación, la dosis de MK-3475 se reduce a la mitad de la dosis de partida, por ejemplo, 1 mg/kg C3S.

35 En cada una de las realizaciones preferidas anteriores para el tratamiento de melanoma avanzado o metastásico, MK-3475 se administra preferentemente como una composición farmacéutica líquida que comprende 25 mg/ml de MK-3475, sacarosa al 7 % (p/v), polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) en tampón de histidina 10 mM, pH 5,5, y la dosis seleccionada de la composición se administra mediante perfusión intravenosa IV durante un período de tiempo de aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, de 25 a 40 minutos).

40 En cualquiera de las realizaciones anteriores para el tratamiento de melanoma avanzado o metastásico, la combinación se administra durante al menos un ciclo de seis semanas, y preferentemente la duración del tratamiento es cualquiera de: al menos 6, 12, 18 o 24 meses, al menos 2 ciclos después de una RC y observación de EP.

45 En cualquiera de las realizaciones anteriores para el tratamiento de melanoma avanzado o metastásico, la combinación se administra a pacientes con un tumor que da positivo para la expresión de PD-L1.

50 En cualquiera de las realizaciones anteriores para el tratamiento de melanoma avanzado o metastásico, preferentemente, el paciente no tiene un diagnóstico de melanoma uveal u ocular, y preferentemente, no ha recibido terapia sistémica previa para melanoma metastásico o avanzado con un agente dirigido a PD-1, PD-L1, CTLA4, BRAF, MEK o a otras moléculas en la vía de la MAPK.

55 La combinación de la invención puede utilizarse sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una combinación adicional que comprende una combinación de la invención con uno o más agentes terapéuticos, composiciones y medicamentos adicionales, que comprenden la combinación y el uso de la combinación, composiciones y medicamentos adicionales en terapia, en particular, en el tratamiento de enfermedades susceptibles de inhibición de MEK y/o inhibición de BRAF y/o de una respuesta inmunitaria mejorada mediante el bloqueo de la señalización inhibidora de PD-1.

60 En una realización, se puede emplear una combinación de la invención con otros métodos terapéuticos de tratamiento del cáncer. En particular, en la terapia antineoplásica, se contempla la terapia de combinación con otros agentes quimioterapéuticos, hormonales, anticuerpos, así como tratamientos quirúrgicos y/o de radiación distintos de los mencionados anteriormente. Las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención incluyen por tanto la administración del Compuesto A, Compuesto B y MK-3475, así como el uso opcional de otros agentes

terapéuticos incluidos otros agentes antineoplásicos. Dicha combinación de agentes puede administrarse conjuntamente o por separado y, cuando se administra por separado, esto puede realizarse de manera simultánea o secuencial en cualquier orden, tanto cercana como distante en el tiempo. En una realización, la combinación farmacéutica incluye el Compuesto A, Compuesto B y MK-3475, y opcionalmente al menos un agente antineoplásico adicional. En una realización, la combinación farmacéutica incluye el Compuesto A, Compuesto B y nivolumab, y opcionalmente al menos un agente antineoplásico adicional.

En una realización, la terapia adicional contra el cáncer es quirúrgica y/o radioterapia.

En una realización, la terapia adicional contra el cáncer es al menos un agente antineoplásico adicional.

Cualquier agente antineoplásico que tenga actividad frente a un tumor susceptible de tratarse, puede utilizarse en la combinación. Los agentes antineoplásicos habituales útiles incluyen, aunque sin limitación, agentes antimicrotúbulos, tales como diterpenoides y alcaloides de la vinca; complejos de coordinación de platino; agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas, oxazafosforinas, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos; agentes antibióticos, tales como antraciclinas, actinomicinas y bleomicinas; inhibidores de topoisomerasa II, tales como epipodofilotoxinas; antimetabolitos tales como análogos de purina y pirimidina, y compuestos antifolato; inhibidores de topoisomerasa I, tales como camptotecinas; hormonas y análogos de hormonas; inhibidores de las vías de transducción de señales; inhibidores de la angiogénesis de tirosinas no receptoras; agentes inmunoterapéuticos; agentes proapoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.

Agentes antimicrotúbulos o agentes antimitóticos: Los agentes antimicrotúbulos o antimitóticos son agentes específicos de fase activos frente a los microtúbulos de las células tumorales durante la fase M o la fase de la mitosis del ciclo celular. Los ejemplos de agentes antimicrotúbulos incluyen, aunque sin limitación, diterpenoides y alcaloides de la vinca.

Los diterpenoides, que se obtienen de fuentes naturales, son agentes contra el cáncer específicos de fase que funcionan en las fases G₂/M del ciclo celular. Se cree que los diterpenoides estabilizan la subunidad β -tubulina de los microtúbulos, a través de la unión con esta proteína. El desensamblaje de la proteína parece estar entonces inhibido al detenerse la mitosis y producirse la consiguiente muerte celular. Los ejemplos de diterpenoides incluyen, aunque sin limitación, paclitaxel y su análogo docetaxel.

El paclitaxel, 13-éster de 2-benzoato de 4,10-diacetato de 5 β ,20-epoxi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexa-hidroxitax-11-en-9-ona con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina; es un producto diterpenoide natural, aislado del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada TAXOL®. Es un miembro de la familia de taxanos de los terpenos. El paclitaxel se ha aprobado en los Estados Unidos para el uso clínico en el tratamiento del cáncer de ovario resistente (Markman *et al.*, Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire *et al.*, Ann. Intern. Med., 111:273,1989) y para el tratamiento del cáncer de mama (Holmes *et al.*, J. Nat. Cancer Inst., 83:1797,1991.) Es un posible candidato para el tratamiento de neoplasias en la piel (Einzig *et al.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46) y de carcinomas de cabeza y cuello (Forastire *et al.*, Sem. Oncol., 20:56, 1990). El compuesto también muestra potencial para el tratamiento de la poliquistosis renal (Woo *et al.*, Nature, 368:750, 1994), cáncer de pulmón y paludismo. El tratamiento de los pacientes con paclitaxel da como resultado la supresión de la médula ósea (múltiples linajes celulares, Ignoff, R.J. *et al.*, Cancer Chemotherapy Pocket Guide 1998) relacionada con la duración de la dosificación por encima de una concentración umbral (50 nM) (Kearns, C.M. *et al.*, Seminars in Oncology, 3(6) págs.16-23, 1995).

El docetaxel, (2R, 3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, N-terc-butil éster, 13-éster con 5 β -20-epoxi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahidroxitax-11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, trihidrato; está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada TAXOTERE®. El docetaxel está indicado para el tratamiento del cáncer de mama. El docetaxel es un derivado semisintético de paclitaxel a demanda, preparado utilizando un precursor natural, 10-desacetil-bacatina III, que se extrae de la acícula del tejo europeo.

Los alcaloides de la vinca son agentes antineoplásicos específicos de fase obtenidos de la vinca. Los alcaloides de la vinca actúan en la fase M (mitosis) del ciclo celular uniéndose específicamente a la tubulina. En consecuencia, la molécula de tubulina unida no puede polimerizarse en los microtúbulos. Se cree que la mitosis está detenida en la metafase con muerte celular posterior. Los ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen, aunque sin limitación, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

La Vinblastina, sulfato de vincalucoblastina, está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada VELBAN®. Aunque tiene una posible indicación como una terapia de segunda línea para diversos tumores sólidos, está indicada principalmente en el tratamiento del cáncer testicular y de diversos linfomas, incluyendo la enfermedad de Hodgkin; y de linfomas linfocíticos e histiocíticos. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la dosis de la vinblastina.

La vincristina, vincalucoblastina, 22-oxo-, sulfato, está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada ONCOVIN®. La vincristina está indicada para el tratamiento de leucemias agudas y también se ha

descubierto su uso en regímenes de tratamiento para linfomas malignos de Hodgkin y no Hodgkin. La alopecia y los efectos neurológicos son los efectos secundarios más comunes de la vincristina y, en un menor grado, pueden producirse efectos de mielosupresión y mucositis gastrointestinal.

La vinorelbina, 3',4'-didehidro-4'-desoxi-C'-norvincalécoblastina[R-(R*,R*)-2,3-dihidroxi-butanodioato (1: 2) (sal)], disponible en el comercio como una solución inyectable de tartrato de vinorelbina (NAVELBINE®), es un alcaloide de la vinca semisintético. La vinorelbina está indicada como agente único o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, tal como cisplatino, en el tratamiento de diversos tumores sólidos, particularmente cánceres de pulmón no microcítico, de mama avanzado y de próstata resistente a hormonas. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la dosis más común de la vinorelbina.

Complejos de coordinación de platino: Los complejos de coordinación de platino son agentes contra el cáncer no específicos de fase, que interactúan con el ADN. Los complejos de platino entran en las células tumorales, experimentan acuciación y forman entrecruzamientos intracadena e intercadena con el ADN provocando efectos biológicos adversos en el tumor. Los ejemplos de complejos de coordinación de platino incluyen, aunque sin limitación, oxaliplatino, cisplatino y carboplatino.

El cisplatino, cis-diaminodicloroplatino, está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada PLATINOL®. El cisplatino está indicado principalmente en el tratamiento del cáncer testicular y ovárico metastásico y del cáncer de vejiga avanzado.

El carboplatino, platino, diamina [1,1-ciclobutano-dicarboxilato(2-)-O,O'], está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada PARAPLATIN®. El carboplatino está indicado principalmente en el tratamiento de primera y segunda línea del carcinoma ovárico avanzado.

Agentes alquilantes: Los agentes alquilantes son agentes contra el cáncer no específicos de fase y son fuertes electrófilos. Normalmente, los agentes alquilantes forman enlaces covalentes, mediante alquilación, con el ADN, a través de radicales nucleófilos de la molécula de ADN, tales como grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Dicha alquilación altera las funciones del ácido nucleico conduciendo a la muerte celular. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, aunque sin limitación, mostazas nitrogenadas tales como ciclofosfamida, melfalán y clorambucilo; sulfonatos de alquilo tales como busulfán; nitrosoureas tales como carmustina; y triacenos tales como dacarbazina.

La ciclofosfamida, 2-[bis (2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina 2-óxido monohidrato, está disponible en el comercio como una solución inyectable o como comprimidos con el nombre de CYTOXAN®. La ciclofosfamida está indicada como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, en el tratamiento de linfomas malignos, mieloma múltiple y leucemias.

El melfalán, 4-[bis(2-cloroetil)amino]-L-fenilalanina, está disponible en el comercio como una solución inyectable o como comprimidos con el nombre de ALKERAN®. El melfalán está indicado para el tratamiento paliativo de mieloma múltiple y de carcinoma epitelial no resecable del ovario. La supresión de la médula ósea es el efecto secundario limitante de la dosis más común del melfalán.

El clorambucilo, ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]bencenobutanoico, está disponible en el comercio como comprimidos con el nombre de LEUKERAN®. El clorambucilo está indicado para el tratamiento paliativo de la leucemia linfática crónica y los linfomas malignos tales como linfoma folicular gigante y enfermedad de Hodgkin.

El busulfán, 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, está disponible en el comercio como comprimidos con el nombre de MYLERAN®. El busulfán está indicado para el tratamiento paliativo de la leucemia mieloide crónica.

La carmustina, 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea, está disponible en el comercio como viales individuales de material liofilizado con el nombre de BiCNU®. La carmustina está indicada para el tratamiento paliativo como un único agente o en combinación con otros agentes para tumores cerebrales, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.

La dacarbazina, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida, está disponible en el comercio como viales individuales de material con el nombre de DTIC-Dome®. La dacarbazina está indicada para el tratamiento de melanoma maligno metastásico y, en combinación con otros agentes, para el tratamiento de segunda línea de la enfermedad de Hodgkin.

Antibióticos antitumorales: Los antibióticos antitumorales son agentes no específicos de fase, que se unen o intercalan con el ADN. Normalmente, dicha acción da como resultado complejos de ADN estables o la rotura de cadenas, lo que altera la función normal de los ácidos nucleicos conduciendo a la muerte celular. Los ejemplos de agentes antibióticos antitumorales incluyen, aunque sin limitación, actinomicinas tales como dactinomicina, antraciclinas tales como daunorrubicina y doxorubicina; y bleomicinas.

La dactinomicina, también conocida como Actinomicina D, está disponible en el comercio en forma inyectable con el nombre de COSMEGEN®. La dactinomicina está indicada para el tratamiento del tumor de Wilm y el rhabdomyosarcoma.

La daunorrubicina, clorhidrato de (8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacenediona, está disponible en el comercio como una forma inyectable liposomal denominada DAUNOXOME® o como una forma inyectable denominada CERUBIDINE®. La doxorubicina está indicada para la inducción de la remisión en el tratamiento de la leucemia no linfocítica aguda y el sarcoma de Kaposi avanzado asociado al VIH.

La doxorubicina, clorhidrato de (8S, 10S)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicolil, 7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacenediona, está disponible en el comercio como una forma inyectable denominada RUBEX® o ADRIAMYCIN RDF®. La doxorubicina está indicada principalmente para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloblástica aguda, pero también es un constituyente útil en el tratamiento de algunos tumores sólidos y linfomas.

La bleomicina, una mezcla de antibióticos glucopeptídicos citotóxicos aislados de una cepa de *Streptomyces verticillus*, está disponible en el comercio como BLENOXANE®. La bleomicina está indicada como un tratamiento paliativo, como agente único o en combinación con otros agentes, de carcinoma escamocelular, linfomas y carcinomas testiculares.

Inhibidores de topoisomerasa II: los inhibidores de topoisomerasa II incluyen, aunque sin limitación, epipodofilotoxinas.

Las epipodofilotoxinas son agentes antineoplásicos específicos de fase obtenidos de la mandrágora. Normalmente, las epipodofilotoxinas ejercen su efecto sobre las células en las fases S y G₂ del ciclo celular mediante la formación de un complejo ternario con la topoisomerasa II y el ADN, causando roturas en las cadenas de ADN. Las roturas de las cadenas se acumulan y a continuación se produce la muerte celular. Los ejemplos de epipodofilotoxinas incluyen, aunque sin limitación, etopósido y tenipósido.

El etopósido, 4'-demetil-epipodofilotoxin 9[4,6-O-(R)-etiliden- β -D-glucopiranosido], está disponible en el comercio como una solución inyectable o como cápsulas con el nombre de VePESID®, y se conoce habitualmente como VP-16. El etopósido está indicado como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer testicular y cáncer de pulmón no microcítico.

El tenipósido, 4'-demetil-epipodofilotoxin 9[4,6-O-(R)-teniliden- β -D-glucopiranosido], está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada VUMON® y se conoce habitualmente como VM-26. El tenipósido está indicado como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda en niños.

Agentes neoplásicos antimetabolitos: los agentes neoplásicos antimetabolitos son agentes antineoplásicos específicos de fase que actúan en la fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular, inhibiendo la síntesis de ADN o inhibiendo la síntesis de bases de purina o pirimidina y, por lo tanto, limitando la síntesis de ADN. En consecuencia, la fase S no avanza y a continuación se produce la muerte celular. Los ejemplos de agentes antineoplásicos antimetabolitos incluyen, aunque sin limitación, fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina y gemcitabina.

El 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2,4-(1H, 3H) pirimidinadiona, está disponible en el comercio como fluorouracilo. La administración de 5-fluorouracilo conduce a la inhibición de la síntesis de timidilato y también se incorpora tanto en el ARN como el ADN. Normalmente el resultado es la muerte celular. El 5-fluorouracilo está indicado como agente único o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de carcinomas de mama, colon, recto, estómago y páncreas. Otros análogos de fluoropirimidina incluyen 5-fluorodesoxiuridina (floxuridina) y monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina.

La citarabina, 4-amino-1- β -D-arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona, está disponible en el comercio como CYTOSAR-U® y se conoce habitualmente como Ara-C. Se cree que la citarabina presenta especificidad de fase celular en la fase S, inhibiendo la elongación de la cadena de ADN mediante la incorporación terminal de citarabina en la cadena de ADN en crecimiento. La citarabina está indicada como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda. Otros análogos de citidina incluyen 5-azacitidina y 2',2'-difluorodesoxiciditina (gemcitabina).

La mercaptopurina, 1,7-dihidro-6H-purina-6-ona monohidrato, está disponible en el comercio como PURINETHOL®. La mercaptopurina presenta especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la síntesis de ADN mediante un mecanismo aún no especificado. La mercaptopurina está indicada como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda. Un análogo de la mercaptopurina útil es la azatioprina.

La tioguanina, 2-amino-1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona, está disponible en el comercio como TABLOID®. La tioguanina presenta especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la síntesis de ADN mediante un mecanismo aún no especificado. La tioguanina está indicada como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia aguda. Otros análogos de purina incluyen pentostatina, eritrohidroxinoniladenina, fosfato de fludarabina y cladribina.

La gemcitabina, monoclóhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β), está disponible en el comercio como GEMZAR®. La gemcitabina presenta especificidad de fase celular en la fase S y bloquea la progresión de las células a través del límite entre G1/S. La gemcitabina está indicada en combinación con cisplatino en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico localmente avanzado y sola en el tratamiento del cáncer pancreático localmente avanzado.

El metotrexato, ácido N-[4[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino] benzoil]-L-glutámico, está disponible en el comercio como metotrexato de sodio. El metotrexato presenta sus efectos en las fases celulares, específicamente en la fase S, inhibiendo la síntesis, la reparación y/o la replicación del ADN, a través de la inhibición de la ácido dihidrofólico reductasa, que es necesaria para la síntesis de nucleótidos de purina y el timidilato. El metotrexato está indicado como único agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de coriocarcinoma, leucemia meníngea, linfoma no Hodgkin y carcinomas de mama, cabeza, cuello, ovario y vejiga.

Inhibidores de la topoisomerasa I: Las camptotecinas, incluyendo, la camptotecina y los derivados de camptotecina, están disponibles o en desarrollo como inhibidores de la Topoisomerasa I. Se cree que la actividad citotóxica de las camptotecinas está relacionada con su actividad inhibidora de la Topoisomerasa I. Los ejemplos de camptotecinas incluyen, aunque no de forma limitativa, irinotecán, topotecán y las diversas formas ópticas de 7-(4-metilpiperazin-metilen)-10,11-etilendioxi-20-camptotecina descritas a continuación.

El irinotecán HCl, (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidinopiperidin)carboniloxi]-1H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14(4H,12H)-diona clorhidrato, está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada CAMPTOSAR®. El irinotecán es un derivado de la camptotecina que se une, junto con su metabolito activo SN-38, al complejo de topoisomerasa I - ADN. Se cree que la citotoxicidad se produce como resultado de roturas bicatenarias irreparables producidas por la interacción del complejo ternario topoisomerasa I : ADN : irinotecán o SN-38, con enzimas de replicación. El irinotecán está indicado para el tratamiento del cáncer metastásico del colon o el recto.

El topotecán HCl, (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14-(4H,12H)-diona monoclóhidrato, está disponible en el comercio como una solución inyectable denominada HYCAMTIN®. El topotecán es un derivado de la camptotecina que se une al complejo topoisomerasa I - ADN e impide el religamiento de las roturas monocatenarias causadas por la Topoisomerasa I en respuesta a la tensión torsional de la molécula de ADN. El topotecán está indicado para el tratamiento de segunda línea del carcinoma metastásico de ovario y el cáncer de pulmón microcítico.

Hormonas y análogos de hormonas: Las hormonas y análogos de hormonas son compuestos útiles para el tratamiento de cánceres en los que existe una relación entre la hormona (u hormonas) y el crecimiento del cáncer, y/o la ausencia del mismo. Los ejemplos de hormonas y de análogos de hormonas útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, aunque sin limitación, adrenocorticosteroides, tales como prednisona y la prednisolona, que son útiles en el tratamiento de linfoma maligno y leucemia aguda en niños; aminoglutetimida y otros inhibidores de la aromatasa, tales como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano, útiles en el tratamiento del carcinoma corticosuprarrenal y del carcinoma de mama dependiente de hormonas que contiene receptores de estrógenos; progestinas, tales como acetato de megestrol, útiles en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas y carcinoma endometrial; estrógenos, andrógenos y anti andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona y 5α-reductasas tales como finasterida y dutasterida, útiles en el tratamiento del carcinoma protático y de la hipertrofia prostática benigna; antiestrógenos, tales como tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, así como moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMS, siglas del inglés *selective estrogen receptor modulators*) tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 5.681.835, 5.877.219 y 6.207.716, útiles en el tratamiento del carcinoma de mama dependiente de hormonas y otros cánceres susceptibles; y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y análogos de la misma, que estimulan la liberación de la hormona luteinizante (LH) y/o la hormona estimulante del folículo (FSH), para el tratamiento del carcinoma prostático, por ejemplo, agonistas y antagonistas de LHRH, tales como acetato de goserelina y luprolida.

Inhibidores de las vías de transducción de señales: Los inhibidores de las vías de transducción de señales son aquellos inhibidores, que bloquean o inhiben un proceso químico que suscita un cambio intracelular. Como se usa en el presente documento, este cambio es la proliferación o diferenciación celular. Los inhibidores de la transducción de señales útiles en la presente invención incluyen inhibidores de tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, bloqueadores de dominio SH2/SH3, serina/treonina cinasas, fosfatidil inositol-3 cinasas, la señalización de mioinositol y oncogenes Ras.

Varias proteínas tirosina cinasas catalizan la fosforilación de restos de tirosilo específicos en diversas proteínas implicadas en la regulación del crecimiento celular. Dichas proteínas tirosina cinasas pueden clasificarse en líneas generales como cinasas receptoras o no receptoras.

Las tirosina cinasas receptoras son proteínas transmembrana que tienen un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio tirosina cinasa. Las tirosina cinasas receptoras están implicadas en la regulación del crecimiento celular y generalmente se denominan receptores de factores de crecimiento. La activación inadecuada o incontrolada de muchas de estas cinasas, es decir, la actividad anómala del receptor del factor de crecimiento de cinasas, por ejemplo, por sobreexpresión o mutación, ha mostrado dar como resultado un crecimiento celular incontrolado. Por consiguiente, la actividad anómala de dichas cinasas se ha relacionado con el crecimiento de tejidos malignos. En consecuencia, los inhibidores de dichas cinasas podrían proporcionar métodos de tratamiento para el cáncer. Los receptores de factores de crecimiento incluyen, por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr, *epidermal growth factor receptor*), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr, *platelet derived growth factor receptor*), erbB2, erbB4, ret, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFr, *vascular endothelial growth factor receptor*), tirosina cinasa con dominios de homología al factor de crecimiento epidérmico y similares a la inmunoglobulina (TIE-2), receptor del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGFI), factor estimulante de colonias de macrófagos (cfms), BTK, kkit, cmet, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), receptores de Trk (TrkA, TrkB y TrkC), receptores de efrina (ef) y el protoncogén RET. Varios inhibidores de receptores de factores de crecimiento está actualmente en desarrollo e incluyen antagonistas de ligandos, anticuerpos, inhibidores de tirosina cinasa y oligonucleótidos anti sentido. Se describen receptores de factores de crecimiento y agentes que inhiben la función dichos receptores, por ejemplo, en Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, N.º 2 de febrero de 1997; y Loftis, F. J. et al, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul y Kerr, David, CRC press 1994, Londres.

Las tirosina cinasas, que son cinasas no receptoras de factores de crecimiento se denominan tirosina cinasas no receptoras. Las tirosina cinasas no receptoras útiles en la presente invención, que son dianas o posibles dianas de fármacos contra el cáncer, incluyen cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (*focal adhesion kinase*, cinasa de adhesión focal), tirosina cinasa de Brutons y Bcr-Abl. Dichas cinasas no receptoras y agentes que inhiben la función de las tirosina cinasas no receptoras se describen en Sinh, S. y Corey, S.J., (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465 - 80; y Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404.

Los bloqueadores de los dominios SH2/SH3 son agentes que alteran la unión del dominio SH2 o SH3 en una diversidad de enzimas o de proteínas adaptadoras, que incluyen, la subunidad p85 de PI3-K, la familia Src de cinasas, las moléculas adaptadoras (Shc, Crk, Nck, Grb2) y Ras-GAP. Los dominios SH2/SH3 son dianas para fármacos contra el cáncer y se comentan en Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32.

Los inhibidores de las serina/treonina cinasas incluyen bloqueadores de la cascada de cinasa MAP, que incluyen bloqueadores de cinasas Raf (rafk), cinasas reguladas por mitógeno o por señales extracelulares (MEK) y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK); y bloqueadores de los miembros de la familia de proteínas cinasas C, incluyendo bloqueadores de las PKC (alfa, beta, gamma, épsilon, mu, lambda, iota, zeta). La familia de las cinasas Ikb (IKKa, IKKb), las cinasas de la familia PKB, los miembros de la familia de cinasas akt y las cinasas receptoras de TGF beta. Dichas serina/treonina cinasas e inhibidores de las mismas se describen en Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P, Samani, A. y Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A. y Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27; Lackey, K. et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; patente de Estados Unidos N.º 6.268.391; y Martinez-lacaci, L., et al, Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52.

Los inhibidores de los miembros de la familia de fosfatidil inositol-3 cinasa que incluyen bloqueadores de cinasa PI3, ATM, ADN-PK y Ku, también son útiles en la presente invención. Dichas cinasas se comentan en Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, DS (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29 (7):935-8; y Zhong, H. et al, Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545.

En la presente invención también son útiles los inhibidores de señalización del mioinositol, tales como los bloqueadores de fosfolipasa C y análogos de mioinositol. Dichos inhibidores de señalización se describen en Powis, G., y Kozikowski A., (1994) New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman y David Kerr, CRC press 1994, Londres.

Otro grupo de inhibidores de las vías de transducción de señales son los inhibidores del oncogén Ras. Dichos inhibidores incluyen inhibidores de farnesiltransferasa, geranil-geranil transferasa y proteasas CAAX, así como oligonucleótidos antisentido, ribozimas y agentes inmunoterapéuticos. Se ha demostrado que dichos inhibidores bloquean la activación de ras en células que contienen ras mutante de tipo silvestre, actuando así como agentes antiproliferativos. La inhibición del oncogén Ras se comenta en Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I.

Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4) 292-8; Ashby, M.N. (1998), Current Opinion en Lipidology. 9 (2) 99 - 102; y BioChim. Biophys. Acta, (1989) 1423(3):19-30.

Como se ha mencionado anteriormente, los antagonistas de anticuerpos contra la unión al ligando de cinasas receptoras también pueden servir como inhibidores de la transducción de señales. Este grupo de inhibidores de las vías de transducción de señales incluyen el uso de anticuerpos humanizados contra el dominio de unión a ligando extracelular de tirosina cinasas receptoras. Por ejemplo, el anticuerpo C225 de Imclone específico contra EGFR (véase Green, M.C. et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4), 269-286); el anticuerpo Herceptin® contra erbB2 (véase Tyrosine Kinase Signalling en Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183); y el anticuerpo específico 2CB contra VEGFR2, (véase Brekken, R.A. et al, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124).

Agentes antiangiogénicos: También pueden ser útiles los agentes antiangiogénicos, incluyendo inhibidores no receptores de la angiogénesis. Los agentes antiangiogénicos, tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo, el anticuerpo bevacizumab contra el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares [Avastin™] y los compuestos que actúan mediante otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha v \beta 3$, endostatina y angiostatina);

Agentes inmunoterapéuticos: También pueden ser útiles en combinación con los compuestos de fórmula (I) los agentes utilizados en regímenes inmunoterapéuticos. Las estrategias de inmunoterapia, incluyen, por ejemplo, estrategias *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tales como la transfección con citocinas tales como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, estrategias para disminuir la anergia de los linfocitos T, estrategias que utilizan células inmunitarias transfectadas, tales como células dendríticas transfectadas con citocinas, estrategias que utilizan líneas celulares tumorales transfectadas con citocinas y estrategias que utilizan anticuerpos antidiotípicos

Agentes proapoptóticos: En la combinación de la presente invención también pueden utilizarse agentes que se utilizan en regímenes proapoptóticos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido bcl-2).

Inhibidores de señalización del ciclo celular: Los inhibidores de señalización del ciclo celular inhiben moléculas implicadas en el control del ciclo celular. Una familia de proteína cinasas denominada cinasas dependientes de ciclina (CDK, *cyclin dependent kinases*) y su interacción con una familia de proteínas denominadas ciclinas, controla la progresión a través del ciclo celular eucariota. La activación e inactivación coordinada de diferentes complejos de ciclina/CDK son necesarias para la progresión normal a través del ciclo celular. Actualmente están en desarrollo varios inhibidores de señalización del ciclo celular. Por ejemplo, se describen ejemplos de cinasas dependientes de ciclina, incluyendo CDK2, CDK4 y CDK6 e inhibidores de las mismas, en Rosania et al, Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(2):215-230.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o un solvato del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado de agentes antimicrotúbulos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa I, hormonas y análogos de hormonas, inhibidores de vías de transducción de señales, inhibidores de angiogénesis de tirosinas no receptoras, agentes inmunoterapéuticos, agentes proapoptóticos e inhibidores de la señalización del ciclo celular.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o un solvato del mismo y al menos un agente antineoplásico que es un agente antimicrotúbulos seleccionado de diterpenoides y alcaloides de la vinca.

En una realización adicional, al menos un agente antineoplásico es un diterpenoide.

En una realización adicional, al menos un agente antineoplásico es un alcaloide de la vinca.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o un solvato del mismo y al menos un agente antineoplásico, que es un complejo de coordinación de platino.

En una realización adicional, al menos un agente antineoplásico es paclitaxel, carboplatino o vinorelbina.

En una realización adicional, al menos un agente antineoplásico es carboplatino.

En una realización adicional, el al menos un agente antineoplásico es vinorelbina.

En una realización adicional, el al menos un agente antineoplásico es paclitaxel.

En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I y las sales o los

solvatos del mismo y al menos un agente antineoplásico que es un inhibidor de la vía de transducción de señales.

En una realización adicional, el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor de una cinasa receptora del factor de crecimiento VEGFR2, TIE2, PDGFR, BTK, erbB2, EGFr, IGFR-1, TrkA, TrkB, TrkC o c-fms.

En una realización adicional, el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor de una serina/treonina cinasa rafk, akt o PKC-zeta.

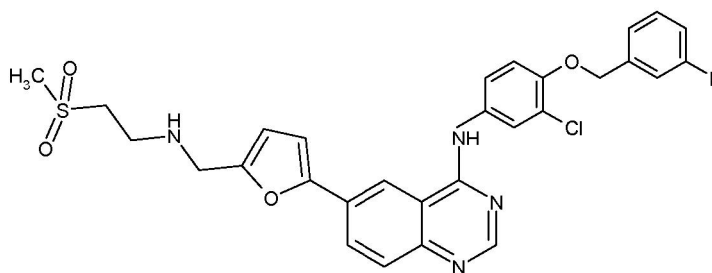
En una realización adicional, el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor de una tirosina cinasa no receptora seleccionada de la familia src de cinasas.

En una realización adicional el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor de c-src.

En una realización adicional el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor del oncogén Ras seleccionado de inhibidores de farnesil transferasa y geranilgeranil transferasa.

En una realización adicional, el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor de una serina/treonina cinasa seleccionada del grupo que consiste en PI3K.

En una realización adicional, el inhibidor de la vía de transducción de señales es un inhibidor doble de EGFr/erbB2, por ejemplo N-{3-Cloro-4-[(3-fluorobencil)oxi]fenil}-6-[5-({[2-(metanosulfonil)etil] amino}metil)-2-furil]-4-quinazolinamina (de estructura mostrada a continuación):



En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o un solvato del mismo y al menos un agente antineoplásico que es un inhibidor de la señalización del ciclo celular.

En una realización adicional, el inhibidor de la señalización del ciclo celular es un inhibidor de CDK2, CDK4 o CDK6.

En una realización, en los métodos y usos de la presente invención, el mamífero es un ser humano.

Tal como se indica, a un ser humano se le administran cantidades terapéuticamente eficaces de los constituyentes activos en combinaciones y terapias de combinación de la invención (un antagonista de PD-1 y Compuesto A y Compuesto B). Normalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes administrados de la presente invención dependerá de diversos factores, incluyendo, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto, la afección exacta que requiere tratamiento, la gravedad de la afección, la naturaleza de la formulación, y la vía de administración. En última instancia, la cantidad terapéuticamente eficaz será según el criterio del médico o veterinario a cargo del tratamiento.

Las combinaciones de la presente invención se someten a ensayo para determinar su eficacia y sus propiedades ventajosas y sinérgicas según procedimientos conocidos. Convenientemente, las combinaciones de la invención se someten a ensayo para determinar su eficacia, sus propiedades ventajosas y sinérgicas generalmente de acuerdo con los siguientes ensayos de combinación de proliferación celular. Las células se siembran en placas de 384 pocillos a 500 células/pocillo en un medio de cultivo apropiado para cada tipo de célula, complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y se incuban durante la noche a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se tratan en cuadrícula con la dilución del Compuesto A (20 diluciones, sin incluir ningún compuesto, de diluciones dobles partiendo de 1-20 mM dependiendo del compuesto) de izquierda a derecha en una placa de 384 pocillos; y opcionalmente también se tratan con Compuesto B (20 diluciones, sin incluir ningún compuesto, de diluciones dobles partiendo de 1-20 mM dependiendo del compuesto) de arriba a abajo en una placa de 384 pocillos; y también se tratan con un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y se incuban como antes durante 72 horas más. En algunos casos, los compuestos se añaden de manera gradual y el tiempo de incubación se puede ampliar hasta 7 días. El crecimiento celular se mide utilizando el reactivo CellTiter-Glo® de acuerdo con el protocolo del fabricante y las señales se leen en un lector PerkinElmer EnVision™ configurado para el modo de luminiscencia con una lectura de 0,5 segundos. Los datos se analizan como se describe a continuación.

Los resultados se expresan como un porcentaje del valor t = 0 y se representan gráficamente frente a la

concentración del compuesto o de los compuestos. El valor $t = 0$ se normaliza al 100 % y representa el número de células presentes en el momento de la adición del compuesto. La respuesta celular se determina para cada compuesto y/o combinación de compuestos utilizando un ajuste de curva de 4 o 6 parámetros de la viabilidad celular frente a la concentración utilizando el programa adicional IDBS XLfit del programa informático Microsoft Excel y determinando la concentración necesaria para que se produzca una inhibición del crecimiento celular del 50 % (IC_{50}). La corrección de fondo se realiza restando los valores de los pocillos que no contienen células. Para cada combinación de fármacos, se calcula un índice de combinación (IC), el sobreexceso del agente único más alto (EOHSA, *Excess Over Highest Single Agent*) y el sobreexceso Bliss (EOBliss, *Excess Over Bliss*) de acuerdo con métodos conocidos, tales como los descritos en Chou y Talalay (1984) *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 37 a 55; y Berenbaum, MC (1981) *Adv. Cancer Research*, 35, 269-335.

Las combinaciones de la presente invención se someten a ensayo en los ensayos anteriores para determinar la utilidad terapéutica ventajosa en el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 1 - Composición del kit

La sacarosa, la celulosa microcristalina y los compuestos A y B de la combinación de la invención, como se muestra en las Tablas I y II a continuación, se mezclan y se granulan individualmente en las proporciones indicadas con una solución de gelatina al 10 %. Los gránulos húmedos se tamizan, se secan, se mezclan con almidón, talco y ácido esteárico, y después se tamizan y se comprimen en un comprimido. Como se describe en la Tabla III, en el kit también se incluye un vial de MK-3475.

Tabla I

PRINCIPIOS ACTIVOS	CANTIDADES
N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida dimetilsulfóxido (el solvato de dimetilsulfóxido del Compuesto A)	2 mg
Celulosa microcristalina	300 mg
Sacarosa	4 mg
Almidón	2 mg
Talco	1 mg
ácido esteárico	0,5 mg

Tabla II

PRINCIPIOS ACTIVOS	
N-{3-[5-(2-Amino-4-pirimidinil)-2-(1,1-dimetiletil)-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobenzenosulfonamida metanosulfonato, (la sal de metanosulfonato del compuesto B)	200 mg
Celulosa microcristalina	200 mg
Sacarosa	10 mg
Almidón	40 mg
Talco	20 mg
ácido esteárico	5 mg

Tabla III

MK-3475 puede suministrarse como una solución que consiste en 25 mg/ml de MK-3475, sacarosa al 7 % (p/v), polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) en tampón de histidina 10 mM pH 5,5.

Ejemplo 2. Respuesta antitumoral de la administración simultánea de un antagonista de PD-1 y Trametinib a ratones portadores de tumores.

Este experimento comparó la respuesta antitumoral de ratones portadores de tumores con la del tratamiento con uno de los tres regímenes: (i) monoterapia con un anticuerpo monoclonal murino anti-PD-1 de ratón de isotipo IgG1 murino (Anti-PD1); (ii) monoterapia con trametinib y (iii) terapia de combinación con anti-PD1 y trametinib administrados al mismo tiempo. El isotipo IgG1 murino es el isotipo homólogo murino del isotipo IgG4 humano.

Aunque las células tumorales o los explantes tumorales humanos pueden crecer en animales inmunodeficientes como xenoinjertos, éstos no pueden utilizarse para someter a ensayo agentes inmunoterapéuticos debido a la falta de un sistema inmunitario funcional. Para una evaluación significativa de agentes inmunoterapéuticos o de una combinación de agentes inmunoterapéuticos con otros agentes, es necesario utilizar un modelo singénico en el que los tumores singénicos crezcan en animales con un sistema inmunitario intacto. CT-26 es una línea celular de

adenocarcinoma colorrectal murino singénica a la cepa de ratón BALB/c. CT-26 lleva una mutación KRAS que activa la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos, lo que lo convierte en un modelo relevante para evaluar la sensibilidad a trametinib (un inhibidor de proteínas cinasas activadas por mitógenos). Este es también un sistema modelo relevante para evaluar el mecanismo de acción de un anticuerpo anti-PD-1 debido al perfil molecular traducible de este tumor después de la terapia anti-PD-1.

El estudio comenzó implantando a ratones portadores de tumores 3×10^5 células CT-26 subconfluentes y en fase logarítmica en el costado dorsal inferior derecho de ratones BALB/c hembra de 7-8 semanas de vida con un peso corporal medio de 20 gramos. Cuando en estos ratones el volumen tumoral medio alcanzó ~ 126 mm³ (FIG 8B, panel izquierdo marcado como Día 0), los ratones portadores de tumores se asignaron al azar a 4 grupos de tratamiento de 12 ratones por grupo: (1) grupo tratado con isotipo + control con Vehículo; (2) Anti-PD1 + control con Vehículo; (3) trametinib + control de isotipo y (4) anti-PD1 + trametinib. El control con vehículo era HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa, Sigma) al 0,5 % y Tween 80 al 0,2 % (Sigma) en agua apta para inyección, pH 8,0. El control de isotipo era un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el hexón 25 adenovírico y era del isotipo IgG1 murino. A los grupos de tratamiento 2 y 4 se les administró por vía i.p. (intraperitoneal) una dosis de 10 mg/kg de anti-PD1, cada 5 días para cada uno de los 5 ciclos, designándose la primera dosis como Día 0 en la Figura 8. A los grupos de tratamiento 3 y 4 se les administró trametinib a una dosis de 1 mg/kg todos los días durante 23 días, designándose la primera dosis como Día 0 en la Figura 8.

Sorprendentemente, la administración de trametinib, un potencial agente inmunosupresor de linfocitos T, no pareció antagonizar los efectos antitumorales de Anti-PD1 en el grupo de tratamiento de combinación. En cambio, como lo demuestran los resultados mostrados en la Figura 8, la respuesta antitumoral media de la administración simultánea de Anti-PD1 y trametinib fue mayor ($p < 0,001$) que la respuesta antitumoral observada con cualquiera de los tratamientos con un solo agente. Además, al final del período de tratamiento de 23 días, la terapia de combinación produjo una regresión completa (RC) (sin tumor medible) en el 17 % de la cohorte (2 de 12 animales), mientras que en los grupos de tratamiento con un solo agente no se observaron RC. Comparando los volúmenes tumorales medios al final del estudio (FIG 8B, panel derecho) utilizando las pruebas ANOVA unidireccional/Bonferroni, los volúmenes tumorales de los ratones tratados con la combinación de trametinib + Anti-PD1 fueron significativamente más pequeños que los de los tratados solo con trametinib.

Ejemplo 3. Seguridad clínica y eficacia de una combinación de un antagonista de PD-1, un inhibidor de MEK y un inhibidor de BRAF.

Para evaluar la seguridad y eficacia de MK-3475 en combinación con trametinib y dabrafenib en sujetos con melanoma avanzado, se realizó un estudio en fase I/II. Este estudio era un ensayo clínico multicéntrico, a nivel mundial, en fase I/II en 3 partes, de MK-3475 intravenoso (IV) en combinación con dabrafenib y/o trametinib oral en sujetos con melanoma avanzado o metastásico que se realizó de conformidad con las prácticas clínicas adecuadas.

La parte 1 es una parte del estudio abierto, no aleatorizado, multisitio, que utiliza un diseño tradicional 3+3 para el aumento de la dosis para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la dosificación de MK-3475 en combinación con dabrafenib y trametinib (MK+D+T) en sujetos con melanoma positivos a mutación BRAF (V600 E/K). La parte 2 es una parte del estudio abierto, no aleatorizado, multisitio, que utiliza una o más cohortes de expansión para evaluar adicionalmente la seguridad y confirmar la dosis de (MK+D+T). Además, en la parte 2, la cohorte o cohortes de expansión se utilizarán para evaluar adicionalmente la seguridad y la eficacia preliminar en la combinación (MK+T). La parte 3 es un estudio con dos grupos, asignados al azar (1:1), comparativo con tratamiento activo, multisitio, de la dosis confirmada de la combinación triple (MK+D+T) frente a placebo en combinación con D+T (PBO+D+T). Los sujetos se estratificaron según la escala de rendimiento (0 frente a 1) del *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG, Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este (de los Estados Unidos)) y el nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) ($> 1,1 \times$ LSN frente a $\leq 1,1 \times$ LSN (límite superior de la normalidad)). En la siguiente tabla se presenta un resumen más detallado del estudio.

Indicación clínica	Tratamiento de sujetos con melanoma avanzado o metastásico
Tipo de ensayo clínico	Intervencionista
Tipo de control	Control sin tratamiento en las Partes 1 y 2. Placebo (terapia activa estándar con un complemento de placebo) en la Parte 3.
Vía de administración	Intravenosa (MK-3475) Oral (trametinib) Oral (dabrafenib)
Ocultación del ensayo clínico	Partes 1 y 2: Abierto sin ocultación Parte 3: Con ocultación doble

(continuación)

Indicación clínica	Tratamiento de sujetos con melanoma avanzado o metastásico
Grupos de tratamiento	En la Parte 1 (diseño 3+3), cohortes de 3 o 6 sujetos con melanoma [V600 E/K] BRAF mutante, recibirán dosis de aumento escalonado de MK-3475 en combinación con trametinib 2 mg UVD y dabrafenib 150 mg DVD: MK-3475 2 mg/kg c3semanas MK-3475 10 mg/kg c2semanas Además, en la Parte 1 (diseño 3 + 3), cohortes de 3 o 6 sujetos con melanoma BRAF natural [sin V600]), recibirán dosis de aumento escalonado de MK-3475 en combinación con trametinib 2 mg UVD: MK-3475 2 mg/kg c3semanas MK-3475 10 mg/kg c2semanas Aproximadamente, 18 sujetos se inscribirán en la Parte 1 (~ 9 para la terapia de combinación (MK+D+T) y ~ 9 para la terapia de combinación (MK+T)). En la Parte 1, y solo en el caso de que el nivel de dosis 1 no sea tolerable en la terapia de combinación (MK+D+T), cohortes de 3 o 6 sujetos con melanoma BRAF mutante [V600 E/K] recibirán dosis de aumento escalonado de MK-3475 en combinación con dabrafenib 150 mg DVD (diseño 3+3): MK-3475 2 mg/kg c3semanas MK-3475 10 mg/kg c2semanas Para la terapia combinada (MK+D), se inscribirán aproximadamente 9 sujetos, pero solo si el nivel de dosis 1 no es tolerable en la combinación (MK + D + T). La Parte 2 ampliará la(s) cohorte(s) de la Parte 1 para la confirmación de la dosis. En la Parte 2 se inscribirán aproximadamente 66 sujetos, ~ 20 para (MK+D+T) y ~ 46 para (MK+T). En la parte 3, aproximadamente 120 sujetos con melanoma BRAF mutante [V600 E/K] serán asignados al azar 1:1 a: (a) la dosis confirmada de MK-3475, trametinib 2 mg UVD, dabrafenib 150 mg DVD o, (b) placebo (solución salina IV), trametinib 2 mg UVD, dabrafenib 150 mg DVD. Observación: La combinación de tres dosis de todos los tratamientos utilizados en la Parte 3 será confirmada por las Partes 1 y 2 del estudio.
Número de sujetos del ensayo clínico	Aproximadamente 89 sujetos se inscribirán en la investigación de la terapia de combinación (MK+D+T) (este total incluye sujetos de grupos específicos en las Partes 1 y 2, y sujetos en el grupo activo con ocultación (MK+D+T) de la Parte 3). Adicionalmente, en la Parte 3 del estudio, 60 sujetos recibirán PBO (solución salina IV) + (D+T). En la investigación de la terapia de combinación (MK+T) (solo Partes 1 y 2) se inscribirán ~ 55 sujetos. En el estudio general, se inscribirán ~ 204 sujetos.
Duración estimada del ensayo clínico	El patrocinador estima que el ensayo clínico durará aproximadamente 44 meses desde el momento en el que el primer sujeto firma el consentimiento informado hasta la última visita del último sujeto.

(continuación)

Indicación clínica	Tratamiento de sujetos con melanoma avanzado o metastásico
Duración de la participación	Cada sujeto participará en el ensayo clínico desde el momento en el que el sujeto firma el Formulario de consentimiento informado (FCI) hasta el contacto final especificado en el protocolo. Después de una fase de selección de hasta 28 días, los sujetos admisibles recibirán el tratamiento asignado el Día 1 del ciclo de dosificación. El tratamiento con MK-3475, trametinib y/o dabrafenib, continuará hasta que se documente la progresión de la enfermedad, uno o más acontecimientos adversos inaceptables, un dolor intercurrente que impida la administración de un tratamiento posterior, la decisión del investigador de retirar al sujeto, que el sujeto retire su consentimiento, que exista embarazo, que no se cumplan los requisitos del procedimiento o tratamiento del ensayo clínico, o razones administrativas. Los sujetos tratados con MK-3475, que obtienen una respuesta completa después de al menos 6 meses de tratamiento del estudio, pueden considerar suspender el tratamiento con MK-3475 (según el criterio del investigador después de recibir al menos dos dosis por encima de la determinación de la respuesta completa inicial), aunque continúan el tratamiento con trametinib y/o dabrafenib. Los sujetos que suspenden el tratamiento con MK-3475 pueden admitirse para un nuevo tratamiento después de experimentar la progresión de la enfermedad según el criterio del investigador si cumplen con los criterios para el nuevo tratamiento; esto se denominará Fase del Segundo Ciclo. El tratamiento con MK-3475 puede continuar durante un máximo de 24 meses. Una vez finalizados todos los tratamientos, se hará un seguimiento de cada sujeto durante un mínimo de 30 días para controlar los acontecimientos adversos (los acontecimientos adversos graves se recopilarán hasta 90 días después del final del tratamiento). Los sujetos tendrán un seguimiento posterior al tratamiento para determinar el estado de la enfermedad, incluyendo el inicio de un tratamiento contra el cáncer fuera del estudio y experimentar la progresión de la enfermedad, hasta la muerte, la retirada del consentimiento o la pérdida en el seguimiento.
Proporción de asignación al azar	Parte 3: 1:1

En la siguiente tabla se proporciona una breve descripción de las secuencias del listado de secuencias.

SEQ ID NO:	Descripción
1	CDR1 de cadena ligera de hPD-1.08A
2	CDR2 de cadena ligera de hPD-1.08A
3	hPD-1.08A cadena ligera CDR3
4	hPD-1.08A CDR1 de cadena pesada
5	hPD-1.08A CDR2 de cadena pesada
6	hPD-1.08A CDR3 de cadena pesada
7	CDR1 de cadena ligera de hPD-1.09A
8	CDR2 de cadena ligera de hPD-1.09A
9	CDR3 de cadena ligera de hPD-1.09A
10	CDR1 de cadena pesada de hPD-1.09A
11	CDR2 de cadena pesada de hPD-1.09A
12	CDR3 de cadena pesada de hPD-1.09A
13	Región variable de cadena pesada de 109A-H
14	Cadena pesada de longitud completa de 409A-H
15	Región variable de cadena ligera de K09A-L-11
16	Región variable de cadena ligera de K09A-L-16
17	Región variable de cadena ligera de K09A-L-17
18	Cadena ligera de longitud completa de K09A-L-11
19	Cadena ligera de longitud completa de K09A-L-16
20	Cadena ligera de longitud completa de K09A-L-17
21	Cadena pesada de MK-3475
22	Cadena ligera de MK-3475
23	Cadena pesada de nivolumab
24	Cadena ligera de nivolumab

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck Sharp & Dohme Corp. GLAXOSMITHKLINE LLC

<120> TERAPIAS DE COMBINACIÓN PARA EL CÁNCER

<130> 23740

5 <150> 61/829472
<151> 31/05/2013

10 <150> 61/873476
<151> 04/09/2013

<150> 61/981906
<151> 21/04/2014

15 <160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> CDR de cadena ligera de anticuerpo

<400> 1

	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Phe	Ser	Tyr	Leu	His
	1				5					10					15

30 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> CDR de cadena ligera de anticuerpo

<400> 2

40

	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
	1				5		

45 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> CDR de cadena ligera de anticuerpo

<400> 3

	Gln	His	Ser	Trp	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr
	1				5				

55 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> CDR de cadena pesada de anticuerpo

<400> 4

Ser Tyr Tyr Leu Tyr
1 5

5 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR de cadena pesada de anticuerpo

<400> 5

Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

15 Ser

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> CDR de cadena pesada de anticuerpo

25 <400> 6

Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> CDR de cadena ligera de anticuerpo

<400> 7

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

40 <210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> CDR de cadena ligera de anticuerpo

<400> 8

50 Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

55 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 822 665 T3

<220>
 <223> CDR de cadena ligera de anticuerpo
 5 <400> 9
 Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
 1 5
 10 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> CDR de cadena pesada de anticuerpo
 <400> 10
 Asn Tyr Tyr Met Tyr
 1 5
 20 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> CDR de cadena pesada de anticuerpo
 <400> 11
 30 Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asn
 35 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> CDR de cadena pesada de anticuerpo
 <400> 12
 Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 45 <210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado
 <400> 13

ES 2 822 665 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

ES 2 822 665 T3

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr		
			20					25						30			
Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
		35					40					45					
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe		
	50					55					60						
Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
		115					120					125					
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala		
	130					135					140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145					150					155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				165					170					175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
			180					185					190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys		
		195					200					205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro		
	210					215					220						
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
225					230					235					240		
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
				245					250					255			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu		

ES 2 822 665 T3

260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445

<210> 15
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 15

ES 2 822 665 T3

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

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

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 16

ES 2 822 665 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 17

ES 2 822 665 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 18

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

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

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

ES 2 822 665 T3

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 19

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

ES 2 822 665 T3

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 20

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

ES 2 822 665 T3

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 21
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado

<400> 21

ES 2 822 665 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 822 665 T3

				35						40						45			
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe				
50						55				60									
Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr				
65					70				75						80				
Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln				
			100					105					110						
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val				
			115				120					125							
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala				
130						135					140								
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser				
145					150					155					160				
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val				
				165					170					175					
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro				
			180					185					190						
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys				
		195					200					205							
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro				
210						215					220								
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val				
225					230					235					240				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr				
				245					250					255					
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu				
			260					265					270						
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys				
		275					280					285							

ES 2 822 665 T3

Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
290						295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370					375					380				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385					390					395					400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405					410					415	
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425					430		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
		435					440					445			

<210> 22
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 22

ES 2 822 665 T3

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Ser	20	25	30	
Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	35	40	45	
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	65	70	75	80
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	85	90	95	
Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	100	105	110	
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	115	120	125	
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	130	135	140	
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	145	150	155	160
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	165	170	175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	180	185	190	
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	195	200	205	
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210	215								

<210> 23
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 822 665 T3

<400> 23

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

ES 2 822 665 T3

50						55						60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser
		115					120					125			
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	130					135					140				
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
145					150					155					160
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165					170					175	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys
			180					185					190		
Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195					200					205			
Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
	210					215					220				
Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225					230					235					240
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				245					250					255	
Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
			260					265					270		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
		275					280					285			
Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
	290					295					300				

ES 2 822 665 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 24
<211> 214
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

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

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

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

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

ES 2 822 665 T3

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 25
<211> 290
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (19)..(290)

<400> 25

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
-15 -10 -5

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
-1 1 5 10

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
15 20 25 30

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
35 40 45

ES 2 822 665 T3

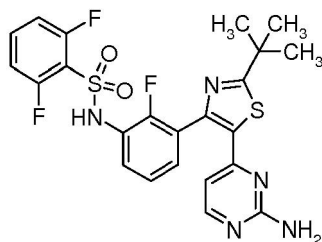
Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	50	55	60	
Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	65	70	75	
Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	80	85	90	
Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	95	100	105	110
Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	115	120	125	
Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	130	135	140	
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	145	150	155	
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	160	165	170	
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	175	180	185	190
Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	195	200	205	
Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	His	210	215	220	
Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	225	230	235	
Phe	Ile	Phe	Arg	Leu	Arg	Lys	Gly	Arg	Met	Met	Asp	Val	Lys	Lys	Cys	240	245	250	
Gly	Ile	Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu	255	260	265	270
Glu	Thr																		

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende un anticuerpo anti-PD-1 humano y un Compuesto A y un Compuesto B, en donde:

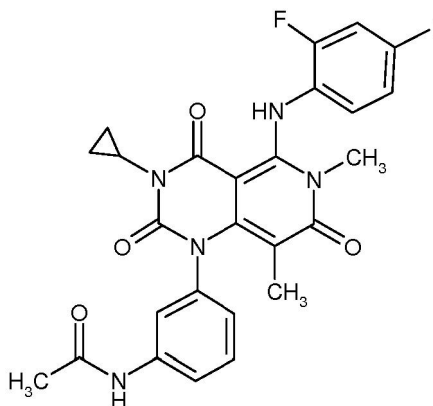
el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22;

el Compuesto B es un compuesto de estructura (II)



(II)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y
el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



(I)

o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable.

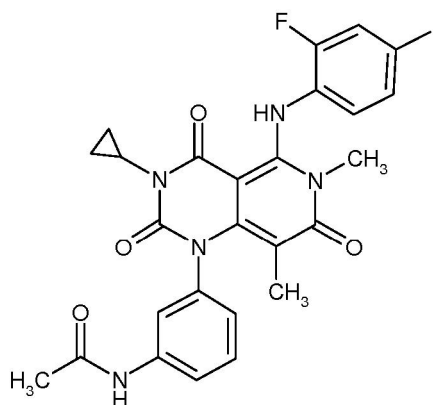
2. La combinación de la reivindicación 1, en donde el compuesto A es trametinib y el compuesto B es dabrafenib.

3. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en terapia.

4. Una composición farmacéutica para su uso en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 humano para tratar un cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende un Compuesto A y un Compuesto B junto con un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable, y en donde:

el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22;

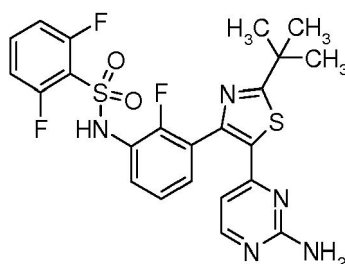
el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



(I)

o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; y el compuesto B es un compuesto de estructura (II):

5



(II)

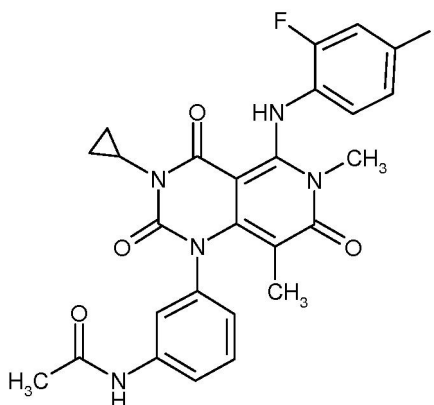
o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

10 5. La composición de la reivindicación 4, en donde el cáncer es un melanoma avanzado que da positivo para una mutación BRAF V600.

6. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1 humano junto con un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable, para su uso en una terapia de combinación para tratar un cáncer, en donde la terapia de combinación comprende la composición farmacéutica y un Compuesto A y un Compuesto B, en donde

15 el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22;

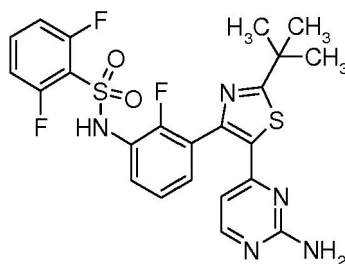
20 el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



(I)

o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable; y donde el Compuesto B es un compuesto de

estructura (II):



(II)

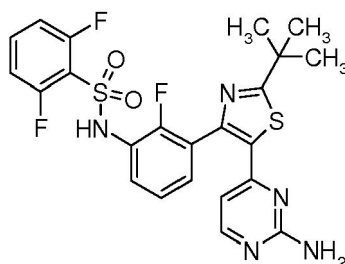
5 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

7. La composición de la reivindicación 6, en donde el cáncer es melanoma avanzado que da positivo para una mutación BRAF V600.

10 8. La composición de la reivindicación 6 o reivindicación 7, en donde el Compuesto A es trametinib, el Compuesto B es dabrafenib, y el cáncer da positivo para la expresión de PD-L1 humano.

9. Un anticuerpo anti-PD-1 humano y un compuesto A y un compuesto B, en donde:

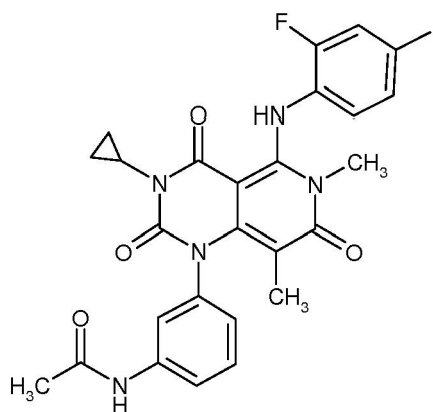
15 el anticuerpo anti-PD-1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22;
el Compuesto B es un compuesto de estructura (II):



(II)

20

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y
el Compuesto A es un compuesto de estructura (I):



(I)

25

o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable;
para uso en terapia de combinación en el tratamiento del cáncer en un mamífero.

30 10. El anticuerpo anti-PD-1 humano y un compuesto A y un compuesto B para su uso de acuerdo con la

reivindicación 9, en donde el mamífero es un ser humano diagnosticado de melanoma avanzado que da positivo para una mutación BRAF V600.

- 5 11. El anticuerpo anti-PD-1 humano y un compuesto A y un compuesto B para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el anticuerpo anti-PD-1 humano se administra en una cantidad de 2 mg/kg una vez cada 3 semanas o 10 mg/kg una vez cada 2 semanas, el trametinib se administra en una cantidad de 2 mg una vez al día y el dabrafenib se administra en una cantidad de 150 mg dos veces al día.

CDR1 de cadena ligera de hPD-1.08A (SEQ ID NO:1)

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His

CDR2 de cadena ligera de hPD-1.08A (SEQ ID NO:2)

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

CDR3 de cadena ligera de hPD-1.08A (SEQ ID NO:3)

Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr

CDR1 de cadena pesada de hPD-1.08A (SEQ ID NO:4)

Ser Tyr Tyr Leu Tyr

CDR2 de cadena pesada de hPD-1.08A (SEQ ID NO:5)

Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys Ser

CDR3 de cadena pesada de hPD-1.08A (SEQ ID NO:6)

Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr

FIG.1

CDR1 de cadena ligera de hPD-1.09A (SEQ ID NO:7)

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His

CDR2 de cadena ligera de hPD-1.09A (SEQ ID NO:8)

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser

CDR3 de cadena ligera de hPD-1.09A (SEQ ID NO:9)

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr

CDR1 de cadena pesada de hPD-1.09A (SEQ ID NO:10)

Asn Tyr Tyr Met Tyr

CDR2 de cadena pesada de hPD-1.09A (SEQ ID NO:11)

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn

CDR3 de cadena pesada de hPD-1.09A (SEQ ID NO:12)

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr

FIG.2

Región variable de cadena pesada de 109A-H (SEQ ID NO:13)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly
 Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr
 Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 Thr Val Thr Val Ser Ser

Cadena pesada de longitud completa de 409A-H (SEQ ID NO:14)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly
 Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr
 Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

FIG.3

Región variable de cadena ligera de K09-L-11 (SEQ ID NO:15)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser
 Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Región variable de cadena ligera de K09-L-16 (SEQ ID NO:16)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
 Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser
 Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

Región variable de cadena ligera de K09-L-17 (SEQ ID NO:17)

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
 Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser
 Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

FIG.4

Cadena ligera de longitud completa de K09-L-11 (SEQ ID NO:18)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser
 Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

Cadena ligera de longitud completa de K09-L-16 (SEQ ID NO:19)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
 Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser
 Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

FIG.5A

Cadena ligera de longitud completa de K09-L-17 (SEQ ID NO:20)

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
 Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser
 Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

FIG.5B

MK-3475

Cadena pesada (SEQ ID NO:21)

```

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG 50
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD 100
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK 150
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT 200
YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT 250
LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT 350
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS 400
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447

```

Cadena ligera (SEQ ID NO:22)

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPGQAPRL 50
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL 100
TFGGGKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV 150
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV 200
THQGLSSPVT KSFNRGEC 219

```

FIG.6

Nivolumab

Cadena pesada (SEQ ID NO:23)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV 50
 IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND 100
 DYWGQGTSLV VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV 150
 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH 200
 KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP 250
 EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300
 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE 350
 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY 400
 SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440

Cadena ligera (SEQ ID NO:24)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ 100
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
 LSSPVTKSFN RGEC 214

FIG.7

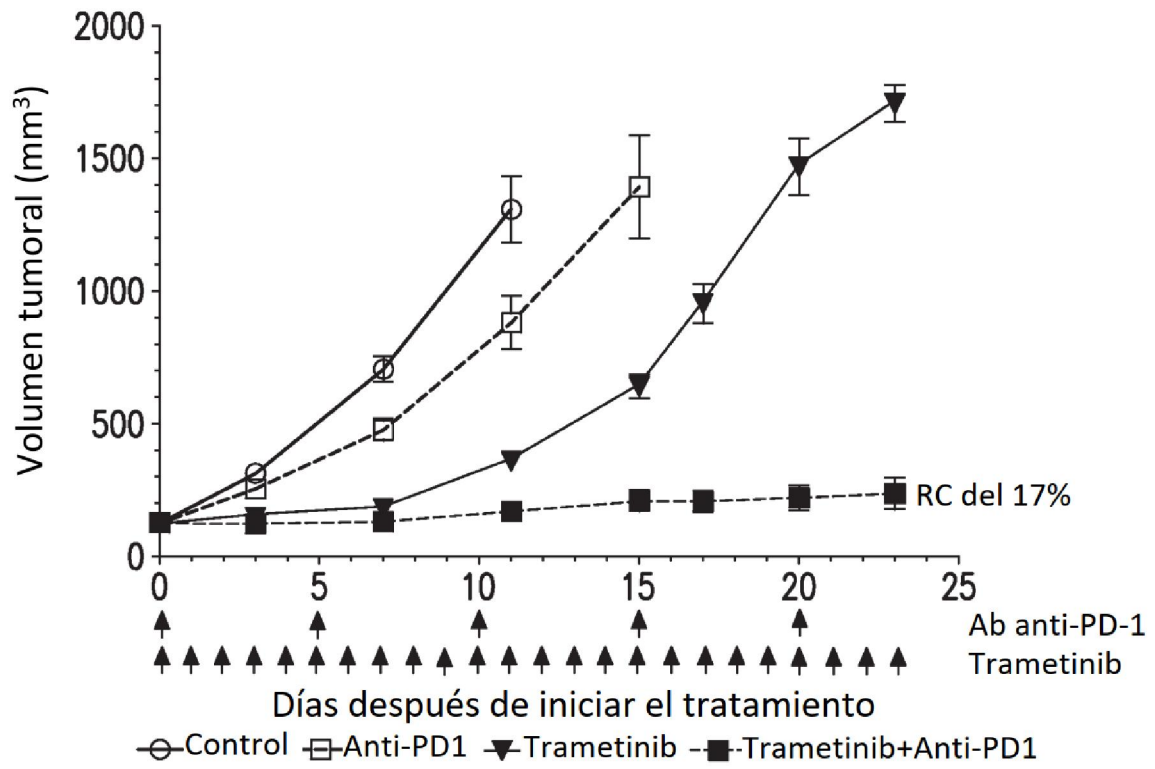


FIG.8A

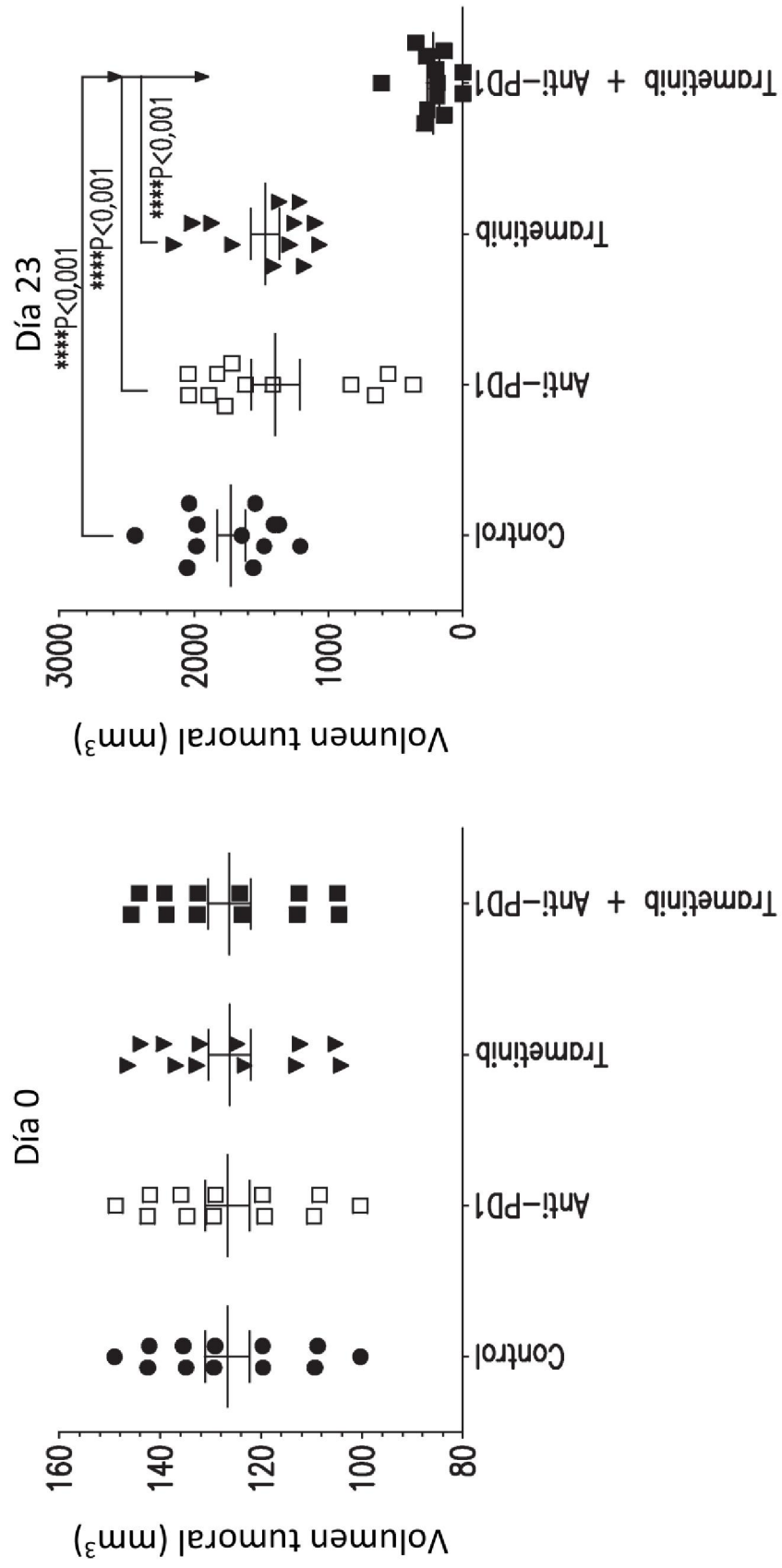


FIG.8B