

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 794**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/70 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/454 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016** **E 20171647 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3747472**

54 Título: **Combinaciones terapéuticas de un inhibidor de CD19 y un inhibidor de BTK**

30 Prioridad:

15.09.2015 US 201562218958 P

19.10.2015 US 201562243646 P

11.01.2016 US 201662277474 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.10.2024

73 Titular/es:

ACERTA PHARMA B.V. (100.0%)

Kloosterstraat 9

5349 AB Oss, NL

72 Inventor/es:

ROTHBAUM, WAYNE y

LANNUTTI, BRIAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 980 794 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

Combinaciones terapéuticas de un inhibidor de CD19 y un inhibidor de BTK

5 CAMPO DE LA INVENCION

Las combinaciones terapéuticas de un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK) y un inhibidor de CD19 y los usos de las combinaciones terapéuticas se divulgan en la presente. En particular, se divulga una combinación de un inhibidor de BTK y un inhibidor de CD19, tal como un anticuerpo dirigido a CD19 o una célula T o célula NK que expresa un receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19, y composiciones y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tirosina cinasa de Bruton (BTK) es una proteína cinasa no receptora de la familia Tec expresada en células B y células mieloides. La función de BTK en las vías de señalización activadas por la participación del receptor de células B (BCR) y FCER1 en las células cebadas está bien establecida. Las mutaciones funcionales en BTK en humanos dan por resultado una enfermedad de inmunodeficiencia primaria caracterizada por un defecto en el desarrollo de células B con un bloqueo entre las etapas de células pro y pre-B. El resultado es una ausencia casi completa de linfocitos B, provocando una reducción pronunciada de la inmunoglobulina sérica de todas las clases. Estos descubrimientos apoyan un papel clave para BTK en la regulación de la producción de auto-anticuerpos en enfermedades autoinmunitarias.

Otras enfermedades con un papel importante para las células B disfuncionales son las neoplasias malignas de células B. El papel informado de BTK en la regulación de la proliferación y apoptosis de las células B indica el potencial de los inhibidores de BTK en el tratamiento de los linfomas de células B. Por lo tanto, los inhibidores de BTK se han desarrollado como terapias potenciales, como se describe en D'Cruz and Uckun, *OncoTargets and Therapy* 2013, 6, 161-176.

El antígeno CD19 (cúmulo de diferenciación 19) se encuentra en las células B a lo largo de su vida útil. Nadler, et al., *J. Immunol.* 1983, 131, 244-50. CD19 se expresa en células cancerosas, incluidas las células cancerosas de leucemia linfoblástica aguda de células B ("B-ALL"). Nadler, et al., *J. Clin. Invest.* 1984, 74, 332-40. CD19 también se encuentra en las células dendríticas foliculares. CD19 es el antígeno de superficie celular más ampliamente expresado en neoplasias malignas de células B. CD19 es, por lo tanto, una diana para enfoques inmunoterapéuticos en cáncer y enfermedades inflamatorias usando anticuerpos monoclonales anti-CD19. Tedder, *NatRev. Rheumatol.* 2009, 5, 572-77. De manera similar, CD19 también ha sido una diana para las células T modificadas por receptor de antígeno quimérico (CAR) y las células asesinas naturales (NK). Kochenderfer y Rosenberg, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013, 10, 267-76. Estas terapias anti-CD19 han mostrado eficacia en diferentes enfermedades, incluidas las neoplasias malignas de células B, tal como leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica.

En muchos tumores sólidos, el microambiente de apoyo (que puede conformar la mayoría de la masa tumoral) es una fuerza dinámica que permite la supervivencia de tumor. El microambiente tumoral se define en general como una mezcla compleja de "células, factores solubles, moléculas de señalización, matrices extracelulares y señales mecánicas que promueven la transformación neoplásica, apoyan el crecimiento e invasión tumoral, protegen al tumor de la inmunidad del hospedador, fomentan la resistencia terapéutica y proporcionan nichos para que prosperen las metástasis dominantes", como se describe en Swartz, et al., *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473. Aunque los tumores expresan antígenos que se deben reconocer por las células T, la depuración del tumor por el sistema inmunitario es rara debido a la supresión inmunitaria por el microambiente. Abordar las células tumorales por sí mismas con, por ejemplo, quimioterapia también ha demostrado ser insuficiente para superar los efectos protectores del microambiente. Por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevos enfoques para tratamiento más efectivo de los tumores sólidos que tengan en cuenta el papel del microambiente.

El antígeno CD20, también llamado antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos Bp35, o B1), se encuentra en la superficie de los linfocitos B maduros y "pre-B" normales, incluidos los linfocitos B malignos. Nadler, et al., *J. Clin. Invest.* 1981, 67, 134-40; Stashenko, et al., *J. Immunol.* 1980, 139, 3260-85. El antígeno CD20 es una proteína de membrana integral glucosilada con un peso molecular de aproximadamente 35 kD. Tedder, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1988, 85, 208-12. CD20 también se expresa en la mayoría de las células de linfoma no de Hodgkin de células B, pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales. Los anticuerpos anti-CD20 se usan actualmente como terapias para muchas neoplasias malignas hematológicas de células B, incluido linfoma no de Hodgkin (NHL) indolente, NHL agresivo y leucemia linfocítica crónica (CLL)/leucemia linfocítica pequeña (SLL). Lim, et. al., *Haematologica* 2010, 95, 135-43; Beers, et. al., *Sem. Hematol.* 2010, 47, 107-14; Klein, et al., *mAbs* 2013, 5, 22-33. Sin embargo, existe una necesidad urgente de proporcionar terapias más eficaces en muchas neoplasias malignas hematológicas de células B.

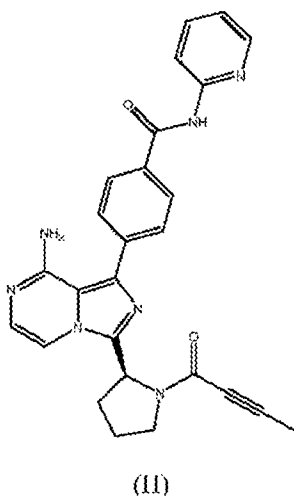
M. Ruella (20th Congress of the European Hematology Association, 13 June 2015, Vienna, Austria, p.1-2) divulga el uso de una combinación del inhibidor de BTK ibrutinib y CTL019 en el tratamiento del linfoma de células de manto (MCL).

WO 2015/110923 A2 divulga el uso de un inhibidor de BTK o la combinación de un inhibidor de BTK y un anticuerpo anti-CD20 en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia linfocítica pequeña (SLL).

La presente invención proporciona el descubrimiento inesperado de que la combinación de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) es sinérgicamente efectivo en el tratamiento de cualquiera de varios tipos de cánceres tal como leucemia, linfoma y cánceres de tumores sólidos. La presente invención proporciona además el descubrimiento inesperado de que la combinación de un anticuerpo anti-CD20 con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, es sinérgicamente efectivo en el tratamiento de cualquiera de varios tipos de cánceres tal como leucemia, linfoma y cánceres de tumores sólidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK), en donde el inhibidor de BTK es el compuesto de la fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19. En una realización, el inhibidor de CD19 es un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 expresado en una célula T o una célula asesina natural (NK).

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el inhibidor de CD19 se selecciona del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos, biosimilares de los mismos y combinaciones de los mismos.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de un cáncer, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK) de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el cáncer es una neoplasia maligna hematológica de células B, y en donde la neoplasia maligna hematológica de células B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), linfoma de Burkitt, mieloma múltiple y mielofibrosis. En una realización, el cáncer es un cáncer de tumor sólido, en donde el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello uterino, cáncer anal, cáncer de páncreas, carcinoma

- de células escamosas que incluye cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas, glioblastoma, tumor de estroma gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, sarcoma óseo, cáncer de estómago, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de colon y cáncer de cerebro. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK) de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende además el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina o paclitaxel unido a albúmina. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de un cáncer en un humano que comprende (1) una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK) de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es efectiva para inhibir la señalización entre las células tumorales del cáncer y al menos un microambiente tumoral seleccionado del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células cebadas, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T reguladoras, células asesinas naturales, células supresoras derivadas de mieloides, células B reguladoras, neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos. En una realización, el cáncer es un cáncer de tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello uterino, cáncer anal, cáncer de páncreas, carcinoma de células escamosas que incluye cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas, glioblastoma, tumor de estroma gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, sarcoma óseo, cáncer de estómago, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de colon y cáncer de cerebro. En una realización, el inhibidor de CD19 se selecciona del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; y (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica. Esta composición es para usarse en el tratamiento de cáncer.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usarse en el tratamiento de cáncer; y (3) una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos y biosimilares de los mismos. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica. En una realización, esta composición es para usarse en el tratamiento de cáncer.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende cualquiera de las composiciones anteriores.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II).
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un anticuerpo anti-CD20.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y gemcitabina.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y paclitaxel unido a albúmina.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y bendamustina.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y una combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y una combinación de rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y una combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y una combinación de bendamustina y rituximab (BR).

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La breve descripción anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderán mejor cuando se lean en conjunto con los dibujos anexos.

La figura 1 ilustra la potencia *in vivo* de la fórmula (2) (etiquetada como "inhibidor de BTK") y la fórmula (10) (ibrutinib). Los ratones se alimentaron por sonda a una concentración creciente de fármaco y se sacrificaron en un punto de tiempo (3 horas después de la dosis). El BCR se estimula con IgM y la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD86 se monitorea por citometría de flujo para determinar los valores de EC₅₀. Los resultados muestran que la fórmula (2) es más potente para inhibir la expresión de los marcadores de activación que la fórmula (10) (ibrutinib).

La figura 2 ilustra la potencia *in vitro* en sangre entera de la fórmula (2), fórmula (10) (ibrutinib) y fórmula (17) (CC-292) en la inhibición de señales a través del receptor de células B.

La figura 3 ilustra la fosforilación de receptor de EGF *in vitro* para la fórmula (2) y fórmula (10) (ibrutinib).

La figura 4 ilustra los efectos del vehículo sobre el flujo en dos puntos de tiempo en el modelo de cáncer de ovario ortotrópico singénico ID8.

La figura 5 ilustra los efectos del inhibidor de BTK de la fórmula (2) sobre el flujo en dos puntos de tiempo, para la comparación con la figura 4, en el modelo de cáncer de ovario ortotrópico singénico ID8.

La figura 6 ilustra que la respuesta tumoral al tratamiento con el inhibidor de BTK de la fórmula (2) se correlaciona con una reducción significativa en los linfocitos inmunosupresores asociados a tumores en ratones portadores de tumores, en comparación con un control (vehículo).

La figura 7 ilustra los efectos del tratamiento con el principio activo farmacéutico de la fórmula (2) sobre los volúmenes tumorales en el modelo de cáncer de páncreas KPC.

La figura 8 ilustra el esquema de dosificación usado con el modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) KrasLA2.

La figura 9 ilustra los efectos inhibidores de BTK en MDSC.

La figura 10 muestra el análisis *in vitro* de la desgranulación mediada por células NK dependientes de anticuerpos con inhibidores de BTK. Para evaluar la función de células NK, se aislaron células NK purificadas de células

mononucleares de sangre periférica sanas y se cultivaron con 0,1 o 1 μM de la fórmula (10) (ibrutinib) o 1 μM de la fórmula (2) durante 4 horas junto con células de linfoma recubiertas con rituximab (10 $\mu\text{g/ml}$), DHL4 o células de cáncer de mama HER2⁺ recubiertas con trastuzumab (10 $\mu\text{g/ml}$), HER18 y células NK aisladas y analizadas para la desgranulación por citometría de flujo para la movilización de CD107a⁺. Todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado. Las etiquetas se definen del siguiente modo: *p = 0,01, **p = 0,002, ***p = 0,003, ****p = 0,0005.

La figura 11 muestra que la fórmula (10) (ibrutinib) antagoniza la citotoxicidad mediada por células NK dependientes de anticuerpos usando la línea de células Raji. La citotoxicidad de células NK como por ciento de lisis de las células tumorales se analizó en ensayos de liberación de cromo con células NK purificadas incubadas con Raji etiquetadas con cromo durante 4 horas a concentraciones variables de rituximab a una relación efector:diana constante de 25:1 y la fórmula (10) (ibrutinib) (1 μM), fórmula (2) (1 μM) u otros inhibidores de BTK que conservan tirosina cinasa inducible (ITK) por interleucina-2 CGI-1746, inhibA (1 μM) y BGB-3111 ("inhibB", 1 μM). Todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado. Las etiquetas se definen del siguiente modo: *p = 0,001.

La figura 12 muestra que la fórmula (10) (ibrutinib) antagoniza la citotoxicidad mediada por células NK dependientes de anticuerpos en células CLL primarias. La citotoxicidad de células NK como por ciento de lisis de las células tumorales se analizó en ensayos de liberación de cromo con células NK purificadas incubadas con Raji etiquetadas con cromo durante 4 horas a concentraciones variables de rituximab a una relación efector:diana constante de 25:1 y la fórmula (10) (ibrutinib) (1 μM), fórmula (2) (1 μM) u otros inhibidores de BTK que conservan ITK CGI-1746, inhibA (1 μM) y BGB-3111 ("inhibB", 1 μM). Todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado. Las etiquetas se definen del siguiente modo: *p = 0,001.

La figura 13 muestra un resumen de los resultados dados en la figura 12 a la concentración más alta de rituximab ("Ab") (10 $\mu\text{g/ml}$).

La figura 14 muestra los resultados de desgranulación de células NK para combinaciones de obinutuzumab con la fórmula (2) y fórmula (10). Se muestra el porcentaje de células NK CD56⁺/CD107a⁺ observadas en sangre completa después del pretratamiento durante 1 hora con los inhibidores de BTK y la estimulación con células MEC-1 opsonizadas con obinutuzumab a 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 horas (n = 3).

La figura 15 muestra los efectos de la inhibición de BTK sobre la citotoxicidad generalizada mediada por células NK.

La figura 16 muestra que la fórmula (2) no tiene ningún efecto adverso sobre las células T auxiliares 17 (Th17), que son un subconjunto de células T auxiliares que producen interleucina 17 (IL-17), en tanto que la fórmula (10) (ibrutinib) inhibe fuertemente las células Th17.

La figura 17 muestra que la fórmula (2) no tiene ningún efecto sobre el desarrollo de células T reguladoras (Treg), en tanto que la fórmula (10) (ibrutinib) incrementa fuertemente el desarrollo de Treg.

La figura 18 muestra que la fórmula (2) no tiene ningún efecto sobre la viabilidad, desarrollo de células T CD8⁺, en tanto que la fórmula (10) (ibrutinib) afecta fuertemente la viabilidad de células T CD8⁺ a dosis más altas.

La figura 19 ilustra los resultados del ensayo de citotoxicidad para la función de células T CD8⁺. La fórmula (10) (ibrutinib) afecta la función de células T CD8⁺ como se mide por % de citotoxicidad, en tanto que la fórmula (2) no tiene ningún efecto sobre la función de células T CD8⁺ como se mide por % de citotoxicidad con respecto al vehículo.

La figura 20 ilustra los resultados de las mediciones del nivel de IFN- γ para la función de células T CD8⁺. La fórmula (10) (ibrutinib) afecta la función de células T CD8⁺ como se mide por el nivel de IFN- γ , en tanto que la fórmula (2) no tiene ningún efecto sobre la función de células T CD8⁺ como se mide por el nivel de IFN- γ con respecto al vehículo.

La figura 21 ilustra los resultados del estudio clínico de la fórmula (2) (etiquetada como "inhibidor de BTK") en CLL, que se muestran en comparación con los resultados reportados para la fórmula (10) (ibrutinib) en la figura 1A de Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Los resultados muestran que el inhibidor de BTK de Fórmula (2) causa un aumento relativo mucho menor y una disminución mucho más rápida del conteo absoluto de linfocitos (ALC, por sus siglas en inglés) en relación con el inhibidor de BTK de Fórmula (10) (ibrutinib). La suma del producto de mayores diámetros (SPD) también disminuye más rápidamente durante el tratamiento con el inhibidor de BTK que con el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib).

La figura 22 muestra la SPD de los ganglios linfáticos agrandados en pacientes con CLL como una función de la dosis (cohorte) del inhibidor de BTK de la fórmula (2).

La figura 23 muestra una comparación de la supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes con CLL tratados con el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib) o el inhibidor de BTK de la fórmula (2). Los datos de ibrutinib se toman de Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Se incluyen los pacientes con CLL tratados con la fórmula (2) durante al menos 8 días.

La figura 24 muestra una comparación del número de pacientes en riesgo en pacientes con CLL tratados con el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib) o el inhibidor de BTK de la fórmula (2). Se incluyen los pacientes con CLL tratados con la fórmula (2) durante al menos 8 días.

La figura 25 muestra una comparación de la supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes con CLL que exhiben la delección 17p y tratados con el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib) o el inhibidor de BTK de la fórmula (2). Los datos del ibrutinib proceden de Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42.

La figura 26 muestra una comparación del número de pacientes en riesgo en pacientes con CLL que exhiben la delección 17p y tratados con el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib) o el inhibidor de BTK de la fórmula (2). Los datos del ibrutinib proceden de Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Se incluyen los pacientes con CLL tratados con la fórmula (2) durante al menos 8 días.

La figura 27 muestra una ocupación diana de BTK mejorada de la fórmula (2) a dosis más bajas en comparación con la fórmula (10) (ibrutinib) en pacientes con CLL recidivante/refractaria.

La figura 28 muestra el % de cambio en el nivel de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) (monocíticas) durante 28 días versus % de cambio de ALC en el ciclo 1, día 28 (C1D28) con líneas de tendencia.

La figura 29 muestra el % de cambio en el nivel de MDSC (monocíticas) durante 28 días versus % de cambio de ALC en el ciclo 2, día 28 (C2D28) con líneas de tendencia.

La figura 30 muestra el % de cambio en el nivel de células asesinas naturales (NK) durante 28 días versus % de cambio de ALC en el ciclo 1, día 28 (C1D28) con líneas de tendencia.

La figura 31 muestra el % de cambio en el nivel de células NK durante 28 días versus % de cambio de ALC en el ciclo 2, día 28 (C2D28) con líneas de tendencia.

La figura 32 compara el % de cambio en el nivel de MDSC (monocíticas) y el % de cambio en el nivel de células NK durante 28 días versus % de cambio de ALC con el % de cambio en el nivel de células T CD4⁺, células T CD8⁺, relación de células T CD4⁺/CD8⁺, células T NK, células T PD-1⁺ CD4⁺ y células T PD-1⁺ CD8⁺, también versus % de cambio de ALC, en el ciclo 1 día 28 (C1D28). Se muestran líneas de tendencia para el % de cambio en el nivel de MDSC (monocíticas) y el % de cambio en el nivel de células NK.

La figura 33 compara el % de cambio en el nivel de MDSC (monocíticas) y el % de cambio en el nivel de células NK durante 28 días versus % de cambio de ALC con el % de cambio en el nivel de células T CD4⁺, células T CD8⁺, relación de células T CD4⁺/CD8⁺, células T NK, células T PD-1⁺ CD4⁺ y células T PD-1⁺ CD8⁺, también versus % de cambio de ALC, en el ciclo 2 día 28 (C2D28). Se muestran líneas de tendencia para el % de cambio en el nivel de MDSC (monocíticas) y el % de cambio en el nivel de células NK.

La figura 34 muestra los resultados actualizados del estudio clínico de la fórmula (2) (etiquetada como "inhibidor de BTK") en CLL, que se muestran en comparación con los resultados reportados para ibrutinib en la figura 1A de Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Los resultados muestran que el inhibidor de BTK de Fórmula (2) causa un aumento relativo mucho menor y una disminución mucho más rápida del conteo absoluto de linfocitos (ALC, por sus siglas en inglés) en relación con el inhibidor de BTK de Fórmula (10) (ibrutinib). La suma del producto de mayores diámetros (SPD) también disminuye más rápidamente durante el tratamiento con el inhibidor de BTK que con el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib).

La figura 35 muestra una ocupación diana de BTK mejorada de la fórmula (2) a dosis más bajas en versus ibrutinib en pacientes con CLL recidivante/refractaria, e incluye resultados de dosificación BID.

La figura 36 ilustra la PFS para pacientes con delección 17p.

La figura 37 ilustra la PFS en pacientes con recaída/refractarios con delección 17p y con delección 11q y sin delección 17p.

La figura 38 ilustra la PFS para pacientes con delección 11q y sin delección 17p.

La figura 39 ilustra resultados de SPD actualizados del estudio clínico de la fórmula (2) en pacientes con CLL recidivante/refractaria.

La figura 40 ilustra que el tratamiento de pacientes con CLL con la fórmula (2) dio por resultado apoptosis incrementada.

La figura 41 ilustra una disminución en los niveles de CXCL12 observados en pacientes tratados con la fórmula (2).

La figura 42 ilustra fotomicrografías representativas y comparación del tamaño máximo del trombo en arteriolas lesionadas por láser de ratones mutantes VWF HA1 infundidos con plaquetas humanas en la ausencia o presencia de diferentes inhibidores de BTK. Las fotomicrografías representativas se dan como una comparación del tamaño máximo del trombo en arteriolas lesionadas por láser (se muestran concentraciones de 1 μ M).

La figura 43 ilustra una comparación cuantitativa obtenida por análisis *in vivo* de la dinámica temprana del trombo en un modelo de lesión por láser de ratón humanizado usando tres inhibidores de BTK a una concentración de 1 μ M.

La figura 44 ilustra los resultados de los estudios de agregación de plaquetas de GPVI de la fórmula (2) (IC₅₀ = 1,15 μ M) y fórmula (10) (ibrutinib, IC₅₀ = 0,13 μ M).

La figura 45 ilustra los resultados de los estudios de agregación de plaquetas de GPVI de la fórmula (2) y fórmula (10) (ibrutinib).

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIA

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab (que corresponde a SEQ ID NO: 52 en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472).

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab (que corresponde a SEQ ID NO: 53 en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472).

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab (que corresponde a SEQ ID NO: 54 en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472).

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab (que corresponde a SEQ ID NO: 55 en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472).

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab (que corresponde a SEQ ID NO: 56 en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472).

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 blinatumomab (que corresponde a SEQ ID NO: 57 en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472).

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 8 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 7 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 4 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 5 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 6 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 1 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 2 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 coltuximab (que corresponde a SEQ ID NO: 3 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0199300 A1).

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD19 denintuzumab.

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable (V_H) de scFv de FMC63 anti-CD19.

SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable (V_L) de scFv de FMC63 anti-CD19.

SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable (V_H) de scFv de SJ25C1 anti-CD19.

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable (V_L) de scFv de SJ25C1 anti-CD19.

SEQ ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:29 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:31 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:32 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:33 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:34 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:35 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:36 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:37 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:38 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:39 es la secuencia de aminoácidos de un dominio scFv anti-CD19 humanizado.

SEQ ID NO:40 es la secuencia de aminoácidos de un dominio de señalización de CD3ζ.

SEQ ID NO:41 es la secuencia de aminoácidos de un dominio de señalización de CD28.

SEQ ID NO:42 es la secuencia de aminoácidos de un dominio de señalización de 4-1BB.

SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos de un dominio transmembranal CD8α.

SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos de un dominio bisagra CD8α.

SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 murino con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 46 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 con el formato anti-CD19(scFv):Fc de IgG1(transmembrana):CD3ζ(señalización). El receptor de antígeno quimérico comprende los aminoácidos 23-634 de SEQ ID NO:46.

SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 con el formato anti-CD19(scFv):IgG4(bisagra):CD28:(transmembrana):4-1BB(señalización): CD3ζ(señalización):T2A: EGFRt.

SEQ ID NO: 48 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización): CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 52 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización): CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización): CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 54 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 56 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización):CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 58 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización): CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 59 es la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado con el formato anti-CD19(scFv):CD8α(transmembrana/bisagra):4-1BB(señalización): CD3ζ(señalización).

SEQ ID NO: 60 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab.

SEQ ID NO: 61 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab.

SEQ ID NO: 62 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 obinutuzumab.

ES 2 980 794 T3

SEQ ID NO: 63 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 obinutuzumab.

5 SEQ ID NO: 64 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

SEQ ID NO: 65 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

10 SEQ ID NO: 66 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de fragmento Fab del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

15 SEQ ID NO: 67 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de fragmento Fab del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

SEQ ID NO: 68 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 veltuzumab.

20 SEQ ID NO: 69 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 veltuzumab.

SEQ ID NO: 70 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 tositumomab.

25 SEQ ID NO: 71 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 tositumomab.

30 SEQ ID NO: 72 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ibritumomab.

SEQ ID NO: 73 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ibritumomab.

35 SEQ ID NO: 74 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID NO: 75 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

40 SEQ ID NO: 76 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID NO: 77 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-1 nivolumab.

45 SEQ ID NO: 78 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID NO: 79 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

50 SEQ ID NO: 80 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID NO: 81 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID NO: 82 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

55 SEQ ID NO: 83 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

SEQ ID NO: 84 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID NO: 85 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

60 SEQ ID NO: 86 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

65 SEQ ID NO: 87 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

ES 2 980 794 T3

SEQ ID NO: 88 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

5 SEQ ID NO: 89 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID NO: 90 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

10 SEQ ID NO:91 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID NO:92 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

15 SEQ ID NO:93 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

SEQ ID NO: 94 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pidilizumab.

SEQ ID NO: 95 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pidilizumab.

20 SEQ ID NO: 96 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-1 pidilizumab.

25 SEQ ID NO: 97 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-1 pidilizumab.

SEQ ID NO:98 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID NO:99 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

30 SEQ ID NO: 100 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

35 SEQ ID NO: 101 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID NO: 102 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID NO: 103 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

40 SEQ ID NO: 104 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID NO:105 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

45 SEQ ID NO: 106 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID NO:107 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.

SEQ ID NO:108 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

50 SEQ ID NO: 109 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID NO: 110 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

55 SEQ ID NO: 111 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (V_L) del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID NO: 112 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

60 SEQ ID NO: 113 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

65 SEQ ID NO: 114 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID NO: 115 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID NO: 116 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID NO: 117 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

SEQ ID NO: 118 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 119 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 120 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 121 es la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (V_H) del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 122 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 123 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 124 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 125 es la secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 126 es la secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

SEQ ID NO: 127 es la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Definiciones

Los términos "coadministración", "que coadministra", "administrado en combinación con", "que administra en combinación con", "simultáneo" y "concurrente", como se usan en la presente, abarcan la administración de dos o más principios activos farmacéuticos (en una realización preferida de la presente invención, por ejemplo, al menos un inhibidor de CD19 y al menos un inhibidor de BTK) a un sujeto de tal forma que ambos principios activos farmacéuticos y/o sus metabolitos estén presentes en el sujeto al mismo tiempo. La coadministración incluye la administración simultánea en composiciones separadas, administración en diferentes momentos en composiciones separadas o administración en una composición en la cual están presentes dos o más principios activos farmacéuticos. Se prefiere la administración simultánea en composiciones separadas y la administración en una composición en la cual ambos agentes están presentes.

El término "*in vivo*" se refiere a un evento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

El término "*in vitro*" se refiere a un evento que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto. Los ensayos *in vitro* abarcan ensayos basados en células en los cuales se emplean células vivas o muertas y también pueden abarcar un ensayo libre de células en el cual no se emplean células intactas.

El término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un compuesto o combinación de compuestos como se describe en la presente que es suficiente para efectuar la aplicación propuesta, incluido el tratamiento de enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de la aplicación propuesta (*in vitro* o *in vivo*), o el sujeto y condición de enfermedad que se trata (por ejemplo, el peso, edad y género del sujeto), la severidad de la condición de enfermedad, la forma de administración, que se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana (por ejemplo, la reducción de la adhesión plaquetaria y/o migración celular). La dosis específica variará dependiendo de los compuestos particulares elegidos, el régimen de dosificación que se va a seguir, si el compuesto se administra en combinación con otros compuestos, sincronización de administración, el tejido al cual se administra y el sistema de administración físico en el cual se porta el compuesto.

Un "efecto terapéutico" como se usa ese término en la presente, abarca un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o condición, retrasar o eliminar el inicio de síntomas de una enfermedad o condición, desacelerar, detener o revertir la progresión de una enfermedad o condición, o cualquier combinación de lo mismo.

Los términos "QD", "qd" o "q.d." significan *quaque die*, una vez al día o una vez diariamente. Los términos "BID", "bid" o "b.i.d." significan *bis in die*, dos veces al día o dos veces diariamente. Los términos "TID", "tid" o "t.i.d." significan *ter in die*, tres veces al día o tres veces diariamente. Los términos "QID", "qid" o "q.i.d." significan *quater in die*, cuatro veces al día o cuatro veces diariamente.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales derivadas de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica. Se pueden formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos preferidos de los cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos preferidos de los cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido salicílico. Se pueden formar sales de adición de base farmacéuticamente aceptables con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas de las cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso y aluminio. Las bases orgánicas de las cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se presentan de manera natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas. Los ejemplos específicos incluyen isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. En algunas realizaciones, la sal de adición de base farmacéuticamente aceptable se elige de sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. El término "cocristal" se refiere a un complejo molecular derivado de varios formadores de cocristales bien conocidos en la técnica. A diferencia de una sal, un cocristal habitualmente no implica la transferencia de hidrógeno entre el cocristal y el fármaco, y en su lugar implica interacciones intermoleculares, tal como enlaces de hidrógeno, apilamiento de anillos aromáticos o fuerzas dispersivas, entre el formador de cocristal y el fármaco en la estructura cristalina.

"Portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" se propone que incluya todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción e ingredientes inertes. El uso de estos portadores farmacéuticamente aceptables o excipientes farmacéuticamente aceptables para principios activos farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier portador farmacéuticamente aceptable o excipiente farmacéuticamente aceptable convencional sea incompatible con el principio activo farmacéutico, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas de la invención. También se pueden incorporar principios activos farmacéuticos adicionales, tal como otros fármacos, en las composiciones y métodos descritos.

"Profármaco" se propone que describa un compuesto que se puede convertir bajo condiciones fisiológicas o por solvolisis en un compuesto biológicamente activo descrito en la presente. Por lo tanto, el término "profármaco" se refiere a un precursor de un compuesto biológicamente activo que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede estar inactivo cuando se administra a un sujeto, pero se convierte *in vivo* en un compuesto activo, por ejemplo, por hidrólisis. El compuesto profármaco frecuentemente ofrece las ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo mamífero (ver, por ejemplo, Bundgaard, H., Design of Prodrugs (1985) (Elsevier, Amsterdam). El término "profármaco" también se propone que incluya cualquier portador unido covalentemente, que libera el compuesto activo *in vivo* cuando se administra a un sujeto. Los profármacos de un compuesto activo, como se describe en la presente, se pueden preparar al modificar los grupos funcionales presentes en el compuesto activo de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea en la manipulación de rutina o *in vivo*, para producir el compuesto de origen activo. Los profármacos incluyen, por ejemplo, compuestos en donde un grupo hidroxilo, amino o mercapto se une a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto activo se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen acetatos, formiatos y derivados de benzoato de un alcohol, diferentes derivados de éster de un ácido carboxílico, o derivados de acetamida, formamida y benzamida de un grupo funcional amina en el compuesto activo.

A menos que se señale de otro modo, se propone que las estructuras químicas representadas en la presente incluyan compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos donde uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan por deuterio o tritio, o en donde uno o más átomos de carbono se reemplazan por carbonos enriquecidos ^{13}C o C^{14} , están dentro del alcance de esta invención.

Cuando se usan intervalos en la presente para describir, por ejemplo, propiedades físicas o químicas tal como peso molecular o fórmulas químicas, se propone que se incluyan todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y realizaciones específicas en las mismas. El uso del término "aproximadamente" cuando se refiere a un número o intervalo numérico significa que el número o intervalo numérico referido es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico) y por lo tanto el número o intervalo numérico puede variar. La variación es habitualmente de 0 % a 15 %, preferentemente de 0 % a 10 %, más preferentemente de 0 % a 5 % del número o intervalo numérico señalado. El término "que comprende" (y términos relacionados tal como "comprenden" o "comprende" o "que tiene" o "que incluye") incluye aquellas realizaciones tal como, por ejemplo, una realización de cualquier composición de materia, método o proceso que "consiste en" o "consiste esencialmente en" las características descritas.

- Los "isómeros" son compuestos diferentes que tienen la misma fórmula molecular. Los "estereoisómeros" son isómeros que difieren solo en la forma en que los átomos se disponen en el espacio, es decir, que tienen una configuración estereoquímica diferente. Los "enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término "(±)" se usa para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado. Los "diastereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema R-S de Cahn-Ingold-Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada carbono quiral se puede especificar por (R) o (S). Los compuestos resueltos cuya configuración absoluta se desconoce se pueden designar (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextrógira o levógira) en la cual giran la luz polarizada plana a la longitud de onda de la línea D de sodio. Algunos de los compuestos descritos en la presente contienen uno o más centros asimétricos y por lo tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S). Las presentes entidades químicas, composiciones farmacéuticas y métodos pretenden incluir todos estos posibles isómeros, incluidas mezclas racémicas, formas ópticamente puras y mezclas intermedias. Los isómeros (R) y (S) ópticamente activos se pueden preparar usando tintones quirales o reactivos quirales, o resolver usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en la presente contienen enlaces dobles olefinicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique de otro modo, se propone que los compuestos incluyan isómeros geométricos tanto *E* como *Z*.
- "Porción" se refiere a un segmento o grupo funcional específico de una molécula. Las porciones químicas frecuentemente son entidades químicas reconocidas incrustadas o anexadas a una molécula.
- "Solvato" se refiere a un compuesto en asociación física con una o más moléculas de un solvente farmacéuticamente aceptable.
- Los compuestos divulgados en la presente para usarse en la invención también incluyen formas cristalinas y amorfas de aquellos compuestos, incluido, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, solvatos, hidratos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos), polimorfos conformacionales y formas amorfas de los compuestos, así como mezclas de los mismos. "Forma cristalina" y "polimorfo" se propone que incluyan todas las formas cristalinas y amorfas del compuesto, incluido, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, solvatos, hidratos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos), polimorfos conformacionales y formas amorfas, así como mezclas de los mismos, a menos que se haga referencia a una forma cristalina o amorfa particular.
- Las combinaciones para usarse en la invención también incluyen anticuerpos. Los términos "anticuerpo" y su forma plural "anticuerpos" se refieren a inmunoglobulinas completas y cualquier fragmento de unión a antígeno ("porción de unión a antígeno") o cadenas individuales de las mismas. Un "anticuerpo" se refiere además a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, o una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada se comprende de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se comprende de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se comprende de un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L de un anticuerpo se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, que se refieren como regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR), y que se pueden intercalar con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino a extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un epítipo o epítopos de antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores hospedadores, incluidas diferentes células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.
- Los términos "anticuerpo monoclonal", "mAb", "composición de anticuerpo monoclonal" o sus formas plurales se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular individual. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión individual y afinidad por un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales específicos para, por ejemplo, CD19, CD20, PD-1, PD-L1 o PD-L2 se pueden elaborar usando el conocimiento y la habilidad en la técnica de inyectar sujetos de prueba con antígeno de CD19, CD20, PD-1, PD-L1 o PD-L2 y entonces aislar hibridomas que expresan anticuerpos que tienen la secuencia deseada o características funcionales. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de este ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células hospedadoras tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle más adelante.
- Los términos "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usan en la presente, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la

capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD19, CD20, PD-1, PD-L1 o PD-L2). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y $CH1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (iv) un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward et al., Nature, 1989, 341, 544-546), que puede consistir en un dominio V_H o V_L ; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento F_v , V_L y V_H , se codifican por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, por un ligador sintético que les permite prepararse como una cadena de proteína individual en la cual las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como F_v de cadena individual (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 5879-5883). También se propone que estos anticuerpos scFv se abarquen dentro de los términos "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, se propone que incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no se propone que incluya anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión individual que tienen regiones variables en las cuales las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, estos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, en tanto que derivan y se relacionan con secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por los genes de región constante de cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en la presente con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

El término "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro principio activo farmacéutico o anticuerpo. Los términos "conjugado", "conjugado de anticuerpo-fármaco", "ADC" o "inmunoconjugado" se refieren a un anticuerpo, o un fragmento del mismo, conjugado con una porción terapéutica, tal como una toxina bacteriana, un fármaco citotóxico o una toxina que contiene radionúclido. La porciones tóxicas se pueden conjugar con anticuerpos de la invención usando métodos disponibles en la técnica.

Los términos "anticuerpo humanizado", "anticuerpos humanizados" y "humanizado" se refieren a anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de región marco dentro de las secuencias marco humanas. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos

que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable 15 de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento de anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 1986, 321, 522-525; Riechmann et al., *Nature* 1988, 332, 323-329; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 1992, 2, 593-596.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Un "diacuerpo" es un pequeño fragmento de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H-V_L o V_L-V_H). Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, la patente europea No. EP 404,097, publicación de patente internacional No. WO 93/11161; y Bolliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6444-6448.

El término "glucosilación" se refiere a un derivado modificado de un anticuerpo. Un anticuerpo aglucosilado carece de glucosilación. La glucosilación se puede alterar para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan por resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de marco de región variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. La glucosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5,714,350 y 6,350,861. Adicionalmente o de manera alternativa, se puede elaborar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac de bisección incrementadas. Estos y patrones de glucosilación alterados similares incrementan la capacidad de los anticuerpos. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, al expresar el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Las células con maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células hospedadoras en las cuales expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas de células Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas de células Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas de células FUT8-/- Ms704, Ms705 y Ms709 se crearon por la alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (ver, por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos No. 2004/0110704 o Yamane-Ohnuki, et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 87, 614-622). Como otro ejemplo, la patente europea No. EP 1,176,195 describe una línea de células con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica para una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en esta línea de células exhiben hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6, y también describe líneas de células que tienen una baja actividad enzimática para adicionar fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea de células de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación de patente internacional WO 03/035835 describe una línea de células CHO variante, células Lec 13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), que también da por resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (ver también Shields, et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 26733-26740. La publicación de patente internacional WO 99/54342 describe líneas de células modificadas para expresar glucosil transferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas de células modificadas exhiben estructuras de GlcNac de bisección incrementadas que dan por resultado actividad de ADCC incrementada de los anticuerpos (ver también Umana, et al., *Nat. Biotech.* 1999, 17, 176-180). De manera alternativa, los residuos de fucosa del anticuerpo se pueden escindir usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa remueve los residuos de fucosilo de los anticuerpos como se describe en Tarentino, et al., *Biochem.* 1975, 14, 5516-5523.

"Pegilación" se refiere a un anticuerpo modificado, o un fragmento del mismo, que habitualmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede, por ejemplo, incrementar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Preferentemente, la pegilación de polipéptido se lleva a cabo

mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en la presente, el término "polietilenglicol" se propone que abarque cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tal como mono (C₁-C₁₀) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. El anticuerpo que se va a pegar puede ser un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para la pegilación se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención, como se describe, por ejemplo, en la patente europea No. EP 0154316 y EP 0401384.

El término "sustituciones de aminoácidos conservadoras" significa modificaciones de secuencia de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo al antígeno. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase se define por propiedades de cadena lateral de aminoácidos fisicoquímicos comunes y altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza, como se determina, por ejemplo, por una matriz de intercambio de frecuencia Dayhoff estándar o matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de clase III, tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo agonista de OX40 se reemplaza preferentemente con otro residuo de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, Brummell, et al., *Biochemistry* 1993, 32, 1180-1187; Kobayashi, et al., *Protein Eng.* 1999, 12, 879-884 (1999); y Burks, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 412-417).

Los términos "identidad de secuencia", "por ciento de identidad" y "por ciento de identidad de secuencia" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo separaciones, si es necesario) para la máxima correspondencia, sin considerar ninguna sustitución de aminoácidos conservadora como parte de la identidad de secuencia. El por ciento de identidad se puede medir usando software o algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Se conocen diferentes algoritmos y software en la técnica que se pueden usar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Los programas adecuados para determinar el por ciento de identidad de secuencia incluyen, por ejemplo, el conjunto de programas BLAST disponible en el sitio web BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Gobierno de Estados Unidos. Las comparaciones entre dos secuencias se pueden llevar a cabo usando el algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácido nucleico, en tanto que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o MegAlign, disponibles en DNASTAR, son programas de software adicionales públicamente disponibles que se pueden usar para alinear secuencias. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para la alineación máxima por un software de alineación particular. En ciertas realizaciones, se usan los parámetros predeterminados del software de alineación.

Ciertas realizaciones de la presente invención comprenden una variante de un anticuerpo, por ejemplo, un inhibidor de CD19 que es un anticuerpo, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y/o un anticuerpo anti-PD-L2. Como se usa en la presente, el término "variante" abarca anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia por medio de una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones en ciertas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia. La variante puede comprender una o más sustituciones conservadoras en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia. Las sustituciones conservadoras pueden implicar, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. La variante retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno del anticuerpo de referencia.

El término "complejo etiquetado con radioisótopo" se refiere a la unión tanto no covalente como covalente de un isótopo radioactivo, tal como ⁹⁰Y, ¹¹¹In o ¹³¹I, a un anticuerpo, que incluye conjugados.

El término "biosimilar" significa un producto biológico que es muy similar a un producto biológico de referencia con licencia de los Estados Unidos a pesar de las pequeñas diferencias en los componentes clínicamente inactivos, y para el cual no existen diferencias clínicamente significativas entre el producto biológico y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia del producto. Además, un medicamento biológico o "biosimilar" similar es un medicamento biológico que es similar a otro medicamento biológico que ya se ha autorizado para usarse por la Agencia Europea de Medicamentos. El término "biosimilar" también se usa como sinónimo por otras agencias reguladoras nacionales y regionales. Los productos biológicos o medicamentos biológicos son medicamentos que se elaboran o derivan de/ una fuente biológica, tal como una bacteria o levadura. Pueden consistir en moléculas relativamente pequeñas tal como insulina humana o eritropoyetina, o moléculas complejas tal como anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, si el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de referencia es rituximab, un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a rituximab es un "biosimilar a" rituximab o es un "biosimilar del mismo" de rituximab. En Europa, un medicamento biológico o "biosimilar" similar es un medicamento biológico que es similar a otro medicamento biológico que ya se ha autorizado para usarse por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). La base jurídica pertinente para aplicaciones biológicas similares en Europa es el artículo 6 del Reglamento (EC) No. 726/2004 y el artículo 10, apartado 4, de la Directiva 2001/83/EC, como se enmienda y por lo tanto, en Europa, el biosimilar se puede autorizar, aprobarse para autorización o ser objeto de una solicitud de autorización bajo el artículo 6

del Reglamento (EC) No. 726/2004 y el artículo 10(4), de la Directiva 2001/83/EC. El producto medicinal biológico original ya autorizado se puede referir como "producto de medicamento de referencia" en Europa. Algunos de los requerimientos para que un producto sea considerado un biosimilar se describen en la Guía del CHMP sobre Productos Medicinales Biológicos Similares. Además, la EMA proporciona lineamientos específicos del producto, incluidos los lineamientos relacionados con los biosimilares de anticuerpos monoclonales, producto por producto y se publican en su sitio web. Un biosimilar como se describe en la presente puede ser similar al producto medicinal de referencia por medio de características de calidad, actividad biológica, mecanismo de acción, perfiles de seguridad y/o eficacia. Además, el biosimilar se puede usar o se propone que se use para tratar las mismas condiciones que el producto medicinal de referencia. Por lo tanto, se puede considerar que un biosimilar como se describe en la presente tiene características de calidad similares o muy similares a un producto medicinal de referencia. De manera alternativa o además, se puede considerar que un biosimilar como se describe en la presente tiene una actividad biológica similar o altamente similar a un producto medicinal de referencia. De manera alternativa o además, se puede considerar que un biosimilar como se describe en la presente tiene un perfil de seguridad similar o muy similar a un producto medicinal de referencia. De manera alternativa o además, se puede considerar que un biosimilar como se describe en la presente tiene una eficacia similar o altamente similar a un producto medicinal de referencia. Como se describe en la presente, un biosimilar en Europa se compara con un producto medicinal de referencia que ha sido autorizado por la EMA. Sin embargo, en algunos casos, el biosimilar se puede comparar con un producto medicinal biológico que se ha autorizado fuera del Espacio Económico Europeo (un "comparador" no autorizado por el EEA) en ciertos estudios. Estos estudios incluyen, por ejemplo, ciertos estudios clínicos e *in vivo* no clínicos. Como se usa en la presente, el término "biosimilar" también se refiere a un producto medicinal biológico que se ha o se puede comparar con un comparador no autorizado por EEA. Ciertos biosimilares son proteínas tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, porciones de unión a antígeno) y proteínas de fusión. Un biosimilar de proteína puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene modificaciones menores en la estructura de aminoácidos (que incluyen, por ejemplo, deleciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos) que no afectan significativamente la función del polipéptido. El biosimilar puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de 97 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de su producto medicinal de referencia, por ejemplo, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. El biosimilar puede comprender una o más modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glucosilación, oxidación, desamidación y/o truncamiento que es/son diferentes a las modificaciones postraduccionales del producto medicinal de referencia, siempre que las diferencias no den por resultado un cambio en la seguridad y/o eficacia del producto medicinal. El biosimilar puede tener un patrón de glucosilación idéntico o diferente al producto medicinal de referencia. Particularmente, aunque no exclusivamente, el biosimilar puede tener un patrón de glucosilación diferente si las diferencias abordan o se propone que aborden los problemas de seguridad asociados con el producto medicinal de referencia. Adicionalmente, el biosimilar puede desviarse del producto medicinal de referencia, por ejemplo, en su concentración, forma farmacéutica, formulación, excipientes y/o presentación, siempre que la seguridad y eficacia del producto medicinal no se vea comprometida. El biosimilar puede comprender diferencias, por ejemplo, en los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) en comparación con el producto medicinal de referencia, pero aún se considera suficientemente similar al producto medicinal de referencia para que se autorice o considere adecuado para autorización. En ciertas circunstancias, el biosimilar exhibe diferentes características de unión en comparación con el producto medicinal de referencia, en donde una Autoridad Reguladora tal como la EMA considera que las diferentes características de unión no son una barrera para la autorización como producto biológico similar. El término "biosimilar" también se usa como sinónimo por otras agencias reguladoras nacionales y regionales.

El término "molécula de unión", como se usa en la presente, incluye moléculas que contienen al menos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a CD19, CD20, PD-1, PD-L1 o PD-L2. Por "se une específicamente" se entiende que las moléculas de unión exhiben esencialmente una unión de fondo a, por ejemplo, moléculas no de CD19. Sin embargo, una molécula de unión aislada que se une específicamente a, por ejemplo, CD19 puede tener reactividad cruzada con moléculas de CD19 de otras especies. Una molécula de unión a CD19 también se puede referir en la presente como un "inhibidor de CD19". Una molécula de unión a PD-1 o PD-L1 también se puede referir en la presente como un "inhibidor de PD-1" o "inhibidor de PD-L1".

El término "neoplasia maligna hematológica" se refiere a cánceres y tumores de mamíferos de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, incluidos tejidos de la sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y sistema linfático. Las neoplasias hematológicas también se conocen como "tumores líquidos". Las neoplasias malignas hematológicas incluyen ALL, CLL, SLL, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica aguda (AMoL), linfoma de Hodgkin y linfomas no de Hodgkin. El término "neoplasia maligna hematológica de células B" se refiere a neoplasias malignas hematológicas que afectan a las células B.

El término "tumor sólido" se refiere a una masa anormal de tejido que usualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. El término "cáncer de tumor sólido" se refiere a tumores sólidos malignos, neoplásicos o cancerosos. Los cánceres de tumores sólidos incluyen sarcomas, carcinomas y linfomas, tal como cánceres de pulmón, mama, próstata, colon, recto y vejiga. La estructura tisular de los tumores sólidos incluye compartimentos de tejidos interdependientes que incluyen el parénquima (células cancerosas) y las células estromales de soporte en las cuales se dispersan las células cancerosas y que pueden proporcionar un microambiente de soporte.

El término "microambiente", como se usa en la presente, puede referirse al microambiente tumoral en su totalidad o a un subconjunto individual de células dentro del microambiente.

El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al cual más tarde se le reintroducirá en el individuo.

El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al cual se introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser suficientemente diferente genéticamente para interactuar antigénicamente.

El término "receptor de antígeno quimérico" se refiere a una construcción de polipéptido recombinante que comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización citoplasmática (también referido como "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora como se define más adelante. En una realización, la molécula estimuladora es la cadena zeta (ζ) asociada con el complejo receptor de células T. En una realización, el dominio de señalización citoplasmática comprende además uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora. En un aspecto, la molécula coestimuladora se elige de 4-1BB (CD137), CD27 y/o CD28. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una secuencia guía opcional en el extremo amino (extremo N-terminal) de la proteína de fusión de CAR. En una realización, el CAR comprende además una secuencia guía en el extremo N-terminal del dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, en donde la secuencia guía se escinde opcionalmente del dominio de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR en la membrana celular. El término "dominio de señalización" se refiere a la porción funcional de una proteína que actúa al transmitir información dentro de la célula para regular la actividad celular mediante rutas de señalización definidas al generar segundos mensajeros o al funcionar como efectores al responder a estos mensajeros.

Para evitar dudas, se propone en la presente que las características particulares (por ejemplo, números enteros, características, valores, usos, enfermedades, fórmulas, compuestos o grupos) descritas junto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención se entiendan como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente a menos que sea incompatible con el mismo. Por lo tanto, estas características se pueden usar cuando sea apropiado junto con cualquiera de las definiciones, reivindicaciones o realizaciones definidas en la presente. Todas las características divulgadas en esta especificación (incluidas las reivindicaciones, resumen y dibujos anexos), y/o todos los pasos de cualquier método o proceso así divulgado, se pueden combinar en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de las características y/o pasos son mutuamente excluyentes. La invención no se limita a ningún detalle de ninguna de las realizaciones divulgadas.

Coadministración de compuestos

Un aspecto de la invención es una composición, tal como una composición farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer, que comprende una combinación de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos.

Otro aspecto es un kit que contiene un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, en donde cada uno de los inhibidores se formula en una composición farmacéutica separada, y en donde estas composiciones farmacéuticas separadas se formulan para la co-administración para usarse en el tratamiento de cáncer.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer en un sujeto, tal como leucemia, linfoma o un cáncer de tumor sólido, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En una realización, el uso anterior exhibe efectos sinérgicos que pueden dar por resultado mayor eficacia, menos efectos secundarios, el uso de un principio farmacéutico menos activo para lograr un resultado clínico dado u otros efectos

sinérgicos. La composición farmacéutica que comprende la combinación y el kit son ambos para usarse en el tratamiento de la enfermedad o afección.

En una realización preferida, el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, de pulmón, colorrectal, de tiroides, sarcoma óseo y de estómago.

En una realización preferida, la leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y leucemia linfocítica crónica (CLL).

En una realización preferida, el linfoma se selecciona del grupo que consiste en linfoma de Burkitt, linfoma de células de manto, linfoma folicular, linfoma no de Hodgkin de células B indolente, linfoma histiocítico, linfoma difuso de células B grandes tipo células B activadas (DLBCL-ABC), linfoma difuso de células B grandes tipo células B de centro germinal (DLBCL-GCB) y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

En una realización, el inhibidor de BTK de la fórmula (II) está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, el inhibidor de CD19 está en forma de un anticuerpo monoclonal, un fragmento de unión a antígeno, un conjugado de anticuerpo-fármaco o un biosimilar del mismo. En una realización preferida, el inhibidor de CD19 es una célula NK o célula T que expresa un receptor de antígeno quimérico anti-CD19.

En una realización, el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se administra al sujeto antes de la administración del inhibidor de BTK de la fórmula (II).

En una realización, el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se administra simultáneamente con la administración del inhibidor de BTK de la fórmula (II).

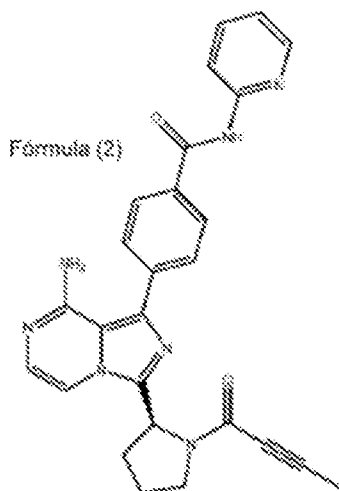
En una realización, el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se administra al sujeto después de la administración del inhibidor de BTK de la fórmula (II).

En una realización preferida, el sujeto es un mamífero, tal como un humano. En una realización, el sujeto es un humano. En una realización, el sujeto es un animal de compañía. En una realización, el sujeto es un canino, felino o equino.

Inhibidores de BTK

El inhibidor de BTK es un inhibidor de BTK de la fórmula (II) como se describe con más detalle en los siguientes párrafos.

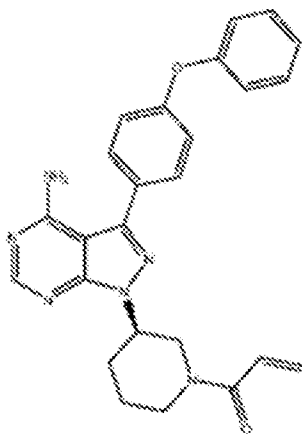
El inhibidor de BTK es un compuesto de la fórmula (2):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La preparación de este compuesto se describe en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2013/010868 y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0155385 A1.

El inhibidor de BTK es (S)-4-(8-amino-3-(1-(but-2-inoil)pirrolidin-2-il)imidazo[1,5-a]pirazin-1-il)-N-(piridin-2-il)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

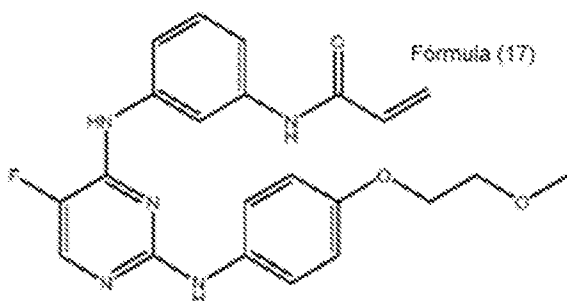
No forma parte de la presente invención, pero cuando se usa como un comparador en los ejemplos más adelante, el inhibidor de BTK es ibrutinib o una sal, solvato, hidrato, cocrystal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo. En este contexto, el inhibidor de BTK es (R)-1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona. En este contexto, el inhibidor de BTK es 1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona. En este contexto, el inhibidor de BTK tiene la estructura de la fórmula (10):



Fórmula (10)

o un enantiómero del mismo, o una sal, solvato, hidrato, cocrystal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

No forma parte de la presente invención, pero se usa como un comparador en los ejemplos que siguen, el inhibidor de BTK es CC-292 (también conocido como AVL-292), o una sal, solvato, hidrato, cocrystal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, preferentemente una sal de clorhidrato o una sal de besilato del mismo. En este contexto, el inhibidor de BTK es un compuesto de la fórmula (17):



Fórmula (17)

que es N-(3-((5-fluoro-2-((4-(2-metoxietoxi)fenil)amino)pirimidin-4-il)amino)fenil)acrilamida, o una sal, solvato, hidrato, cocrystal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, o en una realización de ejemplo es una sal de clorhidrato o una sal de besilato del mismo. La preparación de este compuesto se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2010/0029610 A1 en el ejemplo 20. La preparación de la sal de besilato de este compuesto se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2012/0077832 A1. En una realización, el inhibidor de BTK es un compuesto seleccionado de las estructuras divulgadas en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2010/0029610 A1 o No. 2012/0077832 A1.

Inhibidores de CD19, anticuerpos anti-CD19 y terapias de células anti-CD19

El inhibidor de CD19 se selecciona de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos como se describe con más detalle en los siguientes párrafos. En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en la presente proporcionan una combinación de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos con un inhibidor de BTK de la fórmula (II), y el uso de la combinación en el tratamiento de cáncer.

En una realización preferida, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD19 (es decir, un anticuerpo derivado de una línea de células individual). En una realización preferida, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD19. En una realización, el inhibidor de CD19 es un

antagonista de receptor de CD19. En una realización, el inhibidor de CD19 es un bloqueador de receptor de CD19. En algunas realizaciones, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD19, conjugado con una molécula pequeña que es citotóxica. En algunas realizaciones, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD19, conjugado con un radioisótopo. En algunas realizaciones, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19 que afecta su función a través de la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, a través de la citotoxicidad de células NK. En algunas realizaciones, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19 que afecta su función a través de la fagocitosis de células dependiente de anticuerpos (ADCP). En algunas realizaciones, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19 que afecta su función a través de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de CD19 que se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor, se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 90 pM o menor, se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 80 pM o menor, se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 70 pM o menor, se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 60 pM o menor, se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 50 pM o menor, se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 40 pM o menor, o se une a CD19 humano con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de CD19 que se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M-s o más rápida, se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M-s o más rápida, se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente 8×10^5 1/M-s o más rápida, se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente $8,5 \times 10^5$ 1/M-s o más rápida, se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente 9×10^5 1/M-s o más rápida, se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente $9,5 \times 10^5$ 1/M-s o más rápida, o se une a CD19 humano con una $K_{asociación}$ de aproximadamente 1×10^6 1/M-s o más rápida.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de CD19 que se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta o se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, o se une a CD19 humano con una $k_{disociación}$ de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lenta.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de CD19 que se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o menor, se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o menor, o se une a CD19 humano con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o menor.

En una realización, el inhibidor de CD19 es blinatumomab, también conocido como AMG103, BITE MT-103, MEDI-538 y MT103, o un fragmento de unión a antígeno, conjugado, variante o biosimilar de los mismos. Blinatumomab es una construcción de inmunoglobulina scFv-scFv. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene el formato scFv-scFv. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene el formato $scFv(V_L[\text{kappa}]-V_H) - (scFv-V_H-V_L[\text{kappa}])$, donde V_H representa una cadena pesada de inmunoglobulina, V_L representa una cadena pesada de inmunoglobulina y kappa representa una cadena ligera humana codificada por el locus kappa de inmunoglobulina. En una realización, el inhibidor de CD19 es una construcción de anticuerpo de acoplador de células T biespecífico (BITE). Garber, Nature Rev. Drug Disc. 2014,13, 799-801. En una realización, blinatumomab tiene puentes de disulfuro ubicados en 23-92, 148-222, 277-351 y 415-479; y sitios de N-glucosilación ubicados en 307 (pero un Pro ubicado en 308). Se ha descrito blinatumomab para el tratamiento de enfermedades de células B tal como linfoma no de Hodgkin de células B recidivante y leucemia linfocítica crónica. Baeuerle, et al., Cancer Res. 2009, 69, 4941-4944. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende una construcción de anticuerpo de cadena individual biespecífico que comprende dominios de unión específicos para CD3 humano y CD19 humano, en donde las regiones de cadena pesada variable correspondientes (V_H) y las regiones de cadena ligera variable correspondientes (V_L) se disponen, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, en el orden, $V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ o $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$.

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD19 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a blinatumomab. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 90% con SEQ ID NO: 1. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 95% con SEQ ID NO: 1. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 96% con SEQ ID NO:1. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 97% con

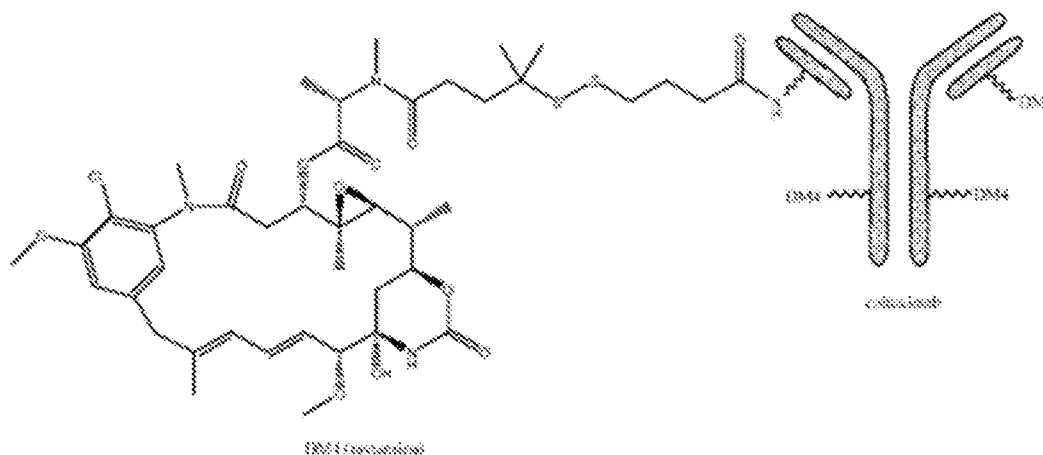
SEQ ID NO: 1. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 98% con SEQ ID NO: 1. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 99% con SEQ ID NO: 1.

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que comprende una región V_H que comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una región V_L que comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En una realización, el inhibidor de CD19 es una construcción de anticuerpo anti-CD19 descrita en la patente de Estados Unidos No. 7,635,472.

En una realización, el inhibidor de CD19 es coltuximab, o un fragmento de unión a antígeno, conjugado, variante o biosimilar del mismo. En una realización, el inhibidor de CD19 es un conjugado de coltuximab. En una realización, el inhibidor de CD19 es un conjugado de coltuximab maitansinoide. En una realización, el inhibidor de CD19 es coltuximab ravtansina. La preparación y propiedades de coltuximab ravtansina se describen en, por ejemplo, Hong, et al., Mol. Pharm. 2015, 12, 1703-16. La coltuximab ravtansina (también conocida como SAR3419 o huB4-DM4) es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que se dirige a CD19 que es un conjugado de un derivado del potente agente citotóxico que actúa sobre los microtúbulos, maitansina, con una versión del anticuerpo anti-CD19, anti-B4, que se humanizó como una IgG1 por rejuvenecimiento de dominio variable. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 8, una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 9, puentes de disulfuro de cadena intrapesada en las siguientes posiciones: 22-96, 147-203, 264-324, 370-428, 22'-96'', 147'-203'', 264'-324'' y 370'-428'', puentes de disulfuro de cadena intraligera en las siguientes posiciones: 23'-87'', 131'-191'', 23''-87'', y 131''-191'', puentes disulfuro de cadenas inter-pesadas y ligeras en las siguientes posiciones: 223-211', 223''-211'', puentes de cadena inter-pesada-pesada en las siguientes posiciones: 229-229'', 232-232'' y sitios de N-glucosilación en 300 y 300', en donde el anticuerpo monoclonal se conjuga con N2'-Desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (ravtansina; DM 4) por ligadores de N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butirato (SPDB). En una realización, el inhibidor de CD19 es un compuesto de la fórmula (44):

Fórmula (44)



en donde la línea ondulada (



) representa un ligador de SPDB, o fragmentos de unión a antígeno, conjugados, variantes o biosimilares de los mismos. En una realización, el inhibidor de CD 19 de la fórmula (44) tiene una sustitución de ravtansina (DM4), reportada como una relación de ravtansina a anticuerpo, de entre 3 a 1 y 5 a 1. En una realización, el inhibidor de CD19 de la fórmula (44) tiene una sustitución de ravtansina (DM4), reportada como una relación de ravtansina:anticuerpo, de entre 3,5 a 1 y 4,5 a 1. En una realización, el inhibidor de CD19 de la fórmula (44) tiene una sustitución promedio de ravtansina (DM4), reportada como una relación de ravtansina:anticuerpo, seleccionada del grupo que consiste en 3 a 1, 3,2 a 1, 3,4 a 1, 3,6 a 1, 3,8 a 1, 4,0 a 1, 4,2 a 1, 4,4 a 1, 4,6 a 1, 4,8 a 1 y 5,0 a 1.

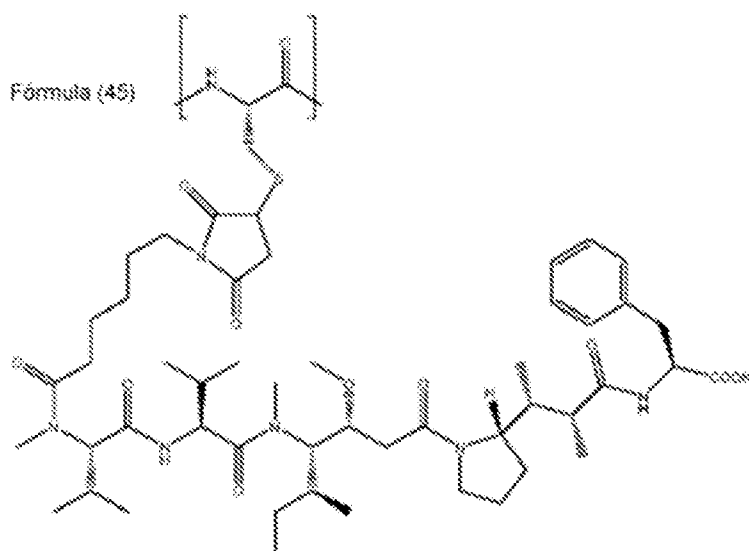
En una realización, el inhibidor de CD19 incluye un ligador escindible seleccionado del grupo que consiste en: hidrazona y porciones de hidrazida; ligadores que contienen disulfuro tal como N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butirato (SPDB); ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut); dipéptidos de valina-citrulina (Val-Cit) y fenilalanina-lisina (Phe-Lys) y ligadores no escindibles que incluyen: porciones de amida; SMCC (succinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato) y porciones de maleimidocaproilo (mc).

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD19 o un conjugado del mismo aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a coltuximab o coltuximab ravtansina. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 90% con SEQ ID NO:8. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 90% con SEQ ID NO:9. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 95% con SEQ ID NO:8. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 95% con SEQ ID NO:9. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 96% con SEQ ID NO:8. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 96% con SEQ ID NO:9. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 97% con SEQ ID NO:8. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 97% con SEQ ID NO:9. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 98% con SEQ ID NO:8. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 98% con SEQ ID NO:9. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 99% con SEQ ID NO: 8. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 99% con SEQ ID NO:9.

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que comprende una región V_H que comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; y en donde dicha región V_L comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; y al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15.

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo anti-CD19 descrito en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2004/0235840 A1 y US 2014/0199300 A1 y la patente de Estados Unidos No. 7,276,497, 7,473,796, 7,851,432, 8,435,528 y 8,841,425.

En una realización, el inhibidor de CD19 es denintuzumab, también conocido como huBU12, o un fragmento de unión a antígeno, conjugado, variante o biosimilar del mismo. En una realización, el inhibidor de CD19 es un conjugado de denintuzumab. En una realización, el inhibidor de CD19 es denintuzumab mafodotina, también conocido como SGN-19A, SGN-CD19A y hBU12-491, o fragmentos de unión a antígeno, conjugados, variantes o biosimilares de los mismos. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 17, una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 18, puentes de disulfuro en las siguientes posiciones: 22-97, 22"-97", 23'-87", 23'''-87"', 133'-193', 133'''-193"', 147-203, 147"-203", 223-213', 223"-213"', 229-229", 232-232", 264-324, 264"-324", 370-428 y 370"-428" (donde no está presente un promedio de dos puentes de disulfuro, dando un promedio de 4 cisteínas enlazadas a mafodotina) y sitios de N-glucosilación en Asn-300 y Asn-300", en donde el anticuerpo monoclonal se conjuga con mafodotina mediante residuos de cisteína como se muestra en la fórmula (45):



En una realización, el inhibidor de CD19 es una inmunoglobulina G1, anti-(antígeno CD19 humano) (cadena pesada de hBU12 monoclonal de Mus musculus humano), disulfuro con cadena κ de hBU12 monoclonal de Mus musculus humano, dímero, tetrakis(tioéter) con N-[6-(3-mercapto-2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-1-oxohexil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoil-(αR,βR,2S)-β-metoxi-α-metil-2-pirrolidinopropanoil-L-fenilalanina. En una realización, el inhibidor de CD19 es un conjugado de inmunoglobulina G1-kappa auristatina F, anti[Homo sapiens CD19 (antígeno de superficie de linfocitos B B4, Leu-12)], anticuerpo monoclonal humanizado; cadena pesada gamma1 (1-450) [VH humanizado (Homo sapiens IGHV4-31*02 (84,80 %) -(IGHD) -IGHJ4*01] [10.7.12] (1-120) -Homo sapiens IGHG1*01

(CH1 (121-218), bisagra (219-233), CH2 (234- 343), CH3 (344-448), CHS (449-450)) (121-450)], (223-213')-disulfuro con cadena ligera kappa (1'-213') [V-KAPPA humanizado (Homo sapiens IGKV3-11*01 (85,30 %) -IGKJ2 *02) [5.3.9] (1'-106') - Homo sapiens IGKC*01 (107'-213) ']; dímero (229-229":232-232") -bisulfuro; conjugado, en promedio de 4 cisteinilo, a monometilauristatina F (MMAF), mediante un ligador maleimidocaproilo (mc) no escindible.

En una realización, el inhibidor de CD19 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD19 o un conjugado del mismo aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a denintuzumab o denintuzumab mafodotina. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 90% con SEQ ID NO: 16. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 90% con SEQ ID NO: 17. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 95% con SEQ ID NO:16. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 95% con SEQ ID NO: 17. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 96% con SEQ ID NO: 16. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 96% con SEQ ID NO: 17. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 97% con SEQ ID NO:16. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 97% con SEQ ID NO: 17. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 98% con SEQ ID NO: 16. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 98% con SEQ ID NO:17. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 99% con SEQ ID NO: 16. En una realización, el inhibidor de CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 99% con SEQ ID NO: 17.

En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que comprende una región V_H que comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; y en donde dicha región V_L comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; y al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23.

En una realización, el inhibidor de CD 19 comprende una construcción de anticuerpo anti-CD 19 descrita en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2009/0136526 A1 y la patente de Estados Unidos No. 7,968,687.

En una realización, el inhibidor de CD19 comprende una construcción de anticuerpo de fragmento variable de cadena individual (scFv), o un fragmento de unión a antígeno, conjugado, variante o biosimilar del mismo. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo scFv anti-CD19 que comprende una cadena pesada variable (V_H) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 26. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo scFv anti-CD19 que comprende una cadena ligera variable (V_L) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 27. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo scFv anti-CD19, la preparación del cual se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2014/0271635 A1. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo scFv anti-CD19 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo scFv anti-CD19 que tiene una identidad de secuencia superior al 99% con un anticuerpo scFv seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el inhibidor de CD19 comprende un anticuerpo scFv anti-CD19 que tiene una identidad de secuencia superior al 98% con un anticuerpo scFv seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39.

En una realización, el inhibidor de CD19 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1342 (Bristol-Myers Squibb), inebilizumab (también conocido como MEDI-551, AstraZeneca), MOR-208 (Morphosys), DT2219ARL (Scott and White Hospital and Clinic), AFM11 (Affimed), GBR401 (Glenmark), anticuerpo de re-direccionamiento de doble afinidad CD19xCD3 (DART, Macrogenics) y Combotox (Montefiore Medical Center). Ejemplos adicionales de inhibidores de CD19 que comprenden anticuerpos anti-CD19 se divulgan en la patente de Estados Unidos No. 7,919,576; 8,097,703; 8,242,252; 7,968,687; 9,073,993; 8,679,492; 8,840,888; 7,812,116; 8,524,867; 8,679,492; 8,323,653; 8,444,973; 7,575,923; 8,147,831; 8,883,992; 8,337,840; 8,097,703; 7,902,338; 8,486,395; 8,624,001; publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US 2009/0142349, US 2012/0294853, US 2009/0136526, US 2011/0312088, US 2009/0068235, US 2010/0272723, US 2012/0082664, US 2014/0086906, US 2008/0260731, US 2014/0112916, US 2010/0104509, US 2014/0286934, US 2010/0215651, US 2014/0271635, US 2015/0086575, US 2012/0121504, US 2012/0141505, US 2011/0165185, US 2012/0328618, US 2004/0136908, US 2005/0048071, US 2015/0071928, US 2013/0115657, US 2007/0166306, US 2014/0056896, US 2006/0233791, US 2010/0158901, US 2006/0148008, US 2011/0104150, US 2013/0084294, US 2006/0263357, US 2006/0280738, US 2009/0220501, US 2009/0246195 y US 2014/0199307; y publicación de solicitud de patente PCT WO 2009/052431, WO 2003/055907, WO 2011/147834, WO 2010/095031, WO 2008/109493, WO 2010/132532, WO 2002/077029, WO 2002/080987, WO 2003/048209, WO 2007/082715, WO 2011/051307 y WO 2012/146394.

Las realizaciones no limitantes de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo anti-CD19 se resumen en la tabla 1.

TABLA 1. Secuencias del anticuerpo anti-CD19

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:1 blinatumomab	DIQLTQSPAS LAVELSQRAT ISCHASQSVQ YGDSYINMY QQIPGQTKL LITDASNLVS GIPPRSSGSG SGTDTLNLH EVKAVDAAPY RQZSTEDPW IPFGSTALEI KGGGSGGGG SGGGSSQVQL QQSGAEIVAP GSSVKISCKA SGTAFSSYWM NRVKRRPGQG LHWIGQINPG DQDTNNGRP KQKATLTADZ SSTAYNQLS SLAGESSAVY PCAPRRTTPY GHYYAMQYW GGGTVTYSS GGHSDIALQ QSGAEIAPG ASVANSCKTS GTFTTRYTMA RVKRRPGQGL EWIGYINPR GTNNGQAFK DZATLTLEK SSTAYNQLS LPSDSAVYV CAPPYDQHYC LFTWQQTFL TVSEVECCSG GSGGSGSGG VDDIQLTQSP AINSASPEK VMTCRASSS VSINHSYQCK GGTSPKRWLY DTSKVASQYV YRFGSGSGCT SYGLTSSNE ALDRTTYCQ QWSSNPLTFC AGIKLELAKL EHHH 60 120 180 240 300 360 420 480 504	
SEQ ID NO: 2 CDR1 de cadena pesada variable de blinatumomab	GYTFTRYTMH	10
SEQ ID NO: 3 CDR2 de cadena pesada variable de blinatumomab	YINPSRGYTN YNQVKV	16
SEQ ID NO: 4 CDR3 de cadena pesada variable de blinatumomab	YYDDHYCLDY	10
SEQ ID NO: 5 CDR1 de cadena ligera variable de blinatumomab	RASSSVSYMN	10
SEQ ID NO: 6 CDR2 de cadena ligera variable de blinatumomab	DTSKVAS	7
SEQ ID NO: 7 CDR3 de cadena ligera variable de blinatumomab	QQWSSNPLT	9
SEQ ID NO:8 cadena pesada de coltuximab	QVQLVQDQAE VVHGGASYKL SKTSGYTFT SNMHHVVKQA PGQGLEWIGE LPPSDSYNMY NQHEQSKAKL IVHSTSTAY MEVSSLRSDD FAVYTCARGS NPTTYAMDYV GGGTIVTVSS ASTKQTSVFP LAPSSTSG GTRALGCLVK DIEREPVTVS KNSGALTSGV HTPFAVLQSS CLYSELSSVT VPSSSLQTQT YICNVNKPQ NTKVDNNVEP KSCENTHTCP PGPAPPELLCG PSVELFRPKP KDTLMISRTF EYTCVAVDVS HEDPEVKNEM YVDQVEVMA KKKRPEEQYN STTPVVSFLT VLRQDWLNCK EYCKVSNKA LPAPIENTIS KAKQPRSPQ VITLPPGQDE LYHQVSLTC LKGFYSSDI AVERESNGQP ENNYATTPCV LKSDGSEFLY SKLTVDKSRW QQSNVFCQV NHRALNNATY QKHLSSFGK 60 120 180 240 300 360 420 450	

ES 2 980 794 T3

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO: 9 cadena ligera de coltuximab	EIVLTQSPFI MSASRCEPVT NTCASASSGVN YMCWYQQKPG TSPRRMIYNT SNLASGVPAR 60 ESGSGSGIDY STTSSMEPE DAATYYCHQR GSYTFGGGT LEIKRTVAAP SVFIFFPSDE 120 QLESSTASVV CLLENYFRE AKVQKVDNA LQSGNSQSEV IEQDSKDSFY GLSTLTLSK 180 ADYSEKVVYA CQVTHQGLSS FVTESENRMG C 211	
SEQ ID NO: 10 CDR1 de cadena pesada variable de coltuximab	SNWMH	5
SEQ ID NO: 11 CDR2 de cadena pesada variable de coltuximab	EIDPSDSYTN	10
SEQ ID NO: 12 CDR3 de cadena pesada variable de coltuximab	GSNPYYYAMD Y	11
SEQ ID NO: 13 CDR1 de cadena ligera variable de coltuximab	SASSGVNYMH	10
SEQ ID NO: 14 CDR2 de cadena ligera variable de coltuximab	DTSKLAS	7
SEQ ID NO: 15 CDR3 de cadena ligera variable de coltuximab	HQRGSYT	7
SEQ ID NO: 16 cadena pesada de denintuzumab	QVQLQESGGG LVPSSQFLSL TCTVSGGSLT TSMGVGWR QHPNGLEWI GHIRWDQQR 60 KRFALGRVT ISVITSAKQF SRKLSSVIAA DTAVYYCAM ELKSYTJYW QQTILVTVSS 120 ASTKQPSVEP LAPSSASTSC CTAALCCLYK DTFPDPVTVS RNSCALTSOV RFPRAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLCTQT YICTVNHKPS HTRVDKXVSP KSCENTLTCL PUPAPELLCC 240 ESVLEFEPKP KPTLNLSPHF SVTCVYVDVG HEDPEVKRAM YVDSVGVNKA STKPRSSQYK 300 STYRVSVYLE VLPQDWLNGK SYEKVSNKA LPAPLSTIS KAGSQRRSPQ VITLPPSKK 360 LIRHQSITFC LVKQYFSDI AVSRSSNQF ERKXNTTFV LQSDGSEFLY SKLTVDKRAM 420 QSGNVSCEV MHEALNNRYT QKLSLSFGK 480	
SEQ ID NO: 17 cadena ligera de denintuzumab	EIVLTQSPAT LSLPGERAF LCCASSSVS YHWYQQKPG QAEPLLIYDI SNLASGIPAP 60 FSGSGSTDE FTTISLSEF OVAVYDGEQ SVYPTFGQC TKLEINPTVA APSVFIFFPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNRETF KAAVQKVDN HALQSGNSQE SVTEQDSKDS FYSLSTLTLE 180 TRADYKHKV YACEVTRQGL SSPYKSFNR GEC 213	

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO: 18 CDR1 de cadena pesada variable de denintuzumab	TSGMGVG	7
SEQ ID NO: 19 CDR2 de cadena pesada variable de denintuzumab	HIWWDDDKRY NPALKS	16
SEQ ID NO: 20 CDR3 de cadena pesada variable de denintuzumab	MELWSYYFDY	10
SEQ ID NO: 21 CDR1 de cadena ligera variable de denintuzumab	SASSSVSYM	10
SEQ ID NO: 22 CDR2 de cadena ligera variable de denintuzumab	DTSKLAS	7
SEQ ID NO: 23 CDR3 de cadena ligera variable de denintuzumab	FQGSVYPFT	9
SEQ ID NO: 24 Dominio de cadena pesada variable (V _H) de scFv de FMC63	DIGNTQITTS LSASGLNRYI LSCFASQDIS RYLWYQQRP LQIVALLIYR TSALASGVPL 60 RFSGSGGSTD YSLTISHLEQ SDIATYEQQ GNTLPYTFQ GTRLEIT 107	
SEQ ID NO: 25 Dominio de cadena ligera variable (V _L) de scFv de FMC63	DYRLQESGPG LVAPGQSLV PTVSGVSLP DYGVSWLRQ PRSLSLWLG VIGSETTYIK 60 SALKSRLLI KNSKSGVPL KNSLQIYQ ALYYCAZHY YGSYAMHY QSGISVTVSS 120	
SEQ ID NO: 26 Dominio de cadena pesada variable (V _H) de scFv de SJ25C1	LDSGAEINRP GSSVNISSCA SGYAFSSYWH NFWNQRPGG LEWICQIYD DGDINYKKE 60 SDQATLIADK SSSTAYMQL GLTSEDGAVI SCARKYISLV VDEYFDMGQ GTVVI 115	
SEQ ID NO: 27 Dominio de cadena ligera variable (V _L) de scFv de SJ25C1	SLVLTQSPK MTSVVDNRVS VTCASQVVC TNVANYQK QSPNELIYS ATIPNSGVFD 60 RFTSGSGSTD FLITITVQS KGLADNEYFC QYNEPYTSC GCTELEIKR S 111	

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)		
SEQ ID NO:28 dominio scFv humanizado	EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCPASQDIS KYLNWYQQKP GQAPRLLIYK TSPHSSGIPA RFSGGSGSTD YTLTISSSLQF EDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQ GTKLEINGGG GSGGGSGGGG GSGVQLQESG PGLVAPSETL ELTCFVSGVS LPDYGVSWIR QPPGKGLEWV GVINGSETTY 60 120 180		
	YSSSLKSAVT ISKDFSKNQV SLNLSSTVAA DTAVYYCAKH VYGGSYAMD YWGQGTITVTV SS 240 242		
SEQ ID NO:29 dominio scFv humanizado	EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCPASQDIS KYLNWYQQKP GQAPRLLIYK TSPHSSGIPA RFSGGSGSTD YTLTISSSLQF EDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQ GTKLEINGGG GSGGGSGGGG GSGVQLQESG PGLVAPSETL ELTCFVSGVS LPDYGVSWIR QPPGKGLEWV GVINGSETTY YSSSLKSAVT ISKDFSKNQV SLNLSSTVAA DTAVYYCAKH VYGGSYAMD YWGQGTITVTV SS 60 120 180 240 242		
SEQ ID NO:30 dominio scFv humanizado	QVQLQESGGG LYKPSATLSL FCTVSGVSLP DYGVSWIRQF PGKGLEWIGV INGSSETTYYS SSLKSRVTIS KNSKKNQVSL KLSSTAAADT AVYYCAKHYY YGGSYAMDYV CQCITLVTVSS GSGGGSGGGG GGGGSEIVMT QSPATLSLSP GERATLSCPA SQDISKYLEW YQKKEGQAPR LLIYETSLRL SGTRARFSGE GSGTDYTLTI SSLQPEDFAV YFCQQGNTLP YTFGQGTILE IK 60 120 180 240 242		
SEQ ID NO:31 dominio scFv humanizado	QVQLQESGGG LYKPSATLSL FCTVSGVSLP DYGVSWIRQF PGKGLEWIGV INGSSETTYYS SSLKSRVTIS KNSKKNQVSL KLSSTAAADT AVYYCAKHYY YGGSYAMDYV CQCITLVTVSS GSGGGSGGGG GGGGSEIVMT QSPATLSLSP GERATLSCPA SQDISKYLEW YQKKEGQAPR LLIYETSLRL SGTRARFSGE GSGTDYTLTI SSLQPEDFAV YFCQQGNTLP YTFGQGTILE IK 60 120 180 240 242		
SEQ ID NO:32 dominio scFv humanizado	EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCPASQDIS KYLNWYQQKP GQAPRLLIYK TSPHSSGIPA RFSGGSGSTD YTLTISSSLQF EDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQ GTKLEINGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGVQ LQESGPGLVK PSETLSITCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPGX GLEWIGVING SETFYSSSL ASPTVTSKIH ENQVSLKLS SVTAADIAVY YCAKHYYYGD SYAMDYWGQG TLTVTVSS 60 120 180 240 247		
SEQ ID NO:33 dominio scFv humanizado	EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCPASQDIS KYLNWYQQKP GQAPRLLIYK TSPHSSGIPA RFSGGSGSTD YTLTISSSLQF EDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQ GTKLEINGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGVQ LQESGPGLVK PSETLSITCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPGX GLEWIGVING SETFYSSSL ASPTVTSKIH ENQVSLKLS SVTAADIAVY YCAKHYYYGD SYAMDYWGQG TLTVTVSS 60 120 180 240 247		
SEQ ID NO:34 dominio scFv humanizado	QVQLQESGGG LYKPSATLSL FCTVSGVSLP DYGVSWIRQF PGKGLEWIGV INGSSETTYYS SSLKSRVTIS KNSKKNQVSL KLSSTAAADT AVYYCAKHYY YGGSYAMDYV CQCITLVTVSS GSGGGSGGGG GGGGSGGGG EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCPASQDIS KYLNWYQQKP GQAPRLLIYK TSPHSSGIPA RFSGGSGSTD YTLTISSSLQF EDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQ GTKLEIX 60 120 180 240 247		

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:35 dominio scFv humanizado	QVQLQESGGPG LKNPSEFPLSL TCTYSGVSLP DYGVSWMRQP PKNGLKNIGV IWGSESTTYTQ 60 SSLRERVILS LKNSKNQVSL KLSGVIAALF AVYYCAKHYY FGGSIAMDW GQGILVTVSS 120 GGCGSGGGGS GCGCGSGGGGS EIVMTQSPAT LSLSPSERAT LSCPASQDIS KILNHYQQKP 180 GQAPRLIYH TSRLHSGIPA RFGSGSGSTD YTLTISLQF EDFAVYFCQZ GNTLPTTFGQ 240 GTKLEIK 247
SEQ ID NO:36 dominio scFv humanizado	EIVMTQSPAT LSLSPSERAT LSCPASQDIS KILNHYQQKP GQAPRLIYH TSRLHSGIPA 60 RFGSGSGSTD YTLTISLQF EDFAVYFCQZ GNTLPTTFGQ GTKLEIKGGC GCGCGSGGGGS 120 GCGCGSGGGGS GCGCGSGGGGS EIVMTQSPAT LSLSPSERAT LSCPASQDIS KILNHYQQKP 180 GQAPRLIYH TSRLHSGIPA RFGSGSGSTD YTLTISLQF EDFAVYFCQZ GNTLPTTFGQ 240 TKLYTSS 247
SEQ ID NO:37 dominio scFv humanizado	QVQLQESGGPG LKNPSEFPLSL TCTYSGVSLP DYGVSWMRQP PKNGLKNIGV IWGSESTTYTQ 60 SSLRERVILS LKNSKNQVSL KLSGVIAALF AVYYCAKHYY FGGSIAMDW GQGILVTVSS 120 GGCGSGGGGS GCGCGSGGGGS EIVMTQSPAT LSLSPSERAT LSCPASQDIS KILNHYQQKP 180 GQAPRLIYH TSRLHSGIPA RFGSGSGSTD YTLTISLQF EDFAVYFCQZ GNTLPTTFGQ 240 GTKLEIK 247
SEQ ID NO:38 dominio scFv humanizado	EIVMTQSPAT LSLSPSERAT LSCPASQDIS KILNHYQQKP GQAPRLIYH TSRLHSGIPA 60 RFGSGSGSTD YTLTISLQF EDFAVYFCQZ GNTLPTTFGQ GTKLEIKGGC GCGCGSGGGGS 120 CSQVQLQESG POLVPESETL SIVTCTVSGVS LDTYGVSWIR QPPGSGLEW L GVARCSETTY 180 YNSELESPVT ISKDESAQV SLKLSGVIAA VFAVYYCAK YYYGGSYAM YWQQTTLVTV 240 SS 242
SEQ ID NO:39 dominio scFv humanizado	QVQLQESGGPG LKNPSEFPLSL TCTYSGVSLP DYGVSWMRQP PKNGLKNIGV IWGSESTTYTQ 60 SSLRERVILS LKNSKNQVSL KLSGVIAALF AVYYCAKHYY FGGSIAMDW GQGILVTVSS 120 GGCGSGGGGS GCGCGSEIVMF QSPATLSLSP GEPATLSLSP SQDISXILW IQQKPGQAPR 180 ILLIVETGDLF SGLPADPSSS GSGTLYTLTI SSLQPEDPAV YFCQGGHTLQ YTFQGGTGLE 240 IK 242

En una realización, el inhibidor de CD19 es un receptores de antígeno quimérico anti-CD19. En una realización, el inhibidor de CD19 es una célula modificada para expresar un receptor de antígeno quimérico anti-CD19. En una realización, el inhibidor de CD19 es una célula T modificada para expresar un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR-T). En una realización, el inhibidor de CD19 es una célula T CD8⁺ modificada para expresar un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR-T). En una realización, el inhibidor de CD19 es una célula asesina natural (NK) modificada para expresar un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR-NK). En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular anti-CD19. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular anti-CD19, en donde la cadena variable pesada se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 26 y la cadena variable ligera se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 27. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular anti-CD19 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal, y un dominio extracelular anti-CD19, en donde el dominio extracelular anti-CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 99% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal, y un dominio extracelular anti-CD19, en donde el dominio extracelular anti-CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 98% con

una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal, y un dominio extracelular anti-CD19, en donde el dominio extracelular anti-CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 97% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal, y un dominio extracelular anti-CD19, en donde el dominio extracelular anti-CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 96% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal, y un dominio extracelular anti-CD19, en donde el dominio extracelular anti-CD19 tiene una identidad de secuencia superior al 95% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, y SEQ ID NO:39. En una realización, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular anti-CD19, en donde el dominio extracelular anti-CD19 es un Fab.

En una realización, los receptores de antígeno quimérico anti-CD19 se pueden preparar por síntesis de polinucleótidos traducidos a partir de cualquiera de las secuencias proporcionadas en la presente, seguido de la inserción del polinucleótido en un vector viral para transducir células que producen virus para la transfección de células T o células NK humanas aisladas, que se pueden expandir y posteriormente transferirse de nuevo de forma adoptiva al humano para tratar una enfermedad. En una realización, se usa un vector lentiviral para transducir células que producen virus para la transfección de células T o células NK humanas aisladas, que posteriormente pueden transferirse de nuevo de forma adoptiva al humano para tratar una enfermedad. Los métodos de transducción lentiviral adecuados para células T y células NK se describen en la patente de Estados Unidos No. 6,627,442. La transducción lentiviral se describe en general en Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71 y Zufferey, et al., Nature Biotechnol. 1997, 15, 871-75. En una realización, se usa un vector gammaretroviral para transducir células que producen virus para la transfección de células T o células NK humanas aisladas, que posteriormente pueden transferirse de nuevo de forma adoptiva al humano para tratar una enfermedad. En una realización, la electroporación de ácido ribonucleico (ARN) se usa para transducir células T o células NK humanas aisladas, que posteriormente se pueden transferir de nuevo de forma adoptiva al humano para tratar una enfermedad. Los métodos de electroporación de ARN adecuados se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0227237 A1. Los métodos de electroporación de ARN adecuados para usarse con CAR se describen en general en Zhao, et al., Cancer Res. 2010, 70, 9053-61. En una realización, los métodos basados en transposones, tal como el sistema Sleeping Beauty (SB), se usan para transducir células T o células NK humanas aisladas, que posteriormente se pueden transferir de nuevo de forma adoptiva al humano para tratar una enfermedad. Los métodos de transposones SB adecuados se describen en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2014/186469 A2. Los sistemas de transposones SB adecuados para usarse con CAR se describen en general en Hackett, et al., Mol. Therapy 2010, 18, 674-83.

En una realización, las células transferidas de forma adoptiva son autólogas. En una realización, las células transferidas de forma adoptiva son alogénicas. La preparación de células alogénicas se describe en US 2014/0349402 A1.

En una realización, las células T o células NK transfectadas se expanden antes de la transferencia adoptiva a un humano. Los métodos de expansión adecuados para células T y células NK se describen en la patente de Estados Unidos No. 5,858,358; 7,977,095; 7,435,596; y 8,026,097; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2015/0225697 A1. En una realización, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa en un paciente, que comprende coadministrar a un mamífero en necesidad de lo mismo cantidades terapéuticamente efectivas de (1) una pluralidad de células T o células NK modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR), en donde la pluralidad de células T o células NK se obtiene primero del paciente por aféresis, la pluralidad de células T o células NK se modifica para expresar el CAR por transfección viral, la pluralidad de células T o células NK se expande y activa por un método de expansión celular, y la pluralidad de células T o células NK se transfiere de manera adoptiva (por ejemplo, por inyección o trasplante) al paciente, y (2) un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK) de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La preparación de receptores de antígeno quimérico anti-CD19 adecuados para usarse con los métodos y composiciones divulgados en la presente se describe en la patente de Estados Unidos No. 7,446,179 y 7,446,190, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2004/0126363 A1, US 2015/0038684 A1, US 2013/0287748 A1 y US 2013/0288368 A1.

En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización seleccionados del grupo que consiste en un dominio de señalización de CD3 ζ , un dominio de señalización de CD28, un dominio de señalización de 4-1BB (CD137), un dominio de señalización de CD27, un dominio de señalización de ICOS, un dominio de señalización de OX40, un dominio de señalización de Fc γ RIII y un dominio de señalización de Fc ϵ RI. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42. En una realización, el receptor de antígeno

quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización con una identidad de secuencia superior al 99% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización con una identidad de secuencia superior al 98% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización con una identidad de secuencia superior al 97% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización con una identidad de secuencia superior al 96% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye uno o más dominios de señalización con una identidad de secuencia superior al 95% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. Varios dominios de señalización no limitantes para usarse con receptores de antígenos quiméricos se dan en la tabla 2. Los dominios de señalización adecuados para usarse con receptores de antígeno quimérico CD19 se describen en la patente de Estados Unidos No. 6,410,319; 7,446,190; 7,070,995 y 7,265,209; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0219975 A1, US 2014/0322275 A1, US 2015/0031624 A1 y US 2014/0301993.

En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye un dominio transmembranal. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 incluye un dominio bisagra. Los dominios transmembrana y bisagra no limitantes adecuados para usarse con receptores de antígenos quiméricos anti-CD19 se dan en SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 en la tabla 2. Otros dominios transmembrana y bisagra adecuados para usarse con receptores de antígeno quimérico CD19 se describen más adelante en los ejemplos de receptores de antígeno quimérico, y también en la patente de Estados Unidos No. 7,446,179 y 7,446,190, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2004/0126363 A1, US 2015/0038684 A1, US 2013/0287748 A1 y US 2013/0288368 A1.

TABLA 2. Dominios de señalización, transmembrana y bisagra para usarse con CAR anti-CD19.

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:40 dominio de señalización de CD3ζ	RVKFSRSADA FAYQQCCQNL YHEINLCRPE EYDVLDEPPG RDPENCCKPR AKNFQEDLYN ELQKDKMRAE YSEIGMKCEP PRGXCHTGLY QGLSTAFEDT YDALHMQALP PR	69 112
SEQ ID NO:41 dominio de señalización de CD28	RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR S	41
SEQ ID NO: 42 Dominio de señalización de 4-1BB (CD137)	KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEEGGC EL	42
SEQ ID NO: 43 dominio transmembranal CD8α	IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYC	24
SEQ ID NO: 44 Dominio bisagra CD8α	TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFACD	45

En una realización preferida, el inhibidor de CD19 es un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 seleccionado del grupo que consiste en un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:CD3ζ, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:4-1BB:CD3ζ, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:CD28:CD3ζ, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:4-1BB:CD28:CD3ζ, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:CD28:4-1BB:CD3ζ, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:CD27, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:CD27:CD3ζ, un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:OX40, y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19:transmembrana:OX40:CD3ζ. En una realización, el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 comprende además un dominio de "interruptor suicida" que permite que las células transducidas con el receptor se controlen a través de, por ejemplo, la administración de un compuesto a un sujeto para activar el interruptor. En una realización, el interruptor suicida es un interruptor suicida de caspasa 9.

En una realización, el inhibidor de CD 19 es un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59. Otros CAR anti-CD19 adecuados se describen en la patente de Estados Unidos No. 7,446,179 y 7,446,190, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2004/0126363 A1, US 2015/0038684 A1, US 2013/0287748 A1 y US 2013/0288368 A1. Las secuencias de aminoácidos de receptor de antígeno quimérico anti-CD19 adecuadas se dan en la tabla 3.

TABLA 3. Secuencias de receptor de antígeno quimérico anti-CD19.

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO: 45 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 murino (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	<pre> MALPVTALL FLALLLEAAR PDIQMTQTTS SLSASLGDVV TISCRASQDI SKYLNWYQQK 60 EPDGVKLLLY HTSPPLRSGVP SPFSSGSGSGF PHLTISMLN QEDLAFYECQ QGNTLFPYTFG 120 GGTFLRITGG GGGGGGGSGG GGGGVNKGES GGLVAPRQS LSVPQTVSGV SLFDYGVSWI 180 RPPFRKGLK LQVINGSETT YNSALKSRLL TILKNSKSSQ VELKMSLQST EDTALYYCAK 240 EYYYGGSYAM DYNSQGTSTVT VSTTTTPADR PTPAPTIAS QQLSLRPEAC RPAAGGAVET 300 NGLDFACDIY IWARPLAGTGG VLLLSLVIFL YCAZGPKKLL YIFQPFMRP VQPTQSEEDGC 360 SCPFPEEEEC GCELPRVAFSR SADAPAYQQC QNQLYNELNL CPPEYDVLQ KPPGPDPEMC 420 CKPFRNPGQ CLYNELQKDK MALATSEICM KCRPPKACH DCLYQGLSTA TKDTYDALEM 480 QALPFR 496 </pre>
SEQ ID NO: 46 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 (anti- CD19: IgG1Fc:CD3ζ)	<pre> MLLVTSLLL CELPPEPAFL IPDIQMTQTF SLSASLGDVR VTISCRASQD ISKYNWYQQ 60 EPDGVKLLLY HTSPPLRSGVP SPFSSGSGSGF PHLTISMLN QEDLAFYECQ QGNTLFPYTF 120 GGTFLRITGG STGGSGKPGS GGGSTKSGVK LQSSSPGLVA PSQSLSVTCF VSGVSLDYG 180 VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSLTIILKN SKSQVFLMKN SLQTDOTATY 240 YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSKSK KSSQNTPTCF PCPASELLGG VSVFLSPKX 300 KDTLNLKRF EVTCVVVQVS EEDPEVKKMN YVDGVNPKA KTXPREEDYN STIRVSVLT 360 VLRQNLKSK EYCKYKSKA LPALEKTLIS KAGQKPKFP YTFPFPFAGE LTNQVSLIC 420 LVSGFYSDI AVESKNGGF EKNYKTPFPV LQSSGFFLY SKLPVKKSPV QQGVFSCSV 480 MEALNHHYT QKSLSLPKR MALIVLCANA GLLLFICLGI FFRVKFSPSA DAPAYQQCQ 540 QLYNELNLKP REEYTVLDR RCRDPEMCK PRKNPQECI YFELKDKMA EAYSEICMKG 600 EASAGKGLG DYGLSTATK DTYDALEMQA LPPA 634 </pre>
SEQ ID NO: 47 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 (anti- CD19ScFv:bisa gra de IgG4: CD28tm:41BB:C D3Zeta: T2A:EGFRt)	<pre> MLLVTSLLL CELPPEPAFL IPDIQMTQTF SLSASLGDVR VTISCRASQD ISKYNWYQQ 60 EPDGVKLLLY HTSPPLRSGVP SPFSSGSGSGF PHLTISMLN QEDLAFYECQ QGNTLFPYTF 120 GGTFLRITGG STGGSGKPGS GGGSTKSGVK LQSSSPGLVA PSQSLSVTCF VSGVSLDYG 180 VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSLTIILKN SKSQVFLMKN SLQTDOTATY 240 YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSKSK KSSQNTPTCF PCPASELLGG VSVFLSPKX 300 AFITFVVKRG LKLLYTFKQ FMRPVQTFQ EEDGSGCRFP DEEEGGCELR VNPSSATAP 360 AYQQGQNLV NELLGKRLI TDVLDKRGH DREMGGRFIR KHFQGLYNE LQKDKMAEAT 420 SEIGMKGERE PGGSGGLYC GLSTAPKOTY DALLMQALPP PLBGGGGRG SLTPCGOVEE 480 NPGFRMLLV TELLCELRH PAFLLITRKV CNGIGIGEFK DLSINATNI KHFVCTSLI 540 GDLRILVAF PGDSFMTIF LDPQELDLK TVKEITGFLI IQAKCEMTD LKAFENLELI 600 PORTKRCQF SLAVYSLNIT SLQSLSLKEL SDQVLIISCN KNLQYAMTIK WNKLECTSCQ 660 ATNLSRPFH NCKATGQVC HALGSPGCM GPRADGVSC RNVAGRGCV LKALLLEGF 720 REFVKSSECI QCFTECLQA RNTTCGRGP DNGIQCAEYI DPFRCVATCP AGVMGNNTL 780 WRYAAGHIV CRCHPRCTY GCTSPGLSGT FTGGRIPFBI ATGRVGRALL LUYVALGIGL 840 --- 844 </pre>
SEQ ID NO:48 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	<pre> MALPVTALL FLALLLEAAR EITVMTQSPA TSLSPCEPA TLSCRASQDI SKYLNWYQQK 60 EQQAPRLLY HTSPPLRSGVP SPFSSGSGSGF PHLTISMLN QEDLAFYECQ QGNTLFPYTFG 120 GGTFLRITGG GGGGGGGSGG GGGGVNKGES GGLVAPRQS LSVPQTVSGV SLFDYGVSWI 180 RPPFRKGLK LQVINGSETT YNSALKSRLL TILKNSKSSQ VELKMSLQST EDTALYYCAK 240 EYYYGGSYAM DYNSQGTSTVT VSTTTTPADR PTPAPTIAS QQLSLRPEAC RPAAGGAVET 300 NGLDFACDIY IWARPLAGTGG VLLLSLVIFL YCAZGPKKLL YIFQPFMRP VQPTQSEEDGC 360 SCPFPEEEEC GCELPRVAFSR SADAPAYQQC QNQLYNELNL CPPEYDVLQ KPPGPDPEMC 420 CKPFRNPGQ CLYNELQKDK MALATSEICM KCRPPKACH DCLYQGLSTA TKDTYDALEM 480 QALPFR 496 </pre>

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)			
SEQ ID NO:49 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	~ MALPVTALLL FLALLLHAAR ESIIVMTQSPA TSLSPGGEPA TSCASASQDI SKYLWVYQRM 60 PQAPRLLLY ETSRLLESGLP AAFSGSGSGT DYTPTISSLQ PEDFAVYFQZ QGNTLPTTFG 120 QYTKLEIRGG GGGGGGGGGG GGGGQVLQGE GPGLVKPSST LSITCTVSGV SLRPGYVDM 160 RQFPCKOLEW IOVINGSEIT YYQSSLKSPV TISKONSKNQ VSLKLSVTA ADTAVYTCAN 240 EYFYCCSTAN DYSCQGLVY VSEETTPAPP PPTPAPFLAS QPLSLAPEAC RPAAGCAVHT 300 NGLNACDIY IWAPLACTOG VLLLSLVITL YCKKSPKALL YIERQPFMRP VQTQGEEDGC 360 SCPFEEDEEG GCELRVAFER SADAPATKQG QNQLYHELM GPPEEYQVLS KRRGADPEMG 420 GKPRKKNPQE GLYNELQKEX MAEAYSEISM KGERRRRGKH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM 480 QALPFR			
SEQ ID NO:50 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR PQVQLQESGP GLVYPSSETLS LTCCTVSGVSL PUYGVSWIRQ 60 PFGKGLERIG VIMGSEITTY SSSLKSPVTI SKKSKNKQVS LKLSVYTAAD TAVYYCAKHY 120 YYGSSYAMDY WQGGTIVTVS SGGGGSGGGG SGGGGSEIVM TQSPATLSLS PGEATILSCR 160 ASQDISKYLE WYQKPKQAP RLLIYHTRNL HSGIPARESC GSGCTLYTIT ISSLQPEDEFA 240 VYFCQQCNIL PYTFGQCTEL EIKITTPAPR PPTPAPFLAS QPLSLAPEAC RPAAGCAVHT 300 PGLDFAADIY IWAPLACTOG VLLLSLVITL YCKKSPKALL YIERQPFMRP VQTQGEEDGC 360 SCPFEEDEEG GCELRVAFER SADAPATKQG QNQLYHELM GPPEEYQVLS KRRGADPEMG 420 GKPRKKNPQE GLYNELQKEX MAEAYSEISM KGERRRRGKH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM 480 QALPFR			
SEQ ID NO: 51 anti-CD19 humanizado	MALPVTALLL FLALLLHAAR PQVQLQESGP GLVYPSSETLS LTCCTVSGVSL PUYGVSWIRQ 60 PFGKGLERIG VIMGSEITTY SSSLKSPVTI SKKSKNKQVS LKLSVYTAAD TAVYYCAKHY 120			
receptor de antígeno quimérico (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	YYGSSYAMDY WQGGTIVTVS SGGGGSGGGG SGGGGSEIVM TQSPATLSLS PGEATILSCR 160 ASQDISKYLE WYQKPKQAP RLLIYHTRNL HSGIPARESC GSGCTLYTIT ISSLQPEDEFA 240 VYFCQQCNIL PYTFGQCTEL EIKITTPAPR PPTPAPFLAS QPLSLAPEAC RPAAGCAVHT 300 PGLDFAADIY IWAPLACTOG VLLLSLVITL YCKKSPKALL YIERQPFMRP VQTQGEEDGC 360 SCPFEEDEEG GCELRVAFER SADAPATKQG QNQLYHELM GPPEEYQVLS KRRGADPEMG 420 GKPRKKNPQE GLYNELQKEX MAEAYSEISM KGERRRRGKH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM 480 QALPFR			
SEQ ID NO:52 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR ESIIVMTQSPA TSLSPGGERA TSCASASQDI SKYLWVYQRM 60 PQAPRLLLY ETSRLLESGLP AAFSGSGSGT DYTPTISSLQ PEDFAVYFQZ QGNTLPTTFG 120 QYTKLEIRGG GGGGGGGGGG GGGGQVLQGE QLQESGPGSL KPSSTLESLC TVSGVSLPQY 160 GYSWIRQPPG KGLEWIGVIN GSEITTYGSS LKSTVFLSKD NSKNQVSLKL SSVTAADTAV 240 YYCAKHYTC GSYAMPTGQ GILVTVSEIT TPAPRPPTPA PPIASQPLSL RPAAGCAVHT 300 GAVTFKLEDF ACDIYIWAPL ACTCGVLLLS LVITLYCKPG EKALLYLKQ PPMRPVQITQ 360 EETGSCSPTT EEEEGGCELP VAFSRSAAP AYQGQKQLY NEMLNGRNEE YDVLGRKGR 420 DPYNGGAPPE EEPQEGLYNE LKXKRMASAY SEIGMAGGPP NGKGRDGLYQ GLSPATKQIT 480 DALRMQALPFR			
SEQ ID NO:53 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR ESIIVMTQSPA TSLSPGGERA TSCASASQDI SKYLWVYQRM 60 PQAPRLLLY ETSRLLESGLP AAFSGSGSGT DYTPTISSLQ PEDFAVYFQZ QGNTLPTTFG 120 QYTKLEIRGG GGGGGGGGGG GGGGQVLQGE QLQESGPGSL KPSSTLESLC TVSGVSLPQY 160 GYSWIRQPPG KGLEWIGVIN GSEITTYGSS LKSTVFLSKD NSKNQVSLKL SSVTAADTAV 240 YYCAKHYTC GSYAMPTGQ GILVTVSEIT TPAPRPPTPA PPIASQPLSL RPAAGCAVHT 300 GAVTFKLEDF ACDIYIWAPL ACTCGVLLLS LVITLYCKPG EKALLYLKQ PPMRPVQITQ 360 EETGSCSPTT EEEEGGCELP VAFSRSAAP AYQGQKQLY NEMLNGRNEE YDVLGRKGR 420 DPYNGGAPPE EEPQEGLYNE LKXKRMASAY SEIGMAGGPP NGKGRDGLYQ GLSPATKQIT 480 DALRMQALPFR			

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)		
SEQ ID NO:54 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR PQVQLQESGP GLVKSSETLS LPCTVSGVSL PEYGVSWIRQ PPOKCLEWIC VIRQSEETYY SSSLSKSVTI SKDNKSNQVS LKLSVYTAAD TAVYYCAKHY YYGGSYANDY WQQGTLVTVS SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG SEIVMTQSPA TSLSPGGERA TLCSPASQDI SKYLNWYQK PQQAPRLLY ETSRLHSGIP APFSGSGSGT DYTLTISSLQ PELFAVYFCQ QGNILPYTFG QGTKLEIKIT TFAPEFTFA FFIASQPLSL KFLACKPAAG GAVHTPGLDF AGDIYIWAPL AGTCGVLLLS LVITLYCKRG RKKLLYIFKQ PFMPEVQITQ EEGGCSGFPF EEEGGGCELR VAFSSASADP AYKQQGNQLY NELNLGPRSE YDVLDPKRRR DEMGCKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERA RGKCHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALFF K	60 120 180 240 300 360 420 480 491	
SEQ ID NO:55 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR PQVQLQESGP GLVKSSETLS LPCTVSGVSL PEYGVSWIRQ PPOKCLEWIC VIRQSEETYY SSSLSKSVTI SKDNKSNQVS LKLSVYTAAD TAVYYCAKHY YYGGSYANDY WQQGTLVTVS SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG SEIVMTQSPA TSLSPGGERA TLCSPASQDI SKYLNWYQK PQQAPRLLY ETSRLHSGIP APFSGSGSGT DYTLTISSLQ PELFAVYFCQ QGNILPYTFG QGTKLEIKIT TFAPEFTFA FFIASQPLSL KFLACKPAAG GAVHTPGLDF AGDIYIWAPL AGTCGVLLLS LVITLYCKRG RKKLLYIFKQ PFMPEVQITQ EEGGCSGFPF EEEGGGCELR VAFSSASADP AYKQQGNQLY NELNLGPRSE YDVLDPKRRR DEMGCKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERA RGKCHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALFF K	60 120 180 240 300 360 420 480 489	
SEQ ID NO:56 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR SEIVMTQSPA TSLSPGGERA TLCSPASQDI SKYLNWYQK PQQAPRLLY ETSRLHSGIP APFSGSGSGT DYTLTISSLQ PELFAVYFCQ QGNILPYTFG QGTKLEIKIT SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG QLQESGPGLV KPSETLSLTC TVSGVSLPDY GVSWIRCPFG KGLEWIGVIN GSETTYKNEE LKSRVITEND NGRKQVSLXL SVTAADTAV YYCAKITYYG GSYANDYWGQ GILVTVSSIT TFAPEFTFA FFIASQPLSL KFLACKPAAG GAVHTPGLDF AGDIYIWAPL AGTCGVLLLS LVITLYCKRG RKKLLYIFKQ PFMPEVQITQ EEGGCSGFPF EEEGGGCELR VAFSSASADP AYKQQGNQLY NELNLGPRSE YDVLDPKRRR DEMGCKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERA RGKCHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALFF K	60 120 180 240 300 360 420 480 491	
SEQ ID NO:57 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR SEIVMTQSPA TSLSPGGERA TLCSPASQDI SKYLNWYQK PQQAPRLLY ETSRLHSGIP APFSGSGSGT DYTLTISSLQ PELFAVYFCQ QGNILPYTFG QGTKLEIKIT SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG QLQESGPGLV KPSETLSLTC TVSGVSLPDY GVSWIRCPFG KGLEWIGVIN GSETTYKNEE LKSRVITEND NGRKQVSLXL SVTAADTAV YYCAKITYYG GSYANDYWGQ GILVTVSSIT TFAPEFTFA FFIASQPLSL KFLACKPAAG GAVHTPGLDF AGDIYIWAPL AGTCGVLLLS LVITLYCKRG RKKLLYIFKQ PFMPEVQITQ EEGGCSGFPF EEEGGGCELR VAFSSASADP AYKQQGNQLY NELNLGPRSE YDVLDPKRRR DEMGCKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERA RGKCHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALFF K	60 120 180 240 300 360 420 480 491	
SEQ ID NO: 58 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALLL FLALLLHAAR PQVQLQESGP GLVKSSETLS LPCTVSGVSL PEYGVSWIRQ PPOKCLEWIC VIRQSEETYY SSSLSKSVTI SKDNKSNQVS LKLSVYTAAD TAVYYCAKHY YYGGSYANDY WQQGTLVTVS SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG SEIVMTQSPA TSLSPGGERA TLCSPASQDI SKYLNWYQK PQQAPRLLY ETSRLHSGIP APFSGSGSGT DYTLTISSLQ PELFAVYFCQ QGNILPYTFG QGTKLEIKIT TFAPEFTFA FFIASQPLSL KFLACKPAAG	60 120 180 240 300	
	GAVHTPGLDF AGDIYIWAPL AGTCGVLLLS LVITLYCKRG RKKLLYIFKQ PFMPEVQITQ EEGGCSGFPF EEEGGGCELR VAFSSASADP AYKQQGNQLY NELNLGPRSE YDVLDPKRRR DEMGCKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERA RGKCHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALFF K	360 420 480 491	

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:59 receptor de antígeno quimérico anti- CD19 humanizado (anti- CD19:CD8α:4- 1BB:CD3ζ)	MALPVTALL PLALLLEAPR PEIVMTGSPA TLGLSPGEPA TLSCIASQDI SKYLNWYQDN 50 PCQAPFLLIY EYSELESQIP ARFSCGGGSE DYILYISSLQ EEDFAVTECQ QONTLPITFC 100 QCTKLEIXGC QGSCGGGSGC QGSGVQLGSE QPGLVKFSET LSLPTVSGV SLFDYGVSEI 150 RQPPGRHLEW IGWINGSETT YNSSLKSRV TISKQSSNQ VSLKLSVTA APTAVYTCAR 200 EYTGGSYAN DYSGGSLVT VSGTTTARR RYTPAPLAS QPGLSPFSC RFAAGGAVET 250 RGLOFACDIY IMAPLAGTGC VLLLSLVITL YCARQPKLL YIFKQPPMP VQTTQEDGCG 300 SCPFEESEG GCELVKFSR SADAFATKQ QNQLYNELND GAREEYVLD KKKGRPEMG 350 CKPPEKPFQ CLYNELQKN MALAYSEICN KCRPPKQCH DLYQGLSTA TQTTDALEN 400 QALFER 450

En una realización, el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se coadministra con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y otro agente para gestionar las toxicidades relacionadas con la infusión de células T o células NK modificadas con receptor de antígeno quimérico, incluido el síndrome de liberación de citocinas y el síndrome de lisis tumoral. En una realización, el inhibidor de CD19 se coadministra con un inhibidor de BTK y un inhibidor de TNFα. En una realización, el inhibidor de CD19 se coadministra con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y etanercept. En una realización, el inhibidor de CD19 se coadministra con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un anticuerpo contra el receptor de IL-6. En una realización, el inhibidor de CD19 se coadministra con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y tocilizumab. Las composiciones adecuadas que comprenden tocilizumab, etanercept y células T modificadas con receptor de antígeno quimérico, así como otros agentes, y métodos de preparación y uso terapéutico de los mismos, se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 20150202286 A1 y la publicación de patente internacional No. WO 2014/011984 A1.

Composiciones farmacéuticas

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer.

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para tratar cánceres de tumores sólidos, linfomas y leucemia.

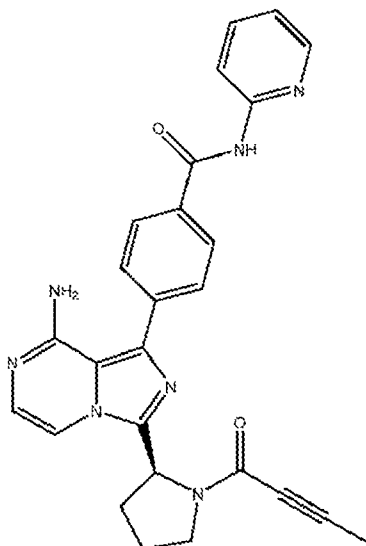
En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19, o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 o un conjugado de fragmento de unión a antígeno de los mismos; y (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usarse en el tratamiento de cáncer. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19, o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (3) un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos y biosimilares de los mismos, para usarse en el tratamiento de cáncer. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición para usarse en el tratamiento de cáncer que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un conjugado de fragmento de unión a antígeno de los mismos; (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (3) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina, bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida, clorambucilo, un principio activo farmacéutico anticoagulante o antiplaquetario, o combinaciones de los mismos. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usarse en el tratamiento de cáncer; (3) un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos, biosimilares de los mismos y combinaciones de los mismos; y (4) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina, bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida, clorambucilo, un anticoagulante o principio activo farmacéutico antiplaquetario, y combinaciones de los mismos. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; y (2) un inhibidor de BTK que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usarse en el tratamiento de cáncer. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos; y (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos; y (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usarse en el tratamiento de cáncer. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos; (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usarse en el tratamiento de cáncer; y (3) un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos y biosimilares de los mismos. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, y fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos; (2) un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usarse en el tratamiento de cáncer; y (3) un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos y biosimilares de los mismos. Esta composición es típicamente una composición farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas se formulan habitualmente para proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación como se describe en la presente, es decir, una combinación de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) como los principios activos. Cuando se desea, las composiciones farmacéuticas contienen una sal farmacéuticamente aceptable y/o un complejo de coordinación de uno o más de los principios activos. Habitualmente, las composiciones farmacéuticas también comprenden uno o más excipientes, portadores, incluidos diluyentes y agentes de relleno sólidos inertes, diluyentes, incluida solución acuosa

estéril y diferentes solventes orgánicos, intensificadores de permeación, solubilizantes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

5 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente son preferentemente para usarse en el tratamiento de las enfermedades y condiciones descritas más adelante. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas son para usarse en el tratamiento de cáncer. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas son para usarse en el tratamiento de cánceres de tumores sólidos, linfomas y leucemias.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, que incluyen cualquiera de las realizaciones anteriores de composiciones, son para usarse en el tratamiento de cáncer. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son para usarse en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas que incluye cáncer de cabeza y cuello, adenocarcinoma ductal de páncreas (PDA), carcinoma de páncreas, carcinoma de colon, carcinoma de mama, cáncer de mama, fibrosarcoma, mesotelioma, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, tioma, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, cáncer de timo, cáncer de cerebro, cáncer de células escamosas, cáncer de piel, cáncer de ojo, retinoblastoma, melanoma, melanoma intraocular, cáncer de cavidad oral y de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, cánceres relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (por ejemplo, linfoma y sarcoma de Kaposi), cáncer inducido por virus, glioblastoma, tumores de esófago, neoplasias hematológicas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia mielocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes, tumor de esófago, linfoma del centro folicular, tumor de cabeza y cuello, infección por virus de hepatitis C, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de colon metastásico, mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin indolente, tumor de ovario, tumor de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma de etapa IV, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células B (ALL), ALL de células B maduras, linfoma folicular, linfoma de células de manto y linfoma de Burkitt.

En una realización, la relación molar del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos con el inhibidor de BTK de la fórmula (II) en las composiciones farmacéuticas está en el intervalo de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente de aproximadamente 2,5:1 a aproximadamente 1:2,5, y más preferentemente de aproximadamente 1:1. En una realización, la relación en peso del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos con el inhibidor de BTK de la fórmula (II) en las composiciones farmacéuticas se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 20:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 18:1, aproximadamente 17:1, aproximadamente 16:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 14:1, aproximadamente 13:1, aproximadamente 12:1, aproximadamente 11:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:11, aproximadamente 1:12, aproximadamente 1:13, aproximadamente 1:14, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:16, aproximadamente 1:17, aproximadamente 1:18, aproximadamente 1:19, y aproximadamente 1:20.

En algunas realizaciones, la concentración de cualquiera del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) proporcionado en las composiciones farmacéuticas para usarse en la invención es independientemente menor que, por ejemplo, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la concentración de cualquiera del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) proporcionados en las composiciones farmacéuticas para usarse en la invención es independientemente superior al 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19,75 %, 19,50 %, 19,25 %, 19 %, 18,75 %, 18,50 %, 18,25 %, 18 %, 17,75 %, 17,50 %, 17,25 %, 17 %, 16,75 %, 16,50 %, 16,25 %, 16 %, 15,75 %, 15,50 %, 15,25 %, 15 %, 14,75 %, 14,50 %, 14,25 %, 14 %, 13,75 %, 13,50 %, 13,25 %, 13 %, 12,75 %, 12,50 %, 12,25 %, 12 %, 11,75 %, 11,50 %, 11,25 %, 11 %, 10,75 %, 10,50 %, 10,25 %, 10 %, 9,75 %, 9,50 %, 9,25 %, 9 %, 8,75 %, 8,50 %, 8,25 %, 8 %, 7,75 %, 7,50 %, 7,25 %, 7 %, 6,75 %, 6,50 %, 6,25 %, 6 %, 5,75 %, 5,50 %, 5,25 %, 5 %, 4,75 %, 4,50 %, 4,25 %, 4 %, 3,75 %, 3,50 %, 3,25 %, 3 %, 2,75 %, 2,50 %, 2,25 %, 2 %, 1,75 %, 1,50 %, 1,25 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

65 En algunas realizaciones, la concentración de cualquiera del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el

inhibidor de BTK de la fórmula (II) proporcionados en las composiciones farmacéuticas está independientemente en el intervalo de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 40 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 %, aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 29 %, aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 28 %, aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 27 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 26 %, aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 24 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 23 %, aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 22 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 21 %, aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 19 %, aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 18 %, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 17 %, aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 16 %, aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 14 %, aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 12 % o aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la concentración de cualquiera de los inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) proporcionados en las composiciones farmacéuticas está independientemente en el intervalo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,9 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la cantidad de cualquiera del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de Fórmula (II) proporcionado en las composiciones farmacéuticas es independientemente igual o menor que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g, o 0,0001 g.

En algunas realizaciones, la cantidad de cualquiera del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) proporcionados en las composiciones farmacéuticas es independientemente más de 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, 3 g, 3,5 g, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g o 10 g.

Cada uno del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) es efectivo en un amplio intervalo de dosis. Por ejemplo, en el tratamiento de humanos adultos, las dosis que varían independientemente de 0,01 a 1000 mg, de 0,5 a 100 mg, de 1 a 50 mg por día y de 5 a 40 mg por día son ejemplos de dosis que se pueden usar. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en la cual se administra el compuesto, el género y edad del sujeto que se va a tratar, el peso corporal del sujeto que se va a tratar y la preferencia y experiencia del médico tratante.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son para usarse en el tratamiento de cáncer. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son para usarse en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas que incluye cáncer de cabeza y cuello, adenocarcinoma ductal de páncreas (PDA), cáncer de páncreas, carcinoma de colon, carcinoma de mama, cáncer de mama, fibrosarcoma, mesotelioma, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, tioma, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, cáncer de timo, cáncer de cerebro, cáncer de células escamosas, cáncer de piel, cáncer de ojo, retinoblastoma, melanoma, melanoma intraocular, cáncer de cavidad oral y de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, cánceres relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (por ejemplo, linfoma y sarcoma de Kaposi), cáncer inducido por virus, glioblastoma, tumores de esófago, neoplasias hematológicas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia mielocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes, tumor de esófago, linfoma del centro folicular, tumor de cabeza y cuello, infección por virus de hepatitis C, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de colon metastásico, mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin indolente, tumor de ovario, tumor de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma de etapa IV, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células B (ALL), ALL de células B maduras, linfoma folicular, linfoma de células de manto y linfoma de Burkitt.

A continuación se describen composiciones farmacéuticas no limitantes y métodos para preparar las mismas.

Composiciones farmacéuticas para administración oral

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición farmacéutica para administración oral que contiene la combinación de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II), y un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral para usarse en el tratamiento de cáncer.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición farmacéutica sólida para administración oral que contiene: (i) una cantidad efectiva de cada uno de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) en combinación y (ii) un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral para usarse en el tratamiento de cáncer. En algunas realizaciones, la composición contiene además (iii) una cantidad efectiva de un cuarto principio activo farmacéutico.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición farmacéutica sólida para administración oral que contiene: (i) una cantidad efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos en combinación con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y (ii) un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral para usarse en el tratamiento de cáncer. En realizaciones seleccionadas, la composición contiene además (iii) una cantidad efectiva de un tercer principio activo farmacéutico.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica líquida adecuada para consumo oral.

Las composiciones farmacéuticas para usarse en la invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como formas de dosis discretas, tal como cápsulas, sobres, tabletas, líquidos o aerosoles, cada uno que contiene una cantidad predeterminada de un principio activo como un polvo o en gránulos, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite en agua, una emulsión líquida de agua en aceite, polvos para reconstitución, polvos para consumos orales, botellas (incluidos polvos o líquidos en una botella), películas, pastillas, pastas, tubos, gomas y paquetes de disolución oral. Estas formas de dosis se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen el paso de asociar el o los principios activos con el portador, que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan al mezclar uniforme e íntimamente el o los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, dando forma al producto en la presentación deseada. Por ejemplo, una tableta se puede preparar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes complementarios. Las tabletas se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un excipiente tal como un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte y/o un agente tensioactivo o dispersante. Las tabletas moldeadas se pueden elaborar al moldear en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

La invención abarca además el uso de composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosis ya puesto el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, se puede adicionar agua (por ejemplo, 5 %) en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo a fin de determinar características tal como la vida útil o la estabilidad de las formulaciones con el paso del tiempo. Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosis para usarse en la invención se pueden preparar usando ingredientes anhidros o que contienen baja humedad y condiciones de baja humedad o baja humectación. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosis para usarse en la invención que contienen lactosa se pueden elaborar anhidras si se espera un contacto sustancial con humedad y/o humectación durante la fabricación, envase y/o almacenamiento. Se puede preparar y almacenar una composición farmacéutica anhidra de manera que se mantenga su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras se pueden envasar usando materiales conocidos para evitar la exposición al agua, de tal forma que se puedan incluir en kits de formulación adecuados. Los ejemplos de envases adecuados incluyen láminas selladas herméticamente, plástico o similares, recipientes de dosis unitaria, envases tipo blíster y envases tipo tira.

Cada uno del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) como principios activos se pueden combinar en una mezcla íntima con un portador farmacéutico de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales. El portador puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. En la preparación de las composiciones para una forma de dosis oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales como portadores, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservadores y agentes colorantes en el caso de preparaciones líquidas orales (tal como suspensiones, soluciones y elixires) o aerosoles; o se pueden usar portadores tal como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes en el caso de preparaciones sólidas orales, en algunas realizaciones sin emplear el uso de lactosa. Por ejemplo, los portadores

adecuados incluyen polvos, cápsulas y tabletas, con las preparaciones orales sólidas. Si se desea, las tabletas se pueden recubrir por técnicas acuosas o no acuosas estándar.

- 5 Los aglutinantes adecuados para usarse en composiciones farmacéuticas y formas de dosis incluyen almidón de maíz, almidón de patata u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tal como goma arábiga, alginato de sodio, ácido alginico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.
- 10 Los ejemplos de agentes de relleno adecuados para usarse en las composiciones farmacéuticas y formas de dosis divulgadas en la presente incluyen talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado y mezclas de los mismos.
- 15 Los desintegrantes se pueden usar en las composiciones para usarse en la invención para proporcionar tabletas que se desintegran cuando se exponen a un ambiente acuoso. Demasiado desintegrante puede producir tabletas que se desintegran en la botella. Muy poco puede ser insuficiente para que se presente la desintegración, alterando de esta manera la velocidad y grado de la liberación de los principios activos de la forma de dosis. Por lo tanto, se puede usar una cantidad suficiente de desintegrante que no sea ni muy pequeña ni demasiado para alterar perjudicialmente la liberación del o de los principios activos para formar las formas de dosis de los compuestos divulgados en la presente. La cantidad de desintegrante usada puede variar con base en el tipo de formulación y modo de administración, y puede ser fácilmente discernible para los expertos en la técnica. Se puede usar de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de desintegrante, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de desintegrante, en la composición farmacéutica. Los disgregantes que se pueden usar para formar composiciones farmacéuticas y formas de dosis para usarse en la invención incluyen agar-agar, ácido alginico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polacrilina de potasio, glicolato de almidón de sodio, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas o mezclas de los mismos.
- 20 Los lubricantes que se pueden usar para formar composiciones farmacéuticas y formas de dosis para usarse en la invención incluyen estearato de calcio, estearato de magnesio, estearil fumarato de sodio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, etilaureato, agar o mezclas de los mismos.
- 25 Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide, un aerosol coagulado de sílice sintética, celulosa microcristalina silicificada o mezclas de los mismos. Opcionalmente, se puede adicionar un lubricante en una cantidad de menos de aproximadamente 0,5 % o menos de aproximadamente 1 % (en peso) de la composición farmacéutica.
- 30 Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para administración oral, el o los principios activos farmacéuticos se pueden combinar con diferentes agentes edulcorantes o saborizante, materia colorante o tintes y, si así se desea, agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con diluyentes tal como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diferentes combinaciones de los mismos.
- 35 Las tabletas pueden no estar recubiertas o estar recubiertas por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.
- 40 Los agentes tensioactivos que se pueden usar para formar composiciones farmacéuticas y formas de dosis para usarse en la invención incluyen agentes tensioactivos hidrófilos, agentes tensioactivos lipófilos y mezclas de los mismos. Es decir, se puede emplear una mezcla de agentes tensioactivos hidrófilos, se puede emplear una mezcla de agentes tensioactivos lipófilos o se puede emplear una mezcla de al menos un agente tensioactivo hidrófilo y al menos un agente tensioactivo lipófilo.
- 45 Un agente tensioactivo hidrófilo adecuado en general puede tener un valor de HLB de al menos 10, en tanto que los agentes tensioactivos lipófilos adecuados en general pueden tener un valor de HLB de o menor que aproximadamente 10. Un parámetro empírico usado para caracterizar la hidrofiliicidad e hidrofobicidad relativas de los compuestos anfífilicos no iónicos es el equilibrio hidrófilo-lipófilo (valor "HLB"). Los agentes tensioactivos con valores de HLB más bajos son más lipófilos o hidrófobos y tienen mayor solubilidad en aceites, en tanto que los agentes tensioactivos con valores de HLB más altos son más hidrófilos y tienen mayor solubilidad en soluciones acuosas. En general, se considera que los agentes tensioactivos hidrófilos son aquellos compuestos que tienen un valor de HLB superior a aproximadamente 10, así como compuestos aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos para los cuales la escala de HLB no es en general aplicable. De manera similar, los agentes tensioactivos lipófilos (es decir, hidrófobos) son compuestos que tienen un valor de HLB igual o menor
- 50
- 55
- 60
- 65

que aproximadamente 10. Sin embargo, el valor de HLB de un agente tensioactivo es simplemente una guía aproximada en general usada para permitir la formulación de emulsiones industriales, farmacéuticas y cosméticas.

Los agentes tensioactivos hidrófilos pueden ser iónicos o no iónicos. Los agentes tensioactivos iónicos adecuados incluyen sales de alquilamonio; sales de ácido fusídico; derivados de ácidos grasos de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; derivados de glicéridos de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; lecitinas y lecitinas hidrogenadas; lisolecitinas y lisolecitinas hidrogenadas; fosfolípidos y derivados de los mismos; lisofosfolípidos y derivados de los mismos; sales de ésteres de ácidos grasos de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; acilactilatos; ésteres de ácido tartárico mono y diacetilados de mono y diglicéridos; mono y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

Dentro del grupo mencionado anteriormente, los agentes tensioactivos iónicos incluyen, a modo de ejemplo: lecitinas, lisolecitina, fosfolípidos, lisofosfolípidos y derivados de los mismos; sales de éster de ácido graso de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácido graso; docusato de sodio; acilactilatos; ésteres de ácido tartárico mono y diacetilados de mono y diglicéridos; mono y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

Los agentes tensioactivos iónicos pueden ser las formas ionizadas de lecitina, lisolecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, lisofosfatidilserina, PEG-fosfatidiletanolamina, PVP-fosfatidiletanolamina, ésteres lácticos de ácidos grasos, estearoil-2-lactilato, estearoil lactilato, monoglicéridos succinilados, ésteres de ácido tartárico mono/diacetilados de mono/diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono/diglicéridos, colilsarcosina, caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, ricinoleato, linoleato, linolenato, estearato, lauril sulfato, teracecil sulfato, docusato, lauroil carnitinas, palmitoil carnitinas, miristoil carnitinas y sales y mezclas de los mismos.

Los agentes tensioactivos no iónicos hidrófilos pueden incluir alquilglucósidos; alquilmaltósidos; alquiltioglucoídos; lauril macroglicéridos; éteres alquílicos de polioxialquilenos tal como éteres alquílicos de polietilenglicol; polioxialquilen alquifenoles tal como polietilenglicol alquil fenoles; ésteres de ácidos grasos de polioxialquilen alquil fenol tal como monoésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y diésteres de ácidos grasos de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol glicerol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol; ésteres de ácidos grasos de polioxialquilen sorbitán tal como ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán; productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; polioxietilen esteroides, derivados y análogos de los mismos; vitaminas polioxietiladas y derivados de las mismas; copolímeros de bloque de polioxietilen-polioxipropileno; y mezclas de los mismos; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán y productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en triglicéridos, aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados. El poliol puede ser glicerol, etilenglicol, polietilenglicol, sorbitol, propilenglicol, pentaeritritol o un sacárido.

Otros agentes tensioactivos hidrófilos no iónicos incluyen, sin limitación, laurato de PEG-10, laurato de PEG-12, laurato de PEG-20, laurato de PEG-32, dilaurato de PEG-32, oleato de PEG-12, oleato de PEG-15, oleato de PEG-20, dioleato de PEG-20, oleato de PEG-32, oleato de PEG-200, oleato de PEG-400, estearato de PEG-15, diestearato de PEG-32, estearato de PEG-40, estearato de PEG-100, dilaurato de PEG-20, trioleato de glicerilo de PEG-25, dioleato de PEG-32, laurato de glicerilo de PEG-20, laurato de glicerilo de PEG-30, estearato de glicerilo de PEG-20, oleato de glicerilo de PEG-20, oleato de glicerilo de PEG-30, laurato de glicerilo de PEG-30, laurato de glicerilo de PEG-40, aceite de almendra de palma de PEG-40, aceite de ricino hidrogenado de PEG-50, aceite de ricino de PEG-40, aceite de ricino de PEG-35, aceite de ricino de PEG-60, aceite de ricino hidrogenado de PEG-40, aceite de ricino hidrogenado de PEG-60, aceite de maíz de PEG-60, glicéridos de caprato/caprilato de PEG-6, glicéridos de caprato/caprilato de PEG-8, laurato de poliglicerilo-10, colesterol de PEG-30, fitoesterol de PEG-25, esteroil de soja de PEG-30, trioleato de PEG-20, oleato de sorbitán de PEG-40, laurato de sorbitán de PEG-80, polisorbato 20, polisorbato 80, lauril éter de POE-9, lauril éter de POE-23, oleil éter de POE-10, oleil éter de POE-20, estearil éter de POE-20, succinato de PEG-100 de tocoferilo, colesterol de PEG-24, 10-oleato de poliglicerilo, Tween 40, Tween 60, monoestearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, serie PEG 10-100 nonil fenol, serie PEG 15-100 octil fenol, y poloxámeros.

Los agentes tensioactivos lipófilos adecuados incluyen, a modo de ejemplo solamente: alcoholes grasos; ésteres de ácidos grasos de glicerol; ésteres de ácidos grasos de glicerol acetilados; ésteres de ácidos grasos de alcohol inferior; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos de sorbitán; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán; esteroides y derivados de esteroil; esteroides y derivados de esteroil polioxietilados; éteres alquílicos de polietilenglicol; ésteres de azúcar; éteres de azúcar; derivados de ácido láctico de mono y diglicéridos; productos de transesterificación hidrófobos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; vitaminas/derivados de vitaminas solubles en aceite; y mezclas de los mismos. Dentro de este grupo, los agentes tensioactivos lipófilos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos de glicerol, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol y mezclas de los mismos, o son productos de transesterificación hidrófobos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados y triglicéridos.

En una realización, la composición puede incluir un solubilizante para asegurar una buena solubilización y/o disolución del compuesto para usarse en la presente invención y para reducir al mínimo la precipitación del compuesto para usarse en la presente invención. Esto puede ser especialmente importante para composiciones para uso no oral, por ejemplo, composiciones para inyección. También se puede adicionar un solubilizante para incrementar la solubilidad del fármaco hidrófilo y/u otros componentes, tal como agentes tensioactivos, o para mantener la composición como una solución o dispersión estable u homogénea.

Los ejemplos de solubilizantes adecuados incluyen los siguientes: alcoholes y polioles, tal como etanol, isopropanol, butanol, alcohol bencílico, etilenglicol, propilenglicol, butanodiolos e isómeros de los mismos, glicerol, pentaeritritol, sorbitol, manitol, transcutole, dimetil isosorbida, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, hidroxipropil metilcelulosa y otros derivados de celulosa, ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina; éteres de polietilenglicoles que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 200 a aproximadamente 6000, tal como PEG éter de alcohol tetrahidrofurfurílico (glicofurol) o metoxi PEG; amidas y otros compuestos que contienen nitrógeno tal como 2-pirrolidona, 2-piperidona,

ε

-caprolactama, N-alquilpirrolidona, N-hidroalquilpirrolidona, N-alquilpiperidona, N-alquilcaprolactama, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona; ésteres tal como propionato de etilo, citrato de tributilo, citrato de acetil trietilo, citrato de acetil tributilo, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, butirato de etilo, triacetina, monoacetato de propilenglicol, diacetato de propilenglicol, épsilon. -caprolactona e isómeros de la misma, δ-valerolactona e isómeros de la misma, β-butilolactona e isómeros de la misma; y otros solubilizantes conocidos en la técnica, tal como dimetil acetamida, dimetil isosorbida, N-metil pirrolidonas, monooctanoína, dietilenglicol monoetil éter y agua.

También se pueden usar mezclas de solubilizantes. Los ejemplos incluyen triacetina, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxietilpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, polietilenglicol 200-100, glicofurol, transcutole, propilenglicol y dimetil isosorbida. Los solubilizantes particularmente preferidos incluyen sorbitol, glicerol, triacetina, alcohol etílico, PEG-400, glicofurol y propilenglicol.

La cantidad de solubilizante que se puede incluir no está particularmente limitada. La cantidad de un solubilizante dado se puede limitar a una cantidad bioaceptable, que se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. En algunas circunstancias, puede ser ventajoso incluir cantidades de solubilizantes muy por encima de las cantidades bioaceptables, por ejemplo, para incrementar al máximo la concentración del fármaco, con el exceso de solubilizante removido antes de proporcionar la composición a un paciente usando técnicas convencionales, tal como destilación o evaporación. Por lo tanto, si está presente, el solubilizante puede estar en una relación en peso de 10 %, 25 %, 50 %, 100 % o hasta aproximadamente 200 % en peso, con base en el peso combinado del fármaco y otros excipientes. Si se desea, también se pueden usar cantidades muy pequeñas de solubilizante, tal como 5 %, 2 %, 1 % o incluso menos. Habitualmente, el solubilizante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 100 %, más habitualmente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % en peso.

La composición puede incluir además uno o más aditivos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Estos aditivos y excipientes incluyen, sin limitación, agentes antiadherentes, agentes antiespumantes, agentes amortiguadores, polímeros, antioxidantes, conservantes, agentes quelantes, viscomoduladores, tonificantes, saborizantes, colorantes, odorizantes, opacificantes, agentes de suspensión, aglutinantes, agentes de relleno, plastificantes, lubricantes y mezclas de los mismos.

Además, se puede incorporar un ácido o una base en la composición para facilitar el procesamiento, para mejorar la estabilidad o por otras razones. Los ejemplos de bases farmacéuticamente aceptables incluyen aminoácidos, ésteres de aminoácidos, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, hidróxido de magnesio, silicato de aluminio y magnesio, silicato de aluminio sintético, hidrocalcita sintética, hidróxido de aluminio y magnesio, diisopropiletilamina, etanolamina, etilendiamina, trietanolamina, trietilamina, triisopropanolamina, trimetilamina y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). También son adecuadas las bases que son sales de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido acético, ácido acrílico, ácido adípico, ácido alginico, ácido alcanosulfónico, aminoácidos, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido bórico, ácido butírico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácidos grasos, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido hidroquinosulfónico, ácido isoascórbico, ácido láctico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido para-bromofenilsulfónico, ácido propiónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tánico, ácido tartárico, ácido tioglicólico, ácido toluenosulfónico y ácido úrico. También se pueden usar sales de ácidos polipróticos, tal como fosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio y dihidrogenofosfato de sodio. Cuando la base es una sal, el catión puede ser cualquier catión conveniente y farmacéuticamente aceptable, tal como amonio, metales alcalinos y metales alcalinotérreos. Los ejemplos pueden incluir sodio, potasio, litio, magnesio, calcio y amonio.

Los ácidos adecuados son ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico y ácido fosfórico. Los ejemplos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácido acético, ácido acrílico, ácido adípico,

ácido algínico, ácidos alcanosulfónicos, aminoácidos, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido bórico, ácido butírico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácidos grasos, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido hidroquinosulfónico, ácido isoascórbico, ácido láctico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido para-bromofenilsulfónico, ácido propiónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tánico, ácido tartárico, ácido tioglicólico, ácido toluenosulfónico y ácido úrico.

Composiciones farmacéuticas para inyección

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición farmacéutica para inyección, para usarse en el tratamiento de cáncer que contiene la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II), y un excipiente farmacéutico adecuado para inyección. Los componentes y las cantidades de agentes en las composiciones son como se describen en la presente.

Las formas en las cuales las composiciones para usarse en la presente invención se pueden incorporar para administración por inyección incluyen suspensiones o emulsiones acuosas u oleosas, con aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón o aceite de cacahuete, así como elixires, manitol, dextrosa o una solución acuosa estéril y vehículos farmacéuticos similares.

Las soluciones acuosas en solución salina también se usan convencionalmente para inyección. También se pueden emplear etanol, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido (y mezclas adecuadas de los mismos), derivados de ciclodextrina y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y por el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede provocar por diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) en las cantidades requeridas en el solvente apropiado con otros ingredientes diferentes como se enumeran anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan al incorporar los diferentes principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, ciertos métodos deseables de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo, más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada previamente estéril de la misma.

Composiciones farmacéuticas para administración tópica

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición farmacéutica para administración transdérmica para usarse en el tratamiento de cáncer que contiene la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II), y un excipiente farmacéutico adecuado para administración transdérmica.

Las composiciones para usarse en la presente invención se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas o líquidas adecuadas para administración local o tópica, tal como geles, jaleas solubles en agua, cremas, lociones, suspensiones, espumas, polvos, suspensiones espesas, ungüentos, soluciones, aceites, pastas, supositorios, aerosoles, emulsiones, soluciones salinas, soluciones basadas en dimetilsulfóxido (DMSO). En general, los portadores con densidades más altas son capaces de proporcionar un área con una exposición prolongada a los principios activos. Por el contrario, una formulación de solución puede proporcionar una exposición más inmediata del principio activo al área elegida.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados, que son compuestos que permiten penetración incrementada de, o ayudan a la administración de, moléculas terapéuticas a través de la barrera de permeabilidad del estrato córneo de la piel. Hay muchas de estas moléculas intensificadoras de penetración conocidas por aquellos expertos en la técnica de la formulación tópica. Los ejemplos de estos portadores y excipientes incluyen humectantes (por ejemplo, urea), glicoles (por ejemplo, propilenglicol), alcoholes (por ejemplo, etanol), ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), agentes tensioactivos (por ejemplo, miristato de isopropilo y lauril sulfato de sodio), pirrolidonas, monolaurato de glicerol, sulfóxidos, terpenos (por ejemplo, mentol), aminas, amidas, alcanos, alcoholes, agua, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tal como polietilenglicoles.

Otra formulación ejemplar para usarse en la presente invención emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Estos parches transdérmicos se pueden usar para proporcionar infusión continua o discontinua de la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) en cantidades controladas, ya sea con o sin otro principio activo farmacéutico.

La construcción y uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 5,023,252; 4,992,445 y 5,001,139. Estos parches se pueden construir para la administración continua, pulsátil o bajo demanda de agentes farmacéuticos.

Composiciones farmacéuticas para inhalación

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe supra. Preferentemente, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en solventes preferentemente farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar por el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede conectar a una mascarilla o a una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo se pueden administrar, preferentemente de manera oral o nasal, a partir de dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada. También se pueden usar inhaladores de polvo seco para proporcionar la administración inhalada de las composiciones.

Otras composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas también se pueden preparar a partir de composiciones descritas en la presente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para administración sublingual, bucal, rectal, intraósea, intraocular, intranasal, epidural o intraespinal. Las preparaciones para estas composiciones farmacéuticas se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Anderson, Philip O.; Knoben, James E.; Troutman, William G, eds., Handbook of Clinical Drug Data, Tenth Edition, McGraw-Hill, 2002; y Pratt and Taylor, eds., Principles of Drug Action, Third Edition, Churchill Livingstone, N.Y., 1990.

La administración de la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) o composiciones farmacéuticas de estos compuestos se puede efectuar por cualquier método que permita la administración de los compuestos al sitio de acción. Estos métodos incluyen vías orales, vías intraduodenales, inyección parenteral (incluida intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o infusión), tópica (por ejemplo, aplicación transdérmica), administración rectal, mediante administración local por catéter o stent o por inhalación. La combinación de compuestos también se puede administrar de manera intraadiposa o de manera intratecal.

Las composiciones para usarse en la invención también se pueden administrar mediante un dispositivo impregnado o recubierto tal como un stent, por ejemplo, o un polímero cilíndrico insertado en la arteria. Este método de administración puede, por ejemplo, ayudar en la prevención o mejora de la reestenosis después de procedimientos tal como angioplastia con balón. Sin limitarse a la teoría, los compuestos para usarse en la invención pueden desacelerar o inhibir la migración y proliferación de células de músculo liso en la pared arterial que contribuyen a la reestenosis. Un compuesto para usarse en la invención se puede administrar, por ejemplo, por administración local desde los puntales de un stent, desde un injerto de stent, desde injertos o desde la cubierta o vaina de un stent. En algunas realizaciones, un compuesto para usarse en la invención se mezcla con una matriz. Esta matriz puede ser una matriz polimérica y puede servir para unir el compuesto al stent. Las matrices poliméricas adecuadas para este uso incluyen, por ejemplo, poliésteres o copoliésteres basados en lactona tal como polilactida, policaprolactonglicolida, poliortoésteres, polianhídridos, poliaminoácidos, polisacáridos, polifosfacenos, copolímeros de poli(éter-éster) (por ejemplo, PEO-PLLA); polidimetilsiloxano, polietilenvinilacetato), polímeros o copolímeros basados en acrilato (por ejemplo, polihidroxietilmetilmetacrilato, polivinilpirrolidinona), polímeros fluorados tal como politetrafluoroetileno y ésteres de celulosa. Las matrices adecuadas pueden no degradarse o pueden degradarse con el tiempo, liberando el compuesto o compuestos. La combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se puede aplicar a la superficie del stent por diferentes métodos tal como recubrimiento por inmersión/rotación, recubrimiento por aspersión, recubrimiento por inmersión y/o recubrimiento con brocha. Los compuestos se pueden aplicar en un solvente y se puede dejar que el solvente se evapore, formando de esta manera una capa de compuesto sobre el stent. De manera alternativa, el compuesto se puede ubicar en el cuerpo del stent o injerto, por ejemplo, en microcanales o microporos. Cuando se implanta, el compuesto se difunde fuera del cuerpo del stent para entrar en contacto con la pared arterial. Estos stents se pueden preparar al sumergir un stent fabricado para contener los microporos o microcanales en una solución del compuesto para usarse en la invención en un solvente adecuado, seguido de evaporación del solvente. El exceso de fármaco en la superficie del stent se puede remover mediante un breve lavado adicional con solvente. En aun otras realizaciones, los compuestos para usarse en la invención se pueden enlazar covalentemente a un stent o injerto. Se puede usar un ligador covalente que se degrada *in vivo*, que conduce a la liberación del compuesto para usarse en la invención. Se puede usar cualquier enlace bio-lábil para este propósito, tal como enlaces de éster, amida o anhídrido.

Las formas de administración parenteral de ejemplo incluyen soluciones o suspensiones de compuesto activo en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Estas formas de dosis se pueden amortiguador adecuadamente, si se desea.

- La invención también proporciona kits como se definió anteriormente para usarse en el tratamiento de cáncer. Los kits incluyen cada uno del inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II), ya sea solo o en combinación en un envase adecuado, y material escrito que puede incluir instrucciones de uso, análisis de estudios clínicos y lista de efectos secundarios. Estos kits también pueden incluir información, tal como referencias de literatura científica, materiales de prospecto de envase, resultados de ensayos clínicos y/o resúmenes de estos, que indican o establecen las actividades y/o ventajas de la composición, y/o que describen la dosificación, administración, efectos secundarios, interacciones farmacológicas u otra información útil para el proveedor de atención médica. Esta información se puede basar en los resultados de diferentes estudios, por ejemplo, estudios que usan animales de experimentación que implican modelos *in vivo* y estudios basados en ensayos clínicos en humanos. El kit puede contener además otro principio activo farmacéutico. En realizaciones seleccionadas, el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) y otro principio activo farmacéutico se proporcionan como composiciones separadas en recipientes separados dentro del kit. En realizaciones seleccionadas, el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) y el agente se proporcionan como una composición individual dentro de un recipiente en el kit. El envase adecuado y los artículos adicionales para usarse (por ejemplo, taza de medición para preparaciones líquidas y envoltura de papel de aluminio para reducir al mínimo la exposición al aire) se conocen en la técnica y se pueden incluir en el kit. Los kits descritos en este documento se pueden proporcionar, comercializar y/o promocionar a los proveedores de salud, incluidos médicos, enfermeras, farmacéuticos y funcionarios del formulario. Los kits también pueden, en realizaciones seleccionadas, comercializarse directamente al consumidor.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para usarse en el tratamiento de cáncer que comprende (1) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; y (2) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Estas composiciones son típicamente composiciones farmacéuticas. El kit es para co-administración del inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II), ya sea simultáneamente o por separado.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para usarse en el tratamiento de cáncer que comprende (1) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; (2) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y/o (3) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos y biosimilares de los mismos. Estas composiciones son típicamente composiciones farmacéuticas. El kit es para co-administración del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, el inhibidor de BTK de la fórmula (II) y/o el anticuerpo anti-CD20, ya sea simultáneamente o por separado.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para usarse en el tratamiento de cáncer que comprende (1) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; (2) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y/o (3) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina, bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida, clorambucilo, un principio activo farmacéutico anticoagulante o antiplaquetario, o combinaciones de los mismos. Estas composiciones son típicamente composiciones farmacéuticas. El kit es para co-administración del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, inhibidor de BTK de la fórmula (II), gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina, bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida, clorambucilo y/o el principio activo farmacéutico anticoagulante o antiplaquetario, ya sea simultáneamente o por separado.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para usarse en el tratamiento de cáncer que comprende (1) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos; (2) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (3) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, derivados, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos, biosimilares de los mismos y combinaciones de los mismos; y/o (4) una composición que

comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina, bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida, clorambucilo, principio activo farmacéutico anticoagulante o antiplaquetario, o combinaciones de los mismos. Estas composiciones son típicamente composiciones farmacéuticas. El kit es para co-administración del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, inhibidor de BTK de la fórmula (II), anticuerpo anti-CD20, gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina, bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida, clorambucilo y/o el principio activo farmacéutico anticoagulante o antiplaquetario, ya sea simultáneamente o por separado.

Los kits descritos anteriormente son preferentemente para usarse en el tratamiento de cáncer. En realizaciones preferidas, los kits son para usarse en el tratamiento de cánceres de tumores sólidos, linfomas y leucemias.

Los kits de la presente invención son para usarse en el tratamiento de cáncer. En una realización preferida, los kits de la presente invención son para usarse en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas que incluye cáncer de cabeza y cuello, adenocarcinoma ductal de páncreas (PDA), cáncer de páncreas, carcinoma de colon, carcinoma de mama, cáncer de mama, fibrosarcoma, mesotelioma, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, tioma, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, cáncer de timo, cáncer de cerebro, cáncer de células escamosas, cáncer de piel, cáncer de ojo, retinoblastoma, melanoma, melanoma intraocular, cáncer de cavidad oral y de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, cánceres relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (por ejemplo, linfoma y sarcoma de Kaposi), cáncer inducido por virus, glioblastoma, tumores de esófago, neoplasias hematológicas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia mielocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes, tumor de esófago, linfoma del centro folicular, tumor de cabeza y cuello, infección por virus de hepatitis C, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de colon metastásico, mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin indolente, tumor de ovario, tumor de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma de etapa IV, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células B (ALL), ALL de células B maduras, linfoma folicular, linfoma de células de manto y linfoma de Burkitt.

Dosis y regímenes de dosificación

Las cantidades de inhibidor de BTK de la fórmula (II) e inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos administrados dependerán del humano o mamífero que se trata, la severidad del trastorno o condición, la velocidad de administración, la disposición de los compuestos y la discreción del médico prescriptor. Sin embargo, una dosis efectiva de cada uno está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por día, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis individuales o divididas. Para un humano de 70 kg, esto equivaldría a aproximadamente 0,05 a 7 g/día, tal como aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día. En algunos casos, los niveles de dosis por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, en tanto que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario dañino, por ejemplo, dividiendo estas dosis mayores en varias dosis pequeñas para su administración a lo largo del día. La dosis del inhibidor de BTK de la fórmula (II) y el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se puede proporcionar en unidades de mg/kg de masa corporal o en mg/m² de área de superficie corporal. En una realización, la relación de la dosis del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos a la dosis del inhibidor de BTK de la fórmula (II) en mg/kg o en mg/m² está en el intervalo de 10:1 a 1:10, preferentemente de 2,5:1 a 1:2,5, y más preferentemente aproximadamente 1:1. En una realización, la relación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos con el inhibidor de BTK de la fórmula (II) en mg/kg o en mg/m² se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 20:1, aproximadamente 19:1, aproximadamente 18:1, aproximadamente 17:1, aproximadamente 16:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 14:1, aproximadamente 13:1, aproximadamente 12:1, aproximadamente 11:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:11, aproximadamente 1:12, aproximadamente 1:13, aproximadamente 1:14, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:16, aproximadamente 1:17, aproximadamente 1:18, aproximadamente 1:19 y aproximadamente 1:20.

En algunas realizaciones, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra en una dosis individual. Esta administración puede ser por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, para introducir el inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) rápidamente. Sin embargo, se pueden usar otras vías, incluida la vía oral preferida, según corresponda. También se puede usar una dosis individual de la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un

receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) para el tratamiento de una afección aguda.

En algunas realizaciones, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra en múltiples dosis. La dosificación puede ser una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces o más de seis veces por día. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. En otras realizaciones, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra aproximadamente una vez al día a aproximadamente 6 veces al día. En algunas realizaciones, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra una vez al día, en tanto que en otras realizaciones, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra dos veces al día, y en otras realizaciones la combinación del inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra tres veces al día. En algunas realizaciones, un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente se administra en combinación con un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos una vez al día, en tanto que en otras realizaciones un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente se administra en combinación con un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos dos veces al día, y en otras realizaciones un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente se administra en combinación con un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos tres veces al día. En algunas realizaciones, un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos divulgado en la presente, en donde el inhibidor de CD19 es una célula T o célula NK que expresa un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, se administra como una infusión individual, y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente se administra una o dos veces al día mediante administración oral durante un período de al menos 1 semana.

La administración de los principios activos farmacéuticos de la invención puede continuar el tiempo que sea necesario. En realizaciones seleccionadas, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 o 28 días. En algunas realizaciones, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra durante menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día. En realizaciones seleccionadas, la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se administra de forma crónica de forma continua, por ejemplo, para el tratamiento de efectos crónicos. En otra realización, la administración de la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) continúa durante menos de aproximadamente 7 días. En otra realización más, la administración continúa durante más de aproximadamente 6, 10, 14, 28 días, dos meses, seis meses o un año. En algunos casos, la dosificación continua se logra y se mantiene el tiempo que sea necesario.

En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 30 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 90 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 80 mg, aproximadamente 30 mg a aproximadamente 70 mg, aproximadamente 40 mg a aproximadamente 60 mg, aproximadamente 45 mg a aproximadamente 55 mg, aproximadamente 48 mg a aproximadamente 52 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg, aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 90 mg a aproximadamente 110 mg, aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg o aproximadamente 198 a aproximadamente 202 mg. En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente es aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 225 mg o aproximadamente 250 mg.

En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgado en la presente descripción está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg a aproximadamente 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg a aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg a aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) divulgada en la presente es de aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, aproximadamente 2,1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 3,2 mg/kg, o aproximadamente 3,6 mg/kg.

En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos divulgado en la presente está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 45 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg, aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 30 mg, aproximadamente 23 mg a aproximadamente 28 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg, aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 90 mg a aproximadamente 110 mg, o aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, aproximadamente 98 mg a aproximadamente 102 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg, o aproximadamente 198 a aproximadamente 207 mg. In some embodiments, an effective dosage of a CD19 inhibitor disclosed herein is aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 225 mg, o aproximadamente 250 mg. En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos divulgado en la presente, en donde el inhibidor de CD 19 es una célula T o una célula NK que expresa un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, es al menos 1×10^5 células, 1×10^6 células, 1×10^7 células, 1×10^8 células, 1×10^9 células, o 1×10^{10} células.

En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos divulgado en la presente está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,07 mg/kg a aproximadamente 0,65 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg a aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg a aproximadamente 1,45 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg o aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos descrito en la presente es de aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, aproximadamente 2,1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 3,2 mg/kg o aproximadamente 3,6 mg/kg.

En algunas realizaciones, una combinación de un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se administra a una dosis de 10 a 200 mg BID, que incluye 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o 150 mg BID, para el inhibidor de BTK de la fórmula (II), y 1 a 500 mg BID, que incluye 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500 mg BID para el inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos.

En algunos casos, los niveles de dosis por debajo del límite inferior del intervalos mencionados anteriormente pueden ser más que adecuados, en tanto que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario dañino, por ejemplo, dividiendo estas dosis mayores en varias dosis pequeñas para su administración a lo largo del día.

Una cantidad efectiva de la combinación del inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el inhibidor de BTK de la fórmula (II) se puede administrar en dosis únicas o múltiples mediante cualquiera de los modos de administración aceptados de agentes que tienen utilidades similares, que incluyen las vías rectal, bucal, intranasal y transdérmica, por inyección intraarterial, de manera intravenosa, de manera intraperitoneal, de manera parenteral, de manera intramuscular, de manera subcutánea, de manera oral, de manera tópica o como inhalador.

Uso en el tratamiento de cánceres de tumores sólidos, neoplasias hematológicas y otras enfermedades

Las composiciones y combinaciones de inhibidores descritas anteriormente se pueden usar en el tratamiento de trastornos y enfermedades mediados por BTK. En una realización preferida, son para usarse en el tratamiento de cáncer.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un conjugado de fragmento de unión a antígeno de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas, cáncer de cabeza y cuello, adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), cáncer de páncreas, carcinoma de colon, carcinoma de mama, cáncer de mama, fibrosarcoma, mesotelioma, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, tioma, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, cáncer de timo, cáncer de cerebro, cáncer de células escamosas, cáncer de piel, cáncer de ojo, retinoblastoma, melanoma, melanoma intraocular, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, cánceres relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (por ejemplo, linfoma y sarcoma de Kaposi), cánceres inducidos por virus tal como carcinoma cervical (virus del papiloma humano), enfermedad linfoproliferativa de células B, carcinoma nasofaríngeo (virus de Epstein-Barr), sarcoma de Kaposi y linfomas de efusión primaria (virus del herpes del sarcoma de Kaposi), carcinoma hepatocelular (virus de hepatitis B y hepatitis C) y leucemias de células T (virus de leucemia de células T humanas-1), glioblastoma, tumores esofágicos, tumor de cabeza y cuello, cáncer de colon metastásico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tumor de ovario, tumor de páncreas, carcinoma de células renales, neoplasias hematológicas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma de etapa IV y glioma.

En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica de células B seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos o mielofibrosis. En una realización, la invención se refiere a un método para tratar un cáncer en un mamífero, en donde el cáncer es leucemia mielocítica crónica, leucemia mieloide aguda, DLBCL (incluidos subtipos de células B activadas (ABC) y células B del centro germinal (GCB)), linfoma del centro del folículo, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin indolente y ALL de células B maduras.

En algunas realizaciones, el cáncer es un subtipo de CLL. Se han caracterizado varios subtipos de CLL. CLL frecuentemente se clasifica para el estado mutacional de la variable región de cadena pesada de inmunoglobulina (IgV_H) en células leucémicas. R. N. Damle, et al., Blood 1999, 94, 1840-47; T. J. Hamblin, et al., Blood 1999, 94, 1848-54. Los pacientes con mutaciones de IgV_H en general sobreviven más tiempo que los pacientes sin mutaciones de IgV_H. La expresión de ZAP70 (positiva o negativa) también se usa para caracterizar la CLL. L. Z. Rassenti, et al., N. Engl. J. Med. 2004, 351, 893-901. La metilación de ZAP-70 en CpG3 también se usa para caracterizar la LLC, por ejemplo, mediante pirosecuenciación. R. Claus, et al., J. Clin. Oncol. 2012, 30, 2483-91; J. A. Woyach, et al., Blood 2014, 123, 1810-17. CLL también se clasifica por etapa de la enfermedad bajo los criterios de Binet o Rai. J. L. Binet, et al., Cancer 1977, 40, 855-64; K. R. Rai, T. Han, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1990, 4, 447-56. Otras mutaciones comunes, tal como delección 11q, delección 13q y delección 17p se pueden valorar usando técnicas bien conocidas tal como hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En una realización, la invención se refiere a un método para tratar una CLL en un humano, en donde la CLL

se selecciona del grupo que consiste en CLL negativa para la mutación H de IgV, CLL positiva para ZAP-70, ZAP-70 metilada en CpG3 CLL, CLL positiva para CD38, leucemia linfocítica crónica caracterizada por una delección 17p13.1 (17p) y CLL caracterizada por una delección 11q22.3 (11q).

- 5 En algunas realizaciones, el cáncer es una CLL en donde la CLL ha experimentado una transformación de Richter. Los métodos para valorar la transformación de Richter, que también se conoce como síndrome de Richter, se describen en P. Jain and S. O'Brien, *Oncology*, 2012, 26, 1146-52. La transformación de Richter es un subtipo de CLL que se observa en 5-10 % de los pacientes. Implica el desarrollo de linfoma agresivo de CLL y tiene un pronóstico en general malo.
- 10 En algunas realizaciones, el cáncer es una CLL o SLL en un paciente, donde el paciente es sensible a la linfocitosis. En una realización, la invención se refiere a un método para tratar CLL o SLL en un paciente, en donde el paciente exhibe linfocitosis provocada por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en una infección viral, una infección bacteriana, una infección protozoaria o un estado posterior a la esplenectomía. En una realización, la infección viral en cualquiera de las realizaciones anteriores se selecciona del grupo que consiste en mononucleosis infecciosa, hepatitis y citomegalovirus. En una realización, la infección bacteriana en cualquiera de las realizaciones anteriores se selecciona del grupo que consiste en tos ferina, tuberculosis y brucelosis.

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en trastornos mieloproliferativos (MPD), neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria (PMF), síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena crónica (BCR-ABL1 positiva), leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica o mastocitosis.

La eficacia de los métodos, compuestos y combinaciones de compuestos descritos en la presente para tratar, prevenir y/o controlar las enfermedades o trastornos indicados se puede probar usando varios modelos animales conocidos en la técnica. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de páncreas se describen en Herreros-Villanueva, et al., *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de mama se describen, por ejemplo, en Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de ovario se describen, por ejemplo, en Mullany, et al., *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; y Fong, et al., *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el melanoma se describen, por ejemplo, en Damsky, et al., *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de pulmón se describen, por ejemplo, en Meuwissen, et al., *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de pulmón se describen, por ejemplo, en Kim, *Clin. Exp. Otorrinolaringol.* 2009, 2, 55-60; y Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer colorrectal, incluido el modelo CT26, se describen en Castle, et al., *BMC Genomics*, 2013, 15, 190; Endo, et al., *Cancer Gene Therapy*, 2002, 9, 142-148; Roth et al., *Adv. Immunol.* 1994, 57, 281-351; Fearon, et al., *Cancer Res.* 1988, 48, 2975-2980. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para DLBCL incluyeron el modelo murino PiBCL1 y ratones BALB/c (haplotipo H-2^d). Illidge, et al., *Cancer Biother. & Radiopharm.* 2000, 15, 571-80. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para NHL incluyen el modelo murino 38C13 con ratones C3H/HeN (haplotipo 2-H^k) o alternativamente el modelo 38C13 Her2/neu. Timmerman, et al., *Blood*, 2001, 97, 1370-77; Penichet, et al., *Cancer Immunolog. Immunother.* 2000, 49, 649-662. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para la CLL incluyen el modelo BCL1 utilizando ratones BALB/c (haplotipo H-2^d). Dutt, et al., *Blood*, 2011, 117, 3230-29.

En realizaciones seleccionadas, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de un cáncer de tumor sólido con una composición que incluye una combinación de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II), en donde la dosis es efectiva para inhibir la señalización entre las células de tumor sólido y al menos un microambiente seleccionado del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, mastocitos, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T reguladoras, células asesinas naturales, células supresoras derivadas de mieloides, células B reguladoras, neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal usando una combinación de un inhibidor de BTK de la fórmula (II), un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y gemcitabina, o una sal, cocrystal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas de una combinación de un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) para usarse en el tratamiento de cáncer como se describe en la presente. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas de una combinación de un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) para usarse en el tratamiento de trastornos tal como trastornos mieloproliferativos (MPD), neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria (PMF), síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena crónica (BCR-ABL1 positiva), leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica o mastocitosis. La

invención proporciona además una composición como se describe en la presente para la prevención de la implantación de blastocitos en un mamífero.

Combinaciones de inhibidores de BTK e inhibidores de CD19 con anticuerpos anti-CD20

Las combinaciones de los inhibidores de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos también se pueden coadministrar de manera segura con anticuerpos inmunoterapéuticos tal como los anticuerpos anti-CD20 rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab e ibritumomab, y o fragmentos de unión a antígeno, derivados, conjugados, variantes y complejos etiquetados con radioisótopos de los mismos, que se pueden administrar solos o con principios activos farmacéuticos quimioterapéuticos convencionales tal como aquellos descritos en la presente. En una realización, las combinaciones anteriores exhiben efectos sinérgicos que pueden dar por resultado mayor eficacia, menos efectos secundarios, el uso de un principio farmacéutico menos activo para lograr un resultado clínico dado u otros efectos sinérgicos.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además un anticuerpo anti-CD20, en donde el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además un anticuerpo anti-CD20, en donde el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo, y en donde el anticuerpo anti-CD20 se une específicamente a CD20 humano con una K_D seleccionada del grupo que consiste en 1×10^{-7} M o menos, 5×10^{-8} M o menos, 1×10^{-8} M o menos y 5×10^{-9} M o menos.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además un anticuerpo anti-CD20 tipo I o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además un anticuerpo anti-CD20 tipo II o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo.

En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 se administran de manera secuencial. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de la fórmula (II) e inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 se administran de manera concomitante. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se administran antes del anticuerpo monoclonal anti-CD20. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se administran después del anticuerpo monoclonal anti-CD20. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 se administran durante el mismo período de tiempo, y la administración del inhibidor de BTK continúa después de que se complete la administración del anticuerpo monoclonal anti-CD20.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es rituximab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. Rituximab es un anticuerpo monoclonal murino-humano quimérico dirigido contra CD20, y su estructura comprende una inmunoglobulina kappa IgG1 que contiene secuencias de región variable de cadena ligera y pesada murina y secuencias de región constante humana. El rituximab se compone de dos cadenas pesadas de 451 aminoácidos y dos cadenas ligeras de 213 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos para las cadenas pesadas de rituximab se establece en la SEQ ID NO: 60. La secuencia de aminoácidos

para las cadenas ligeras de rituximab se expone en SEQ ID NO: 61. Rituximab está disponible comercialmente, y sus propiedades y uso en el cáncer y otras enfermedades se describen con más detalle en Rastetter, et al., Ann. Rev. Med. 2004, 55, 477-503, y en Plosker and Figgett, Drugs, 2003, 63, 803-43. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a rituximab. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 90% con SEQ ID NO:60. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 90% con SEQ ID NO:61. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 95% con SEQ ID NO:60. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 95% con SEQ ID NO:61. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 98% con SEQ ID NO:60. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 98% con SEQ ID NO:61. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 99% con SEQ ID NO:60. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 99% con SEQ ID NO:61.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es obinutuzumab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. El obinutuzumab también se conoce como afutuzumab o GA-101. Obinutuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD20. La secuencia de aminoácidos para las cadenas pesadas de obinutuzumab se establece en la SEQ ID NO: 62. La secuencia de aminoácidos para las cadenas ligeras de obinutuzumab se expone en SEQ ID NO: 63. El obinutuzumab está disponible comercialmente, y sus propiedades y uso en el cáncer y otras enfermedades se describen con más detalle en Robak, Curr. Opin. Investig. Drugs 2009, 10, 588-96. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a obinutuzumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 90% con SEQ ID NO:62. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 90% con SEQ ID NO:63. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 95% con SEQ ID NO:62. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 95% con SEQ ID NO:63. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 98% con SEQ ID NO:62. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 98% con SEQ ID NO:63. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 99% con SEQ ID NO:62. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 99% con SEQ ID NO:63. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 obinutuzumab es una inmunoglobulina G1, anti(antígeno de linfocitos B humanos CD20 (miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarca la membrana, antígeno de superficie de linfocitos B B1, Leu-16 o Bp35)), obinutuzumab monoclonal de ratón humanizado des-CH31 07 - K-y 1 cadena pesada (222-219 '-disulfuro con obinutuzumab monoclonal de ratón humanizado dímero de cadena ligera κ (228-228 "-231- 231") -anticuerpo de bisdisulfuro.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es ofatumumab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. Ofatumumab se describe en Cheson, J. Clin. Oncol. 2010, 28, 3525-30. La estructura cristalina del fragmento Fab de ofatumumab se ha informado en Protein Data Bank referencia 3GIZ y en Du, et al., Mol. Immunol. 2009, 46, 2419-2423. Ofatumumab está disponible comercialmente, y su preparación, propiedades y uso en el cáncer y otras enfermedades se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 8,529,202 B2. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a ofatumumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable superior al 90 % con SEQ ID NO: 64. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable superior al 90 % con SEQ ID NO: 65. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable superior al 95 % con SEQ ID NO: 64. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable superior al 95 % con SEQ ID NO: 65. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable superior al 98 % con SEQ ID NO: 64. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable superior al 98 % con SEQ ID NO: 65. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable superior al 99 % con SEQ ID NO: 64. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable superior al 99 % con SEQ ID NO: 65. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de fragmento Fab superior al 90 % con SEQ ID NO: 66. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de fragmento Fab superior al 90 % con SEQ ID NO: 67. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de fragmento Fab superior al 95 % con SEQ ID NO: 66. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de fragmento Fab superior al 95 % con SEQ ID NO: 67. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de fragmento Fab superior al 98 % con SEQ ID NO: 66. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de fragmento Fab superior al 98 % con SEQ ID NO: 67. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de fragmento Fab superior al 99 % con SEQ ID NO: 66. En una realización, el

anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de fragmento Fab superior al 99 % con SEQ ID NO: 67. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab es una inmunoglobulina G1, anti(antígeno de linfocitos B humanos CD20 (miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarca la membrana, antígeno de superficie de linfocitos B B1, Leu-16 o Bp35)); ofatumumab monoclonal humano-cadena pesada de CD20 γ 1 (225-214')-disulfuro con ofatumumab monoclonal humano-cadena ligera de CD20 κ , dímero (231-231'':234-234')-anticuerpo de bisdisulfuro.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es veltuzumab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. El veltuzumab también se conoce como hA20. Veltuzumab se describe en Goldenberg, et al., Leuk. Lymphoma 2010, 51, 747-55. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a veltuzumab. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 90% con SEQ ID NO:68. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 90% con SEQ ID NO:69. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 95% con SEQ ID NO:68. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 95% con SEQ ID NO:69. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 98% con SEQ ID NO:68. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 98% con SEQ ID NO:69. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 99% con SEQ ID NO:68. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 99% con SEQ ID NO:69. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab es una inmunoglobulina G1, anti(antígeno de linfocitos B humanos CD20 (miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarca la membrana, Leu-16, Bp35)); [218-arginina, ácido 360-glutámico, 362-metionina] cadena pesada monoclonal de ratón humanizado hA20 γ 1 (224-213')-disulfuro con cadena ligera monoclonal de ratón humanizado hA20 κ (230-230'':233-233') -dímero de bisdisulfuro

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es tositumomab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es tositumomab etiquetado con ^{131}I . En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a tositumomab. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 90% con SEQ ID NO:70. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 90 % con SEQ ID NO: 71. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 95% con SEQ ID NO:70. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 95% con SEQ ID NO:71. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 98% con SEQ ID NO:70. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 98% con SEQ ID NO:71. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 99% con SEQ ID NO:70. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 99% con SEQ ID NO:71.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es ibritumomab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. La forma activa de ibritumomab usada en la terapia es ibritumomab tiuxetan. Cuando se usa con ibritumomab, el quelante tiuxetan (ácido dietilentriaminopentaacético) se vuelve complejo con un isótopo radioactivo tal como ^{90}Y o ^{111}In . En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es ibritumomab tiuxetan, o complejo etiquetado con radioisótopo del mismo. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-CD20 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a tositumomab. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 90% con SEQ ID NO:72. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 90% con SEQ ID NO:73. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 95% con SEQ ID NO:72. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 95% con SEQ ID NO:73. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 98% con SEQ ID NO:72. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 98% con SEQ ID NO:73. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada superior al 99% con SEQ ID NO:72. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera superior al 99% con SEQ ID NO:73.

En una realización, un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab e ibritumomab, y/o fragmentos de unión a antígeno, derivados, conjugados, variantes y complejos etiquetados con radioisótopos de los mismos, se administra a un sujeto por infusión de una dosis seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 75 mg, 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg,

aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1900 mg y aproximadamente 2000 mg. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 se administra semanalmente. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 se administra cada dos semanas. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 se administra cada tres semanas. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 se administra mensualmente. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 se administra a una dosis inicial más baja, que se modifica en escala cuando se administra a intervalos posteriores administrados mensualmente. Por ejemplo, la primera infusión puede administrar 300 mg de anticuerpo anti-CD20, y las dosis semanales posteriores pueden administrar 2.000 mg de anticuerpo anti-CD20 durante ocho semanas, seguidas de dosis mensuales de 2.000 mg de anticuerpo anti-CD20. Durante cualquiera de las realizaciones anteriores, las combinaciones de los inhibidores de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD 19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos se pueden administrar diariamente, dos veces al día o a diferentes intervalos como se describió anteriormente, a las dosis descritas anteriormente.

En una realización, la invención proporciona un kit que comprende una primera composición que comprende combinaciones del inhibidor de BTK de la fórmula (II) con un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y un anticuerpo anti-CD20 seleccionado del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab e ibritumomab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o complejo etiquetado con radioisótopo de los mismos, para usarse en el tratamiento de CLL o SLL, neoplasias malignas hematológicas, neoplasias malignas de células B o cualquiera de las otras enfermedades descritas en la presente. Las composiciones son habitualmente composiciones farmacéuticas. El kit es para usarse en co-administración del anticuerpo anti-CD20 y el inhibidor de BTK de la fórmula (II), ya sea simultáneamente o por separado, en el tratamiento de CLL o SLL, neoplasias malignas hematológicas, neoplasias malignas de células B o cualquiera de las otras enfermedades descritas en la presente.

Las secuencias de anticuerpo anti-CD20 a las que se hace referencia en lo anterior se resumen en la tabla 4.

TABLA 4. Secuencias del anticuerpo anti-CD20

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:60 cadena pesada de rituximab	QVQLQSGAE LVRPGASVKM SRAAGSTET SYNNRWVQT PGKLEWIGA IYPNGDIDY 60 NQKFKGRATL TADKSSSTAY NQLSLTSEED SAVYYCARST YGCDWTFPV WCAGTTIVTS 120 AASIKDFSVF PLAFSSASTS GCTAALGCLV ADYTFPTVTV SWSGALTSG YETTFAVLQS 180 SGLYSLSSVV TPSSSLGTQ TYICAVNHHP ENRVKRVKVS PSCDKTHTC PPGAPPELLG 240 GRSVLTPFPN EYDTLMISRT RMTTCVVVNV SNEDEPKPKK NYVQGVVHVN ANTKERHQQN 300 ESTYRVVSVL TVLQDWLNG KEYNCKVENK ALPAPIEKTI SKXGQPFEP QYTLPPSRD 360 ELTKNQVELT CLVKGTFPSD LAVWLSNGQ RENNFKTTPV VLDSDGSFFL YSKLVKRRQ 420 WQDGNVTRCS VKRKAIRHKK TQKSLSLSPG A 481
SEQ ID NO:61 cadena ligera de rituximab	QIVLSQSPAI LKASPGKVT HTCRASSVS NIEWFQQKPG SSPKPNVYAT SKLASGVPR 60 PSGSSGSTSY SLTISRVEAS DAATYYQQW TSKPTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPG 120 SEQLKSTAS VVCLLNNTYP KEAIVQKVVJ KALQSGNSQE SVTEQSRKVS TYGLSLTLIL 180 SKADYENHNV YACENTHQSL SSPVTSBNR GEC 213
SEQ ID NO:62 cadena pesada de obinutuzumab	QVQLVQSGAE VNRPGSSVKV SRAASGYAF YSWNHWVQA PGQGLEWNGP ITPGQGDIDY 60 NQKFKGRVTL TADKSSSTAY NQLSLTSEED SAVYYCARNV PDGYNLVTVS QDTLVTVSSA 120 STNGPSVFPVLP APSSKSTGGC TAAALGCLVRD YTFPTVTVEN NSCALISGVH TTFEAVLQSSG 180 LYSLSSVVTV PSSLGTQTY ICHVNEKPHN TRVOKKVEPK SCDKHTCTCP CPAPPELLGCP 240 SVELFPKPKR DTLNISRTPE VTCVAVDVSH EDPEVKFNWY VQGVVHVNK TXPREEQHNS 300 TYRVSVSVTV LQDWLNGKE TKCKVKNKAL PAPIEKFKK AQQPFEPGV YTLFSSKDL 360 ENQVSLTCL VNGFYSSDIA VERESAGQPE ENYNTTFFVL DSDGSFFLIS NTVOKRRRQ 420 QNAVFSQVH KEALNNATQ KSLSLSPGK 448

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO:63 cadena ligera de obinutuzumab	DIYVNTQITFLR LPVTTCGPAP ISCRSSSKSL ESNGITVLYW YLQNPQQA-PQ LLIYQMNLV 60 SEVDFRFGG GGTAFFLKI SPVRAEDVGV ETCAQNLLEP YTFGGGTRVE IKNTVAAPSV 120 PIFPPSDEQL KSGTAVVCL LKKFTFPEAK VQKRVNNALQ SGNSQSSVTE QDSKDSVSL 180 SSITFLNAD YKHKVYACE VTEQGLSSSV TKSFNPSEC 210
SEQ ID NO:64	EVQLVESGGG LVQPGKSLRL SCAASGFTFN DYAMHWVQA PGKGLERVS ISWNSGSIQY 60
cadena pesada variable de ofatumumab	ADSVKGRFTI SRDAKKSLY LQMSLSRAED TALYYCAKDI QYGNYYVGMN VWGQSTTVTV 120 SE 122
SEQ ID NO: 65 Cadena ligera variable de ofatumumab	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCTASQSVS SYLAWYQQKP QCAPPLLIYD ASNPATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTLSLEP EDFAVYTCQQ RSNWPIITPQ QTRLEIA 107
SEQ ID NO: 66 cadena pesada de fragmento Fab de ofatumumab	EVQLVESGGG LVQPGKSLRL SCAASGFTFN DYAMHWVQA PGKGLERVS ISWNSGSIQY 60 ADSVKGRFTI SRDAKKSLY LQMSLSRAED TALYYCAKDI QYGNYYVGMN VWGQSTTVTV 120 SSASTNGDSV FPLAPSSSKS TSGTAALGCL VKNFTPEPVT VSNNSGALTS GVHTFPAVLQ 180 SSGLYSLSFV VIVYSSSLGT QTYICHVHEK PSNTXVDRKV EP 222
SEQ ID NO: 67 cadena ligera de fragmento Fab de ofatumumab	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCTASQSVS SYLAWYQQKP QCAPPLLIYD ASNPATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTLSLEP EDFAVYTCQQ RKWPITPQ GTPLSIRTV AAPSVETFP 120 SDQLKSGTA SVVCLLNRFY DEAKVQWV DNALQSGNSQ SVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSNADYKHK VYACEVTHQ LSSTVTKSPN P 211
SEQ ID NO: 68 cadena pesada de veltuzumab	QVQLQSGAE VKKPGSSVAV SCYASGYTFI SYNHWVYQA PGQGLEWIGA YTFGMGDISY 60 AQXFKGKATL TADSTNTAY MELSLSLSSD TAFYYCARST YFGGHWYFV WGQSTTVIVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSL GGTAALGCLV KYTFPEPVTV SNNSGALTSQ VETFPVAVLS 180 GLYLSLSVY TFPSSSLCTQ TYTCVNHRE SHXVDNRVS EKSCENTHIC FFCPAPELLC 240 GPSVELEPPK EDTLNISRT DEVTGVVDV SHEDPEVKFN WYVDCVSVHN AKTKEREESQY 300 NGTYRVSVL TVLHQDWLNC KYKCKVSNK ALAPDIENI SKAKQCPRE QVITLPPSR 360 EMTINQVSLT CLVKGFPSSD LAVWESNGQ PENNYXTTTP VLESDGSEFL YSKLTVDASR 420 WQGGNVFSGH VNREALENRY TGKLSLSFG K 451
SEQ ID NO: 69 cadena ligera de veltuzumab	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCTASQSVS SYLAWYQQKP QCAPPLLIYD ASNPATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTLSLEP EDFAVYTCQQ TSKPPITPQQ TKLEIAATVA APSVETFP 120 SDQLKSGTA SVVCLLNRFY DEAKVQWV NALQSGNSQS SVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSNADYKHK VYACEVTHQ SSPVRSENR GEC 210

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO: 70 cadena pesada de tositumomab	<pre> DAYLQSGAE LVRPGASVKH SCKASGYTET SYNMHWYQT PRQGLEWIGA YPCNGDTSY 60 NQRIKQKATL TVDSSSTAY MQLSELTSSE SAVYFCARVV YYSNQYWFY VAGIGOTTVTY 120 TQPSVPLPAP SSSTSTSGTA ALGCLVGYTF PEPVTVSWHS GALTSGVHTF RAVLQSSGLY 180 ELSSVTVPS SSLOTQTYIC NVNKKPSNTK VDKKAEPKSC DTEITCPPCF APRLGGPSV 240 ELSPKPKEDT LMISRIPEVT QVVVDVSHED PEVAENNVVD QVEYHMAKTK PRSQYKSTY 300 PVVSVLTPLH QDWLNCKEYK CNVSNKALPA ELKATISKAK QCPRIPOVIT LPTSDDELTK 360 NIVSLTCLVX GYFSDHAYE WESNCGPERR YNTPEPVLEH DQSFPLYSKL TVDKSPWQGG 420 NIVSCSVMEH ALENRYTKRH LSLSPGK 447 </pre>
SEQ ID NO: 71 cadena ligera de tositumomab	<pre> QIVLSQSPAI LSASPGENV MTCDASSSVS YMEWYQQKPG SSKPKNIYAP SKLASGVGAR 60 PSSGGSTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW SFNPPTFGAG TKLELKTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNMYYP PEKAVQNKVD KALQSGNSQE SVTEQDSKIS TYSLSSTLEL 180 SKADYENKVV YACEVTHQGL SSPVTKSFN 210 </pre>
SEQ ID NO: 72 cadena pesada de ibritumomab	<pre> DAYLQSGAE LVRPGASVKH SCKASGYTET SYNMHWYQT PRQGLEWIGA YPCNGDTSY 60 NQRIKQKATL TVDSSSTAY MQLSELTSSE SAVYFCARVV YYSNQYWFY VAGIGOTTVTY 120 TQPSVPLPAP VGGSTFGSSV ELGCLVGYTF PEPVTLWHS GALTSGVHTF RAVLQSSGLY 180 LSSSVTVPS TWPSSQITCR VAEFASSTKV DALLSPKOPT LKCPFCPCF APRLGGPSV 240 ELSPKPKEDT LMISRIPEVT QVVVDVSHED PVQISWVVR NVEVRIAGTQ TEADYKSTL 300 PVVSVLTPLH QDWLNCKEYK CNVSNKALPA ELKATISKAP QSVRAPOVIT LPTSDDELTK 360 NQVTLTCNVT DEMFEDLYVE RTNCKTEFLN YNTPEPVLEH DQSFPLYSKL TVDKKNWVER 420 NIVSCSVVLE GLENRYTKRH FSK 448 </pre>
SEQ ID NO: 73 cadena ligera de ibritumomab	<pre> QIVLSQSPAI LSASPGENV MTCDASSSVS YMEWYQQKPG SSKPKNIYAP SKLASGVGAR 60 PSSGGSTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW SFNPPTFGAG TKLELKTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNMYYP PEKAVQNKVD KALQSGNSQE SVTEQDSKIS TYSLSSTLEL 180 SKADYENKVV YACEVTHQGL SSPVTKSFN 208 </pre>

Combinaciones de inhibidores de BTK e inhibidores de CD19 con principios activos farmacéuticos quimioterapéuticos

5

10

15

20

Las combinaciones de los inhibidores de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD 19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos también se pueden coadministrar de manera segura con principios activos farmacéuticos quimioterapéuticos tal como gemcitabina, paclitaxel unido a albúmina (nab-paclitaxel) y bendamustina o clorhidrato de bendamustina. En una realización preferida, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina o una sal, profármaco, cocrystal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK que consiste en la fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de CD 19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina o una sal, profármaco, cocrystal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización, el cáncer de tumor sólido en cualquiera de las realizaciones anteriores es cáncer de páncreas.

25

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de paclitaxel unido a albúmina. En una realización, el cáncer de tumor sólido en cualquiera de las realizaciones anteriores es cáncer de páncreas.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de clorhidrato de bendamustina. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de clorhidrato de bendamustina y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab (denominado colectivamente como "BR" o "quimioterapia BR"). Se ha demostrado que la quimioterapia BR mejora las tasas de respuesta general en el linfoma no Hodgkin y los linfomas de células del manto y también demostró una seguridad mejorada en comparación con los regímenes alternativos, como se describe en Flinn, et al., Blood 2014, 123, 2944-52.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (que colectivamente se pueden denominar "FCR" o "quimioterapia FCR"). Se ha demostrado que la quimioterapia FCR mejora la supervivencia en pacientes con cáncer, como se describe en Hallek, et al., Lancet. 2010, 376, 1164-1174.

En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica o un cáncer de tumor sólido en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de rituximab, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina (también denominado hidroxidaunomicina), sulfato de vincristina (también denominado oncovina) y prednisona (que colectivamente pueden denominarse "R-CHOP" o "quimioterapia R-CHOP"). Se ha demostrado que la quimioterapia R-CHOP mejora las tasas de supervivencia general y libre de progresión a 10 años para pacientes con cáncer, como se describe en Sehn, Blood, 2010, 116, 2000-2001.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el principio activo farmacéutico quimioterapéutico o combinaciones de los mismos se pueden administrar antes, simultáneamente o después de la administración de los inhibidores de CD 19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos y los inhibidores de BTK de la fórmula (II).

Combinaciones de inhibidores de BTK e inhibidores de CD19 con inhibidores de PD-1, PD-L1 y/o PD-L2

Las combinaciones de los inhibidores de BTK de la fórmula (II) con inhibidores de CD 19 seleccionados de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos también se pueden combinar adicionalmente con anticuerpos o inhibidores de unión a muerte programada-1 (PD-1), ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y/o ligando de muerte programada 2 (PD-L2) (es decir, bloqueadores). En una realización preferida, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, durvalumab, atezolizumab, avelumab y fragmentos de unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares de los mismos. En una realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de un cáncer en un humano que comprende un inhibidor de BTK de la fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de CD19, que incluye un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento o conjugado de anticuerpo, del mismo, y que comprende además un inhibidor de PD-1 o PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante o biosimilar del mismo.

La muerte programada 1 (PD-1) es una proteína receptora de inmunocomprobación transmembrana de 288 aminoácidos expresada por células T, células B, células T asesinas naturales (NK), monocitos activados y células dendríticas. PD-1, que también se conoce como CD279, es un inmunorreceptor que pertenece a la familia CD28 y en humanos está codificado por el gen *Pdcd1* en el cromosoma 2. PD-1 consiste en un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig), una región transmembrana y un dominio intracelular que contiene un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) y un motivo de cambio basado en tirosina inmunorreceptor (ITSM). PD-1 y sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) juegan un papel clave en la tolerancia inmunitaria, como se describe en Keir, et al., Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 677-704. PD-1 proporciona señales inhibitoras que regulan negativamente las respuestas inmunitarias de las células T. PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-DC o CD273) se expresan en células tumorales y células estromales, que pueden encontrarse con células T activadas que expresan PD-1, lo que conduce a la inmunosupresión de las células T. PD-L1 es una proteína transmembrana de 290 aminoácidos codificada por el gen *Cd274* en el cromosoma 9 humano. El bloqueo de la interacción entre PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2 mediante el uso de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 y/o un inhibidor de PD-L2 puede superar la resistencia inmunitaria, como se demostró en estudios clínicos recientes, tal como el descrito en Topalian, et al., N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443. PD-L1

se expresa en muchas líneas celulares tumorales, mientras que PD-L2 se expresa principalmente en células dendríticas y algunas líneas tumorales. Además de las células T (que expresan induciblemente PD-1 después de la activación), PD-1 también se expresa en células B, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos activados y células dendríticas.

5 En una realización, el inhibidor de PD-1 puede ser cualquier inhibidor de PD-1 o bloqueador de PD-1 conocido en la técnica. En particular, es uno de los inhibidores o bloqueadores de PD-1 descritos con más detalle en los siguientes párrafos. Los términos "inhibidor" y "bloqueador" se usan indistintamente en la presente con referencia a los inhibidores de PD-1. Para evitar dudas, las referencias en la presente a un inhibidor de PD-1 que es un anticuerpo pueden referirse a un compuesto o fragmentos de unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares del mismo. Para evitar dudas, las referencias en la presente a un inhibidor de PD-1 también pueden referirse a un compuesto o una sal, éster, solvato, hidrato, cocrystal o fármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen un inhibidor de PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es una molécula pequeña. En una realización preferida, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo (es decir, un anticuerpo anti-PD-1), un fragmento del mismo, que incluye fragmentos Fab, o un fragmento variable de cadena individual (scFv) del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo policlonal. En una realización preferida, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 compete por la unión con PD-1, y/o se une a un epítipo en PD-1. En una realización, el anticuerpo compete por la unión con PD-1, y/o se une a un epítipo en PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 se incluye en una composición y se combina adicionalmente con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, se incluye un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 en una composición y se combina además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos.

25 En algunas realizaciones, los inhibidores de PD-1 proporcionados en la presente son selectivos para PD-1, ya que los compuestos se unen o interactúan con PD-1 a concentraciones sustancialmente más bajas de las que se unen o interactúan con otros receptores.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor, se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 90 pM o menor, se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 80 pM o menor, se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 70 pM o menor, se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 60 pM o menor, se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 50 pM o menor, se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 40 pM o menor, o se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ l/M·s o más rápida, se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ l/M·s o más rápida, se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 8×10^5 l/M·s o más rápida, se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $8,5 \times 10^5$ l/M·s o más rápida, se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 9×10^5 l/M·s o más rápida, se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $9,5 \times 10^5$ l/M·s o más rápida, o se une a PD-1 humano con una $K_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 1×10^6 l/M·s o más rápida.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta o se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, o se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lenta.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o menos, o bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o menos.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende nivolumab (disponible comercialmente de Bristol-Myers Squibb Co.), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. Nivolumab se conoce como 5C4 en la publicación de patente internacional No. WO 2006/121168. A Nivolumab se le asignó el número de registro del Servicio de Resúmenes Químicos (CAS) 946414-94-4 y también se le conoce como BMS-936558, MDX-1106 u ONO-4538. Nivolumab es un anticuerpo IgG4 completamente humano que bloquea el receptor PD-1. La seguridad clínica y la eficacia de nivolumab en diversas formas de cáncer se han descrito en Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014, 2, 846-56; Page et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; y Weber, et al., J. Clin. Oncology, 2013, 31, 4311-4318. El anticuerpo monoclonal de nivolumab incluye una cadena pesada dada por SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera dada por SEQ ID NO: 75. Nivolumab tiene enlaces de disulfuro de cadena intrapesada en 22-96, 140-196, 254-314, 360-418, 22"-96", 140"-196", 254"-314" y 360"-418"; enlaces de disulfuro de cadena intraligera en 23'-88', 134'-194', 23'''-88''' y 134'''-194'''; enlaces de disulfuro de cadena interpesada-ligera en 127'-214', 127'''-214''', enlaces de disulfuro de cadena interpesada-pesada en 219'-219" y 222'-222''; y sitios de N-glucosilación (H CH₂ 84,4) en 290, 290". En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo de inmunoglobulina G4 kappa, anti-(CD274 humano). En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables de cadena individual (scFv), variantes o conjugados de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o regiones variables (VR) de nivolumab. En una realización, la región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-PD-1 (V_H) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 76, y la región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-PD-1 (V_L) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 77. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77, respectivamente. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende regiones V_H y/o V_L que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:76 y/o SEQ ID NO:77, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80, respectivamente, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79 y SEQ ID NO:80, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79 y SEQ ID NO:80, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79 y SEQ ID NO:80, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79 y SEQ ID NO:80, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos antes mencionados.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:83, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:83, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:83, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende

una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:83, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos antes mencionados.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo divulgado y/o preparado de acuerdo con la patente de Estados Unidos No. 8,008,449 o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0217401 A1 o 2013/0133091 A1. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo monoclonal incluye 5C4 (referido en la presente como nivolumab), 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, descrito en la patente de Estados Unidos No. 8,008,449. Los anticuerpos de PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11, están todos dirigidos contra PD-1 humano, se unen específicamente a PD-1 y no se unen a otros miembros de la familia CD28. Las secuencias y regiones CDR para estos anticuerpos se proporcionan en la patente de Estados Unidos No. 8,008,449, en particular en la figura 1 a figura 12.

El anticuerpo anti-PD-1 nivolumab se puede preparar por el siguiente procedimiento, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 8,008,449. Los protocolos de inmunización utilizaron como antígeno tanto (i) una proteína de fusión recombinante que comprende la porción extracelular de PD-1 como (ii) PD-1 de longitud completa unida a membrana. Ambos antígenos se generaron mediante métodos de transfección recombinante en una línea de células CHO. Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos contra PD-1 usando la cepa HCo7 de ratones transgénicos HuMab y la cepa KM de ratones transgénicos transgénicos, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno se ha alterado de forma homocigótica como se describe en Chen et al. EMBO J. 1993, 12, 811-820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha alterado homocigóticamente como se describe en el ejemplo 1 de la publicación de patente internacional No. WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild, et al. Nat. Biotechnology 1996, 14, 845-851. La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada humana HCo7 como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5,545,806; 5,625,825; y 5,545,807. La cepa KM contiene el transgén SC20 como se describe en la publicación de patente internacional No. WO 02/43478. Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra PD-1, se inmunizaron ratones HuMab y ratones KM[™] con proteína de fusión PD-1 recombinante purificada y células CHO transfectadas con PD-1 como antígeno. Los esquemas de inmunización generales para ratones HuMab se describen en Lonberg, et al., Nature 1994, 368, 856-859; Fishwild, et al., Nat. Biotechnology 1996, 14, 845-851, y la publicación de patente internacional No. WO 98/24884. Los ratones tuvieron 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno de proteína de fusión PD-1 y 5-10×10⁶ células para inmunizar los ratones HuMab y KM Mice[™] de manera intraperitoneal, de manera subcutánea (Sc) o mediante inyección en la almohadilla plantar. Los ratones transgénicos se inmunizaron dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante Ribi IP, seguido de 3-21 días IP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund o Ribi. La respuesta inmunitaria se controló por hemorragias retroorbitales. El plasma se examinó por ELISA (como se describe más adelante) y se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-PD-1 para las fusiones. Los ratones se reforzaron de manera intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la remoción del bazo. Habitualmente, se realizaron 10-35 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno. Para seleccionar anticuerpos que producen HuMab o KM Mice[™] que se unen a PD-1, se probaron sueros de ratones inmunizados por ELISA como se describe por Fishwild, et al., Nat. Biotechnology 1996, 14, 845-851. En resumen, las placas de microtitulación se recubrieron con proteína de fusión PD-1 recombinante purificada de células CHO transfectadas a 1-2 µg/ml en PBS, 100 µl/pozos se incubaron a 4 °C durante la noche y entonces se bloquearon con 200 µl/pozo de suero bovino fetal al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). Se adicionaron diluciones de sueros de ratones inmunizados con PD-1 a cada pozo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y entonces se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron mediante espectrofotómetro a OD 415-495. Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-PD-1 se usaron para las fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe más adelante y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para determinar la actividad anti-PD-1 por ELISA. Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMab o KM, se fusionaron con una línea de células de mieloma de ratón usando PEG basado en protocolos estándar o electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión de células de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Md.). Los hibridomas resultantes entonces se examinaron para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Las suspensiones de células individuales de esplenocitos de ratones inmunizados se fusionaron a un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con 50 % de PEG (Sigma). Las células se colocaron en placas a aproximadamente 1×10⁵/pozo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contenía suero bovino fetal al 10 %, medio acondicionado con P388D1 al 10 % (ATCC, CRL TIB-63), origen al 3-5 % (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alto contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y 1xHAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio en el que el HAT se reemplazó con HT. Entonces, los pozos individuales se examinaron por ELISA (descrito anteriormente) para anticuerpos IgG monoclonales anti-PD-1 humanos. Una vez que se produjo un crecimiento extenso del hibridoma, el medio se controló usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se volvieron a sembrar en placas, se examinaron de nuevo y, si aún eran positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 se subclonaron al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su posterior

caracterización. El anticuerpo nivolumab se puede producir de esta manera, o por otros medios conocidos dada la descripción de las secuencias de aminoácidos en la presente.

En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende pembrolizumab, que está disponible comercialmente de Merck, o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. El pembrolizumab tiene asignado el número de registro CAS 1374853-91-4 y también se conoce como lambrolizumab, MK-3475 y SCH-900475. La estructura, propiedades, usos y preparación de pembrolizumab se describen en la publicación de patente internacional No. WO 2008/156712 A1, patente de Estados Unidos No. 8,354,509 y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 y US 2013/0109843 A2. Pembrolizumab tiene una inmunoglobulina G4, anti-(proteína humana PDCD1 (muerte celular programada 1)) (cadena pesada monoclonal de Mus musculus humano), disulfuro con cadena ligera monoclonal de Mus musculus humano, estructura de dímero. La estructura de pembrolizumab también se puede describir como inmunoglobulina G4, anti(muerte celular programada humana 1); monoclonal de ratón humanizado [228-L-prolina(H10-S>P)] cadena pesada γ 4 (134-218')-disulfuro con dímero de cadena ligera κ monoclonal de ratón humanizado (226-226'':229-229'')-bisdisulfuro. La seguridad clínica y eficacia de pembrolizumab en diversas formas de cáncer se describe en Fuerst, Oncology Times, 2014, 36, 35-36; Robert, et al., Lancet, 2014, 384, 1109-17; y Thomas et al., Exp. Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 1061-1064. En una realización, el anticuerpo monoclonal de pembrolizumab incluye una cadena pesada proporcionada por SEQ ID NO: 84 y una cadena ligera proporcionada por SEQ ID NO: 85, e incluye los siguientes puentes de disulfuro: 22-96, 22''-96'', 23-92', 23'''-92''', 134-218', 134''-218'', 138'-198', 138'''-198''', 147-203, 147''-203'', 226-226'', 229-229'', 261-321, 261''-321'', 367-425 y 367''-425'', y los siguientes sitios de glucosilación (N): Asn-297 y Asn-297''. Pembrolizumab es un isotipo IgG4/kappa con una mutación estabilizadora S228P en la región Fc; la inserción de esta mutación en la región bisagra de IgG4 evita la formación de semimoléculas habitualmente observadas para los anticuerpos IgG4. El pembrolizumab se glucosila de forma heterogénea en Asn297 dentro del dominio Fc de cada cadena pesada, que produce un peso molecular de aproximadamente 149 kDa para el anticuerpo intacto. La glucoforma dominante de pembrolizumab es la forma de glucano diantenario agalacto fucosilado (G0F).

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o VR de pembrolizumab. En una realización, la región V_H de anticuerpo anti-PD-1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 86, y la región V_L de anticuerpo anti-PD-1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 87. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:86 y SEQ ID NO:87, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:86 y SEQ ID NO: 87, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:86 y SEQ ID NO:87, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:86 y SEQ ID NO:87, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:86 y SEQ ID NO:87, respectivamente. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende regiones V_H y/o V_L que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:86 y/o SEQ ID NO:87, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO:90, respectivamente, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO:90, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90 % idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO:90, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias

mostradas en SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:88, SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO:90, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos antes mencionados.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:93, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:93, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:93, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:93, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos antes mencionados.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo divulgado en la patente de Estados Unidos No. 8,354,509 o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2010/0266617 A1, 2013/0108651 A1, 2013/0109843 A2.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es pidilizumab, que también se conoce como CT-011 (CureTech Ltd.), y que se divulga en la patente de Estados Unidos No. 8,686,119 B2. La eficacia de pidilizumab en el tratamiento de cánceres, tal como neoplasias malignas hematológicas, se describe en Berger, et al., Clin. Cancer Res. 2008, 14, 3044-51. El anticuerpo monoclonal de pidilizumab incluye una cadena pesada dada por SEQ ID NO: 94 y una cadena ligera dada por SEQ ID NO: 95. Pidilizumab tiene enlaces de disulfuro de cadena intrapesada en 22-96, 144-200, 261-321, 367-425, 22"-96", 144"-200", 261"-321" y 367"-425"; enlaces de disulfuro de cadena intraligera en 223'-87', 133'-193', 23"-87'" y 133"-193'"'; enlaces de disulfuro de cadena interpesada-ligera en 220-213' y 220"-213'", enlaces de disulfuro de cadena interpesada-pesada en 226-226" 229-229"; y sitios de N-glucosilación (H CH₂ 84,4) en 297, 297".

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal humanizado de inmunoglobulina G1 kappa, anti-(CD274 humano). En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o conjugados del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:97, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:97, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:97, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:97, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:97, respectivamente.

En una realización, los anticuerpos anti-PD-1 y otros inhibidores de PD-1 incluyen aquellos descritos en la patente de Estados Unidos No. 8,287,856, 8,580,247 y 8,168,757 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0028857 A1, 2010/0285013 A1, 2013/0022600 A1 y 2011/0008369 A1. En otra realización, también se incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos para unirse a PD-1. En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo divulgado en la patente de Estados Unidos No. 8,735,553 B1.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, tal como los clones anti-m-PD-1 J43 (Cat # BE0033-2) y RMP1-14 (Cat # BE0146) (Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH, EUA). Un número de anticuerpos anti-PD-1 comercialmente disponibles son conocidos por un experto en la materia.

Los anticuerpos monoclonales que inhiben o bloquean PD-1 se pueden preparar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, al inyectar sujetos de prueba con antígeno de PD-1 y entonces aislar hibridomas que expresan anticuerpos que tienen la secuencia deseada o características funcionales. El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, al usar

sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de este ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células hospedadoras tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma, u otras células adecuadas que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los detalles de la producción recombinante de anticuerpos específicos se pueden encontrar en las referencias citadas en lo anterior. Los anticuerpos monoclonales que inhiben PD-1 se pueden preparar por métodos de biología molecular estándar usando las secuencias proporcionadas en la presente por traducción inversa e inserción en vectores de ADN o ARN apropiados.

En una realización, el inhibidor de PD-1 puede ser una molécula pequeña o un péptido, o un derivado peptídico, tal como aquellos descritos en la patente de Estados Unidos No. 8,907,053; 9,096,642; y 9,044,442 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2015/0087581; compuestos de 1,2,4 oxadiazol y derivados tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2015/0073024; compuestos peptidomiméticos cíclicos y derivados tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2015/0073042; compuestos cíclicos y derivados tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2015/0125491; compuestos de 1,3,4 oxadiazol y 1,3,4 tiadiazol y derivados tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2015/033301; compuestos y derivados basados en péptidos tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2015/036927 y WO 2015/04490, o compuestos y derivados basados en péptidos macrocíclicos tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2014/0294898.

Las secuencias de anticuerpo anti-PD-1 analizadas y a las que se hace referencia en algunas de las realizaciones anteriores se resumen en la tabla 5.

TABLA 5. Secuencias de aminoácidos de anticuerpo anti-PD-1.

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO: 74 cadena pesada de nivolumab	QVQLVESGGG VQPGSRSLRL DCRASGIPFS NSGMHWVRQA POKGLEWVAV ITYDGSKYY 60 ADSYAGRTTI EDNSKNTLP LQNSLRAED IAVYTCATD PYGQCPLVT VSSASTROPFS 120 VFELAPCSRS TRESTAALCT LKRYTFSPV TVSNNSCALT SVHTFFAVL QSSCLYSLSS 180 VVTVPSSSLG IATYTCNVLH KPSNTAVDKR VESNYCPFCF PDPAPFELCG PSVLEFPKP 240 KPTLMISSTP EYTCVVDVS QEDPEVQFNW YVDSVVRKA KRPRESQFN STYRVSVLT 300 VLKQWLNCK EYKRVENKI LEFSISKPIG KAGGQRRSP VYTLFFSQDE MTKQVSLFC 360 LVKGYFESLI AVSEESNCF DHHYKTFPV LDDGSEELY SPLTVASRN QENVFSCSV 420 DHEALENYT QKSLSLCK 480	
SEQ ID NO: 75 cadena ligera de nivolumab	EIVLTQSPAT LSLPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQCKP QCAPRLIYD ASNPATGIPA 60 PPSGSGSDT FLTISSLEP ERFVNYCQQ SSKRPRTGQ GTRVEIKRTV AAPSVFIPP 120 SDEQLNGTA SVVLLNNEY PREAEVQNV DNALQSGNSQ EGVTEQDSKD STYSLSLIT 180 LSKADYEXH VYACEVTHQ LSPVTKGFN RGEQ 214	
SEQ ID NO: 76 cadena pesada variable de nivolumab	QVQLVESGGG VQPGSRSLRL DCRASGIPFS NSGMHWVRQA POKGLEWVAV ITYDGSKYY 60 ADSYAGRTTI EDNSKNTLP LQNSLRAED IAVYTCATD PYGQCPLVT VSS 113	
SEQ ID NO: 77 cadena ligera variable de nivolumab	EIVLTQSPAT LSLPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQCKP QCAPRLIYD ASNPATGIPA 60 PPSGSGSDT FLTISSLEP ERFVNYCQQ SSKRPRTGQ GTRVEIK 107	
SEQ ID NO: 78 CDR1 de cadena pesada de nivolumab	NSGMH	5

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:79 CDR2 de cadena pesada de nivolumab	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID NO:80 CDR3 de cadena pesada de nivolumab	NDDY	4
SEQ ID NO:81 CDR1 de cadena ligera de nivolumab	RASQSVSSYLA	11
SEQ ID NO:82 CDR2 de cadena ligera de nivolumab	DASNRAT	7
SEQ ID NO:83 CDR3 de cadena ligera de nivolumab	QQSSNWPRT	9
SEQ ID NO: 84 cadena pesada de pembrolizumab	QVQLVQSGQVE VKNRQASVEV SCKASCTFT NYNYWVPPQ PQQGLEWMGC INPSNGOTNE 60 NERKARVYL TDSSTITAY MELASLQFLD TAVYYCAPPD YRDMGFDFW QQGFTIVTVSS 120 ASTKPSVFP LARCSRSTEE STAALCCLVX DYFEPVIVE WNSCALTEGV ATFFAVLQSS 150 GLYSLSSTVT VSSSLGTET YTONVDKPPS NTKVOKPVEE KYGFCFPCP APFPLGGPSV 240 ELFFPKPKT LMSRTPEVT QVYVDSQED EEWQFNWVVD GVSENAKTA FEEQPKSTY 300 RVVSVLVLE QWLAGKXKA QVSNKGLPS EIEKPIKAA QQRPEQVIT APPSQHEMK 360 HQVSLTCLV GEYSSDIADV WESNGQDEN YKTPPVLDG DGEFFLYSL TVDKSRWQDG 420 NVESSVMHD ALNNTYQAS LSLSLGR 447	
SEQ ID NO: 85 cadena ligera de pembrolizumab	EIVLTQSPAT LSLSPCEPAT LSCRASKQVS TSCYSYLHWY QQKFCQAPPL LIYLASYLES 60 GVEARFSGSG SGTOSTITIS SLEPELFAVI YQGESRLDPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 LFTPSDEQLK SGTASVVCLL HRFYPREAVY QKQVDNALQS QHQSQSVTEQ ESKDSTYSLG 180 STILSLNADY EKHVYACEV IEQGLSSFTV KLPKRSGC 219	
SEQ ID NO: 86 cadena pesada variable de pembrolizumab	QVQLVQSGQVE VKNRQASVEV SCKASCTFT NYNYWVPPQ PQQGLEWMGC INPSNGOTNE 60 NERKARVYL TDSSTITAY MELASLQFLD TAVYYCAPPD YRDMGFDFW QQGFTIVTVSS 120	
SEQ ID NO: 87 cadena ligera variable de pembrolizumab	EIVLTQSPAT LSLSPCEPAT LSCRASKQVS TSCYSYLHWY QQKFCQAPPL LIYLASYLES 60 GVPAPFSGSG SCTFTLTIS SLEPEHFAVI YQGESRLDPL TFGGGTKVEI K 111	
SEQ ID NO:88 CDR1 de cadena pesada de pembrolizumab	NYNMY	5

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:89 CDR2 de cadena pesada de pembrolizumab	GINPSNGGTN FNEKFK	16
SEQ ID NO:90 CDR3 de cadena pesada de pembrolizumab	RDYRFDMGFD Y	11
SEQ ID NO:91 CDR1 de cadena ligera de pembrolizumab	RASKGVSTSG YSYLH	15
SEQ ID NO:92 CDR2 de cadena ligera de pembrolizumab	LASYLES	7
SEQ ID NO:93 CDR3 de cadena ligera de pembrolizumab	QHSRDPLPT	9
SEQ ID NO:94 cadena pesada de pidilizumab	QVQLVQSGSE LKRPASVKI SCKASGYFT NYGMNVPQA PGQGLQRMGW INTDSGESTY 60 ADEEAGREVF SLFTSVNTAY LQITSLIAED TGMVFCVRVQ YDALLRWQQG TLVIYSSAST 120 KQPSVFELAP SSKSTSCOTA ALGCLVRDYF PEPVTVSNKS GALTSCVHTF PAVLQSSGLY 180 SLSSVIVFES SSLOTQSYLC NVNKRPSNTK VDKRVLPKSC DKTHCPFCF APFLLQCPGV 240 FLFPKPKEDT LMSRTEPVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD QVEVHNAIKT FREEQYNSTY 300 NVSVLIYLR QVWLAGAEIK QVSAALAPA FIEKTIIRAK QPRPFPVYT LPPSRHMTK 360 NQVSLTCLVE GFYPSQIAVE WEEFQPEAK YKTTFPVLS DGSFFLYSL TVKSKWQQG 420 NVFSCVMHE ADEEYIQKS LSLSPGK 447	
SEQ ID NO:95 cadena ligera de pidilizumab	EIVLTQSPFS LSASVGRVT ITCSARSSV YMERFQQKPS KAPKMIYPT SNLASGVPSR 60 PEGGGSGFET CLTINSLQPE DEATYYCQGP SSEPLTFGGG TNLKIKRIVA ADSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNTFP PRAKVKQKVD NALQSGNSQE SVTRQPSHDS TYSLSSTLT 180 SZADYEXHKV YACEVTHOOL SSPVTKSFNR QET 213	
SEQ ID NO: 96 cadena pesada variable de pembrolizumab	QVQLVQSGSE LKRPASVKI SCKASGYFT NYGMNVPQA PGQGLQRMGW INTDSGESTY 60 ADEEAGREVF SLFTSVNTAY LQITSLIAED TGMVFCVRVQ YDALLRWQQG TLVIYSS 117	
SEQ ID NO: 97 cadena ligera variable de pembrolizumab	EIVLTQSPFS LSASVGRVT ITCSARSSV YMERFQQKPS KAPKMIYPT SNLASGVPSR 60 PEGGGSGTST CLTINSLQPE DEATYYCQGP SSEPLTFGGG TNLKIKRIVA 106	

El inhibidor de PD-L1 o PD-L2 puede ser cualquier inhibidor o bloqueador de PD-L1 o PD-L2 conocido en la técnica. En particular, es uno de los inhibidores o bloqueadores de PD-L1 o PD-L2 descritos con más detalle en los siguientes párrafos. Los términos "inhibidor" y "bloqueador" se usan indistintamente en la presente con referencia a los inhibidores de PD-L1 y PD-L2. Para evitar dudas, las referencias en la presente a un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 que es un anticuerpo pueden

referirse a un compuesto o fragmentos de unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares del mismo. Para evitar dudas, las referencias en la presente a un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 pueden referirse a un compuesto o una sal, éster, solvato, hidrato, cocrystal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En algunas realizaciones, las composiciones y métodos incluyen un inhibidor de PD-L1 o PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y PD-L2 es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo anti-PD-L1 o anti-PD-L2, un fragmento del mismo, que incluye fragmentos Fab o fragmentos variables de cadena individual (scFv). En un aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo en cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente se reemplaza por, o se combina con, un anticuerpo anti-PD-L1 o anti-PD-L2 o fragmento del mismo. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une a un epítipo en PD-L1 y/o PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, se incluye un inhibidor de PD-L1 en una composición y se combina además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, se incluye un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 en una composición y se combina además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, se incluye un inhibidor de PD-L2 en una composición y se combina además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, tanto un inhibidor de PD-1 como un inhibidor de PD-L1 se incluyen en una composición y se combinan además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, tanto un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 como un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 se incluyen en una composición y se combinan además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, tanto un inhibidor de PD-1 como un inhibidor de PD-L2 se incluyen en una composición y se combinan además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, tanto un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 como un anticuerpo monoclonal anti-PD-L2 se incluyen en una composición y se combinan además con un inhibidor de BTK de Fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos.

En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en la presente proporcionan una combinación de un inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 con un inhibidor de BTK de la fórmula (II) y un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos. En algunas realizaciones, los inhibidores de PD-L1 proporcionados en la presente son selectivos para PD-L1, ya que los compuestos se unen o interactúan con PD-L1 a concentraciones sustancialmente más bajas de las que se unen o interactúan con otros receptores, incluido el receptor PD-L2. En ciertas realizaciones, los compuestos se unen al receptor de PD-L2 a una constante de unión que es al menos aproximadamente una concentración 2 veces mayor, aproximadamente una concentración 3 veces mayor, aproximadamente una concentración 5 veces mayor, aproximadamente una concentración 10 veces mayor, aproximadamente una concentración 20 veces mayor, aproximadamente una concentración 30 veces mayor, aproximadamente una concentración 50 veces mayor, aproximadamente una concentración 100 veces mayor, aproximadamente una concentración 200 veces mayor, aproximadamente una concentración 300 veces mayor o aproximadamente una concentración 500 veces mayor que al receptor de PD-L1.

Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que las células tumorales expresan PD-L1 y que las células T expresan PD-1. Sin embargo, la expresión de PD-L1 por las células tumorales no es necesaria para la eficacia de los inhibidores o bloqueadores de PD-1 o PD-L1. En una realización, las células tumorales expresan PD-L1. En otra realización, las células tumorales no expresan PD-L1. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente incluyen una combinación de un anticuerpo PD-1 y PD-L1, tal como aquellas descritas en la presente, en combinación con un inhibidor de BTK de la fórmula (II). La administración de una combinación de un anticuerpo PD-1 y PD-L1 y un inhibidor de BTK de la fórmula (II) puede ser simultánea o secuencial.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 que se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 90 pM o menor, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 80 pM o menor, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 70 pM o menor, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 60 pM o menor, a K_D de aproximadamente 50 pM o menor, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 40 pM o menor, o se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor,

- En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 que se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M·s o más rápida, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 8×10^5 1/M·s o más rápida, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $8,5 \times 10^5$ 1/M·s o más rápida, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 9×10^5 1/M·s o más rápida, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $9,5 \times 10^5$ 1/M·s y/o más rápida, o se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 1×10^6 1/M·s o más rápida.
- En algunas realizaciones, las composiciones para usarse descritas incluyen un inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 que se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-1 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta, o se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lenta.
- En algunas realizaciones, las composiciones para usarse descritas incluyen un inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 que bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o menos; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o menos; o bloquea PD-1 humano o bloquea la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o menos.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es durvalumab, también conocido como MEDI4736 (que está disponible comercialmente de Medimmune, LLC, Gaithersburg, Maryland, una subsidiaria de AstraZeneca plc.), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo divulgado en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108 o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2013/0034559. La eficacia clínica de durvalumab (MEDI4736, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99) se ha descrito en: Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (complemento, resumen 8021); y McDermott, et al., Cancer Treatment Rev., 2014, 40, 1056-64. El anticuerpo monoclonal de durvalumab (MEDI4736) incluye una región V_H dada por SEQ ID NO: 100 (que corresponde a SEQ ID NO: 72 en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108) y una región V_L dada por SEQ ID NO: 101 (que corresponde a SEQ ID NO: 77 en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108). El anticuerpo monoclonal de durvalumab incluye enlaces de disulfuro en 22-96, 22"-96", 23'-89', 23"-89", 135'-195', 135"-195", 148-204, 148"-204", 215'-224, 215"-224", 230-230", 233-233", 265-325, 265"-325", 371-429 y 371"-429"; y sitios de N-glucosilación en Asn-301 y Asn-301".
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es una inmunoglobulina G1, anti-(antígeno CD humano CD274) (cadena pesada monoclonal humana), disulfuro con cadena κ monoclonal humana, dímero. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las cadenas pesadas y ligeras de durvalumab (MEDI4736). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o conjugados del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 100 (que corresponde a SEQ ID NO: 72 en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108) y SEQ ID NO: 101 (que corresponde a SEQ ID NO: 77 en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108), respectivamente, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108 o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2013/0034559 que incluye fragmentos de unión a antígeno, conjugados y variantes de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ

- ID NO:100 y SEQ ID NO: 101, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:101, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:101, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:101, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:101, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 90% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:101, respectivamente.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 104, respectivamente, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO:106, y SEQ ID NO:107, respectivamente.
- En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO:103, y SEQ ID NO:104, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103 y SEQ ID NO:104, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, y SEQ ID NO:104, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103 y SEQ ID NO:104, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compete por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos antes mencionados.
- En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, y SEQ ID NO: 107, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, y SEQ ID NO: 107, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:106 y SEQ ID NO:107, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, y SEQ ID NO: 107, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compete por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos antes mencionados.
- En una realización, los anticuerpos anti-PD-L1 y otros inhibidores de PD-L1 incluyen aquellos escritos en la patente de Estados Unidos No. 8,779,108 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2013/0034559A1. En otra realización, también se incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos para unirse a PD-L1.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab, también conocido como MPDL3280A o RG7446 (disponible comercialmente de Genentech, Inc., una subsidiaria de Roche), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo divulgado en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo divulgado en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2010/0203056 A1, 2013/0045200 A1, 2013/0045201 A1, 2013/0045202 A1 o 2014/0065135 A1. El anticuerpo monoclonal de atezolizumab incluye una cadena pesada dada por SEQ ID NO: 108 y una cadena ligera dada por SEQ ID NO: 109. Atezolizumab tiene enlaces de disulfuro de cadena intrapesada (C23-C104) en 22-96, 145-201, 262-322, 368-426, 22"-96", 145"-201", 262"-322" y 368"-426"; enlaces de disulfuro de cadena intraligera (C23-C104) en 23'-88', 134'-194', 23'''-88''' y 134'''-194'''; enlaces de disulfuro de cadena intraligera-pesada (h 5-CL 126) en 221-214' y 221'''-214'''; enlaces de disulfuro de cadena intraligera-pesada (h 11, h 14) en 227-227" y 230-230"; y sitios de N-glucosilación (H CH₂ N84,4 >A) en 298 y 298'.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal humanizado de inmunoglobulina G1 kappa, anti-(PD-L1 humano). En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las cadenas pesadas y ligeras de atezolizumab (MPDL3280A). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:108 y SEQ ID NO:109, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o conjugados del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 109, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:108 y SEQ ID NO:109, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:108 y SEQ ID NO:109, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en

SEQ ID NO:108 y SEQ ID NO:109, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:108 y SEQ ID NO:109, respectivamente.

5 En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o VR de atezolizumab (MPDL3280A). En una realización, la región V_H de anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 110 (que corresponde a SEQ ID NO: 20 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), y la región V_L de anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 111 (que corresponde a SEQ ID NO: 21 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO: 111, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO: 111, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO: 111, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO:111, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO:111, respectivamente.

20 En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende un polipéptido de región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde la secuencia de CDR1 se da por SEQ ID NO: 112 (GFTFSX₁SWIH) (que corresponde a SEQ ID NO: 1 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), la secuencia de CDR2 es SEQ ID NO: 113 (AWIX₂PYGGX₃YYADSVKG) (que corresponde a SEQ ID NO: 2 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), y la secuencia de CDR3 es SEQ ID NO: 114 (RHWPGGFDY) (que corresponde a SEQ ID NO: 3 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), en donde además X₁ es D o G, X₂ es S o L, y X₃ es T o S, y el anticuerpo anti-PD-L1 también comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 en donde la secuencia de CDR1 se da por SEQ ID NO: 115 (RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A) (que corresponde a SEQ ID NO: 8 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), la secuencia de CDR2 se da por SEQ ID NO: 116 (SASX₉LX₁₀S) (que corresponde a SEQ ID NO: 9 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), y la secuencia de CDR3 es SEQ ID NO: 117 (QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T) (que corresponde a SEQ ID NO: 10 en la patente de Estados Unidos No. 8,217,149), en donde además: X₄ es D o V; X₅ es V o I; X₆ es S o N; X₇ es A o F; X₈ es V o L; X₉ es para T; X₁₀ es Y o A; X₁₁ es Y, G, F, o S; X₁₂ es L, Y, F o W; X₁₃ es Y, N, A, T, G, F o I; X₁₄ es H, V, P, T o I; y X₁₅ es A, W, R, P o T.

35 En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab, también conocido como MSB0010718C (disponible comercialmente de Merck KGaA/EMD Serono), o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo divulgado en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1. El anticuerpo monoclonal de avelumab incluye una cadena pesada dada por SEQ ID NO: 118 y una cadena ligera dada por SEQ ID NO: 119. Avelumab tiene enlaces de disulfuro de cadena intrapesada (C23-C104) en 22-96, 147-203, 264-324, 370-428, 22"-96", 147"-203", 264"-324" y 370"-428"; enlaces de disulfuro de cadena intraligera (C23-C104) en 22'-90', 138'-197', 22'''-90''' y 138'''-197'''; enlaces de disulfuro de cadena intraligera-pesada (h 5-CL 126) en 223-215' y 223"-215"; enlaces de disulfuro de cadena intraligera-pesada (h 11, h 14) en 229-229" y 232-232 "; sitios de N-glucosilación (H CH₂ N84,4) en 300, 300"; glucanos de tipo CHO biantenarios complejos fucosilados; y recorte de lisina C-terminal CHS K2 en 450 y 450'.

45 En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal humano de inmunoglobulina G1 lambda-1, anti-(PD-L1 humano). En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las cadenas pesadas y ligeras de avelumab (MSB0010718C). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:119, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o conjugados del mismo. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:119, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:119, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:119, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:119, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:119, respectivamente.

60 En una realización, la región V_H de anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 120 (que corresponde a SEQ ID NO: 24 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1), y la región V_L de anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 121 (que corresponde a SEQ ID NO: 25 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:120 y SEQ ID NO:121, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:120 y SEQ ID NO:121, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos

97% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:120 y SEQ ID NO:121, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:120 y SEQ ID NO:121, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95% idénticas a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:120 y SEQ ID NO:121, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende un polipéptido de región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde la secuencia de CDR1 se da por SEQ ID NO: 122 (que corresponde a SEQ ID NO: 15 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1), la secuencia de CDR2 se da por SEQ ID NO: 123 (que corresponde a SEQ ID NO: 16 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1), y la secuencia de CDR3 se da por SEQ ID NO: 124 (que corresponde a SEQ ID NO: 17 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1), y el anticuerpo anti-PD-L1 también comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 en donde la secuencia de CDR1 se da por SEQ ID NO: 125 (que corresponde a SEQ ID NO: 18 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1), la secuencia de CDR2 se da por SEQ ID NO: 126 (que corresponde a SEQ ID NO: 19 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1), y la secuencia de CDR3 se da por SEQ ID NO: 127 (que corresponde a SEQ ID NO: 20 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1).

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO:123, y SEQ ID NO:124, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:122, SEQ ID NO: 123, y SEQ ID NO:124, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123 y SEQ ID NO:124, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123 y SEQ ID NO:124, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos antes mencionados.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 95% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO:126, y SEQ ID NO:127, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 90% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:125, SEQ ID NO: 126, y SEQ ID NO:127, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 85% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126 y SEQ ID NO:127, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 que son cada uno al menos 80% idénticos a las secuencias mostradas en SEQ ID NO:125, SEQ ID NO: 126, y SEQ ID NO:127, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos antes mencionados.

En una realización, los anticuerpos anti-PD-L1 y otros inhibidores de PD-L1 incluyen aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2014/0341917 A1. En otra realización, también se incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos para unirse a PD-L1.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, también conocido como BMS-935559, que se divulga en la patente de Estados Unidos No. US 7,943,743 B2. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona de los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en la patente de Estados Unidos No. US 7,943,743 B2.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, tal como INVIVOMAB anti-m-PD-L1 clon 10F.9G2 (Catálogo # BE0101, Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH, EUA). En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, tal como AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1). Un número de anticuerpos anti-PD-L1 comercialmente disponibles son conocidos por un experto en la materia.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L2 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, tal como IgG2a de ratón BIOLEGEND 24F.10C12, isotipo κ (catálogo # 329602 Biolegend, Inc., San Diego, CA), anticuerpo anti-PD-L2 SIGMA (catálogo # SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), u otros anticuerpos anti-PD-L2 disponibles comercialmente conocidos por un experto en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales que inhiben PD-L1 y/o PD-L2 se pueden preparar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, al inyectar sujetos de prueba con antígeno de PD-L1 o PD-L2 y entonces aislar hibridomas que expresan anticuerpos que tienen la secuencia deseada o características funcionales. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo,

utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de este ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células hospedadoras tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma, u otras células adecuadas que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los detalles de la producción recombinante de anticuerpos específicos se pueden encontrar en las referencias citadas en lo anterior. Los anticuerpos monoclonales que inhiben PD-1 se pueden preparar por métodos de biología molecular estándar usando las secuencias proporcionadas en la presente por traducción inversa e inserción en vectores de ADN o ARN apropiados.

Las secuencias de anticuerpo anti-PD-L1 a las que se hace referencia en algunas de las realizaciones anteriores se resumen en la tabla 6.

TABLA 6. Secuencias de aminoácidos de anticuerpo anti-PD-L1.

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO: 98 cadena pesada de durvalumab (MEDI4736)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASGFTFS RYRMSWVRQA PQNGLEWVAN INQDGSEKYY 60 VDSVKGAFIL SPDAKASLY LQNNELRAED TAVYYCARLG GWFGELAFDY WQGGLVTVYS 120 EASTKGFQVI PLAESEKSTG GGTALGSLV KQYFFEFYIV SRNSGALTGG VRTTFAYLQS 180 DGLYSLSSVY EVESSESLGIY TQICHVNRKP SRUYVKKRYL PRSCDXTHTG PPTFAPEFSG 240 GSVLELFPPK PBDTLMISRT PEVTCVAVTV SHEDEEVKEN WIVDGVVHN AMTKPREEQY 300 KSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYNCKVSNK ALPASTEKTI SRANGQPREP QVITLPPSSE 360 EMTXNQVSLT CLVKGKYPED IAVEMESNG PENNYXTTUY VLESQSSIFL YSALFVDSK 420 WQGQNVFSCS VMHEALNNY TQGLSLSPG R 481	
SEQ ID NO: 99 cadena ligera de durvalumab (MEDI4736)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASGFTFS RYRMSWVRQA PQNGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCPASQRVS GSYLAWYQK PQAPALLLY DASSATGIP DPFSGSGSCT 120 DPTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGLPWTFG QQTIVEIKRT VAAPSVTFIP PDEQLKSCST 180 ASVVCLNNF YPEEAVQWK VGNALSGAS QELVTEQDSX GSTYSLSTPL TLRADYKXK 240 KVAQEVTHQ GLSPVTKSF NRGEL 265	
SEQ ID NO: 100 cadena pesada variable de durvalumab	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASGFTFS RYRMSWVRQA PQNGLEWVAN INQDGSEKYY 60 VDSVKGAFIL SRDAKASLY LQNNELRAED TAVYYCARPG GWFGELAFDY WQGGLVTVYS 120 S 121	
SEQ ID NO: 101 cadena ligera variable de durvalumab	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCPASQRVS GSYLAWYQK PQAPALLLY DASSATGIP 60 DPFSGSGSCT DPTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGLPWTFG QQTIVEIK 100	
SEQ ID NO: 102 CDR1 de cadena pesada de durvalumab	RYWMS	5
SEQ ID NO: 103 CDR2 de cadena pesada de durvalumab	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
SEQ ID NO: 104 CDR3 de cadena pesada de durvalumab	EGGWFGELAF DY	12

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:105 CDR1 de cadena ligera de durvalumab	RASQRVSSSY LA	12
SEQ ID NO:106 CDR2 de cadena ligera de durvalumab	DASSRAT	7
SEQ ID NO:107 CDR3 de cadena ligera de durvalumab	QQYGSLPWT	9
SEQ ID NO:108 cadena pesada de atezolizumab (MPDL3280A)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASQGTFS DSNIHWYRQA PQKGLERVAW ISFYGGSTYY 60 ADEVRGRFTI SADIYNTAY LQMSLRASD IAVYTCARRE WPGGFLYWCQ QILVTVSSAL 120 TKPFSVEFLA EGGHSTSOCT AALGCLVNDY FPEPVTVSNK SCALTGVVNT FPAVLQSSCL 180 YLEESVVPVF SSRLGFTTYI GNVKXKPSAY AVDEKVEPKS GDETHGPPC PAPELLGGPS 240 VLEFPFKPKD FLMIERTPEY TCVVVDVSEI DPEVEFNNIV GQVEVHNAT KPEEDQYAST 300 YGVVSVLPVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APLEYTTSKA KQQTTERQVY TLEPSREENT 360 KNQVSLTCLV KQFIPSDIAV ERESKQPEDA NYKTTPEVLD SDGSFPLYSK LTPKLRWQQ 420 GNVESSVME SAEKRYTQK SLSELPK 448	
SEQ ID NO: 109 cadena ligera de atezolizumab (MPDL3280A)	DIQNTQSPES LSASVCDPVT ITCPASQDVS TAVAWYQQK FKAPELLIYS ASFLYSCVPS 60 RPSGSGGSDT FPLTISSLQF EDFATLYCQZ YLYEPATFGQ GPKVEIKETV AAFSVFIETP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNKPY FREAKVQWIV DNALQSGNSQ ESVEEQDSKD STVELGSTLT 180 LSKADYLRKK VVCEVTHQZ LSSPTKSPN PGET 214	
SEQ ID NO: 110 cadena pesada variable de atezolizumab	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASQGTFS DSNIHWYRQA PQKGLERVAW ISFYGGSTYY 60 ADEVRGRFTI SADIYNTAY LQMSLRASD IAVYTCARRE WPGGFLYWCQ QILVTVSSAL 118	
SEQ ID NO: 111 cadena ligera variable de atezolizumab	DIQNTQSPES LSASVCDPVT ITCPASQDVS TAVAWYQQK FKAPELLIYS ASFLYSCVPS 60 RPSGSGGSDT FPLTISSLQF EDFATLYCQZ YLYEPATFGQ GPKVEIKETV AAFSVFIETP 199	
SEQ ID NO:112 CDR1 de cadena pesada de atezolizumab	GFTFSXSWIH	10
SEQ ID NO:113 CDR2 de cadena pesada de atezolizumab	AWIXPYGGSX YYADSVKG	18
SEQ ID NO:114 CDR3 de cadena pesada de atezolizumab	RHWPGGFDY	9
SEQ ID NO:115 CDR1 de cadena ligera de atezolizumab	RASQXXXTXX A	11

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:116 CDR2 de cadena ligera de atezolizumab	SASXLXS	7
SEQ ID NO:117 CDR3 de cadena ligera de atezolizumab	QXXXXXPXT	9
SEQ ID NO:118 cadena pesada de avelumab (MSB0010718C)	EVQLLESGGQ LVQPGGSLPL SCAASQPIFS SYIMMWVRQA PCKGLEWVSS IYPSGGIFY 60 APTVKGFTI SRDSSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARL LSTVITVDYV QGQPLVTVSS 120 ASTNGDSVFP LATSSKSTSG GTAALGCLVK DYETEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSVVP VPSSSLSTQF YICNVNKKPS RTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCRAPELLGG 240 PSVLEPPPKP KDTLMISKTP EYTVVVVDVS RERPEVKKKV YVDGVEVHNA KTKPPEDQYN 300	
	STTPVVSIVT VLSQDWLNGK EYKCNVSKA LPAPLEKPIE KANGQPREPQ VYTLQPSQHE 360 LTKNQVELTC LVKGFYPSDI AVENESNGQP ENKYETTPY LSSDGSFELY SRTLVKSSW 420 QQGVFSCSV MKEELNNHYT QMSLSLSPCK 450	
SEQ ID NO: 119 cadena ligera de avelumab (MSB0010718C)	QSALTQPAIV SCSPGQSITI SCTCTSSDVC GYNYVSWYQQ EPCKAPKLMI YDVSNRPSCV 60 SNRPSGSKSG NTASLTISGL QAEDDAQVYC SSYTSSTRV FGTGTNVIVL QGQKAPFTVT 120 LPFESSERLQ ANKATLVCLT SPTVFGAVTV ARKADGSPVX RGVETTTDSK QNNKXAAAE 180 YLSLTPEDRN SRGYSQQT REGGIVETV ACTEC 216	
SEQ ID NO: 120 cadena pesada variable de avelumab	EVQLLESGGQ LVQPGGSLPL SCAASQPIFS SYIMMWVRQA PCKGLEWVSS IYPSGGIFY 60 APTVKGFTI SRDSSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARL LSTVITVDYV QGQPLVTVSS 120	
SEQ ID NO: 121 cadena ligera variable de avelumab	QSALTQPAIV SCSPGQSITI SCTCTSSDVC GYNYVSWYQQ EPCKAPKLMI YDVSNRPSCV 60 SNRPSGSKSG NTASLTISGL QAEDDAQVYC SSYTSSTRV FGTGTNVIVL 110	
SEQ ID NO:122 CDR1 de cadena pesada de avelumab	SYIMM	5
SEQ ID NO:123 CDR2 de cadena pesada de avelumab	SIYPSGGITF YADTVKG	17
SEQ ID NO:124 CDR3 de cadena pesada de avelumab	IKLGTVTVDY	11
SEQ ID NO:125 CDR1 de cadena ligera de avelumab	TGTSSDVGGY NYVS	14

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)	
SEQ ID NO:126 CDR2 de cadena ligera de avelumab	DVSNRPS	7
SEQ ID NO:127 CDR3 de cadena ligera de avelumab	SSYTSSSTRV	10

La preparación, propiedades y usos de inhibidores de PD-1 y PD-L1 adecuados se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 8,008,449 o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0217401 A1 o 2013/0133091 A1; patente de Estados Unidos No. 8,354,509 y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 y US 2013/0109843 A2; patente de Estados Unidos No. 8,287,856, 8,580,247 y 8,168,757 y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2009/0028857 A1, US 2010/0285013 A1, US 2013/0022600 A1 y US 2011/0008369 A1; patente de Estados Unidos No. 8,779,108 o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2013/0034559 A1; patente de Estados Unidos No. 8,217,149 y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2010/0203056 A1, US 2013/0045200 A1, US 2013/0045201 A1, US 2013/0045202 A1 o US 2014/0065135 A1; y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2014/0341917 A1.

En tanto que las realizaciones preferidas de la invención se muestran y describen en la presente, estas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo y no se propone que limiten de otro modo el alcance de la invención como se define por las reivindicaciones. Se pueden emplear diferentes alternativas a las realizaciones descritas de la invención en la práctica de la invención.

EJEMPLOS

Las realizaciones abarcadas en la presente se describen ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para el propósito de ilustración solamente y la divulgación abarcada en la presente no se debe interpretar de ninguna manera como que se limita a estos ejemplos, sino que se debe interpretar como que abarca cualquiera y todas las variaciones que llegan a ser evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente.

Ejemplo 1 - Características preclínicas de los inhibidores de BTK

El inhibidor de BTK ibrutinib (fórmula (10)), (1-[(3*R*)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona) es un inhibidor de BTK de primera generación. En las pruebas clínicas como monoterapia en sujetos con neoplasias malignas hematológicas, ibrutinib en general se toleró bien a niveles de dosis de hasta 840 mg (la dosis más alta probada). Advani, et al., J. Clin. Oncol. 2013, 31, 88-94; Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42; Wang, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 507-16. No fue evidente ninguna dosis máxima tolerada (MTD) dentro del intervalo de dosis probado. Además, los sujetos habitualmente encontraron que el fármaco es tolerable durante períodos que se extendían a > 2 años. Ningún sujeto tuvo síndrome de lisis tumoral. No se asoció ningún patrón manifiesto de mielosupresión con el tratamiento con ibrutinib. No se observaron reducciones relacionadas con fármaco en las células T CD4⁺ circulantes ni en las inmunoglobulinas séricas. Los eventos adversos con una relación aparente con el fármaco de estudio incluyeron diarrea y erupción cutánea.

En sujetos con linfoma no de Hodgkin (NHL) fuertemente pretratado, ibrutinib mostró actividad antitumoral sustancial, induciendo regresiones duraderas de linfadenopatía y esplenomegalia en la mayoría de los sujetos. Se observaron mejoras en la anemia y trombocitopenia asociadas con la enfermedad. El patrón de cambios en los sujetos con CLL fue notable. El principio activo farmacéutico individual ibrutinib provocó reducciones rápidas y sustanciales en el tamaño de ganglios linfáticos concomitante con una redistribución de sitios malignos en la sangre periférica. Se observó un incremento asintomático de conteo absoluto de linfocitos (ALC) que fue máximo durante los primeros meses de tratamiento y en general disminuyó a partir de entonces, pero puede ser persistente en algunos sujetos o se puede observar repetidamente en sujetos que tuvieron interrupción y reanudación de la terapia con fármacos.

En conjunto, estos datos con ibrutinib respaldan los beneficios potenciales de la inhibición selectiva de BTK en el tratamiento de sujetos con cánceres linfoides recidivantes. Sin embargo, en tanto que es altamente potente en la inhibición de BTK, ibrutinib también ha mostrado actividad *in vitro* contra otras cinasas con una cisteína en la misma posición que Cys481 en BTK, a la cual se une covalentemente el fármaco. Por ejemplo, ibrutinib inhibe el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que puede ser la causa de la diarrea y erupción cutánea relacionadas con ibrutinib. Además, es un sustrato para las enzimas de citocromo P450 (CYP) 3A4/5 y 2D6, que incrementa la posibilidad de interacciones fármaco-fármaco. Estas responsabilidades respaldan el desarrollo de inhibidores de BTK alternativos para usarse en la terapia de cáncer linfóide.

Las características de selectividad y potencia preclínica del inhibidor de BTK de segunda generación de la fórmula (2) se compararon con el inhibidor de BTK de primera generación de la fórmula (10) (ibrutinib). En la tabla 7, se muestra un examen de quinomas (realizado por Life Technologies o con base en datos de la bibliografía) que compara estos compuestos.

5

TABLA 7. Examen de quinomas para inhibidores de BTK (IC₅₀, nM)

3F-Cys cinasa	Fórmula (2)	Ibrutinib (fórmula (10))
Btk	3,1	0,5
Tec	29	78
Bmx	39	0,80
ITK	>1000	10,7
Txk	291	2,0
EGFR	>1000	5,6
ErbB2	912	9,4
ErbB4	13,2	2,7
Blk	>1000	0,5
JAK-3	>1000	16,1

10 Los resultados mostrados en la tabla 7 se obtienen a partir de un ensayo bioquímico de 10 puntos generado a partir de curvas de concentración de 10 puntos. El inhibidor de BTK de la fórmula (2) muestra selectividad mucho mayor para BTK en comparación con otras cinasas que ibrutinib.

15 En la figura 1 se muestra una comparación de los resultados de potencia *in vivo* para los inhibidores de BTK de la fórmula (2) e ibrutinib. CD86 y CD69 son proteínas de superficie celular que son marcadores de activación de BCR. Para obtener los resultados de potencia *in vivo*, los ratones se alimentaron por sonda a una concentración creciente de fármaco y se sacrificaron en un punto de tiempo (3 horas después de la dosis). El BCR se estimuló con IgM y la expresión del marcador de activación CD69 y CD86 se monitorea por citometría de flujo para determinar los valores de EC₅₀.

20 Los estudios de farmacología de seguridad *in vitro* e *in vivo* con la fórmula (2) han demostrado un perfil de seguridad no clínico favorable. Cuando se examina a 10 μ M en ensayos de unión que evalúan interacciones con 80 dianas farmacológicas conocidas tal como receptores acoplados a proteína G, receptores nucleares, proteasas y canales iónicos, la fórmula (2) muestra actividad significativa solo contra el receptor de adenosina A3; los experimentos de dosis-respuesta de seguimiento indicaron una IC₅₀ de 2,7 μ M, que sugiere un bajo riesgo clínico de efectos fuera de diana. La fórmula (2) a 10 μ M no mostró inhibición de la fosforilación de EGFR *in vitro* en una línea de células de cáncer epidermoide humano A431, en tanto que ibrutinib tuvo una IC₅₀ de 66 nM. El efecto *in vitro* de la fórmula (2) sobre la actividad de canal del gen relacionado con éter-à-go-go humano (hERG) se investigó *in vitro* en células de riñón embrionario humano transfectadas de forma estable con hERG. La fórmula (2) inhibió la actividad de canal de hERG por 25 % a 10 μ M, que sugiere un riesgo clínico bajo de que la fórmula (2) induciría la prolongación clínica de QT como se predijo por este ensayo. La fórmula (2) se toleró bien en estudios estándar *in vivo* de buenas prácticas de laboratorio (GLP) de seguridad farmacológica. Una batería de observación funcional en ratas a dosis de hasta 300 mg/kg (el nivel de dosis más alto) no reveló efectos adversos sobre los efectos neuroconductuales o la temperatura corporal a ningún nivel de dosis. Un estudio de la función respiratoria en ratas tampoco indicó efectos adversos relacionados con el tratamiento a dosis de hasta 300 mg/kg (el nivel de dosis más alto). En un estudio de función cardiovascular en perros beagle machos telemetrizados despiertos, las dosis individuales de la fórmula (2) a niveles de dosis de hasta 30 mg/kg (el nivel de dosis más alto) no indujeron cambios significativos en los parámetros de temperatura corporal, cardiovasculares o electrocardiográficos (ECG) (incluido intervalo QT). Los resultados sugieren que es poco probable que la fórmula (2) provoque efectos graves fuera de diana o efectos adversos en los sistemas de órganos críticos.

40 También se evaluó el potencial de interacción fármaco-fármaco de la fórmula (2). Los experimentos *in vitro* que evalúan la pérdida de fármaco de origen como se cataliza por CYP indicaron que la fórmula (2) se metaboliza por CYP3A4. Los estudios de metabolismo *in vitro* usando hepatocitos de ratón, rata, perro, conejo, mono y humano incubados con la fórmula etiquetada con ¹⁴C (2) indicaron dos metabolitos mono-oxidados y un conjugado de glutatión. No se identificó ningún metabolito humano único. Las evaluaciones preliminares del metabolismo en el plasma, bilis y orina de ratas, perros y monos indicaron procesos metabólicos de oxidación, unión a glutatión e hidrólisis. Se mostró que la fórmula (2) se une al glutatión pero no agota el glutatión *in vitro*. Los datos de estudios de interacción de CYP no clínicos indican que

es muy poco probable que la fórmula (2) provoque interacciones fármaco-fármaco clínicas a través de la alteración del metabolismo de los fármacos que son sustratos de las enzimas CYP.

También se valoró la potencia *in vitro* en sangre entera de la fórmula (2), fórmula (10) (ibrutinib) y fórmula (17) (CC-292) en la inhibición de señales a través del receptor de células B. Se incubó sangre de cuatro donantes sanos durante 2 horas con los compuestos mostrados en un intervalo de concentración y entonces se estimuló con IgD anti-humana (10 µg/ml) durante 18 horas. La intensidad fluorescente media (MFI) de CD69 (y CD86, datos no mostrados) en células B CD19+ seleccionadas se midió por citometría de flujo. Los valores de MFI se normalizaron de tal forma que 100 % representa el nivel de CD69 en células estimuladas sin inhibidor, en tanto que 0 % representa la condición no estimulada/sin fármaco. Los resultados se muestran en la figura 2. Los valores de EC₅₀ obtenidos fueron 8,2 nM (intervalo de confianza de 95 %: 6,5 - 10,3), 6,1 nM (intervalo de confianza de 95 %: 5,2 - 7,2) y 121 nM (intervalo de confianza de 95 %: 94 - 155) para la fórmula (2), fórmula (10) (ibrutinib) y fórmula (17) (CC-292), respectivamente.

La fosforilación de receptor de EGF *in vitro* también se determinó para la fórmula (2) y fórmula (10) (ibrutinib). Se incubaron células de carcinoma epidermoide A431 durante 2 h con una titulación de dosis de la fórmula (2) o fórmula (10) (ibrutinib), antes de la estimulación con EGF (100 ng/ml) durante 5 min para inducir la fosforilación de EGFR (p-EGFR). Las células se fijaron con paraformaldehído al 1,6 % y se permeabilizaron con MeOH al 90 %. La citometría de fosfoflujo se realizó con p-EGFR (Y1069). Los valores de MFI se normalizaron de tal forma que 100 % representa el nivel de p-EGFR en células estimuladas sin inhibidor, en tanto que 0 % representa la condición no estimulada/sin fármaco. Los resultados se muestran en la figura 3. Se determinó que la inhibición de p-EGFR inducida por EGF es de 7 % a 10 µM para la fórmula (2), en tanto que ibrutinib tiene una EC₅₀ de 66 nM. La inhibición mucho más potente de p-EGFR inducida por EGF por ibrutinib se puede asociar con efectos secundarios incrementados, incluida diarrea y erupción cutánea.

Ejemplo 2 - Efectos inhibidores de BTK en el microambiente de tumores sólidos en un modelo de cáncer de páncreas ortotópico y combinación sinérgica de un inhibidor de BTK y gemcitabina

Se realizó un estudio para observar la reducción potencial en la carga tumoral a través de la modulación de MDSC y TAM infiltrantes de tumores usando el inhibidor de BTK de la fórmula (2) y/o gemcitabina ("Gem"). En este estudio, se inyectaron células de cáncer de páncreas de ratón derivadas de KPC (KrasG12D;Trp53R172H;Pdx1-Cre) en el páncreas. Los animales se trataron con (1) vehículo; (2) fórmula (2), 15 mg/kg/BID administrada de manera oral; (3) gemcitabina 15 mg/kg intravenosa (IV) administrada cada 4 días durante 3 inyecciones; o (4) fórmula (2), 15 mg/kg/BID administrada de manera oral junto con gemcitabina, 15 mg/kg IV administrada cada 4 días durante 3 inyecciones.

Suspensiones de células individuales de muestras tumorales. Se recolectó tejido tumoral de ratón y se almacenó en PBS/inhibidor de tripsina de soja al 0,1 % antes de la disociación enzimática. Las muestras se picaron finamente con unas tijeras y el tejido de ratón se transfirió a DMEM que contiene 1,0 mg/ml de colagenasa IV (Gibco), inhibidor de tripsina de soja al 0,1 % y 50 U/ml de DNasa (Roche) y se incubó a 37 °C durante 30 min con agitación constante en tanto que el tejido humano se digería en 2,0 mg/ml de colagenasa IV, 1,0 mg/ml de hialuronidasa, inhibidor de tripsina de soja al 0,1 % y 50 U/ml de DNasa durante 45 minutos. Las suspensiones se filtraron a través de un filtro de 100 micras y se lavaron con amortiguador FACS (PBS/BSA al 0,5 %/EDTA 2,0 mM) antes de la tinción. Dos millones de células totales se tiñeron con anticuerpos como se indica. La detección intracelular de FoxP3 se logró después de la permeabilización con BD Perm Buffer III (BD Biosciences) y eBioscience Fix/Perm, respectivamente. Después de la tinción de superficie, las muestras se adquirieron en un BD Fortessa y se analizaron usando el software FlowJo (Treestar).

Ejemplo 3 - Efectos inhibidores de BTK en el microambiente de tumores sólidos en un modelo de cáncer de ovario

El modelo murino de cáncer de ovario ortotrópico singénico ID8 se usó para investigar la eficacia terapéutica del inhibidor de BTK de la fórmula (2) a través del tratamiento del microambiente de tumor sólido. Los modelos de cáncer de ovario humano, incluido el modelo de cáncer de ovario ortotrópico singénico ID8 y otros modelos animales, se describen en Fong and Kakar, J. Ovarian Res. 2009, 2, 12; Greenaway, et al., Gynecol. Oncol. 2008, 108, 385-94; Urzua, et al., Tumour Biol. 2005, 26, 236-44; Janat-Amsbury, et al., Anticancer Res. 2006, 26, 3223-28; Janat-Amsbury, et al., Anticancer Res. 2006, 26, 2785-89. Los animales se trataron con vehículo o fórmula (2), 15 mg/kg/BID administrada de manera oral. Los resultados del estudio se muestran en la figura 4, figura 5 y figura 6.

La figura 4 y figura 5 demuestran que el inhibidor de BTK de la fórmula (2) altera el crecimiento de cáncer de ovario ID8 en el modelo murino singénico ID8. La figura 6 muestra que la respuesta tumoral al tratamiento con el inhibidor de BTK de la fórmula (2) se correlaciona con una reducción significativa en los linfocitos inmunosupresores asociados a tumores en ratones portadores de tumores.

Ejemplo 4 - Efectos inhibidores de BTK en el microambiente de tumores sólidos en un modelo de cáncer de páncreas KPC

Dado el potencial de la inhibición de BTK para afectar a los TAM y MDSC, se evaluó el principio activo farmacéutico individual de la fórmula (2) en ratones con cáncer de páncreas avanzado que surge como resultado de modificaciones genéticas de los oncogenes KRAS y p53, y el promotor de diferenciación pancreática PDX-1 (ratones KPC). El modelo de ratón KPC recapitula muchas de las características moleculares, histopatológicas y clínicas de la enfermedad humana

(Westphalen and Olive, Cancer J. 2012, 18, 502-510). También se evaluó la terapia de combinación con gemcitabina en este modelo. Los ratones se inscribieron después de la identificación de tumores de aparición espontánea en el páncreas que fueron $\geq 100 \text{ mm}^3$ (como se valora por ultrasonografía de alta resolución). Los ratones se trataron con (1) vehículo (N = 6); o (2) fórmula (2), 15 mg/kg BID administrada de manera oral (N = 6).

Como se muestra en la figura 7, el tratamiento con el principio activo farmacéutico individual de la fórmula (2) desaceleró sustancialmente el crecimiento de cáncer de páncreas e incrementó la supervivencia de animales. Con vehículo, los volúmenes tumorales antes de la dosis promediaron 152 mm^3 , y en el día 28 promediaron 525 mm^3 . En la cohorte tratada con la fórmula (2), los volúmenes tumorales antes de la dosis promediaron 165 mm^3 , y en el día 28 promediaron 272 mm^3 , que indica mejora significativa. Con el vehículo, la supervivencia en el día 14 fue 5/6 animales y en el día 28 fue de 0/6 animales. Con la fórmula (2), la supervivencia en el día 14 fue 6/6 animales, y en el día 28 fue 5/6 animales.

Ejemplo 5 - Efectos inhibidores de BTK en el microambiente de tumores sólidos en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

Se estudió un modelo de tumor genético de NSCLC (KrasLA2) como modelo para el cáncer de pulmón usando el esquema de tratamiento mostrado en la figura 8. El modelo se diseña para tener expresión esporádica en células individuales de Kras mutante G12D fuera de su propio promotor desencadenado por recombinación intracromosómica espontánea. Johnson, et al. Nature 2001, 410, 1111-16. En tanto que la proteína Kras mutante se expresa en unas pocas células en todos los tejidos, el desarrollo tumoral se observa solo en el pulmón a alta penetrancia.

Ejemplo 6 - Efectos inhibidores de BTK en MDSC en el microambiente de tumores sólidos

Se usó un ensayo de sonda molecular para calcular el por ciento de ocupación irreversible de BTK total. Las MDSC se purificaron de ratones PDA portadores de tumores (como se describió previamente) dosificados a 15 mg/kg BID de la fórmula (2). Se observa una ocupación completa de BTK tanto para los compartimentos de MDSC granulocíticas como monocíticas el día 8 a 4 horas después de la dosis (N = 5). Los resultados se muestran en la figura 9.

Ejemplo 7 - Efectos de los inhibidores de BTK sobre la citotoxicidad mediada por células NK dependientes de anticuerpos usando rituximab

La quimioterapia de combinación con rituximab es el estándar de atención actual en neoplasias malignas de células B CD20⁺. Estudios previos investigaron y determinaron que ibrutinib antagoniza la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de rituximab mediada por células NK. Esto puede deberse a la unión irreversible secundaria de ibrutinib a la tirosina cinasa inducible por interleucina-2 (ITK) que se requiere para la función de las células NK estimuladas por FcR, incluida la movilización de calcio, liberación de gránulos y ADCC total. Kohrt, et al., Blood 2014, 123, 1957-60.

En este ejemplo, se evaluaron los efectos de la fórmula (2) e ibrutinib sobre la función de células NK en líneas de células y células NK primarias de voluntarios sanos y pacientes con CLL. En resumen, los resultados muestran que la activación de las células NK cocultivadas con células diana recubiertas con anticuerpos se inhibió fuertemente por ibrutinib. La secreción de IFN- γ se redujo por 48 % (p = 0,018) y 72 % (p = 0,002) en cultivos tratados con ibrutinib a 0,1 y 1,0 μM respectivamente y la desgranulación de células NK se redujo significativamente (p = 0,002), en comparación con los cultivos de control. El tratamiento con fórmula (2) a 1 μM , una concentración clínicamente relevante, no inhibió la desgranulación de IFN- γ o células NK. Se evaluó la ADCC mediada por rituximab en células NK de voluntarios sanos, así como ensayos de células NK de pacientes con CLL que se dirigen a células de CLL autólogas. En ambos casos, la ADCC no se inhibió por el tratamiento con fórmula (2) a 1 μM . Por el contrario, la adición de ibrutinib a los ensayos de ADCC inhibió fuertemente la citotoxicidad mediada por rituximab de las células diana, y no se observó ningún incremento sobre la citotoxicidad natural a ninguna concentración de rituximab. Este resultado indica que la combinación de rituximab y la fórmula (2) proporciona un beneficio inesperado en el tratamiento de neoplasias malignas de células B y otras enfermedades donde la inhibición de células NK no es deseable.

BTK es una enzima no receptora de la familia Tec quinasa que se expresa entre las células de origen hematopoyético, incluidas células B, células mieloides, células cebadas y plaquetas, donde regula múltiples procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación, apoptosis y migración celular. Khan, Immunol Res. 2001, 23, 147-56; Mohamed, et al., Immunol Rev. 2009, 228, 58-73; Bradshaw, Cell Signal. 2010, 22, 1175-84. Las mutaciones nulas funcionales de BTK en humanos provocan la enfermedad hereditaria, agammaglobulinemia enlazada a X, que se caracteriza por la falta de células B periféricas maduras. Vihinen, et al., Front Biosci. 2000, 5, D917-28. Por el contrario, la activación de BTK se implica en la patogénesis de varias neoplasias malignas de células B. Herman, et al., Blood 2011, 117, 6287-96; Kil, et al., Am. J. Blood Res. 2013, 3, 71-83; Tai, et al., Blood 2012, 120, 1877-87; Buggy, y Elias, Int. Rev. Immunol. 2012, 31, 119-32 (Erratum in: Int. Rev. Immunol. 2012, 31, 428). Además, se ha mostrado que la activación dependiente de BTK de células cebadas y otros inmuncitos en el estroma inflamatorio peritumoral mantiene el complejo microambiente necesario para el mantenimiento de tumores linfoides y sólidos. Soucek, et al., Neoplasia 2011, 13, 1093-100; Ponader, et al., Blood 2012, 119, 1182-89; de Rooij, et al., Blood 2012, 119, 2590-94. En conjunto, estos descubrimientos han sugerido que la inhibición de BTK puede ofrecer una estrategia atractiva para tratar neoplasias de células B, otras neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos.

- Ibrutinib (PCI-32765, INMRUVICA), es el primer inhibidor terapéutico de BTK de su clase. Este fármaco de molécula pequeña administrado de manera oral está siendo desarrollado por Pharmacyclics, Inc. para la terapia de neoplasias malignas de células B. Como se describió anteriormente, en pacientes con linfoma no de Hodgkin indolente (iNHL), linfoma de células de manto (MCL) y CLL fuertemente pretratados, ibrutinib mostró actividad antitumoral sustancial, induciendo regresiones duraderas de linfadenopatía y esplenomegalia en la mayoría de los pacientes. Advani, et al., J. Clin. Oncol. 2013, 31, 88-94; Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42; Wang, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 507-16; O'Brien, et al., Blood 2012, 119, 1182-89. El patrón de cambios en CLL fue notable. La inhibición de BTK con ibrutinib provocó una movilización rápida y sustancial de células de CLL malignas de sitios de tejido en la sangre periférica, como se describe en Woyach, et al., Blood 2014, 123, 1810-17; este efecto fue consistente con la adherencia disminuida de CLL a las células estromales protectoras. Ponader, et al., Blood 2012, 119, 1182-89; de Rooij, et al., Blood 2012, 119, 2590-94. En general, ibrutinib se ha tolerado bien. A los niveles de dosis asociados con la ocupación total de BTK, no se identificaron toxicidades limitantes de dosis y los sujetos encontraron que el fármaco es tolerable durante períodos que se extendían a >2,5 años.
- Dada la homología entre BTK e ITK, se ha confirmado recientemente que ibrutinib se une irreversiblemente a ITK. Dubovsky, et al., Blood 2013, 122, 2539-2549. La expresión de ITK en células NK estimuladas por receptor Fc (FcR) conduce a movilización de calcio, liberación de gránulos y citotoxicidad incrementadas. Khurana, et al., J. Immunol. 2007, 178, 3575-3582. Como rituximab es una cadena principal de la terapia de linfoma, con mecanismos de acción que incluyen ADCC, así como inducción directa de apoptosis y citotoxicidad dependiente de complemento, y la estimulación de FcR es necesaria para ADCC, se investigó si ibrutinib o la fórmula (2) (esta última carece de inhibición de ITK) influyeron en la actividad anti-linfoma de rituximab *in vitro* al valorar la secreción de IFN- γ de células NK, la desgranulación por movilización de CD107a y la citotoxicidad por liberación de cromo usando líneas de células CD20⁺ y muestras de pacientes autólogas con leucemia linfocítica crónica (CLL).
- La fórmula (2) es un inhibidor más selectivo que ibrutinib, como se mostró previamente. La fórmula (2) no es un inhibidor potente de ITK en contraste con ibrutinib, como se muestra en la presente (ver, por ejemplo, tabla 7). Se requiere ITK para la función de células NK estimuladas por FcR, incluida la movilización de calcio, liberación de gránulos y ADCC total. Los anticuerpos anti-CD20 como rituximab son actualmente el estándar de atención para el tratamiento de muchas neoplasias malignas de células B CD20⁺, frecuentemente como parte de regímenes de combinación con agentes quimioterapéuticos más antiguos. El potencial de ibrutinib o la fórmula (2) para antagonizar ADCC se evaluó *in vitro*. Estudios previos han determinado que ibrutinib antagoniza indeseablemente los efectos de ADCC de rituximab mediados por células NK. Kohrt, et al., Blood 2014, 123, 1957-60. Se planteó la hipótesis de que el inhibidor de BTK de la fórmula (2), que no tiene actividad contra ITK, puede conservar la función de las células NK y por lo tanto, sinergizar en lugar de antagonizar la ADCC mediada por rituximab. Se valoró la citotoxicidad mediada por células NK dependientes de rituximab usando líneas de células de linfoma, así como células tumorales de CLL autólogas.
- Las condiciones de cultivo celular fueron como sigue. Las líneas de células Raji y DHL-4 se mantuvieron en RPMI 1630 complementado con suero bovino fetal, L-glutamina, 2-mercaptoetanol y penicilina-estreptomicina a 37 °C en una incubadora humidificada. Las células HER18 se mantuvieron en DEM complementado con suero bovino fetal, penicilina-estreptomicina y. Antes del ensayo, las células HER18 se cosecharon usando tripsina-EDTA, se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene suero al 5 % y se contaron las células viables. Para el cultivo de células diana primarias, la sangre periférica de pacientes con CLL se sometió a centrifugación de densidad para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las preparaciones celulares se lavaron y entonces se sometieron a selección positiva de células CLL CD5⁺CD19⁺ usando perlas magnéticas (MACS, Miltenyi Biotech). Las preparaciones de células se usaron frescas después de la selección. Las células NK de pacientes con CLL y voluntarios sanos se enriquecieron a partir de sangre periférica recolectada en tubos anticoagulantes de citrato de sodio y entonces se sometieron a centrifugación de densidad. La remoción de células no NK se realizó usando selección negativa por separación MACS. Las células NK recién aisladas se lavaron tres veces, se enumeraron y entonces se usaron inmediatamente para los ensayos de ADCC.
- La secreción de citocinas se determinó como sigue. Se valoraron la liberación de citocinas y desgranulación mediada por células NK dependientes de rituximab y trastuzumab usando líneas de células de linfoma y de cáncer de mama HER2⁺ (DHL-4 y HER18, respectivamente). Las células diana se cultivaron en placas de fondo plano que contienen 10 μ g/ml de rituximab (DHL-4) o trastuzumab (HER18) y artículos de prueba (ibrutinib 0,1 o 1 μ M, fórmula 1 μ M (2) o control de vehículo DMSO). Las células NK de donantes sanos se enriquecieron como se describió anteriormente y entonces se adicionaron a las células diana y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Se realizaron cultivos por triplicado en células NK de donantes. Después de la incubación, los sobrenadantes se cosecharon, se centrifugaron brevemente y entonces se analizaron para interferón- γ usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).
- La liberación de gránulos líticos se determinó como sigue. Las células NK de donantes sanos se enriquecieron y cultivaron en la presencia de células diana, anticuerpos monoclonales y artículos de prueba como se describió anteriormente. Después de 4 horas, los cultivos se cosecharon y las células se sedimentaron, se lavaron y entonces se tiñeron para evaluación por citometría de flujo. La desgranulación se evaluó mediante citometría de flujo por externalización de CD107a, una proteína normalmente presente en la valva interior de los gránulos líticos, y la selección de las células NK (linfocitos CD3-CD16⁺). El porcentaje de células NK positivas para CD107a se cuantificó por comparación con un control negativo (control de isotipo, células no teñidas/FMO). También se evaluaron los cultivos de control (células NK cultivadas

sin células diana, o NK, cocultivos de células diana en la ausencia del anticuerpo monoclonal apropiado); todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Los ensayos de ADCC se realizaron como sigue. En resumen, las células diana (Raji o CLL primariaa) se etiquetaron por incubación a 37 °C con 100 pCi ⁵¹Cr durante 4 horas antes del co-cultivo con células NK. Las células se lavaron, se enumeraron y entonces se adicionaron por triplicado a placas de 96 pozos preparadas que contienen células NK tratadas en una relación efector:diana (E:T) de 25:1. Se adicionó rituximab (Genentech) a los pozos de ADCC a concentraciones de 0,1, 1,0 o 10 µg/ml y los ensayos se mezclaron brevemente y entonces se centrifugaron para recolectar las células en el fondo de los pozos. Se valoró el efecto de la citotoxicidad natural de células NK en los pozos que no contienen rituximab. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 4 horas y entonces se centrifugaron. Los sobrenadantes se cosecharon y la liberación de ⁵¹Cr se midió mediante conteo de centelleo líquido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La fórmula (2) no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la desgranulación de células NK estimuladas con rituximab (< 2 %), en tanto que ibrutinib redujo la desgranulación por ~50 % (p = 0,24, figura 10). La fórmula (2) no ningún tuvo efecto inhibitorio, en tanto que ibrutinib evitó la desgranulación de células NK estimulada por trastuzumab por ~84 % a 1 µM (figura 10: **p = 0,002).

En muestras de células Raji, la actividad de células NK *ex vivo* contra células tumorales autólogas no se inhibió por la adición de la fórmula (2) a 1 µM, y se observó lisis celular incrementada con concentraciones crecientes de rituximab a una relación E:T constante (figura 11). En muestras de CLL primaria, la actividad de células NK *ex vivo* contra células tumorales autólogas no se inhibió por la adición de la fórmula (2) a 1 µM, y se observó lisis celular incrementada con concentraciones crecientes de rituximab a una relación E:T constante (figura 12). Por el contrario, la adición de ibrutinib 1 µM inhibió completamente la ADCC, con menos de 10 % de lisis celular a cualquier concentración de rituximab y sin incremento de la lisis celular en la presencia de rituximab, en comparación con los cultivos sin rituximab. En la figura 13 se muestra una gráfica que destaca las diferencias significativas entre la fórmula (2) e ibrutinib (donde "Ab" se refiere a rituximab). La diferencia entre la fórmula (2) e ibrutinib fue altamente significativa en este ensayo (p = 0,001).

En los ensayos de ADCC que usan células NK de donantes sanos, la lisis dependiente de anticuerpos de células Raji recubiertas con rituximab no se inhibió por la adición de 1 µM de la fórmula (2) (figura 13). En estos experimentos, la adición de rituximab estimuló un incremento de 5 a 8 veces en la lisis celular a 0,1 y 1 µg/ml, en comparación con la baja (< 20 %) citotoxicidad natural en la ausencia de rituximab. Como se reportó previamente, la adición de ibrutinib 1 µM inhibió fuertemente la lisis dependiente de anticuerpos de las células diana, con menos de 20 % de lisis celular a todas las concentraciones de rituximab y sin incremento en ADCC a concentraciones más altas de rituximab.

Ibrutinib es clínicamente efectivo como monoterapia y en combinación con rituximab, a pesar de la inhibición de los modelos murinos de ADCC *in vitro* e *in vivo* debido a la unión irreversible secundaria de ibrutinib a ITK. Preclínicamente, la eficacia de los agentes terapéuticos que no inhiben la función de células NK, incluida la fórmula (2), es superior a ibrutinib. Estos resultados respaldan la propiedad inesperada de la fórmula (2) como un principio activo farmacéutico sinérgico y superior al ibrutinib para usarse en combinaciones con anticuerpos que tienen ADCC como mecanismo de acción. Se espera que el rendimiento mejorado de la fórmula (2) en combinación con terapias con anticuerpos anti-CD20 se extienda a su uso en combinación con inhibidores de CD19 y PD-1/PD-L1 tanto en neoplasias malignas hematológicas como en tumores sólidos, ya que estas combinaciones también se beneficiarían de la inhibición reducida de la función de células NK. Los resultados también indican que la fórmula (2) se puede combinar sinérgicamente con terapias de células NK anti-CD19, tal como células NK que expresan receptores de antígeno quimérico dirigidos a CD 19, en tanto que la fórmula (10) no se puede combinar de manera similar sin pérdida de función para terapias de células NK.

Ejemplo 8 - Efectos de inhibición de BTK sobre la citotoxicidad mediada por células NK dependientes de anticuerpos usando obinutuzumab

Se ha mostrado anteriormente que ibrutinib antagoniza indeseablemente los efectos de ADCC de rituximab mediados por células NK, y que la fórmula (2) no antagoniza los efectos de ADCC de rituximab y en cambio, permite una combinación sinérgica. Como se señaló previamente, esto puede deberse a la unión irreversible secundaria de ibrutinib a ITK, que se requiere para la función de las células NK estimuladas por FcR, incluida la movilización de calcio, liberación de gránulos y ADCC total. H. E. Kohrt, et al., Blood 2014,123, 1957-60. También se exploró el potencial de antagonización de ibrutinib de ADCC de obinutuzumab (GA-101) como se media por células NK y se comparó con los efectos de la fórmula (2).

El ensayo de desgranulación de células NK/ADCC se realizó usando un ensayo de sangre entera con dianas de CLL adicionadas a sangre entera de donante normal, en la presencia o ausencia de diferentes dosis de la fórmula (2) e ibrutinib, seguido de opsonización con el anticuerpo anti-CD20 obinutuzumab. Se usó ibrutinib como control y se proporcionaron a los investigadores dos muestras ciegas de inhibidores de BTK, fórmula (2) y una segunda muestra de ibrutinib. La desgranulación en sangre entera se realizó como sigue. Las dianas de CLL (células MEC-1) se expandieron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Inc.) con suero bovino fetal al 10 % (FBS). Se usaron células de crecimiento exponencial. El día del experimento, se extrajeron 8 ml de sangre de un voluntario normal en un tubo de ensayo que contiene desirudina para obtener una concentración final de 50 µg/ml. Se realizó un conteo de glóbulos blancos (WBC) de sangre entera. Las células MEC-1 se resuspendieron a la concentración de WBC en sangre entera (por ejemplo, si se midió 6×10^6 WBC/ml, las células MEC-1 se resuspendieron a 6×10^6 células/ml, para permitir una relación final de WBC:células MEC-1 de 1:1).

El control de ibrutinib y dos inhibidores de BTK ciegos se diluyeron en medio de células hematopoyéticas sin suero X-VIVO 15 (Lonza Group, Ltd.) a concentraciones de 200 μ M, 20 μ M y 2 μ M. Se incubaron alícuotas de 170 μ l de sangre entera no manipulada con 10 μ l de inhibidores de BTK o medio X-VIVO 15 durante una hora en una placa. Se diluyeron cetuximab y obinutuzumab (GA-101) en medio X-VIVO 15 a una concentración de 20 μ g/ml. Se incubaron volúmenes iguales de células MEC-1 y anticuerpos durante 5 minutos. Después de la incubación, se adicionó 20 μ l de células MEC-1 y anticuerpos a sangre entera y los inhibidores de BTK/medio X-VIVO 15 (para un volumen final de 200 μ l). Las muestras se colocaron en una incubadora de CO₂ al 5 % durante 4 horas a 37 °C. Las condiciones experimentales lograron de esta manera una relación de WBC:células MEC-1 de 1:1, con concentraciones finales de los inhibidores de BTK en el ensayo de 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M y concentraciones finales de los anticuerpos de 1 μ g/ml.

Después de 4 horas, las muestras se mezclaron suavemente y se removieron alícuotas de 50 μ l de cada pozo y se colocaron en tubos de ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se adicionó una alícuota de 20 μ l de anticuerpo anti-CD56-APC y anticuerpo anti-CD107a-PE. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se adicionó una alícuota de 2 ml de solución de lisis FACS (BD Biosciences). Las muestras se incubaron de nuevo durante 5 minutos y entonces se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento de células se resuspendió en 500 μ l de PBS. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo para células NK CD107a⁺ (CD56⁺).

Los resultados de desgranulación de células NK se resumen en la figura 14 para n = 3 experimentos, que muestra los efectos sobre la sangre entera después del pretratamiento durante 1 hora con los inhibidores de BTK a las concentraciones mostradas y la posterior estimulación con MEC-1 opsonizado con obinutuzumab o cetuximab a 1 μ g/ml durante 4 horas. Se observa una fuerte reducción en el porcentaje de células NK CD56⁺/CD107a⁺ usando ibrutinib (tanto como control como inhibidor de BTK ciego), que indica que ibrutinib antagoniza de manera indeseable las células NK. Por el contrario, la fórmula (2) muestra poco antagonismo hacia las células NK y tuvo un efecto mínimo sobre la desgranulación de células NK estimulada por obinutuzumab, en tanto que ibrutinib redujo la desgranulación de células NK estimulada por obinutuzumab superior a 40 %. Estos resultados respaldan la combinación sinérgica de obinutuzumab y la fórmula (2) en el tratamiento de neoplasias malignas de células B humanas.

Ejemplo 9 - Efectos de inhibición de BTK sobre la citotoxicidad mediada por células NK generalizada

Se realizó un ensayo para valorar los efectos de la inhibición de BTK usando la fórmula (2) sobre la aniquilación generalizada de NK (aniquilación no de ADCC). Las dianas (células K562) no expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, por lo que no inactivan las células NK. Las células diana se cultivaron hasta la fase semilogarítmica y se etiquetaron 5 × 10⁵ células en 100 μ l de medio de ensayo (IMDM con FCS al 10 % y penicilina/estreptomicina) con 100 μ Ci de ⁵¹Cr durante 1 hora a 37 °C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio de ensayo. Se usó un total de 5000 células diana/pozo en el ensayo. Las células efectoras se resuspendieron en medio de ensayo, se distribuyeron en una placa de 96 pozos con fondo en V y se mezclaron con células diana etiquetadas a relaciones E: T de 40: 1. La liberación máxima se determinó al incubar células diana en Triton X-100 al 1 %. Para la liberación espontánea, las dianas se incubaron sin efectores en medio de ensayo solo. Después de una centrifugación de 1 minuto a 1000 rpm, las placas se incubaron durante 4 y 16 horas a 37 °C. El sobrenadante se cosechó y la liberación de ⁵¹Cr se midió en un contador gamma. El porcentaje de liberación específica se calculó como (liberación experimental-liberación espontánea)/(liberación máxima-liberación espontánea) × 100. Los resultados se muestran en la figura 15.

Ejemplo 10 - Efectos de inhibición de BTK en células T

Se realizó un ensayo para valorar los efectos de la inhibición de BTK usando la fórmula (2) en células T. Las células T CD4⁺ enriquecidas se colocan en placas de cultivo de 24 pozos que se han pre-revestido 2 h con 250 μ l de anti-TCR β (0,5 μ g/ml) más anti-CD28 (5 μ g/ml) a 37 °C en PBS. Entonces, las células se complementan con medios que contienen inhibidores de BTK junto con las citocinas sesgadas como se indica en lo siguiente. Los cultivos de Th17 y Treg se cultivan durante 4 días antes del análisis. Las células se mantienen durante 3 días adicionales con citoquinas sesgadas (Th17; 20 ng/ml de IL-6, 0,5 ng/ml de TGF- β , 5 μ g/ml de IL-4, 5 μ g/ml de IFN- γ y Treg; 0,5 ng/ml de TGF- β , 5 μ g/ml de IL-4, 5 μ g/ml de IFN- γ) y se complementan con IL2 como factor de crecimiento.

Los resultados se muestran en la figura 16 y figura 17, e ilustran adicionalmente las propiedades sorprendentes de la fórmula (2) en comparación con la fórmula (10) (ibrutinib). Debido a la falta de actividad de la fórmula (2) sobre ITK y Txk, no se observó ningún efecto adverso sobre el desarrollo de Th17 y Treg. Puesto que ibrutinib inhibe tanto ITK como Txk, se observa una inhibición profunda de las células Th17 y un incremento en el desarrollo de Treg, que es comparable a las células inactivadas dobles de ITK/Txk murinas que se usaron como control.

También se valoraron los efectos de ibrutinib en comparación con la fórmula (2) sobre la viabilidad de células T CD8⁺. Las células T totales se colocaron en placas en pozos recubiertos con anti-TCR y anti-CD28 en la presencia de ambos inhibidores de BTK. Se usaron condiciones de cultivo neutras que no polarizarán las células T a un linaje auxiliar. Las células se cultivan durante 4 días y entonces se tiñen con anti-CD4, anti-CD8 y reactivo LIVE/DEAD para determinar si los fármacos tienen efectos selectivos sobre las células CD4⁺ o CD8⁺. La significancia estadística se calculó usando la prueba T de Mann Whitney. Los resultados, mostrados en la figura 18, indican que concentraciones más altas de la fórmula

(10) (ibrutinib) tienen un fuerte efecto negativo sobre la viabilidad de células T CD8⁺ que no se observa con la fórmula (2) a ninguna concentración.

Sin limitarse a ninguna teoría, las células T CD8⁺ tienen dos funciones efectoras principales: (1) producir grandes cantidades de IFN- γ (que activa los macrófagos), y (2) actividad citolítica. Se realizó un ensayo de células T citotóxicas (CTL) para comparar los inhibidores de BTK de la fórmula (2) y fórmula (10) (ibrutinib). Los efectores se prepararon por generación de CTL al cultivar esplenocitos no coincidentes con MHC durante 4 días con (500 nM) y sin la fórmula (2) o fórmula (10) (ibrutinib). Las dianas fueron linfoblastos B de cultivos tratados con lipopolisacáridos (LPS). El ensayo se realizó al incubar diferentes relaciones efectoras: dianas durante 4 horas. En la figura 19, los resultados muestran que la fórmula (10) (ibrutinib) afecta la función de células T CD8⁺ como se mide por % de citotoxicidad. La fórmula (2), por el contrario, no tiene ningún efecto sobre la función de células T CD8⁺ como se mide por % de citotoxicidad con respecto al vehículo. El efecto sobre la función de células T CD8⁺ también se puede observar por la medición de los niveles de IFN- γ , como se muestra en la figura 20, donde la fórmula (10) (ibrutinib) nuevamente da por resultado una pérdida significativa de función con respecto a la fórmula (2) y el vehículo.

Como se describe en la presente, el microambiente tumoral proporciona soporte estromal para el crecimiento tumoral y oculta el tumor de la vigilancia inmunitaria. El estroma asociado a tumores comprende una mezcla de fibroblastos, Treg, MDSC y TAM que promueven el crecimiento tumoral y restringen la aniquilación de células tumorales mediada por sistema inmunitario. El direccionamiento de infiltrados inmunitarios puede afectar el soporte estromal y mejorar la aniquilación de células cancerosas mediada por sistema inmunitario. Específicamente, las células mieloides se infiltran significativamente en el microambiente tumoral y suprimen la inmunidad antitumoral, promueven el crecimiento tumoral y metástasis tumoral. Dos subconjuntos de células mieloides con actividad inmunosupresora significativa son las MDSC y los TAM. Durante la progresión tumoral, las MDSC y los TAM facilitan el crecimiento tumoral al disminuir de forma regulada la respuesta inmunitaria de hospedador a través de la supresión de la función y activación de células T CD8⁺. BTK se expresa entre células de origen hematopoyético, incluidas células B, células mieloides, células cebadas y plaquetas, pero no células T, donde regula múltiples procesos celulares. La activación dependiente de BTK de células mieloides y linfocitos mantiene el complejo microambiente necesario para el mantenimiento de tumores linfoides y sólidos. La inhibición de BTK cambia el microambiente de supresor a estimulador al inhibir la infiltración y función y de subconjuntos inmunitarios innatos (MDSC y TAM), permitiendo de esta manera la activación de células T CD8⁺ citotóxicas. La selectividad única del inhibidor de BTK de la fórmula (2), en comparación con, por ejemplo, el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib), evita la pérdida de función para las células T CD8⁺ como se muestra en este ejemplo. Como resultado, las terapias de células T que incluyen CAR-T (células T CD8⁺ que expresan receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19) se pueden usar en combinación con la fórmula (2) y otros inhibidores selectivos de BTK descritos en la presente de una manera sinérgica. La fórmula (10) no se puede coadministrar sin pérdida de función para células T que expresan receptor de antígeno quimérico dirigido a CD8⁺ CD19.

Ensayos clínicos recientes han demostrado que las células CAR-T son una terapia prometedora para las neoplasias malignas hematológicas y de tumores sólidos. Los CAR incluyen proteínas de fusión que combinan el fragmento de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo monoclonal con dominios de activación de células T del complejo receptor de células T, tal como la cadena ζ , y endodominios coestimuladores, de CD28, 4-1BB u OX40. En los ensayos clínicos, se han observado tasas de respuesta completa de hasta 90 % después de la administración de CD19-CAR-T, incluso en leucemia linfocítica aguda resistente a quimioterapia. Sin embargo, los resultados en otros cánceres de células B, tal como leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), han sido menos sorprendentes. Una explicación para las diferentes tasas de respuesta entre los tipos de tumores es que la funcionalidad de CAR-T se puede inhibir por un microambiente tumoral inmunosupresor. Como se mencionó anteriormente, los TAM, macrófagos y las MDSC inhiben las respuestas de células T y promueven el reclutamiento de células T reguladoras. Por lo tanto, un inhibidor de BTK que promueve la función de células T (tal como la fórmula (2)) puede tener beneficios diversos y sinérgicos en combinación con la terapia adoptiva de células T y células T CAR en la práctica clínica a través de la reducción del microambiente tumoral inhibidor al inhibir la infiltración y función y de subconjuntos inmunitarios innatos en el microambiente tumoral.

Ejemplo 11 - Estudio clínico de un inhibidor de BTK en leucemia/linfoma y efectos en microambientes de médula ósea y linfoides

Los estudios clínicos han mostrado que dirigirse a la vía de señalización de BCR al inhibir BTK produce un beneficio clínico significativo en pacientes con linfoma no de Hodgkin (NHL). El inhibidor de BTK de segunda generación, fórmula (2), logra una biodisponibilidad y potencia oral significativa, y tiene características preclínicas favorables, como se describió anteriormente. El propósito de este estudio es evaluar la seguridad y eficacia del inhibidor de BTK de segunda generación de la fórmula (2) al tratar sujetos con leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL).

El diseño y realización de este estudio se respalda por la comprensión de la historia y terapias actuales para sujetos con cánceres linfoides; el conocimiento de la actividad y seguridad de un inhibidor de BTK de primera generación, ibrutinib, en sujetos con cánceres hematológicos; y la información no clínica disponible con respecto a la fórmula (2). Los datos colectivos respaldan las siguientes conclusiones. La expresión de BTK desempeña un papel importante en la biología de las neoplasias linfoides, que representan trastornos graves y potencialmente mortales con necesidades médicas continuas no satisfechas. La evaluación clínica de la fórmula (2) como un tratamiento potencial para estos trastornos tiene una

justificación científica sólida basada en observaciones de que el compuesto anula selectivamente la actividad de BTK y muestra actividad en modelos no clínicos de cánceres linfoides. Estos datos se respaldan por la documentación clínica de que ibrutinib, un inhibidor de BTK de primera generación, es clínicamente activo en estas enfermedades. Los datos clínicos de ibrutinib y los estudios no clínicos de farmacología y toxicología de seguridad de la fórmula (2) respaldan la seguridad de probar la fórmula (2) en sujetos con neoplasias malignas de células B.

Los objetivos principales del estudio clínico son los siguientes: (1) establecer la seguridad y la MTD de la fórmula administrada de manera oral (2) en sujetos con CLL/SLL; (2) determinar la farmacocinética (PK) de la fórmula administrada de manera oral (2) e identificación de sus metabolitos principales; y (3) medir los parámetros farmacodinámicos (PD) que incluyen la ocupación de fármaco de BTK, la enzima diana, y el efecto sobre los marcadores biológicos de la función de células B.

El objetivo secundario del estudio clínico es evaluar las respuestas tumorales en pacientes tratados con la fórmula (2).

Este estudio es un estudio multicéntrico, abierto, no aleatorizado, de grupo secuencial, de modificación de escala de dosis. Se evaluarán las siguientes cohortes de dosis:

Cohorte 1: 100 mg/día durante 28 días (= 1 ciclo)

Cohorte 2: 175 mg/día durante 28 días (= 1 ciclo)

Cohorte 3: 250 mg/día durante 28 días (= 1 ciclo)

Cohorte 4: 350 mg/día durante 28 días (= 1 ciclo)

Cohorte 5: 450 mg/día durante 28 días (= 1 ciclo)

Cohorte 6: Se va a determinar la cantidad en mg/día durante 28 días (= 1 ciclo)

Cada cohorte se inscribirá secuencialmente con 6 sujetos por cohorte. Si se observa ≤ 1 toxicidad limitante de dosis (DLT) en la cohorte durante el ciclo 1, se procederá a la modificación de escala a la siguiente cohorte. Los sujetos se pueden inscribir en la siguiente cohorte si 4 de los 6 sujetos inscritos en la cohorte completaron el ciclo 1 sin experimentar una DLT, en tanto que los 2 sujetos restantes están completando la evaluación. Si se observan ≥ 2 DLT durante el ciclo 1, se suspenderá la dosificación a esa dosis y superior y se establecerá la MTD como la cohorte anterior. La MTD se define como la dosis diaria más grande para la cual menos de 33 % de los sujetos experimentan una DLT durante el ciclo 1. La modificación de escala de dosis finalizará cuando se logre la MTD o a 3 niveles de dosis por arriba de la ocupación total de BTK, lo que se presente primero. La ocupación total de BTK se define como la ocupación de sitio activo de fórmula (2) de > 80 % (promedio de todos los sujetos en la cohorte) a 24 horas después de la dosis. En caso de que sea necesario modificación de escala a la Cohorte 6, la dosis se determinará con base en los datos agregados de las cohortes 1 a 5, que incluyen la seguridad, eficacia y resultados PK/PD. La dosis para la cohorte 6 no excederá 900 mg/día.

El tratamiento con la fórmula (2) puede continuar durante > 28 días hasta que se presente la progresión de enfermedad o una toxicidad inaceptable relacionada con fármaco. Los sujetos con progresión de enfermedad se removerán del estudio. Todos los sujetos que interrumpen el fármaco de estudio tendrán una visita de seguimiento de seguridad 30 (± 7) días después de la última dosis del fármaco de estudio, a menos que hayan comenzado otra terapia contra cáncer dentro de ese plazo. La valoración radiológica de tumor se realizará en el examen y al final del ciclo 2, ciclo 4 y ciclo 12 y a discreción del investigador. La confirmación de la respuesta completa (CR) requerirá análisis de médula ósea y valoración radiológica de tumor. Para los sujetos que permanecen en el estudio durante > 11 meses, se requiere un aspirado de médula ósea y una biopsia obligatorios en el ciclo 12 junto con la valoración radiológica de tumor.

Todos los sujetos tendrán paneles de seguridad estándar de hematología, química y análisis de orina realizados en el examen. Este estudio también incluye la valoración de función pancreática (amilasa sérica y lipasa sérica) debido a los descubrimientos pancreáticos en el estudio de toxicidad en ratas GLP de 28 días. Una vez que comience la dosificación, se evaluará la seguridad de todos los sujetos una vez a la semana durante las primeras 4 semanas, cada dos semanas durante el ciclo 2 y posteriormente, de manera mensual. Se recolectarán muestras de sangre durante la primera semana de tratamiento para valoraciones PK/PD. Los ECG se realizarán en el examen, y en los días 1-2, 8, 15, 22, 28 del ciclo 1, día 15 y 28 del ciclo 2, y de manera mensualmente posteriormente hasta el ciclo 6. Los ECG se realizan por triplicado solo para el examen. Posteriormente, se realizan pruebas de ECG individuales a menos que se requiera una prueba de ECG repetida.

La toxicidad limitante de dosis se define como cualquiera de los siguientes eventos (si no están relacionados con la progresión de enfermedad): (1) cualquier toxicidad no hematológica grado ≥ 3 (excepto alopecia) que persista a pesar de recibir un curso individual de terapia sintomática ambulatoria estándar (por ejemplo, diarrea grado 3 que responda a una dosis terapéutica individual de Imodium® no se consideraría una DLT); (2) prolongación grado ≥ 3 del intervalo QT corregido (QTc), como se determina por una lectura excesiva de laboratorio de ECG central; (3) neutropenia grado 4 (conteo absoluto de neutrófilos [ANC] $< 500/\mu\text{l}$) que dura > 7 días después de la interrupción de la terapia sin factores de

crecimiento o que dura > 5 días después de la interrupción de la terapia en tanto que los factores de crecimiento (es decir, neutropenia grado 4 que no dura tanto como se especifica no se considerará una DLT), (4) trombocitopenia grado 4 (conteo de plaquetas < 20.000/μl) que dura > 7 días después de la interrupción de la terapia o que requiere transfusión (es decir, trombocitopenia grado 4 que no dure tanto tiempo como se especifica no se considerará una DLT), y (5) retraso de dosificación debido a toxicidad durante > 7 días consecutivos.

Los parámetros de eficacia para el estudio incluyen la tasa de respuesta total, duración de la respuesta y supervivencia libre de progresión (PFS). Los parámetros de seguridad para el estudio incluyen DLT y MTD, frecuencia, severidad y atribución de eventos adversos (AE) con base en los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (CTCAE v4.03) para AE no hematológicos. Hallek, et al., Blood 2008, 111, 5446-5456.

El programa de valoraciones es el siguiente, con todos los días indicados en el siguiente significado el día dado o +/- 2 días a partir del día dado. Se realiza un examen físico, que incluye los signos vitales y peso, en el examen, durante el ciclo 1 a 1, 8, 15, 22 y 28 días, durante el ciclo 2 a 15 y 28 días, durante los ciclos 3 a 24 a 28 días y en el seguimiento (después de la última dosis). El examen físico de detección incluye, como mínimo, la apariencia general del sujeto, altura (solo detección) y peso, y el examen de la piel, ojos, oídos, nariz, garganta, pulmones, corazón, abdomen, extremidades, sistema musculoesquelético, sistema linfático y sistema nervioso. Posteriormente, se realizan exámenes físicos dirigidos a los síntomas. Los signos vitales (presión arterial, pulso, frecuencia respiratoria y temperatura) se valoran después de que el sujeto haya descansado en posición sentada. El estado del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) se valora en el examen, durante el ciclo 1 a 1, 8, 15, 22 y 28 días, durante el ciclo 2 a 15 y 28 días, durante los ciclos 3 a 24 a 28 días, y en el seguimiento, usando las indicaciones publicadas de estado funcional de ECOG descritas en Oken, et al., Am. J. Clin. Oncol. 1982, 5, 649-655. Las pruebas de ECG se realizan en el examen, durante el ciclo 1 a 1, 2, 8, 15, 22 y 28 días, durante el ciclo 2 a 15 y 28 días, durante los ciclos 3 a 24 a 28 días y en el seguimiento. La prueba de ECG de 12 derivaciones se realizará por triplicado (≥ 1 minuto de diferencia) en el examen. El promedio de QTc calculado de los 3 ECG debe ser <480 ms para ser elegible. En el ciclo 1, día 1 y ciclo 1, día 8, se realizan ECG individuales antes de la dosis y a 1, 2, 4 y 6 horas después de la dosis. El ECG individual en el día 2 del ciclo 1 se realiza antes de la dosis. En el ciclo 1, día 15, día 22 y día 28, se realiza un ECG individual 2 horas después de la dosis. A partir del ciclo 2, se realiza un ECG individual por visita. Los sujetos deben estar en posición supina y en reposo durante al menos 10 minutos antes de los ECG relacionados con el estudio. Dos QTc de lectura mecánica consecutivos > 500 ms o > 60 ms por arriba de la línea de base requieren revisión central de ECG. La hematología, incluido el conteo de sangre completo con conteo diferencial y de plaquetas y reticulocitos, se valora en el examen, durante el ciclo 1 a 1, 8, 15, 22 y 28 días, durante el ciclo 2 a 15 y 28 días, durante los ciclos 3 a 24 a 28 días y en el seguimiento. La química de suero se valora en el examen, durante el ciclo 1 a 1, 8, 15, 22 y 28 días, durante el ciclo 2 a 15 y 28 días, durante los ciclos 3 a 24 a 28 días y en el seguimiento. La química de suero incluye albúmina, fosfatasa alcalina, ALT, AST, bicarbonato, nitrógeno ureico en sangre (BUN), calcio, cloruro, creatinina, glucosa, lactato deshidrogenasa (LDH), magnesio, fosfato, potasio, sodio, bilirrubina total, proteína total y ácido úrico. Los conteos celulares e inmunoglobulina sérica se realizan en el examen, en el ciclo 2, día 28 y cada 6 meses a partir de entonces hasta la última dosis e incluyen conteos de células T/B/NK/monocitos (CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD19, CD16/56 y otros como sea necesario) e inmunoglobulina sérica (IgG, IgM, IgA e inmunoglobulina total). Los aspirados de médula ósea se realizan en el ciclo 12. Las muestras de farmacodinámica se extraen durante el ciclo 1 a 1, 2 y 8 días, y en el seguimiento. En los días 1 y 8, se extraen muestras farmacodinámicas antes de la dosis y 4 horas (± 10 minutos) después de la dosis, y en el día 2, se extraen muestras farmacodinámicas antes de la dosis. Las muestras de farmacocinética se extraen durante el ciclo 1 a 1, 2, 8, 15, 22 y 28 días. Las muestras farmacocinéticas para el día 1 del ciclo 1 se extraen antes de la dosis y a 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas (antes de la dosis en el día 2) después de la dosis. Las muestras para el día 8 del ciclo 1 se extraen antes de la dosis y a 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas después de la dosis. En el día 15, 22 y 28 del ciclo 1, se extrae una muestra de PK antes de la dosis y la segunda muestra de PK se debe extraer antes (hasta 10 minutos antes) de la adquisición de ECG, que es 2 horas después de la dosis. Las valoraciones radiológicas de tumor previas al tratamiento se realizan dentro de los 30 días antes de la primera dosis. Se requiere una tomografía computarizada (CT) (con contraste a menos que esté contraindicado) del tórax, abdomen y pelvis. Además, se debe realizar una tomografía por emisión de positrones (PET) o PET/CT para sujetos con SLL. Las valoraciones radiológicas de tumor son obligatorias al final del ciclo 2 (-7 días), ciclo 4 (-7 días) y ciclo 12 (-7 días). De otro modo, las valoraciones radiológicas de tumor se realizan a discreción del investigador. Se requiere una CT (con contraste a menos que esté contraindicado) del tórax, abdomen y pelvis para sujetos con CLL. Además, se requiere una PET/CT en sujetos con SLL. Se requieren valoraciones radiológicas y de médula ósea para confirmación de una respuesta completa (CR). Las valoraciones clínicas de la respuesta tumoral se deben realizar al final del ciclo 6 y cada 3 meses a partir de entonces. Los marcadores moleculares se miden en el examen e incluyen citogenética de interfase, cariotipo estimulado, estado mutacional de IgHV, metilación de Zap-70 y niveles de microglobulina beta-2. El análisis de orina se realiza en el examen e incluye pH, cetonas, gravedad específica, bilirrubina, proteínas, sangre y glucosa. Otras valoraciones, incluido el consentimiento informado, elegibilidad, historial médico y prueba de embarazo, se realizan en el momento del examen.

El investigador califica la respuesta del sujeto al tratamiento con base en los lineamientos recientes para CLL, como se da en Hallek, et al., Blood 2008, 111, 5446-56, y para SLL, como se da en Cheson, et al., J. Clin. Oncol. 2007, 25, 579-586. Los criterios de valoración de respuesta para CLL se resumen en la tabla 12.

TABLA 12. Criterios de valoración de respuesta para CLL. Abreviaturas: ANC = conteo absoluto de neutrófilos; CR = remisión completa; CRi = CR con recuperación de conteo de sangre incompleto; PR = remisión parcial.

Respuesta	Sangre periférica	Médula ósea (si se realiza)	Ganglios, hígado y bazo ^a
CR	Linfocitos $< 4 \times 10^9/L$ ANC $> 1,5 \times 10^9/L$ ^b Plaquetas $> 100 \times 10^9/L$ ^b Hemoglobina $> 11,0$ g/dl (sin transfundir) ^b	Normocelular < 30 % linfocitos sin nódulos linfoides B	Normal (por ejemplo, sin ganglios linfáticos $> 1,5$ cm)
CRi	Linfocitos $< 4 \times 10^9/L$ Anemia persistente, trombocitopenia o neutropenia relacionadas con toxicidad de fármaco	Hipocelular < 30 % linfocitos	Normal (por ejemplo, sin ganglios linfáticos $> 1,5$ cm)
PR	Linfocitos ≥ 50 % de disminución desde el ANC de línea de base $> 1,5 \times 10^9/L$ o Plaquetas $> 100 \times 10^9/L$ o 50 % de mejora sobre la línea de base ^b o Hemoglobina $> 11,0$ g/dl o 50 % de mejora sobre la línea de base (sin transfundir) ^b	No valorado	≥ 50 % de reducción en la linfadenopatía ^c y/o en el agrandamiento de bazo o hígado
a. Se requiere tomografía computarizada (CT) de abdomen, pelvis y tórax para esta evaluación b. Sin necesidad de factores de crecimiento exógenos c. En la suma de los productos de ≤ 6 ganglios linfáticos o en el diámetro más grande de los ganglios linfáticos agrandados detectados antes de la terapia y sin incremento en ningún ganglio linfático o nuevos ganglios linfáticos agrandados			

Los criterios de valoración de respuesta para SLL se resumen en la tabla 13.

- 5 TABLA 13. Criterios de valoración de respuesta para SLL. Abreviaturas: CR = remisión completa, CT = tomografía computarizada, FDG = [¹⁸F]fluorodesoxiglucosa, PET = tomografía de emisión de positrones, PR = remisión parcial, SD = enfermedad estable, SPD = suma del producto de los diámetros.

Respuesta	Definición	Masas ganglionares	Bazo, hígado	Médula ósea
CR	Desaparición de toda evidencia de enfermedad	(a) FDG-ávido o PET positivo antes de la terapia; masa de cualquier tamaño permitida si PET negativo (b) Variablemente FDG-ávido o PET negativo; regresión al tamaño normal en CT	No palpable, nódulos desaparecidos	Si el infiltrado está presente en el examen, el infiltrado se depura al repetir la biopsia; si no está determinado por morfología, la inmunohistoquímica debe ser negativa

Respuesta	Definición	Masas ganglionares	Bazo, hígado	Médula ósea
PR	Regresión de enfermedad medible y sin nuevos sitios	≥ 50 % de disminución en SPD de hasta 6 masas dominantes más grandes; sin incremento en el tamaño de otros ganglios	≥ 50 % de disminución en el SPD de los nódulos (para nódulo individual en el diámetro transversal más grande); sin incremento en el tamaño del hígado o bazo	Irrelevante si es positivo antes de la terapia; se debe especificar el tipo de célula
		(a) FDG-ávido o PET positivo antes de la terapia; ≥ 1 PET positivo en el sitio previamente implicado		
		(b) Variablemente FDG-ávido o PET negativo; regresión en CT		
SD	Falla para lograr CR/PR o enfermedad progresiva	(a) FDG-ávido o PET positivo antes de la terapia; PET positivo en sitios anteriores de enfermedad y sin sitios nuevos en CT o PET		
		(b) Variablemente FDG-ávido o PET negativo; sin cambio en el tamaño de las lesiones previas en CT		

Los parámetros PK del estudio son los siguientes. La PK plasmática de la fórmula (2) y un metabolito se caracteriza usando análisis no compartimental. Los siguientes parámetros PK se calculan, siempre que sea posible, a partir de las concentraciones plasmáticas de la fórmula (2):

$AUC_{(0-t)}$: Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo calculada usando la suma trapezoidal lineal desde tiempo 0 hasta tiempo t, donde t es el tiempo de la última concentración medible (C_t),

$AUC_{(0-24)}$: Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 24 horas, calculada usando suma trapezoidal lineal,

$AUC_{(0-\infty)}$: Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a infinito, calculada usando la fórmula: $AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + C_t / \lambda_z$, donde λ_z es la constante de velocidad de eliminación terminal aparente,

C_{max} : Concentración plasmática máxima observada,

T_{max} : Tiempo de la concentración plasmática máxima (obtenida sin interpolación),

$t_{1/2}$: Semivida de eliminación terminal (siempre que sea posible),

λ_z : Constante de velocidad de eliminación terminal (siempre que sea posible),

Cl/F: Depuración oral.

Los parámetros PD del estudio son los siguientes. La ocupación de BTK por la fórmula (2) se mide en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con la ayuda de una sonda análoga de fórmula (2) etiquetada con biotina. También se evaluará el efecto de la fórmula (2) sobre los marcadores biológicos de la función de células B.

El análisis estadístico usado en el estudio es el siguiente. No se realizan pruebas estadísticas formales de hipótesis. Las estadísticas descriptivas (incluidas medias, desviaciones estándar y medianas para variables continuas y las proporciones para variables discretas) se usan para resumir los datos como sea apropiado.

5 Las siguientes definiciones se usan para los conjuntos de análisis de seguridad y eficacia: Conjunto de análisis de seguridad: Todos los sujetos inscritos que reciben ≥ 1 dosis del fármaco de estudio; Conjunto de análisis por protocolo (PP): Todos los sujetos inscritos que reciben ≥ 1 dosis del fármaco de estudio y con ≥ 1 valoración de respuesta tumoral después del tratamiento. El conjunto de análisis de seguridad se usará para evaluar los parámetros de seguridad en este estudio. Los conjuntos de análisis de PP se analizarán para parámetros de eficacia en este estudio.

10 No se realiza ninguna imputación de valores para datos faltantes, excepto para fechas de inicio y finalización faltantes o parciales para eventos adversos y la medicación concomitante se imputará de acuerdo con reglas de imputación conservadoras preespecificadas. Los sujetos perdidos durante el seguimiento (o abandonados) se incluirán en los análisis estadísticos hasta el punto de su última evaluación.

15 El análisis de criterio de valoración de seguridad se realizó como sigue. Los resúmenes de seguridad incluirán resúmenes en la forma de tablas y listados. La frecuencia (número y porcentaje) de eventos adversos emergentes de tratamiento se reportará en cada grupo de tratamiento por Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) System Organ Class and Preferred Term. Los resúmenes también se presentarán por la severidad del evento adverso y por la relación con el fármaco de estudio. Las tablas de turnos de laboratorio que contienen conteos y porcentajes se prepararán por asignación de tratamiento, parámetro de laboratorio y tiempo. Se prepararán tablas de resumen para cada parámetro de laboratorio. Se generarán cifras de cambios en los parámetros de laboratorio con el paso del tiempo. Los signos vitales, ECG y exámenes físicos se tabularán y resumirán.

25 Los análisis adicionales incluyen resúmenes de datos demográficos del sujeto, características de línea de base, cumplimiento y tratamientos concurrentes. Los medicamentos concomitantes se codificarán de acuerdo con el diccionario de fármacos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se tabularán.

30 El análisis de los parámetros de eficacia se realizó como sigue. La estimación puntual de la tasa de respuesta total se calculará para el conjunto de análisis de PP. También se derivará el intervalo de confianza de 95 % correspondiente. La duración de la respuesta total se mide desde el momento en que se cumplen los criterios de medición para CR o PR (lo que se registre por primera vez) hasta la primera fecha en que la enfermedad recidivante o progresiva se documenta objetivamente (tomando como referencia para la enfermedad progresiva las mediciones más pequeñas registradas desde que comenzó el tratamiento). Se usará la metodología de Kaplan-Meier para estimar las curvas libres de eventos y los cuantiles correspondientes (incluida la mediana). La supervivencia libre de progresión se mide desde el momento de la primera administración de fármaco de estudio hasta la primera fecha en que la enfermedad recidivante o progresiva se documenta objetivamente (tomando como referencia para la enfermedad progresiva las mediciones más pequeñas registradas desde que comenzó el tratamiento). Se usará la metodología de Kaplan-Meier para estimar las curvas libres de eventos y los cuantiles correspondientes (incluida la mediana).

40 El esquema de estudio es una modificación de escala secuencial de cohorte. Cada cohorte consiste en seis sujetos. El tamaño de muestra del estudio es 24 a 36 sujetos, dependiendo de la modificación de escala de dosis en cohortes posteriores. La cohorte 1 (N = 6) consiste en la fórmula (2), 100 mg QD durante 28 días. La cohorte 2 (N = 6) consiste en la fórmula (2), 175 mg QD durante 28 días. La cohorte 3 (N = 6) consiste en la fórmula (2), 250 mg QD durante 28 días. La cohorte 4 (N = 6) consiste en la fórmula (2), 350 mg QD durante 28 días. La cohorte 5 (N = 6) consiste en la fórmula (2), 450 mg QD durante 28 días. La cohorte 6 (N = 6) consiste en la fórmula (2), a una dosis que se va a determinar QD durante 28 días. El nivel de dosis para la cohorte 6 se determinará con base en la seguridad y eficacia de las cohortes 1 a 5, y no excederá 900 mg/día. La modificación de escala finalizará con la cohorte MTD o tres niveles por arriba de la ocupación total de BTK, lo que se observe primero. Un brazo adicional del estudio explorará la dosificación de 100 mg BID. El tratamiento con la fórmula (2) oral puede continuar durante superior a 28 días hasta que se presente la progresión de enfermedad o una toxicidad inaceptable relacionada con fármaco.

55 Los criterios de inclusión para el estudio son los siguientes: (1) hombres y mujeres ≥ 18 años de edad con un diagnóstico confirmado de CLL/SLL, que han recaído después de, o han sido refractarios a, ≥ 2 tratamientos previos para CLL/SLL; sin embargo, los sujetos con delección 17p son elegibles si han recaído después de, o han sido refractarios a, 1 tratamiento previo para CLL/SLL; (2) peso corporal ≥ 60 kg, (3) estado de rendimiento de ECOG de ≤ 2 ; (4) acuerdo para usar anticonceptivos durante el estudio y durante 30 días después de la última dosis del fármaco de estudio si son sexualmente activos y capaces de tener hijos; (5) dispuesto y capaz de participar en todas las evaluaciones y procedimientos requeridos en este protocolo de estudio, incluida la deglución de cápsulas sin dificultad; o (6) capacidad para comprender el propósito y riesgos del estudio y proporcionar consentimiento informado firmado y fechado y autorización para usar información de salud protegida (de acuerdo con las regulaciones de privacidad nacionales y locales de los sujetos).

65 La forma de dosis y concentración de la fórmula (2) usada en el estudio clínico es una cápsula de gelatina dura preparada usando excipientes de grado farmacéutico estándar (celulosa microcristalina) y que contiene 25 mg de la fórmula (2) cada uno. El color de las cápsulas es naranja sueco. La vía de administración es oral (*per os*, o PO). El régimen de dosis es

una vez al día o dos veces al día, como se defina por la cohorte, con el estómago vacío (definido como sin alimentos 2 horas antes y 30 minutos después de la dosificación).

Las características de línea de base de los pacientes inscritos en el estudio clínico se dan en la tabla 14.

TABLA 14. Características de línea de base de CLL recidivante/refractaria.

Característica	CLL (N = 44)
Datos demográficos de paciente	
Edad (años), mediana (intervalo)	62 (45-84)
Sexo, hombres (%)	33 (75)
Terapias previas, mediana (intervalo), n	3 (1-10)
≥3 terapias previas, n (%)	26 (59)
Detalles clínicos	
Estado de rendimiento de ECOG ≥ 1 (%)	28 (63)
Etapas Rai III/IV	16 (36)
Enfermedad voluminosa ≥ 5 cm, n (%)	15 (34)
Citopenia en línea de base	33 (75)
Estado citogénico	
Deleción de cromosoma 11q22.3 (Del 11q), n (%)	18 (41)
Cromosoma 17p13.1 (Del 17p), n (%)	19 (34)
Estado de IgV _H (no mutado), n (%)	28 (64)

Los resultados del estudio clínico en pacientes con CLL recidivante/refractaria se resumen en la tabla 15.

TABLA 15. Actividad de la fórmula (2) en CLL recidivante/refractaria. (PR = respuesta parcial; PR+L = respuesta parcial con linfocitosis; SD = enfermedad estable; PD = enfermedad progresiva).

n (%)	Todas las cohortes (N = 31)	100 mg QD (N=8)	175 mg QD (N=8)	250 mg QD (N=7)	100 mg BID (N=3)	400 mg QD (N=5)
PR	22 (71)	7 (88)	5 (63)	5 (71)	3 (100)	2 (40)
PR+L	7 (23)	0 (0)	3 (37)	2 (29)	0 (0)	2 (40)
SD	2 (6)	1 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
PD	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mediana (intervalo) de ciclos						
	7,3 (3,0-10,8)	10,0 (9,0-10,8)	8,6 (3,0-8,8)	7,0 (7,0-7,3)	5,2 (4,7-5,5)	5,0 (4,8-5,5)

La figura 21 muestra la mediana del % de cambio en ALC y SPD desde línea de base en el estudio clínico de la fórmula (2), graficada en comparación con los resultados reportados para ibrutinib en la figura 1A de Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Los resultados muestran que la fórmula (2) conduce a una respuesta más rápida del paciente en CLL

que el tratamiento correspondiente con ibrutinib. Este efecto se ilustra, por ejemplo, por la mediana del % de cambio en SPD, que logró el mismo estado en el presente estudio a los 7 meses de tratamiento con la fórmula (2) en comparación con 18 meses para ibrutinib. El % de cambio en SPD observado en las diferentes cohortes (es decir, por dosis y régimen de dosificación) se muestra en la figura 22, y en todos los casos muestra respuestas significativas.

En la figura 23 se muestra una curva de Kaplan-Meier que muestra la PFS del estudio clínico de CLL de la fórmula (2). Se realizó una comparación de las curvas de supervivencia usando la prueba de Log-Rank (Mantle-Cox), con un valor p de 0,0206 que indica que las curvas de supervivencia son diferentes. El número de pacientes en riesgo se muestra en la figura 24. Tanto la figura 23 como la figura 24 muestran los resultados para la fórmula (2) en comparación con los resultados reportados para la fórmula (10) (ibrutinib) en Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Se observa una mejora en la supervivencia y una reducción en el riesgo en pacientes con CLL tratados con la fórmula (2) en comparación con los pacientes tratados con ibrutinib.

Con base en los datos y las comparaciones mostradas anteriormente, el estudio de CLL mostró que la eficacia de la fórmula (2) fue sorprendentemente superior a la de la fórmula (10) (ibrutinib).

En el estudio de literatura de ibrutinib, la progresión de enfermedad incrementada se asoció con pacientes con lesiones citogenéticas de alto riesgo (deleción 17p13.1 o deleción 11q22.3), como se muestra en la figura 3A en Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42, que muestra la PFS de ibrutinib que incluye la PFS desglosada por anomalía genética. Las deleciones 17p y 11q son características de alto riesgo validadas de CLL, y la deleción 17p es el riesgo más alto. En la figura 25, se muestra la PFS para la fórmula (2) en pacientes con la deleción 17p en comparación con los resultados obtenidos para ibrutinib en Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369, 32-42. Se obtuvo un valor p de 0,0696. En la figura 26, se compara el número de pacientes en riesgo con la deleción 17p. Hasta la fecha, ningún paciente con 17p ha progresado con la fórmula (2).

Los eventos adversos observados en el estudio clínico en CLL recidivante/refractaria se dan en la tabla 16. No se observaron DLT. No se ha alcanzado la MTD. No se observaron eventos adversos graves (AAG) relacionados con el tratamiento. No se necesitaron antivirales profilácticos ni antibióticos.

TABLA 16. Eventos adversos relacionados con el tratamiento reportados en el estudio clínico de la fórmula (2) en CLL recidivante/refractaria. (Reportado en $\geq 5\%$ de los pacientes).

Eventos adversos (relacionados con tratamiento), n (%)	Grado	Todos (N = 44)
Cefalea	1/2	7 (16)
Tendencia incrementada a moretones	1	6 (14)
Diarrea	1	4 (9)
Petequias	1	3 (7)

Por lo tanto, el estudio clínico de la fórmula (2) mostró otros resultados inesperadamente superiores en comparación con la terapia con ibrutinib. Se observó falta de linfocitosis en el estudio. Además, solo se observaron AE grado 1, y estos AE fueron atribuibles a la alta selectividad de BTK de la fórmula (2).

La ocupación diana de BTK se midió para pacientes con CLL recidivante/refractaria con los resultados que se muestran en la figura 27. Para la dosificación de 200 mg QD del inhibidor de BTK de la fórmula (2), se observó aproximadamente 94 % - 99 % de ocupación de BTK, con una cobertura superior de 24 horas y también se observó menos variabilidad entre pacientes. Para 420 mg y 840 mg QD del inhibidor de BTK ibrutinib, se observó una ocupación de BTK del 80 % - 90 %, con más variabilidad entre pacientes y ocupación limitada. Estos resultados indican que el inhibidor de BTK de la fórmula (2) logra una ocupación de BTK superior en pacientes con CLL que ibrutinib.

Los efectos de la fórmula (2) sobre los porcentajes de subconjuntos de células también se evaluaron usando análisis de citometría de flujo de sangre periférica, con los resultados mostrados en la figura 28, figura 29, figura 30, figura 31, figura 32 y figura 33. Las muestras de PBMC de muestras de pacientes con CLL extraídas antes (antes de la dosis) y después de 28 días de dosificación con la fórmula (2) se compararon para posibles cambios en los subconjuntos de células. Las PBMC se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con etiquetas fluorescentes (fluorocromos) para identificar subconjuntos de células mediante citometría de flujo. Las células no viables se excluyeron del análisis utilizando el tinte

7-aminoactinomicina D (7-AAD). Para producir la métrica del cambio porcentual, se tomaron los siguientes pasos. En primer lugar, cada subconjunto de células se definió por selección por citometría de flujo jerárquica. Entonces, se calculó el cambio en la frecuencia (entre el día 1 y día 28) para cada subconjunto de células. Los subconjuntos de MDSC se midieron como un % de todas las células mieloides. Los subconjuntos de células T se midieron como un % de todas las células CD3⁺, y las células NK se midieron como un % de todas las células CD45⁺ vivas. En la figura 28 y figura 29, los resultados muestran el % de cambio en el nivel de MDSC (monocíticas) durante 28 días versus % de cambio de ALC en el día 28 del ciclo 1 (C1D28) y en día 28 del ciclo 2 (C2D28). Un ciclo es de 28 días. Se observa una tendencia en donde los pacientes con % de ALC decreciente tuvieron % de MDSC (monocíticas) crecientes. Esto puede incluir pacientes que tuvieron linfocitosis de resolución rápida y aquellos sin linfocitosis inicial. Esto proporciona evidencia de que el tratamiento con la fórmula (2) moviliza las MDSC y por lo tanto, afecta el microambiente tumoral de CLL en la médula y ganglios linfáticos, que es una indicación inesperada de eficacia superior. En la figura 30 y figura 31, los resultados muestran el % de cambio en el nivel de células NK durante 28 días versus % de cambio de ALC, medido en C1D28 o C2D28, y se observan tendencias similares en donde los pacientes con % de ALC decreciente tuvieron % de células NK crecientes. Esto puede incluir pacientes que tuvieron linfocitosis de resolución rápida y aquellos que no tienen linfocitosis inicial. Los efectos en la figura 28 a figura 31 se observan en múltiples cohortes, a dosis que incluyen 100 mg BID, 200 mg QD y 400 mg QD. En la figura 32 y figura 33, los efectos sobre las células NK y células MDSC se comparan con varios marcadores diferentes versus % de cambio en ALC en C1D28 y C2D28. Estos otros marcadores incluyen células T CD4⁺, células T CD8⁺, relación de células T CD4⁺/CD8⁺, células T NK, células T PD-1⁺ CD4⁺ y células T PD-1⁺ CD8⁺. Se observa que los efectos sobre las células NK y células MDSC son mucho más pronunciados que sobre cualquiera de estos otros marcadores.

Estos resultados sugieren que después de la administración de fórmula (2), el microambiente de CLL experimenta un cambio en donde las células NK y los subconjuntos de MDSC monocíticas incrementan en frecuencia en la sangre periférica en pacientes con conteos decrecientes de ALC, un parámetro clínico importante en CLL. El incremento de células NK puede reflejar un incremento total en la actividad citolítica contra B-CLL que da por resultado que el % de ALC disminuya. El incremento en el % de MDSC en la sangre se puede deber a un movimiento de estas células fuera de los ganglios linfáticos, bazo y médula ósea, que son todos posibles sitios de proliferación de CLL. Es probable que menos MDSC en los centros de proliferación de CLL den por resultado un microambiente inmunosupresor reducido que conduzca a un incremento de la inmunidad mediada por células contra el tumor, proliferación tumoral disminuida y finalmente, un menor % de ALC en la circulación.

Los resultados clínicos actualizados del estudio de CLL se muestran en la figura 34 a figura 39. La figura 34 muestra una actualización de los datos presentados en la figura 21. La figura 35 muestra una actualización de los datos presentados en la figura 27 e incluye resultados de dosificación BID. La dosificación de 200 mg QD de fórmula (2) dio por resultado 94 % - 99 % de ocupación de BTK, cobertura de 24 horas y menos variabilidad entre pacientes. La dosificación de 420 mg y 840 mg QD de ibrutinib dio por resultado una ocupación de BTK de 80 % - 90 %, más variabilidad entre pacientes y ocupación limitada. La dosificación de 100 mg BID de fórmula (2) dio por resultado una ocupación de BTK de 97 % - 99 %, una cobertura completa de BTK y menos variabilidad entre pacientes. La PFS para pacientes con delecciones 17p y delecciones 11q se ilustra en la figura 36, figura 37 y figura 38. Los resultados de SPD actualizados se ilustran en la figura 39, y nuevamente muestran resultados significativos en todas las cohortes y regímenes de dosificación.

El tratamiento de pacientes con CLL con la fórmula (2) también dio por resultado apoptosis incrementada, como se ilustra en la figura 40. La B-CLL apoptótica se definió por citometría de flujo por tener fenotipos PARP⁺, Caspasa 3⁺, CD19⁺ y CD5⁺ escindidos. El 82 % de las muestras probadas tuvieron un cambio de línea de base superior a 25 %. El tratamiento de pacientes con CLL también mostró que la fórmula (2) disminuyó las quimiocinas plasmáticas asociadas con la migración y retención de MDSC. Se ha observado una disminución significativa en los niveles de CXCL12 en pacientes tratados con la fórmula (2), como se muestra en la figura 41.

Ejemplo 12 - Efectos de inhibidores de BTK en trombosis

Los estudios clínicos han mostrado que dirigirse a la vía de señalización de BCR al inhibir BTK produce un beneficio clínico significativo (Byrd, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369(1), 32-42; Wang, et al., N. Engl. J. Med. 2013, 369(6), 507-16). Sin embargo, en estos estudios, se ha reportado sangrado en hasta 50 % de los pacientes tratados con ibrutinib. La mayoría de los eventos hemorrágicos fueron de grado 1-2 (hematomas espontáneos o petequias) pero, en 5 % de los pacientes, fueron de grado 3 o superior después del traumatismo. Estos resultados se reflejan en la información de prescripción de ibrutinib, donde se reportaron eventos hemorrágicos de cualquier grado, incluidos hematomas y petequias, en aproximadamente la mitad de los pacientes tratados con ibrutinib (INMRUVICA prospecto de envase e información de prescripción, revisado en julio de 2014, Administración de Alimentos y Fármacos de EUA).

La activación constitutiva o aberrante de la cascada de señalización de BCR se ha implicado en la propagación y mantenimiento de una variedad de neoplasias malignas de células B. Los inhibidores de molécula pequeña de BTK, una proteína al principio de esta cascada y expresada específicamente en células B, han surgido como una nueva clase de agentes dirigidos. Hay varios inhibidores de BTK, incluida la fórmula (17) (CC-292) y fórmula (10) (ibrutinib), en desarrollo clínico. Es importante destacar que los ensayos clínicos en etapa temprana han encontrado que ibrutinib es particularmente activo en la leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma de células de manto (MCL), lo que sugiere que esta clase de inhibidores puede desempeñar un papel significativo en diferentes tipos de cánceres (Aalipour and Advani,

Br. J. Haematol. 2013, 163, 436-43). Sin embargo, sus efectos no se limitan a leucemia o linfomas, ya que las plaquetas también dependen de los miembros de familia de cinasas Tec, BTK y Tec, para la transducción de señales en respuesta a diferentes estímulos trombogénicos (Oda, et al., Blood 2000, 95(5), 1663-70; Atkinson, et al., Blood 2003, 102(10), 3592-99). De hecho, tanto Tec como BTK desempeñan un papel importante en la regulación de la fosfolipasa $\text{C}\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) corriente abajo de la glicoproteína VI de receptor de colágeno (GPVI) en las plaquetas humanas. Además, BTK se activa y experimenta fosforilación de tirosina tras la exposición al receptor de trombina plaquetaria, que requiere el compromiso de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y actividad de PI3K (Laffargue, et al., FEBS Lett. 1999, 443(1), 66-70). También se ha implicado en la estabilidad de trombo dependiente de GPIIb en sitios de lesión vascular (Liu, et al., Blood 2006, 108(8), 2596-603). Por lo tanto, BTK y Tec se implican en varios procesos importantes para apoyar la formación de un tapón hemostático estable, que es fundamental para prevenir una pérdida significativa de sangre en respuesta a una lesión vascular. Por lo tanto, los efectos de los inhibidores de BTK de la fórmula (2) y fórmula (10) (ibrutinib) se evaluaron sobre la trombosis mediada por plaquetas humanas al utilizar la formación de trombos humanos *in vivo* en el modelo de ratones VWF HA1 descrito en Chen, et al., Nat. Biotechnol. 2008, 26(1), 114-19.

La administración de anestesia, inserción de catéteres venosos y arteriales, etiquetado fluorescente y administración de plaquetas humanas ($5 \times 10^8/\text{ml}$), y la preparación quirúrgica del músculo cremáster en ratones se han descrito previamente (Chen et al., Nat Biotechnol. 2008, 26(1), 114-19). La lesión en la pared del vaso de las arteriolas ($\sim 40\text{-}65 \text{ mm}$ de diámetro) se realizó usando un láser de tinte de nitrógeno pulsado (440 nm, Photonic Instruments) aplicado a través de un objetivo Olympus de inmersión en agua 20x (LUMPlanFI, 0,5 apertura numérica (NA)) de un microscopio Zeiss Axiotech vario. Las interacciones de plaquetas humanas y pared se visualizaron por microscopía de fluorescencia usando un sistema equipado con un escáner confocal de disco giratorio Yokogawa CSU-22, cámara iXON EM y líneas láser de 488 nm y 561 nm para detectar plaquetas etiquetadas con BCECF y etiquetadas con rodamina, respectivamente (Revolution XD, Andor Technology). El grado de la formación de trombos se valoró durante 2 minutos después de la lesión y se determinó el área (μm^2) de cobertura (Image IQ, Andor Technology). Para los estudios de inhibición de la fórmula (2), fórmula (17) (CC-292) y fórmula (10) (ibrutinib), los inhibidores de BTK se adicionaron a plaquetas humanas purificadas durante 30 minutos antes de la administración.

Los efectos de trombo *in vivo* de los inhibidores de BTK, fórmula (2), fórmula (17) (CC-292) y fórmula (10) (ibrutinib), se evaluaron en trombosis mediada por plaquetas humanas al utilizar la formación de trombo humano *in vivo* en el modelo de ratones HA1 de VWF, que se ha descrito previamente (Chen, et al., NatBiotechnol. 2008, 26(1), 114-19). Las plaquetas humanas purificadas se preincubaron con diferentes concentraciones de los inhibidores de BTK (0,1 μM , 0,5 μM o 1 μM) o DMSO y entonces se administraron a ratones VWF HA1, seguido de la formación de trombos inducida por láser. Las plaquetas humanas tratadas con inhibidor de BTK se etiquetaron con fluorescencia y se infundieron continuamente a través de un catéter insertado en la arteria femoral. Su comportamiento en respuesta a la lesión vascular inducida por láser se monitoreó en tiempo real usando microscopía intravital confocal de dos (Furie and Furie, J. Clin. Invest. 2005, 115(12), 2255-62). Tras la inducción de la lesión de la arteriola, las plaquetas no tratadas formaron rápidamente trombos con un tamaño promedio de trombo de $6,450 \pm 292 \text{ mm}^2$ (media $\pm$ s.e.m.), como se muestra en la figura 42 y figura 43. De manera similar, las plaquetas tratadas con la fórmula (2) (1 μM) formaron un trombo ligeramente más pequeño pero no significativamente diferente con un tamaño promedio de trombo de $5733 \pm 393 \text{ mm}^2$ (media $\pm$ s.e.m.). Por el contrario, se presentó una reducción dramática en el tamaño de trombo en las plaquetas pretratadas con 1 μM de la fórmula (10) (ibrutinib), $2600 \pm 246 \text{ mm}^2$ (media $\pm$ s.e.m.), dando por resultado una reducción en el tamaño máximo de trombo por aproximadamente 61 % en comparación con el control ($P > 0,001$) (figura 42). Se obtuvieron resultados similares con plaquetas pretratadas con 500 nM de la fórmula (2) o ibrutinib: tamaño de trombo de $5946 \pm 283 \text{ mm}^2$ y $2710 \pm 325 \text{ mm}^2$, respectivamente. Estos resultados iniciales pueden proporcionar algunos antecedentes mecánicos y explicación sobre las tasas de eventos adversos relacionados con hemorragia reportada de 44 % en el estudio RESONATE de fase III que compara ibrutinib con ofatumumab. Los resultados obtenidos para la fórmula (17) (CC-292) fueron similares a los de la fórmula (10) (ibrutinib), como se muestra en las figuras 42 y 43. Estos resultados demuestran la sorprendente ventaja del inhibidor de BTK de la fórmula (2), que no interfiere con la formación de trombos, en tanto que los inhibidores de BTK de la fórmula (17) (CC-292) y la fórmula (10) (ibrutinib) interfieren con la formación de trombos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la formación de trombos *in vivo* en la presencia de inhibidores de BTK. La prueba *in vivo* de nuevos agentes antiplaquetarios requiere biomarcadores informativos. Al utilizar un modelo de factor von Willebrand de ratón modificado genéticamente (VWFR1326H) que respalda la trombosis mediada por plaquetas humana pero no de ratón, se evaluaron los efectos de la fórmula (2), fórmula (17) (CC-292) y fórmula (10) (ibrutinib) en la formación de trombos. Estos resultados muestran que la fórmula (2) no tuvo ningún efecto significativo sobre la formación de trombo mediada por plaquetas humanas, en tanto que la fórmula (10) (ibrutinib) fue capaz de limitar este proceso, dando por resultado una reducción en el tamaño máximo de trombo por 61 % en comparación con el control. La fórmula (17) (CC-292) mostró un efecto similar a la fórmula (10) (ibrutinib). Estos resultados, que muestran una formación reducida de trombos para ibrutinib a concentraciones fisiológicamente relevantes, pueden proporcionar algunos antecedentes mecanicistas para los eventos hemorrágicos de grado ≥ 3 (por ejemplo, hematoma subdural, hemorragia gastrointestinal, hematuria y hemorragia postoperatoria) que se han reportado en ≤ 6 % de los pacientes tratados con la fórmula (10) (ibrutinib).

La agregación de plaquetas de GPVI se midió para la fórmula (2) y fórmula (10) (ibrutinib). La sangre se obtuvo de humanos no tratados y las plaquetas se purificaron a partir de proteínas ricas en plasma por centrifugación. Las células se resuspendieron a una concentración final de 350.000/ μl en amortiguador que contiene 145 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L

de HEPES, 0,5 mmol/L de Na_2HPO_4 , 5 mmol/L de KCl, 2 mmol/L de MgCl_2 , 1 mmol/L de CaCl_2 y glucosa al 0,1 %, a pH 7,4. Las soluciones madre de convulxina (CVX) GPVI se prepararon el día de la experimentación y se adicionaron a las suspensiones de plaquetas 5 minutos (37 °C, 1200 rpm) antes de la inducción de la agregación. La agregación se valoró con un Chronolog Lumi-Aggregometer (modelo 540 VS; Chronolog, Havertown, PA) y se dejó proceder durante 6 minutos después de la adición del agonista. Los resultados se reportan como cambio porcentual máximo en la transmitancia de la luz desde línea de base con el amortiguador de plaquetas usado como referencia. Los resultados se muestran en la figura 44.

En la figura 45, se muestran los resultados de los resultados de agregación de plaquetas humanas inducidas por CVX (250 ng/ml) antes y 15 minutos después de la administración de los inhibidores de BTK a 6 individuos sanos.

Los resultados representados en la figura 44 y figura 45 indican que el inhibidor de BTK de la fórmula (10) (ibrutinib) inhibe significativamente la agregación de plaquetas de GPVI, en tanto que el inhibidor de BTK de la fórmula (2) no lo hace, que ilustra adicionalmente los sorprendentes beneficios de este último compuesto.

Ejemplo 13 - Combinaciones sinérgicas de inhibidores de BTK e inhibidores de CD19

Se pueden realizar experimentos de combinación para valorar el comportamiento sinérgico de combinaciones de fármacos de inhibidores de BTK e inhibidores de CD19. Se pueden usar modelos animales singénicos para linfomas de células B, incluidos modelos murinos, para valorar este comportamiento usando inducción intravenosa, intraesplénica, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intracerebral.

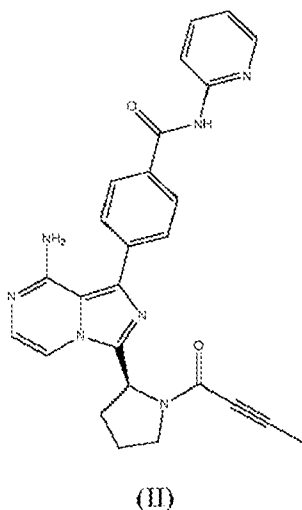
También se puede usar un modelo de xenoinjerto de ratón para valorar el comportamiento sinérgico de las combinaciones de fármacos de inhibidores de BTK e inhibidores de CD19. En este estudio, se obtienen ratones NOD-SCID-yc-/- (NSG) de 6 a 10 semanas de edad del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME) y la línea humana CD19+ ALL Nalm-6 se obtiene de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Los animales se inyectan mediante la vena de la cola con 10^6 células Nalm-6 viables en 0,2 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) estéril. A partir de 3 a 5 semanas después de la inyección, los ratones se examinaron para el injerto cada 3 semanas por muestreo retroorbital de sangre periférica. El injerto se detecta por análisis de citometría de flujo usando anticuerpos que reconocen CD19 y CD45. Además, los ratones se examinan usando anti-CD3 y anti-CD33 para asegurar que el injerto fue de la población de linfoblastos y no de un linaje de células T o mieloide. Los ratones xenoinjertados se aleatorizaron al tratamiento con (i) el inhibidor de BTK de la fórmula (2), (ii) un anticuerpo monoclonal anti-CD19 murino (BioXcell, clon 1D3), (iii) una combinación del inhibidor de BTK de la fórmula (2) y el mismo anticuerpo monoclonal anti-CD19 murino, o (iv) vehículo, después del establecimiento de la enfermedad, definido como más de 5 % de blastos detectados en sangre periférica. La respuesta al tratamiento se midió semanalmente por hemorragias retroorbitales para determinar los conteos de glóbulos blancos y el por ciento de blastos por citometría de flujo.

Ejemplo 14 - Estudio *in vivo* de combinaciones sinérgicas de células T CAR CD19 y BTK

Para evaluar el efecto de la inhibición de BTK en tumores tratados con células T CAR CD19, se inyectan ratones SCID-Beige de ocho semanas de edad (Charles River) por la vena de la cola el día 1 con 1×10^6 células tumorales NALM-6 transducidas con luciferasa de luciérnaga de proteína fluorescente verde (GFP-FFLuc). Siete días después del injerto tumoral, los ratones se inyectaron de manera intravenosa con 1×10^7 células T CAR (día 7 y día 14). La bioluminiscencia tumoral se monitorea usando un sistema de imagenología Xenogen *in vivo* (IVIS; Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) para adquisición de conjuntos de datos de imagenología. Para evaluar un efecto inhibidor de BTK, se inyectan células NALM-6 transducidas con GFP-FFLuc mediante la vena de la cola, y los ratones se tratan con (A) fórmula oral (2) a una dosis de 15 mg/kg BID, (B) células T CAR intravenosas como se describió anteriormente, o (C) una combinación de fórmula (2) a una dosis de 15 mg/kg BID y células CAR-T intravenosas como se describió anteriormente. Las células T CAR pueden usar una variedad de dominios de señalización, incluidos dominios CD28, 4-1BB y CD3ζ, diferentes dominios transmembrana y diferentes dominios scFv de CD19 para evaluar la combinación óptima.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para usarse en el tratamiento de cáncer, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de (1) un inhibidor de CD19 seleccionado de un anticuerpo anti-CD19 o un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, o un fragmento de unión a antígeno o conjugado de los mismos, y (2) un inhibidor de tirosina cinasa de Bruton (BTK), en donde el inhibidor de BTK es el compuesto de la fórmula (II):



- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de CD19 se selecciona del grupo que consiste en blinatumomab, coltuximab ravtansina, denintuzumab mafodotina y fragmentos de unión a antígeno, conjugados, variantes y biosimilares de los mismos.
3. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de CD19 es una célula T que comprende un receptor de antígeno quimérico anti-CD19.
4. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de CD19 es una célula NK que comprende un receptor de antígeno quimérico anti-CD19.
5. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 comprende un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular anti-CD 19, en donde el dominio extracelular anti-CD 19 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y sustituciones de aminoácidos conservativas de lo mismo.
6. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de CD3 ζ y un dominio coestimulador seleccionado del grupo que consiste en un dominio de señalización de 4-1BB, un dominio de señalización de CD28 y combinaciones de los mismos.
7. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, sustituciones de aminoácidos conservativas de lo mismo y combinaciones de lo mismo.
8. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y sustituciones de aminoácidos conservadoras de lo mismo.
9. La combinación para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD20.
10. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo anti-CD20 se selecciona del grupo que consiste en rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab, ibritumomab y fragmentos, conjugados, variantes, complejos etiquetados con radioisótopos, biosimilares de los mismos y combinaciones de los mismos.

11. La combinación para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de un régimen quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en (1) fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR); (2) rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP); y (3) bendamustina y rituximab (BR).
- 5 12. La combinación para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer es una neoplasia maligna hematológica de células B.
- 10 13. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la neoplasia maligna hematológica de células B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), linfoma de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), linfoma de Burkitt, mieloma múltiple y mielofibrosis.
- 15 14. La combinación para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer es un cáncer de tumor sólido.
- 20 15. La combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello uterino, cáncer anal, cáncer de páncreas, carcinoma de células escamosas que incluye cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas, glioblastoma, tumor de estroma gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, sarcoma óseo, cáncer de estómago, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer ginecológico, cáncer de colon y cáncer de cerebro.

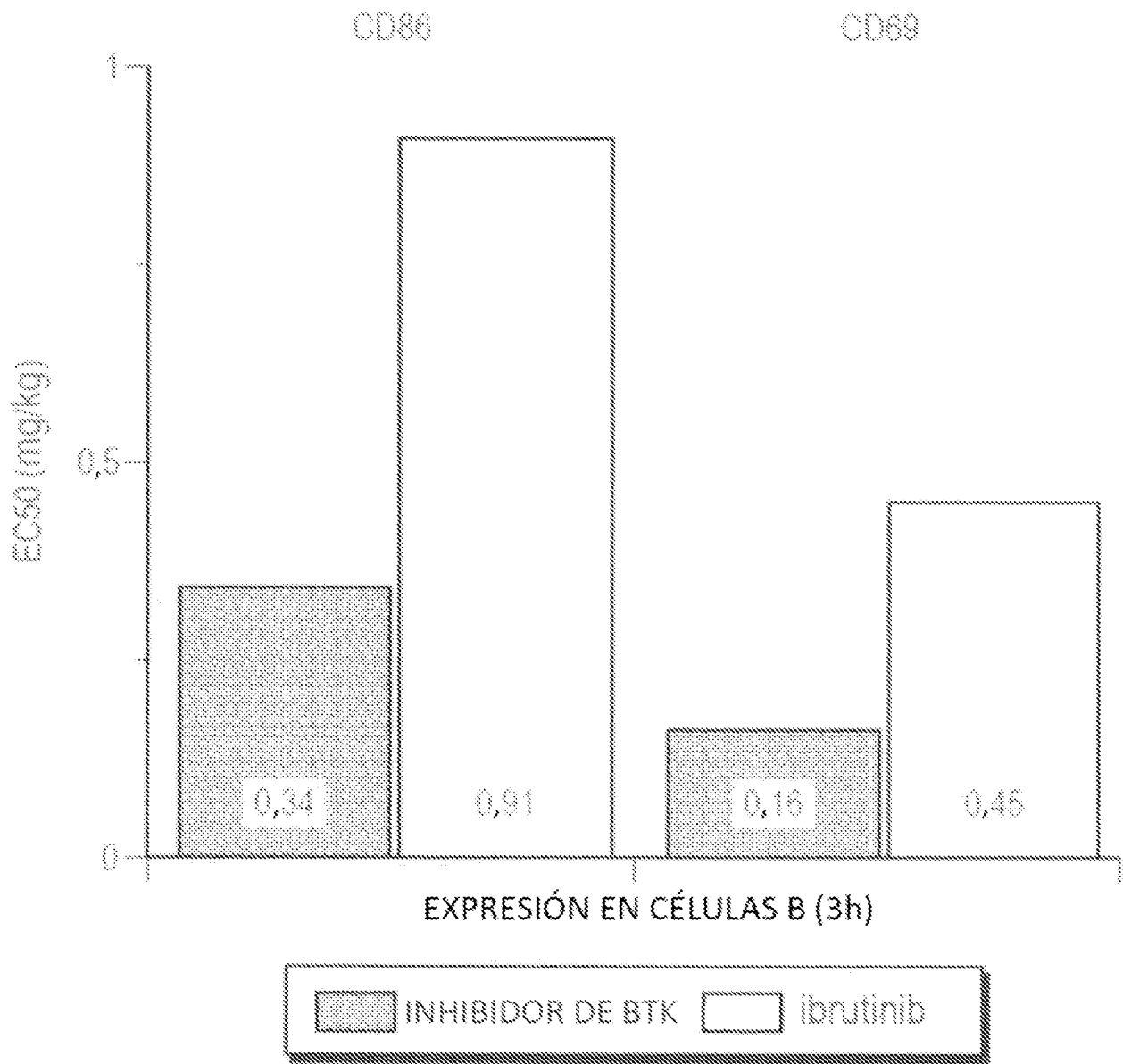


Figura 1

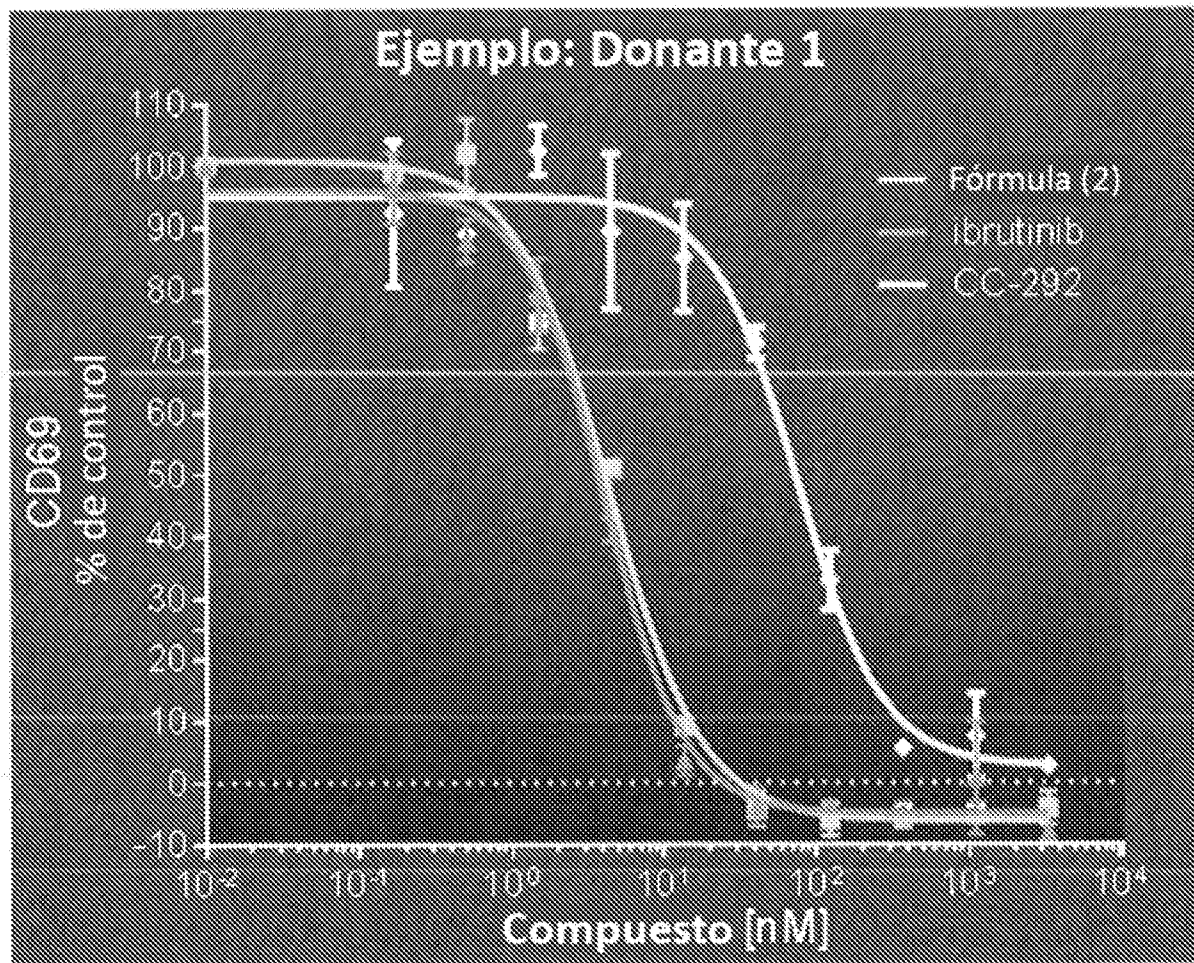


Figura 2

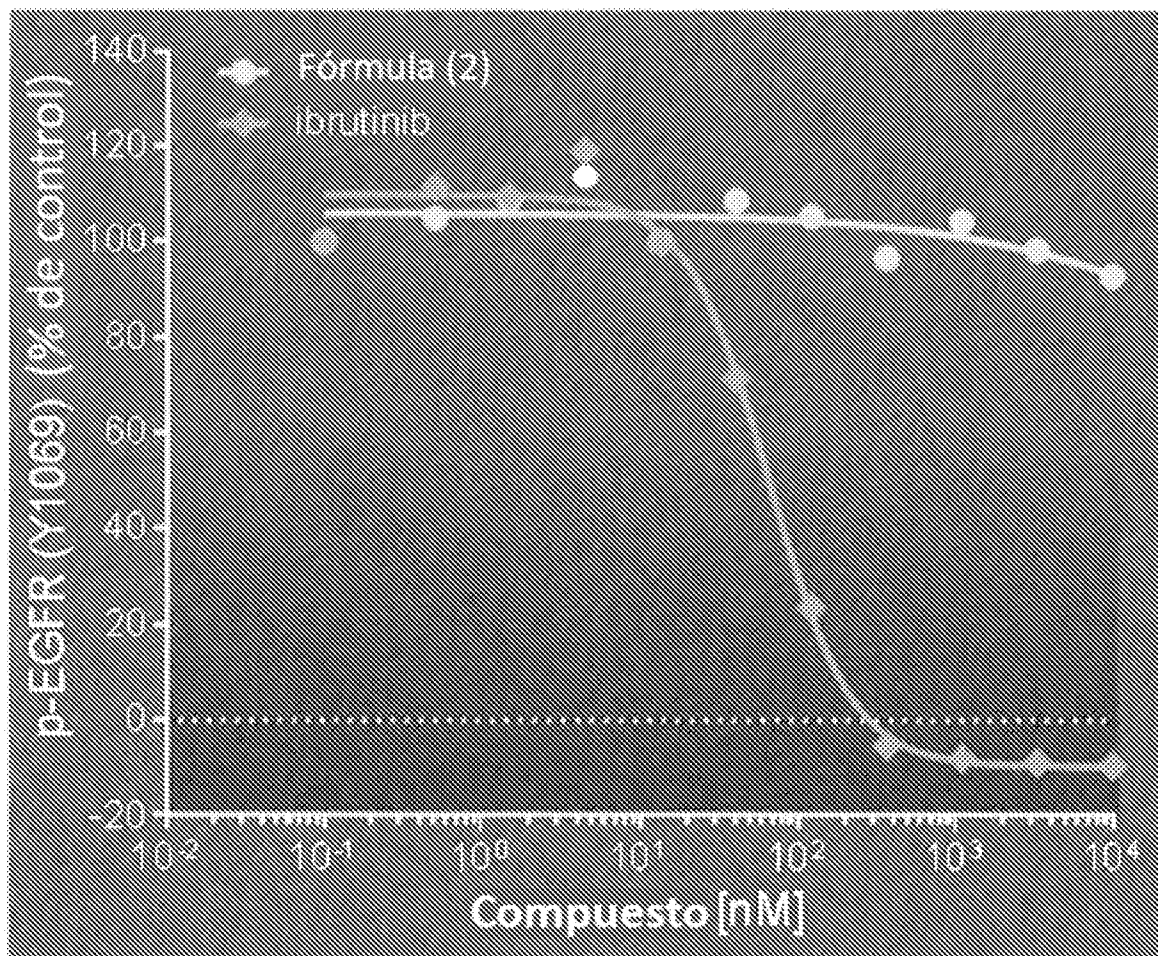


Figura 3

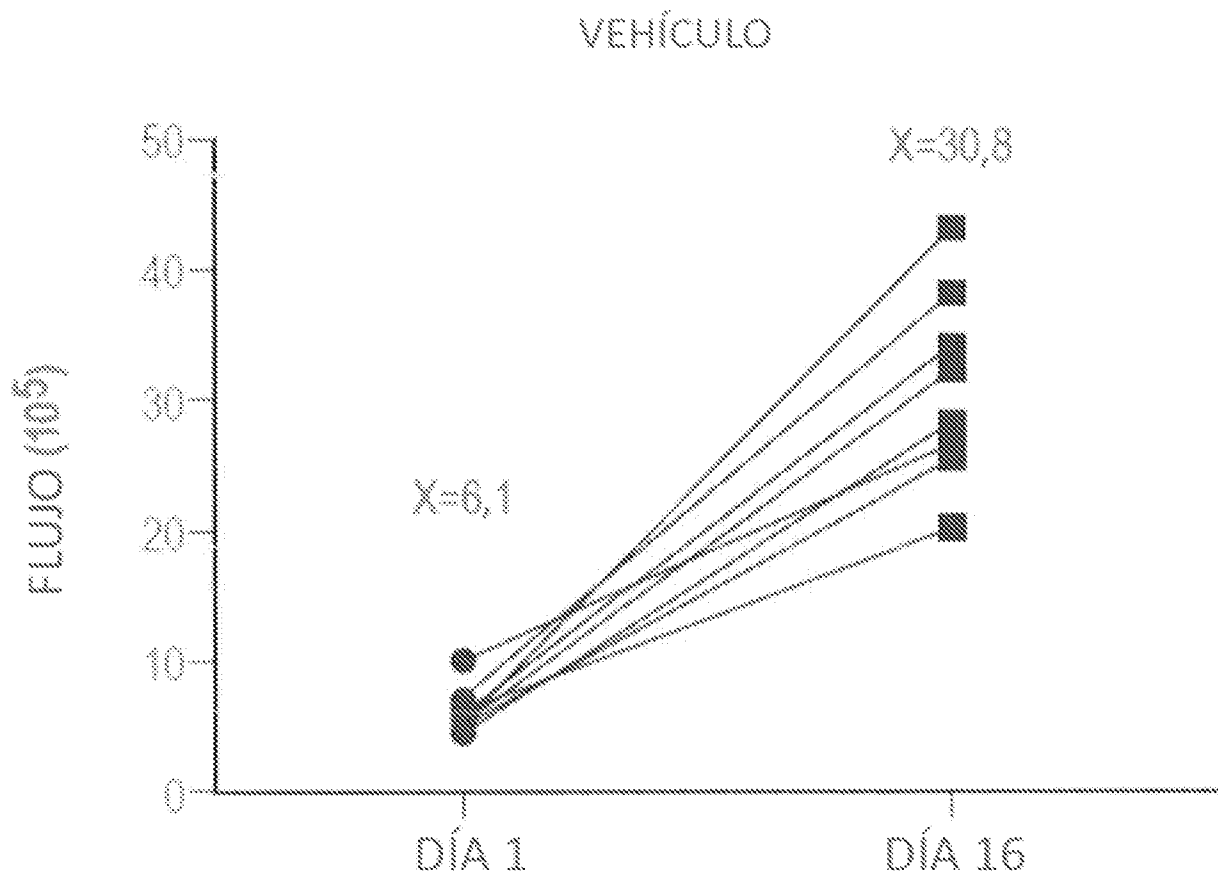


Figura 4

FÓRMULA XVIII

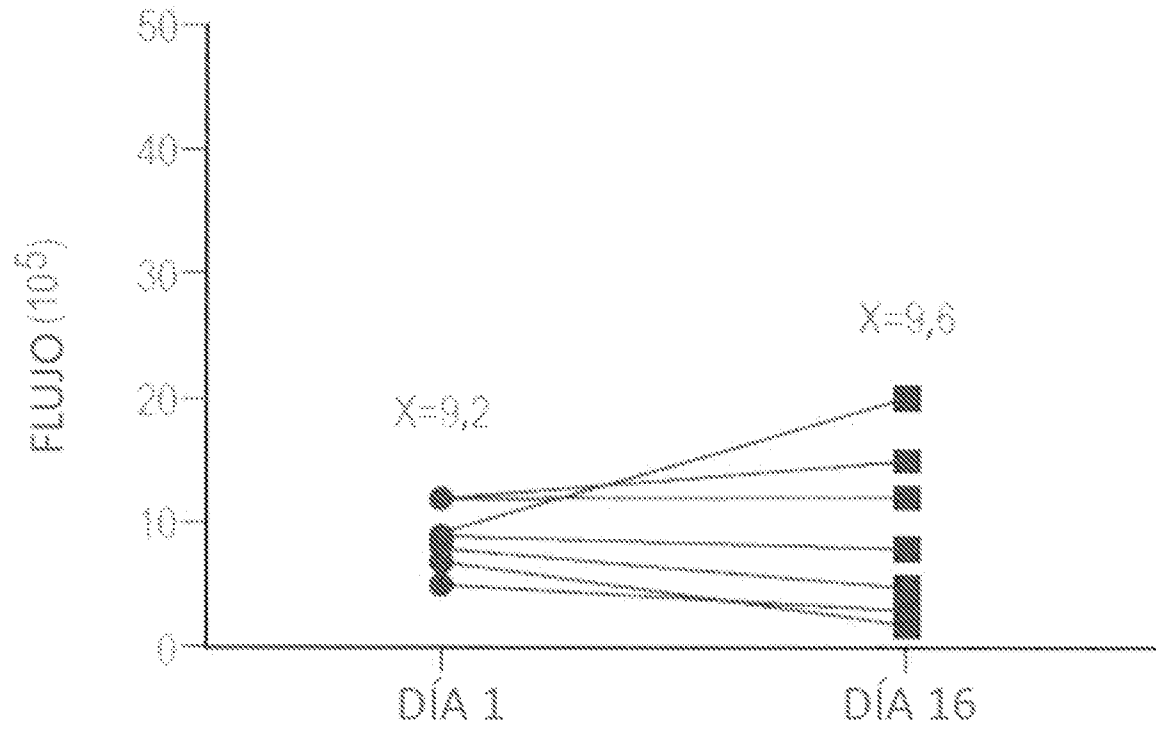


Figura 5

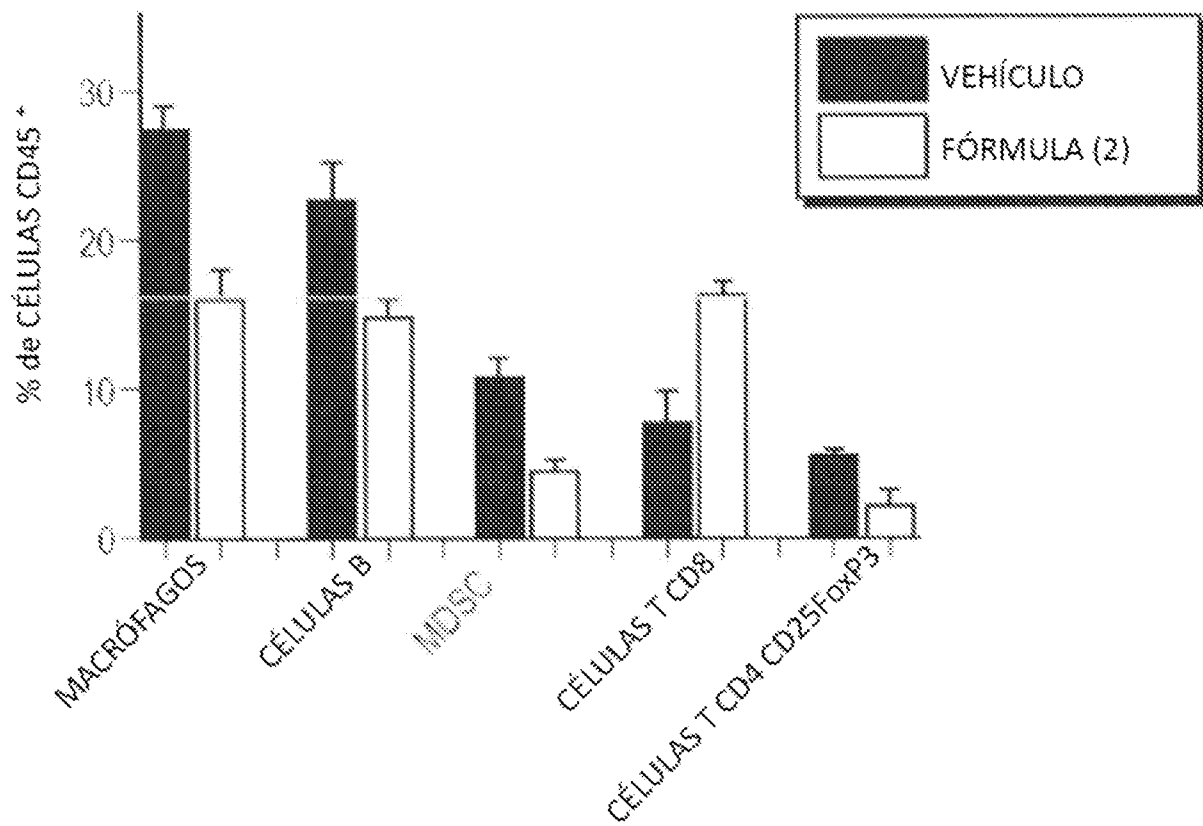


Figura 6

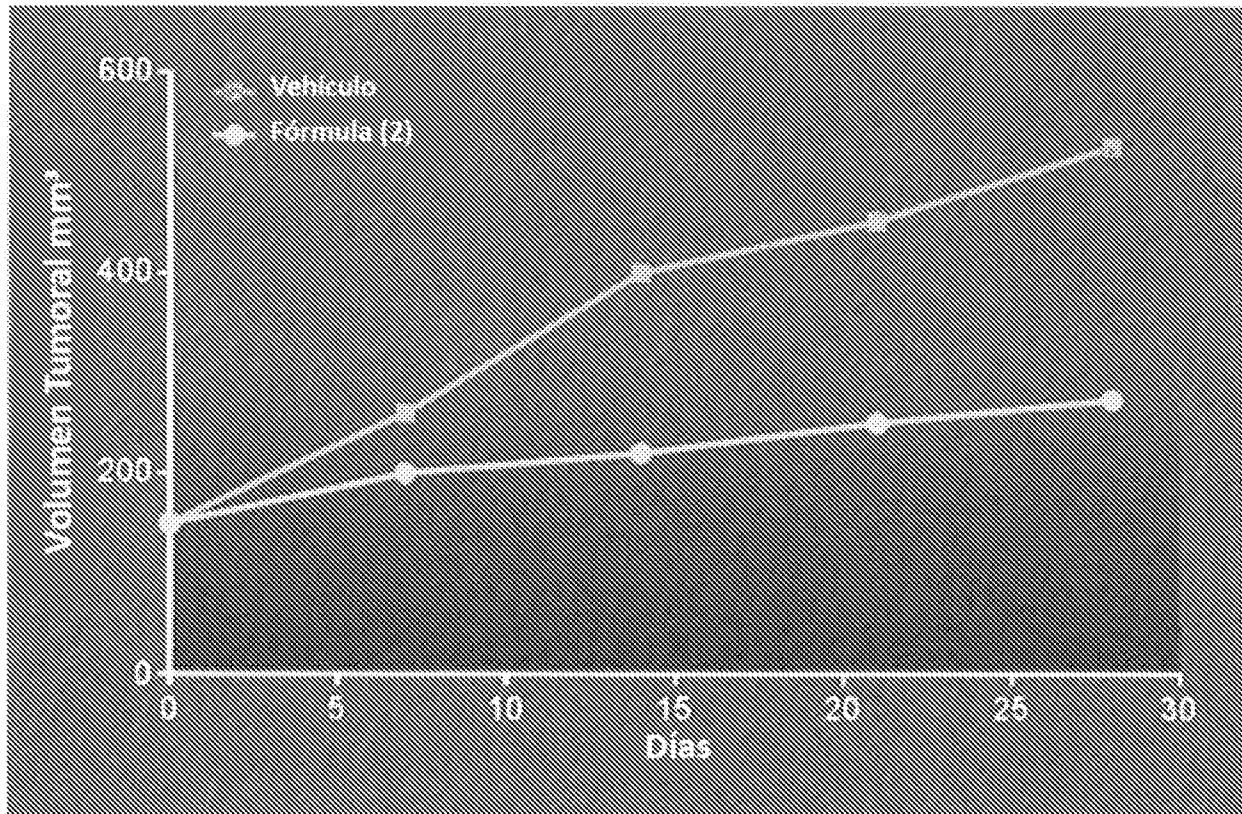


Figura 7

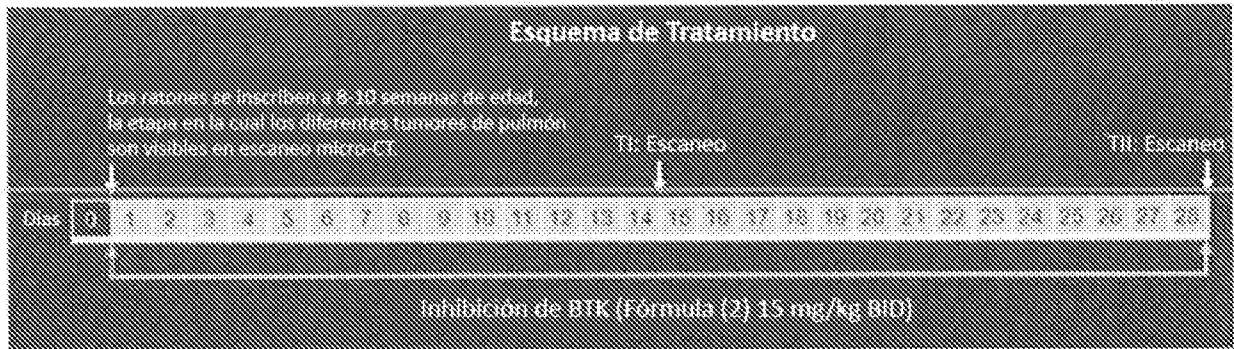


Figura 8

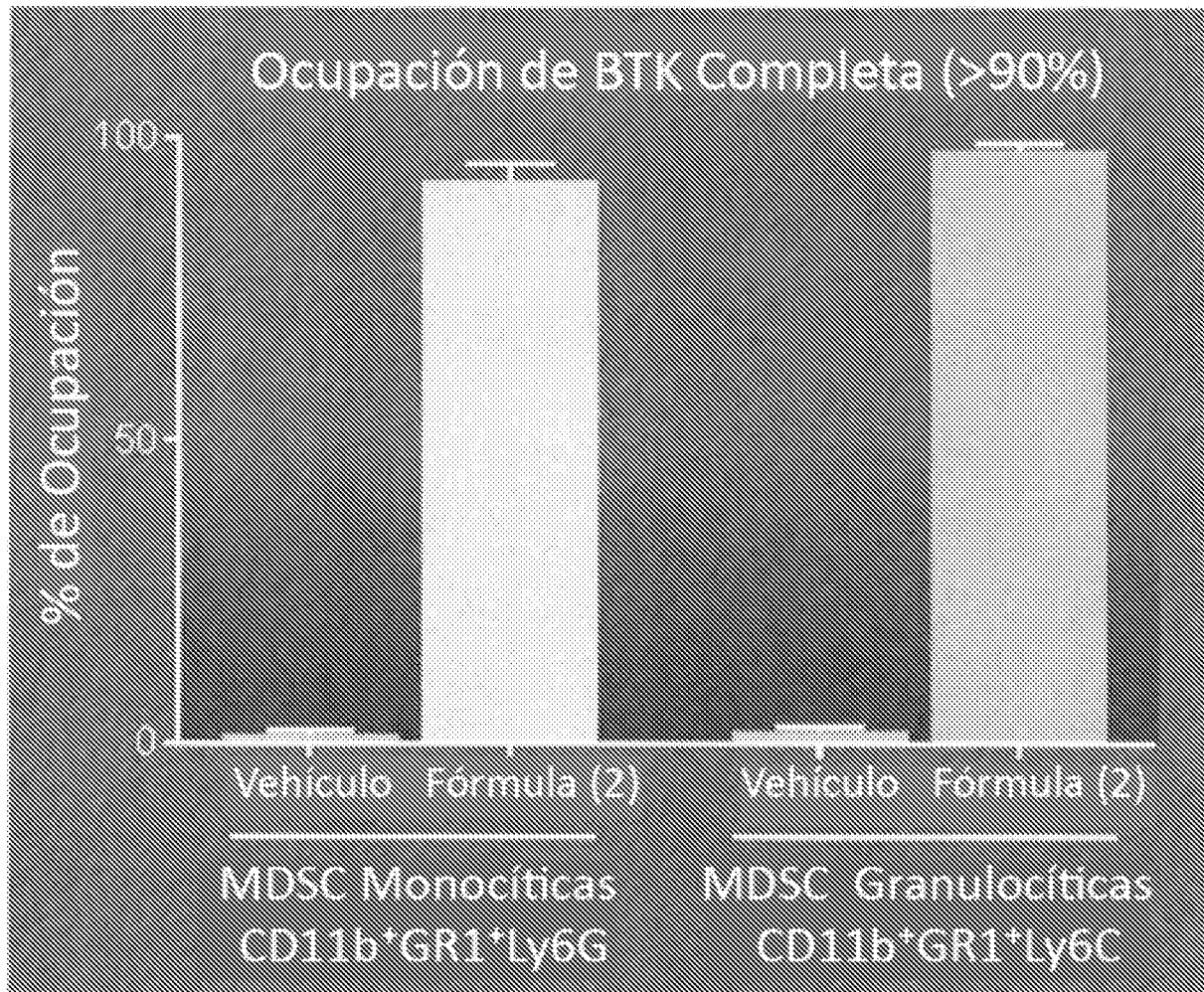


Figura 9

Expresión de CD107a⁺
(Marcador de activación de NK)

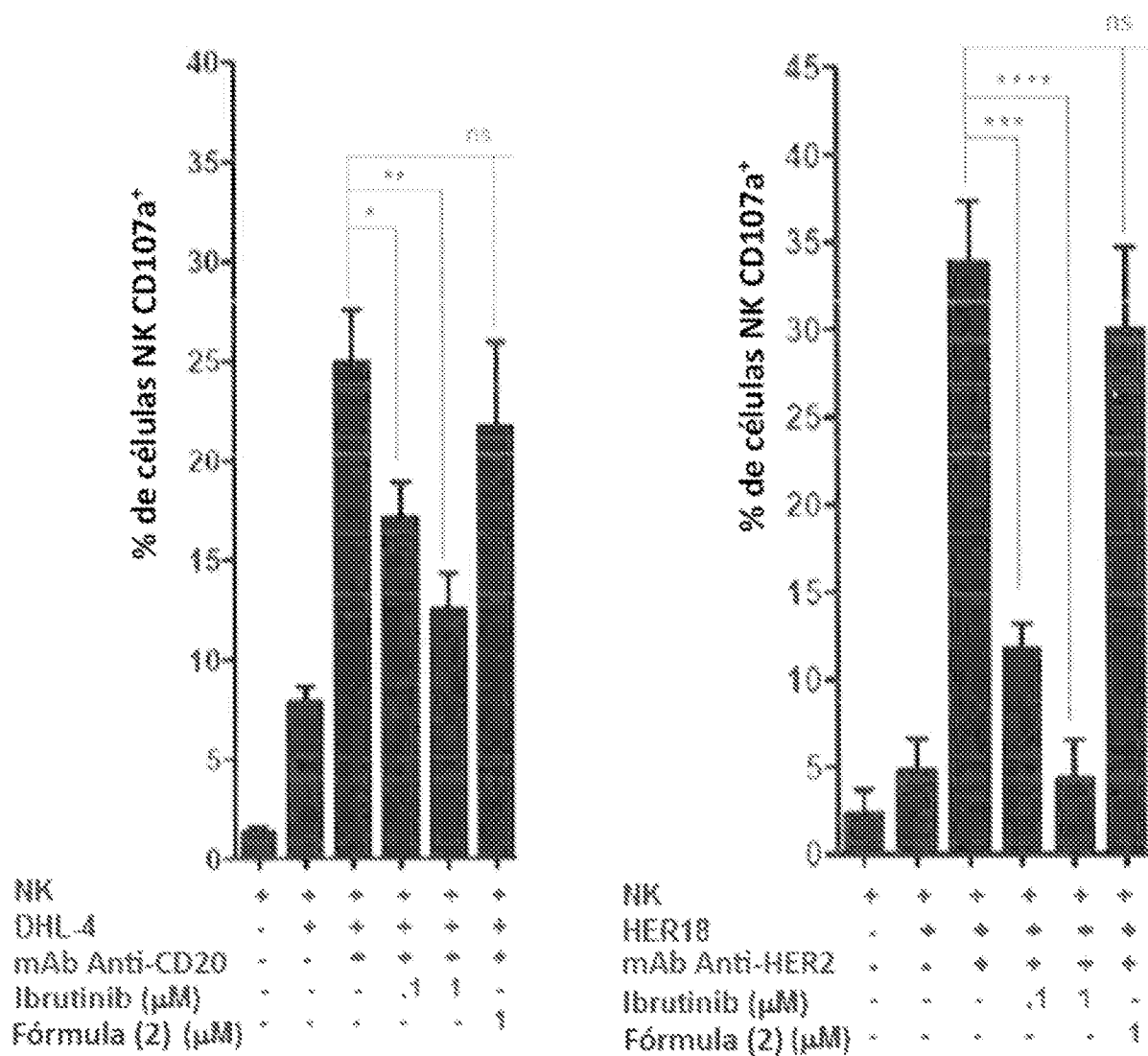


Figura 10

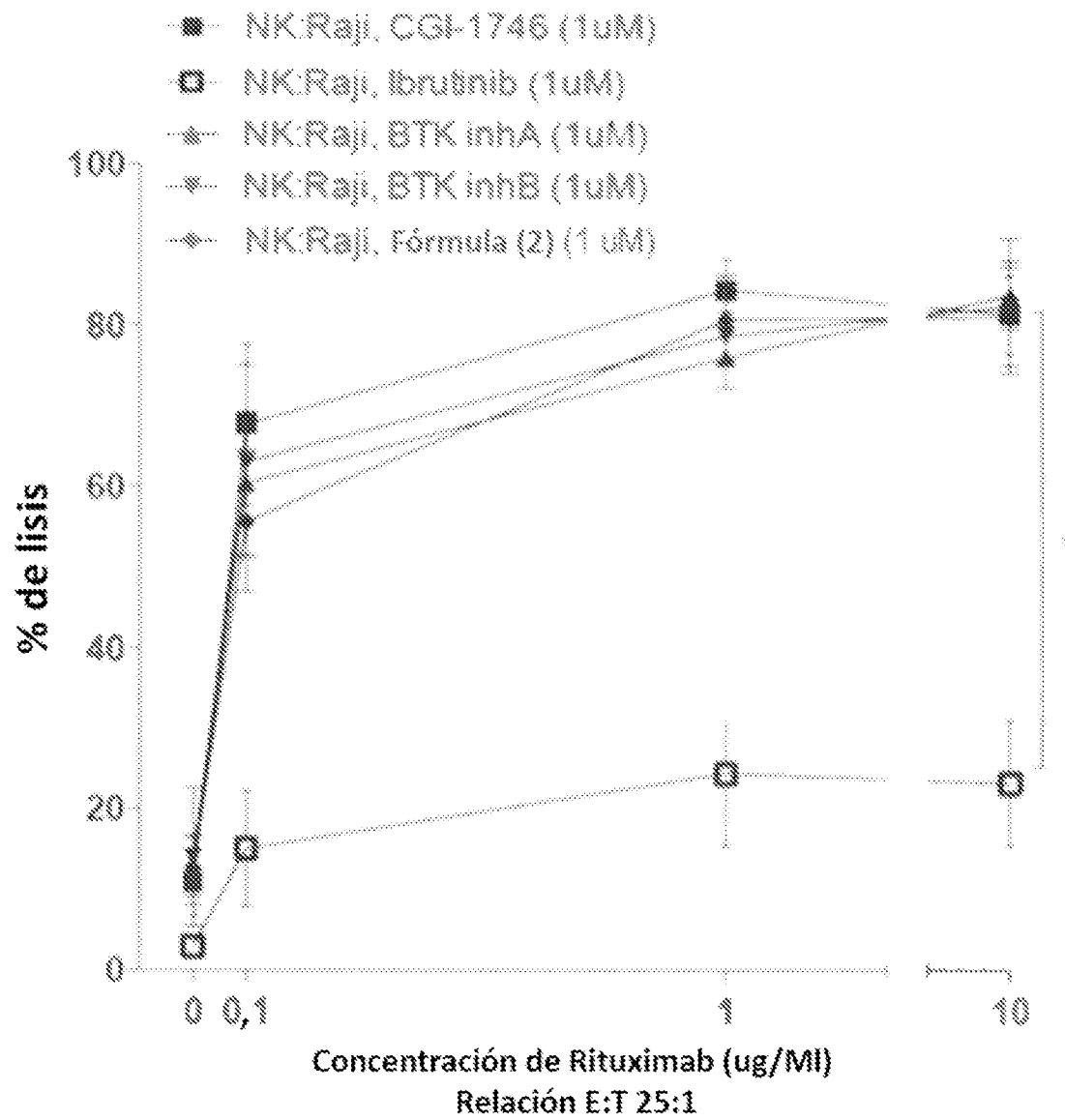


Figura 11

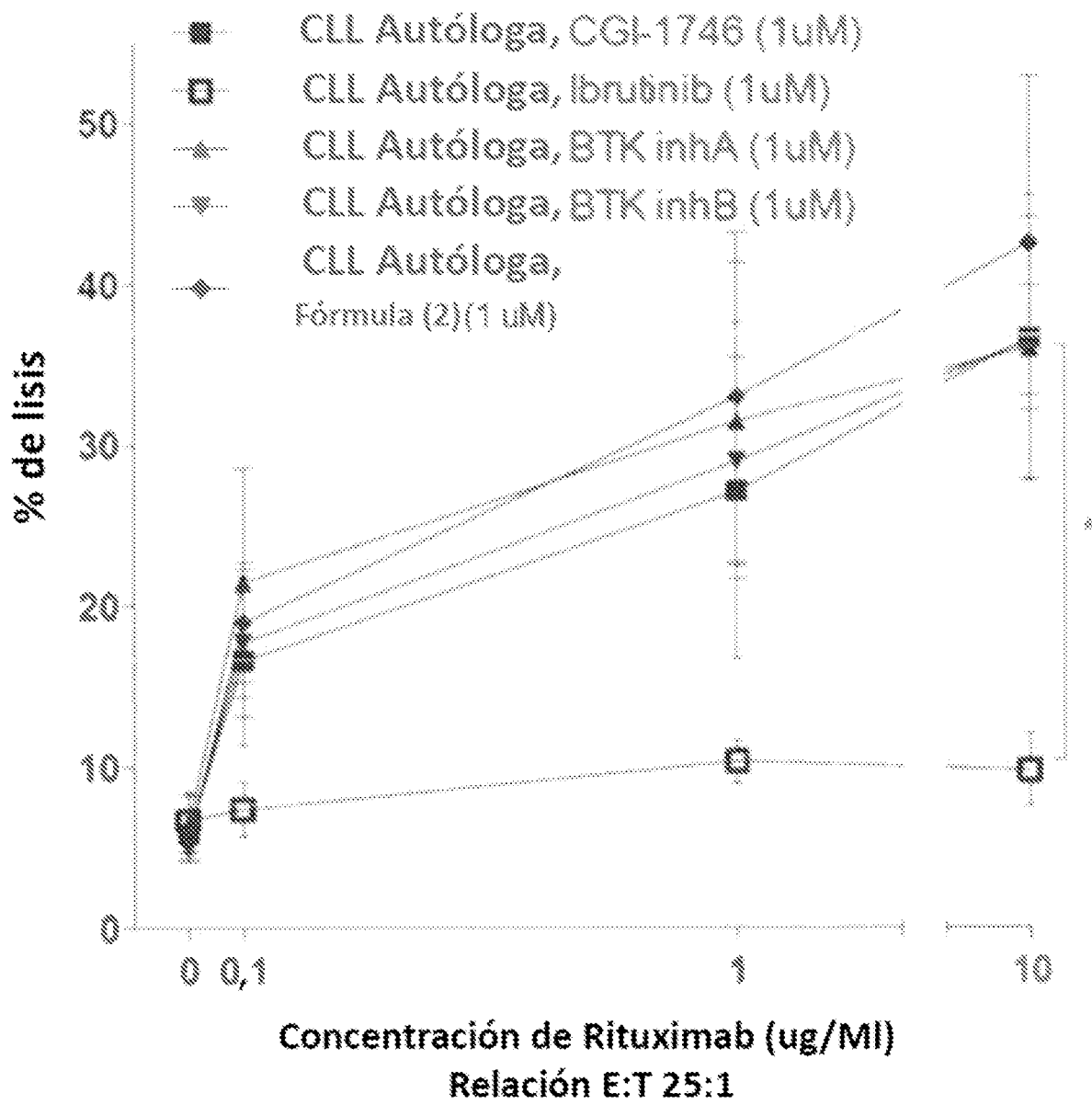


Figura 12

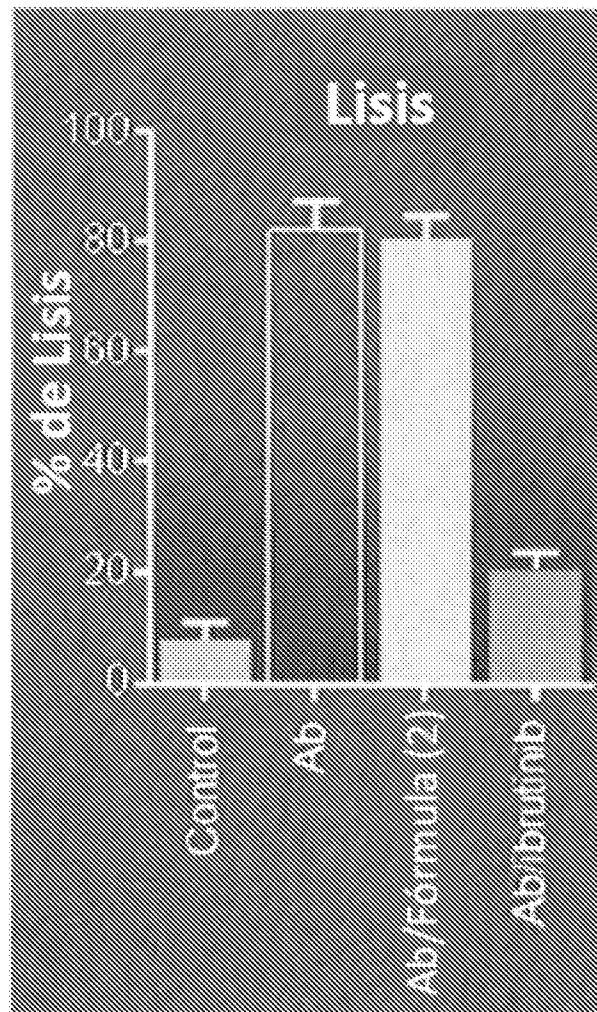


Figura 13

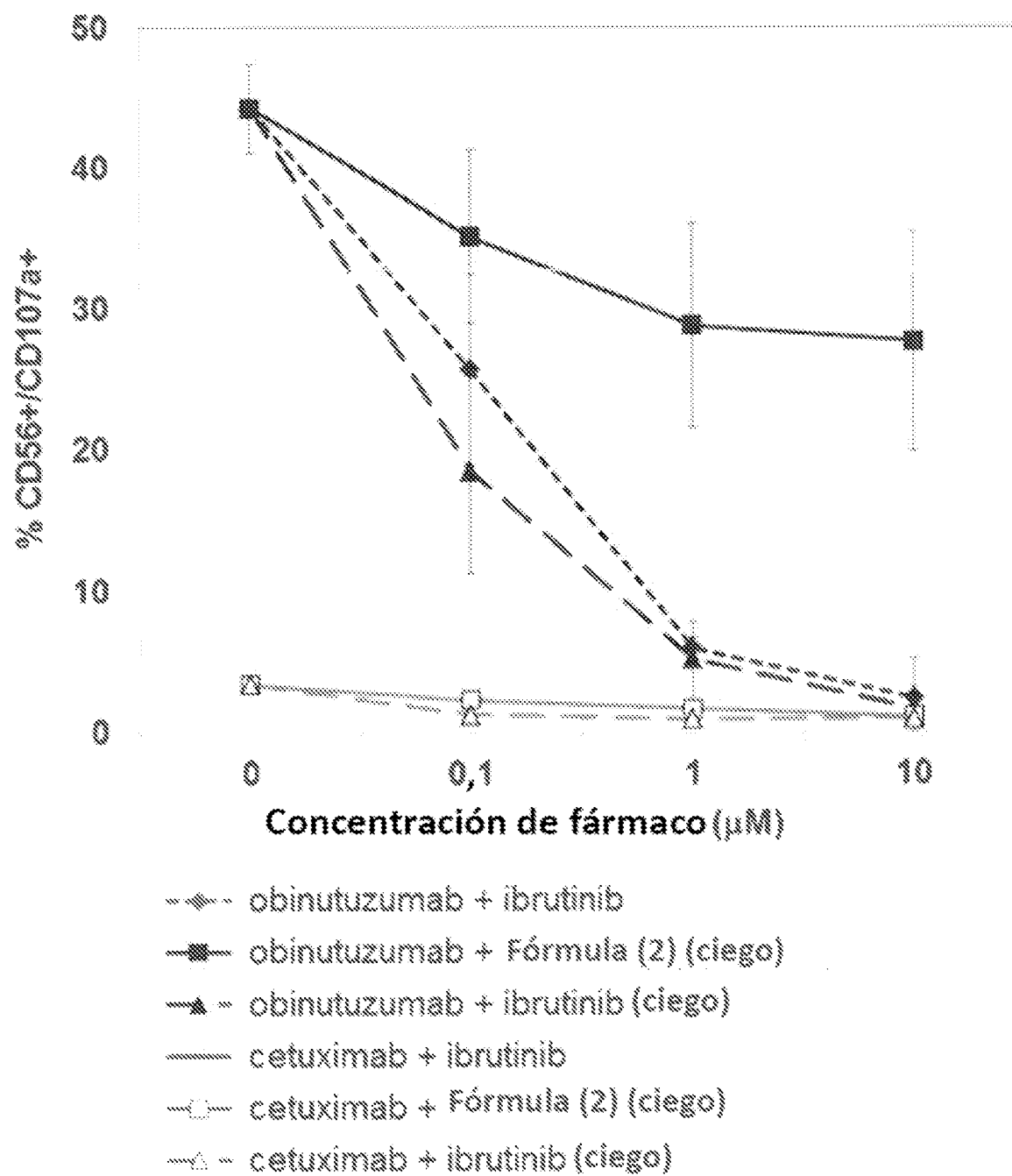


Figura 14

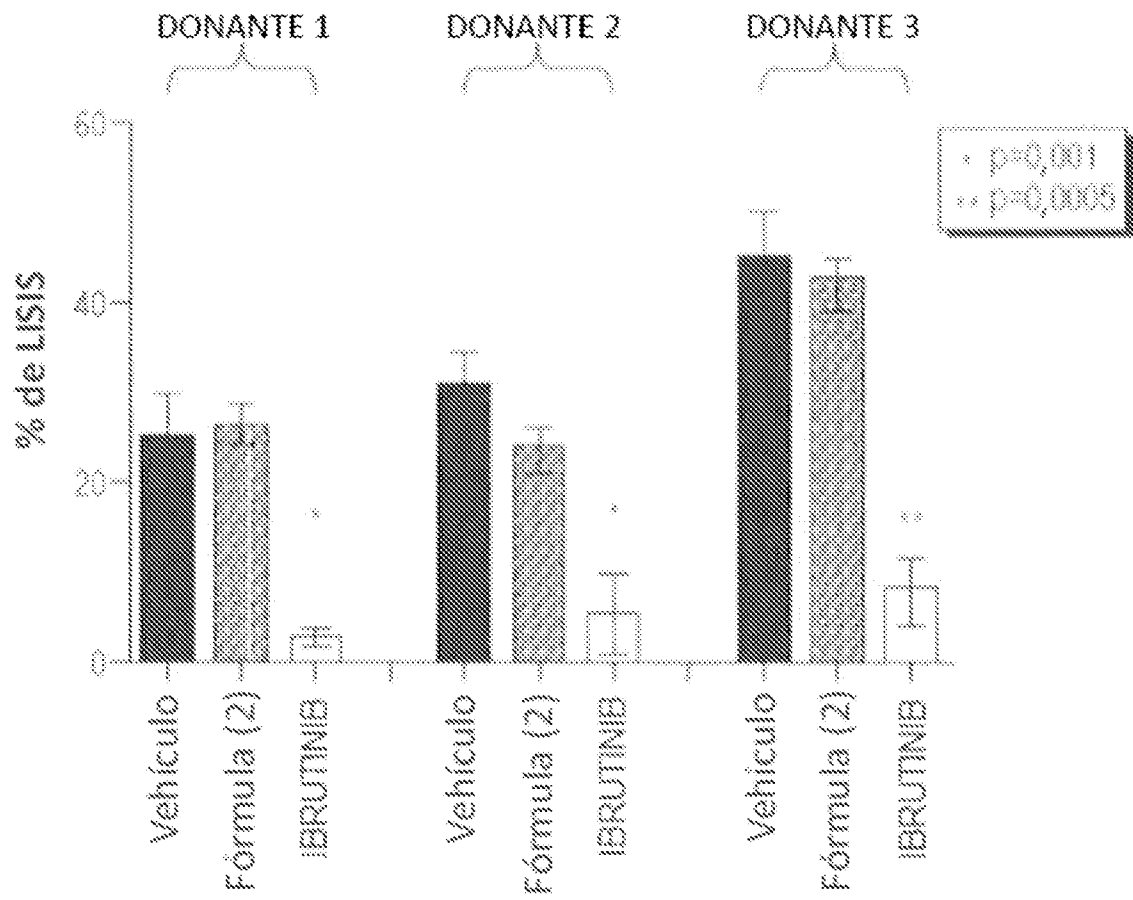


Figura 15

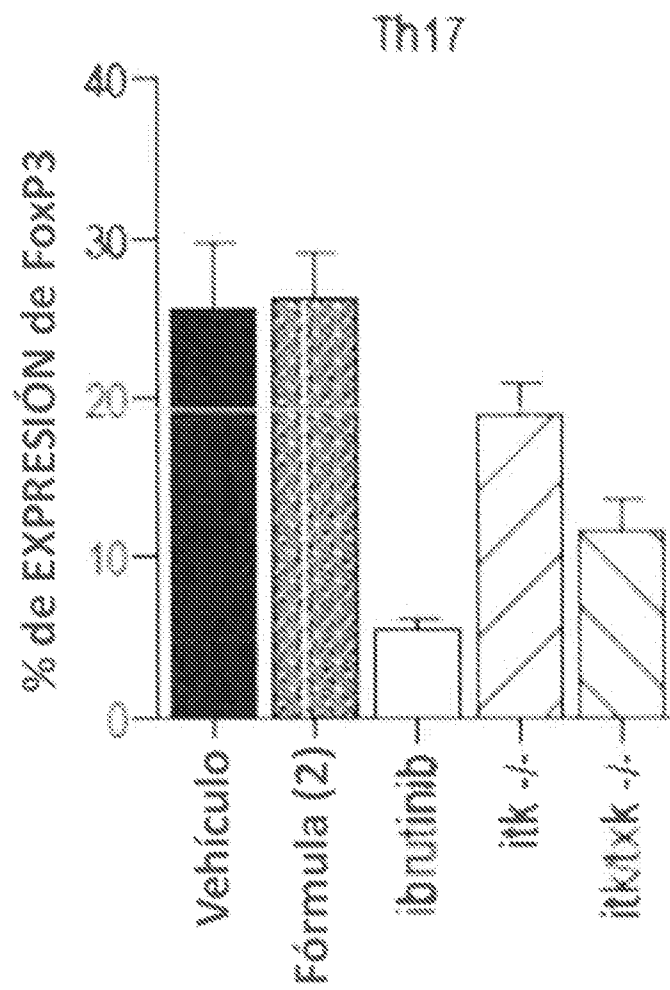


Figura 16

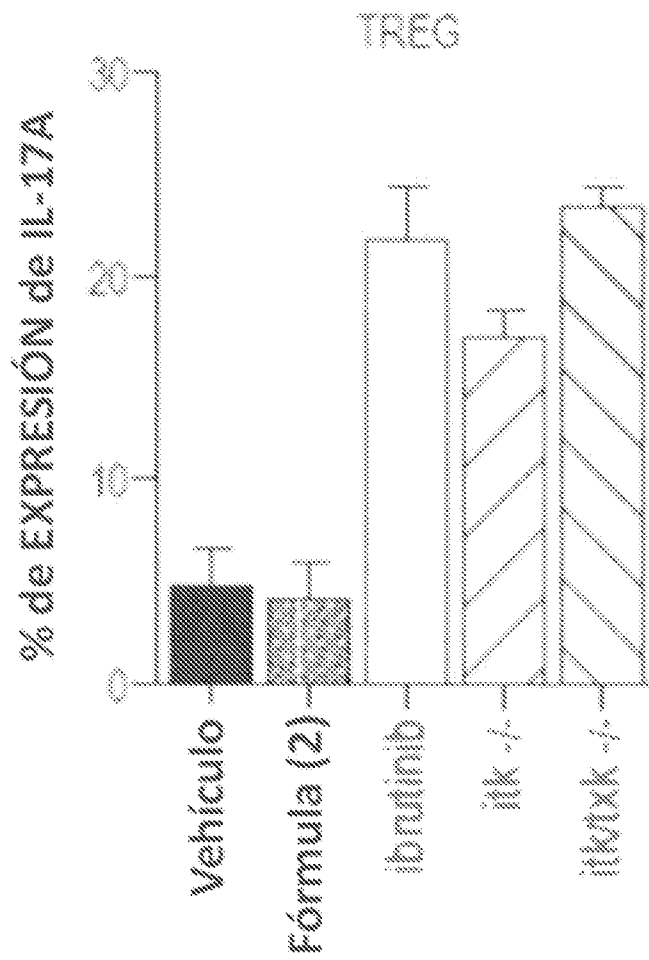


Figura 17

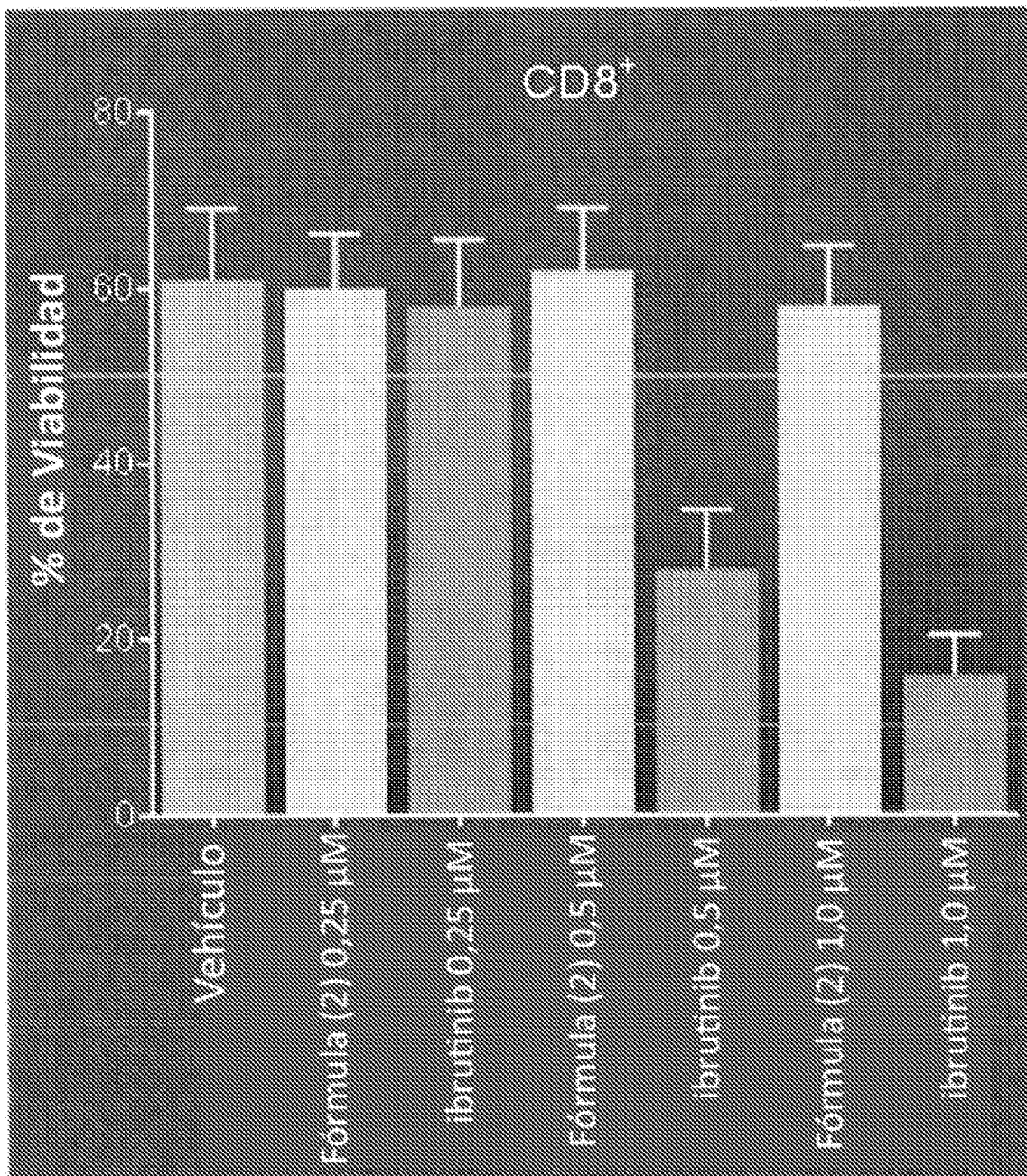


Figura 18

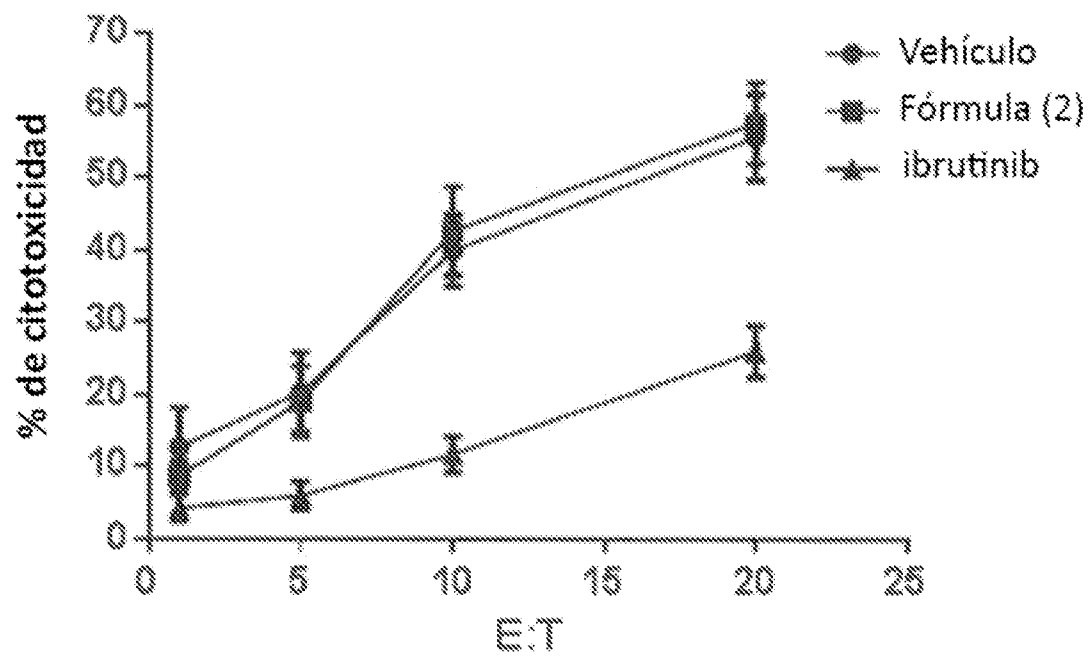


Figura 19

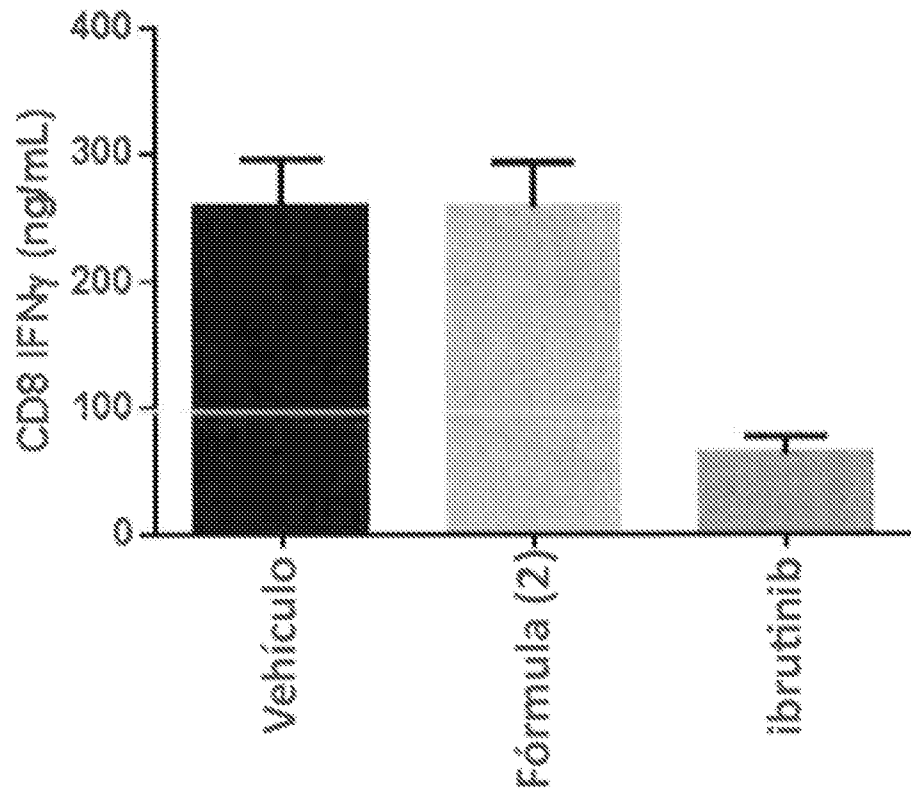


Figura 20

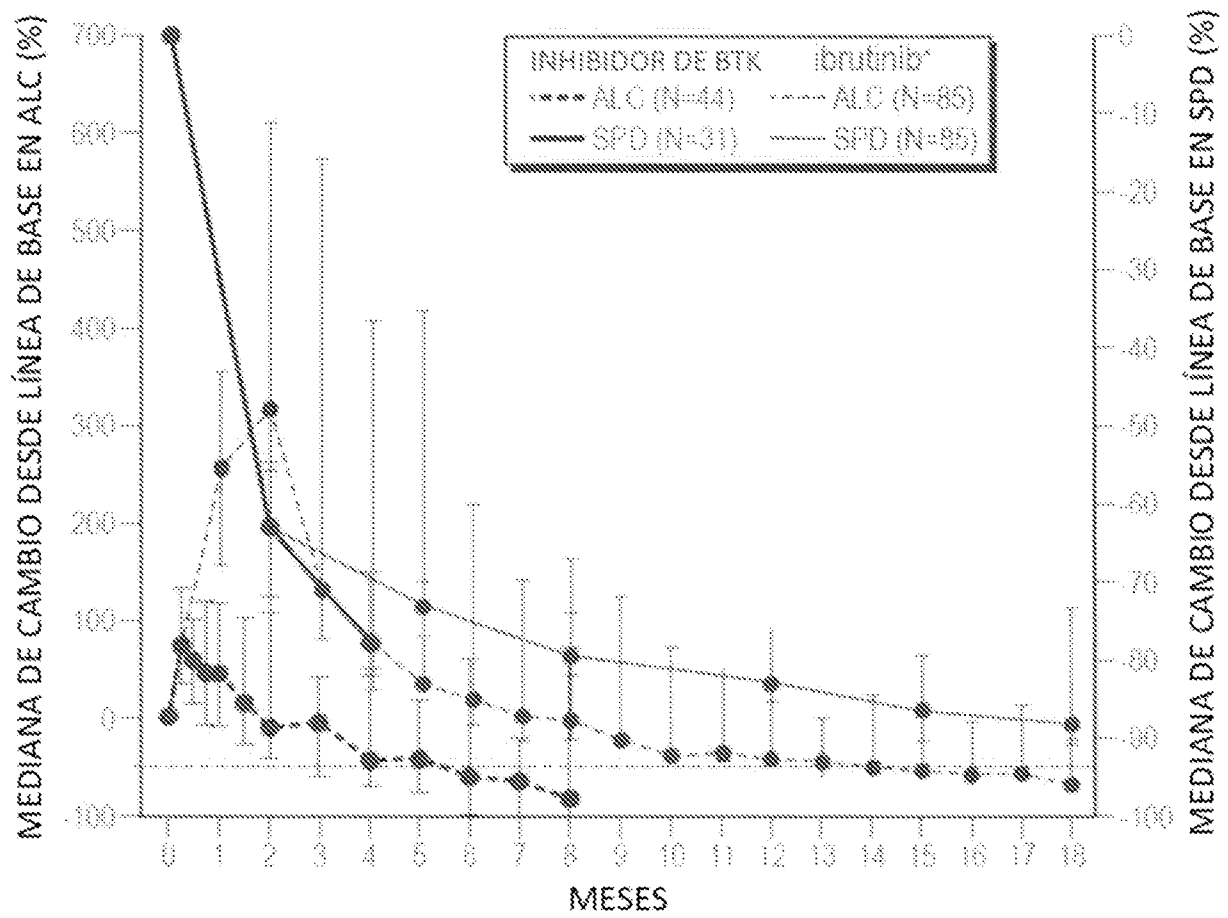


Figura 21

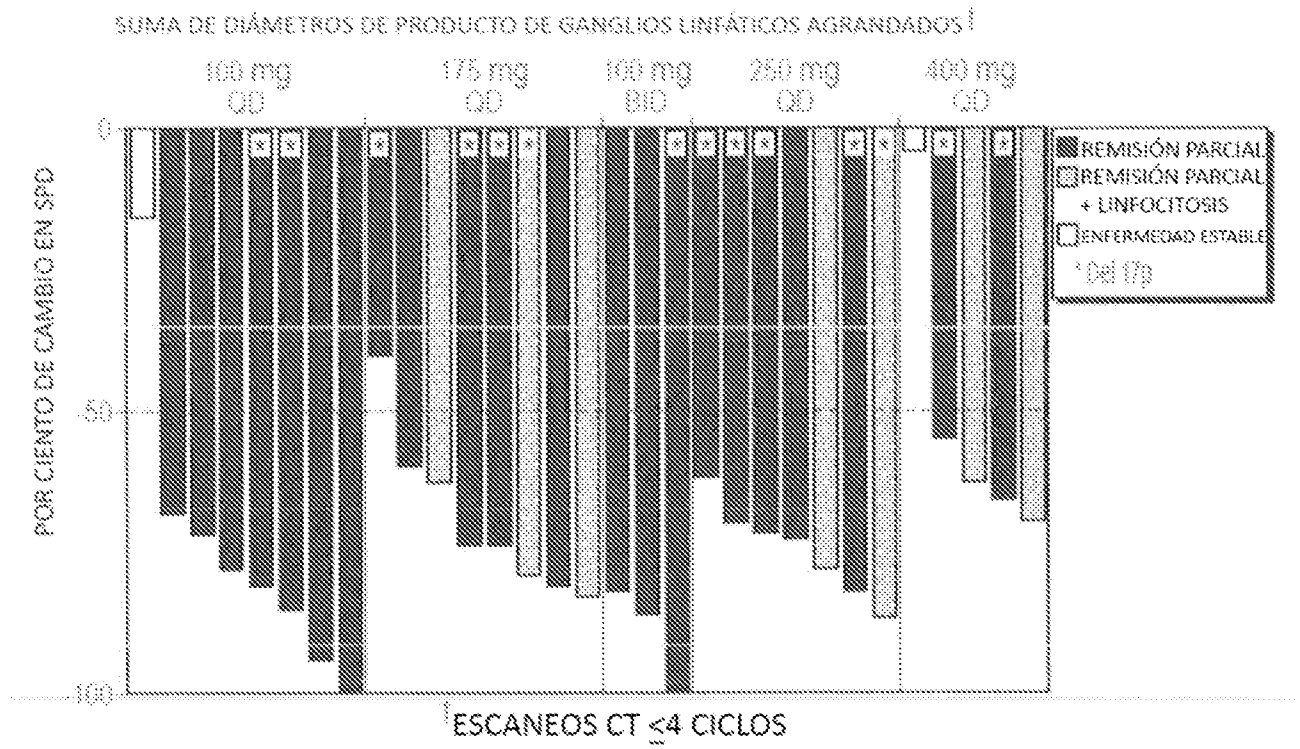


Figura 22

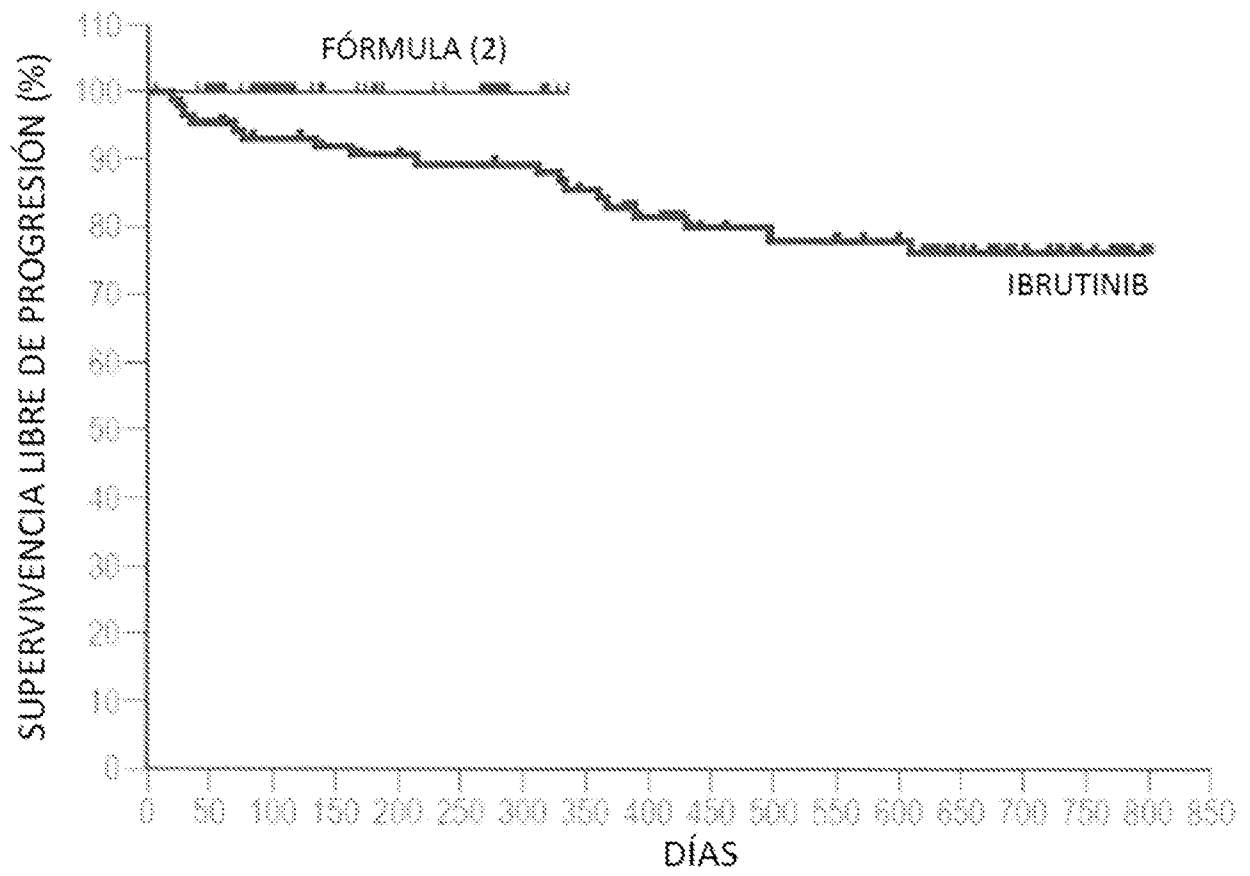


Figura 23

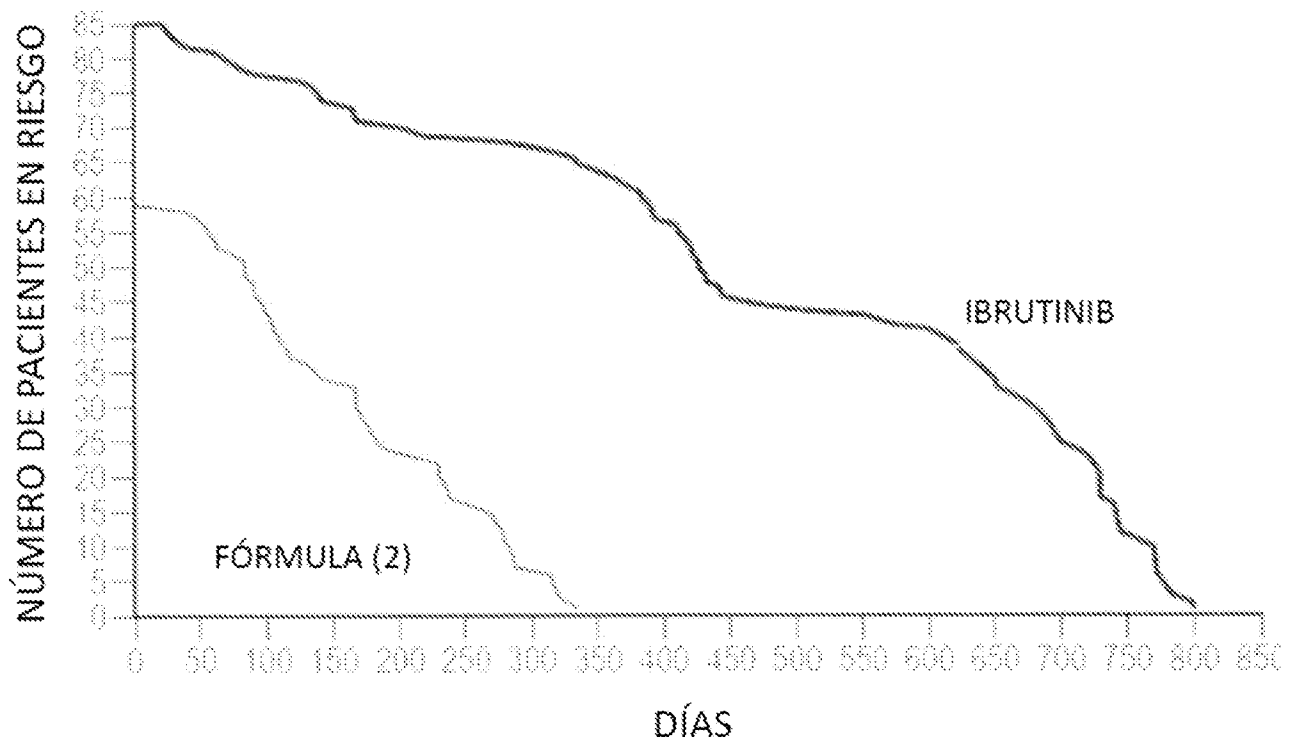


Figura 24

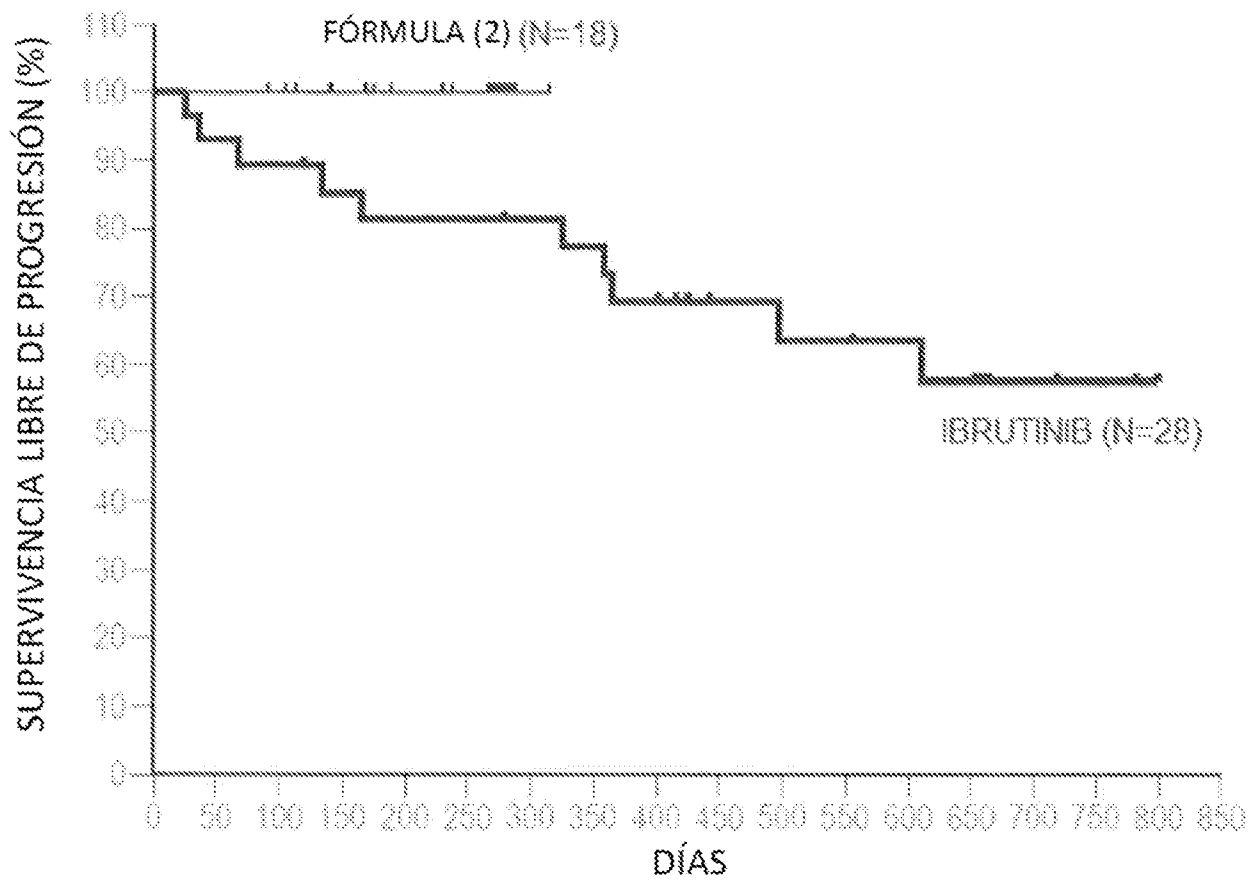


Figura 25

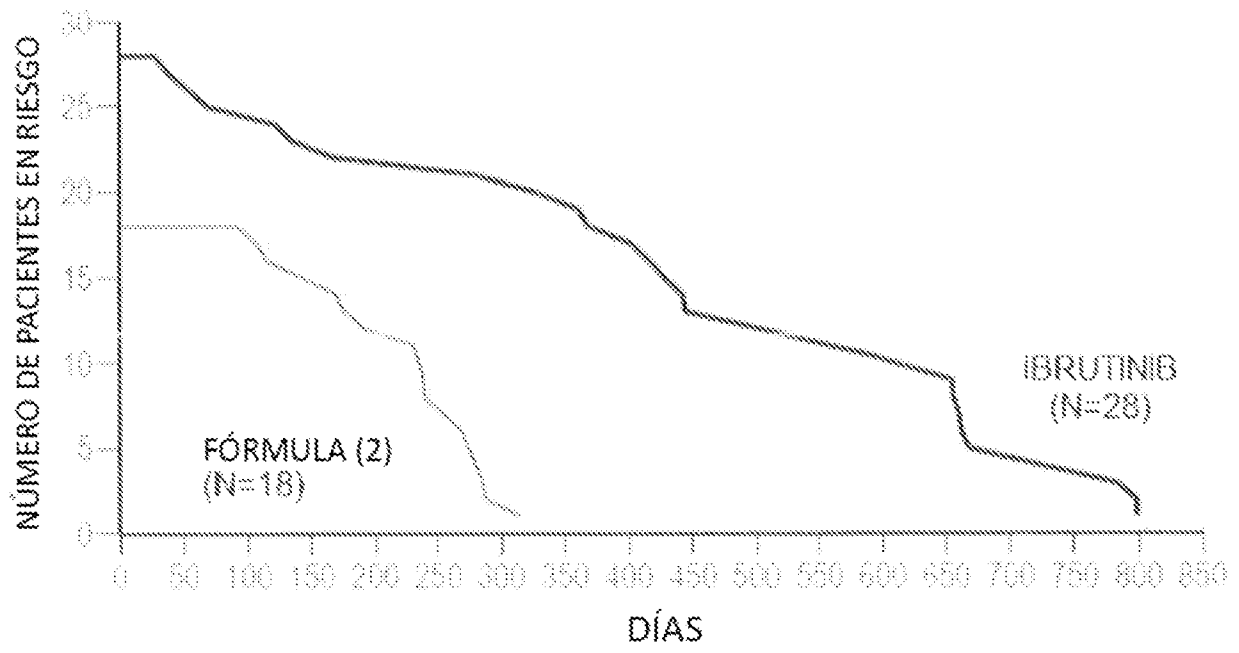


Figura 26

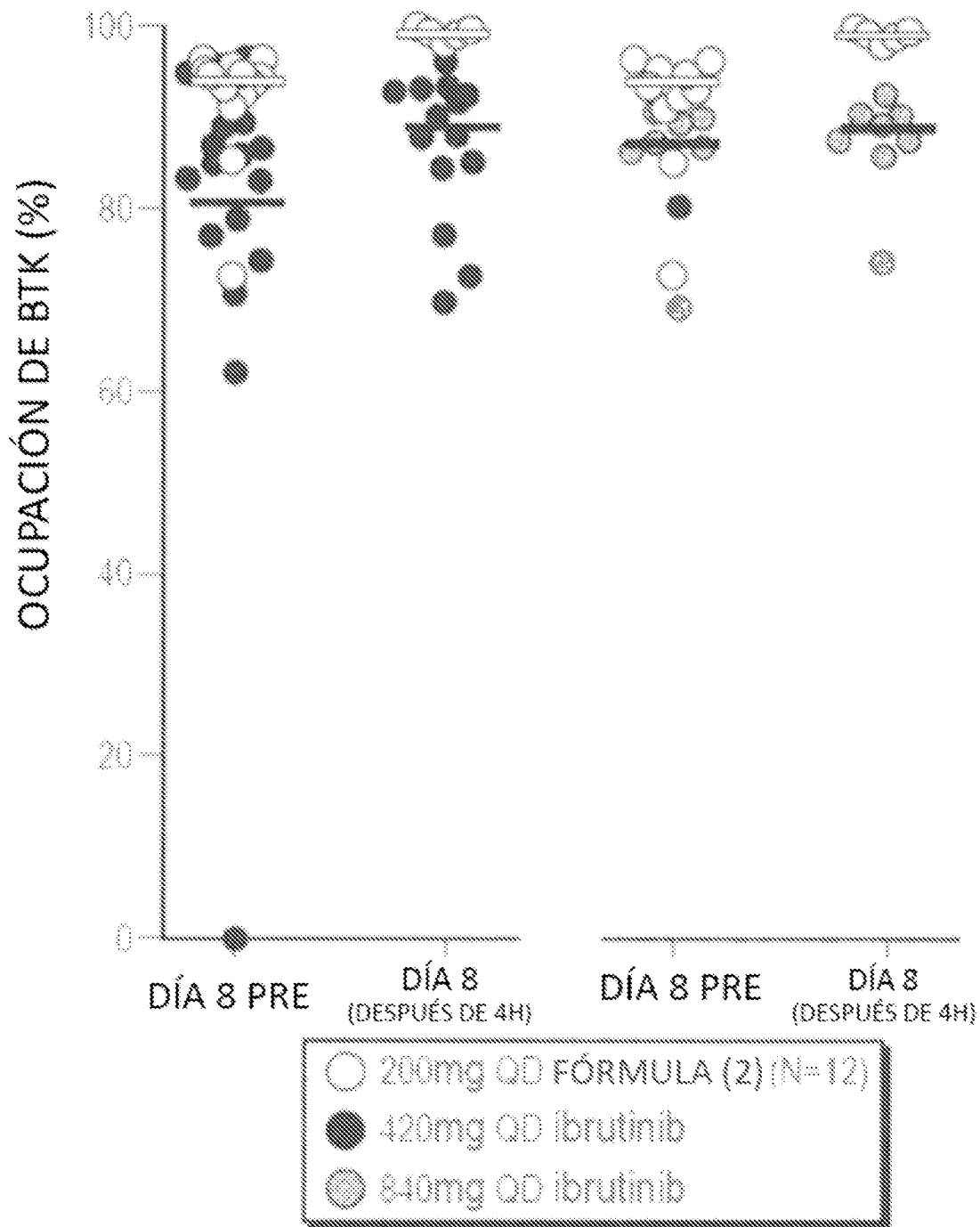


Figura 27

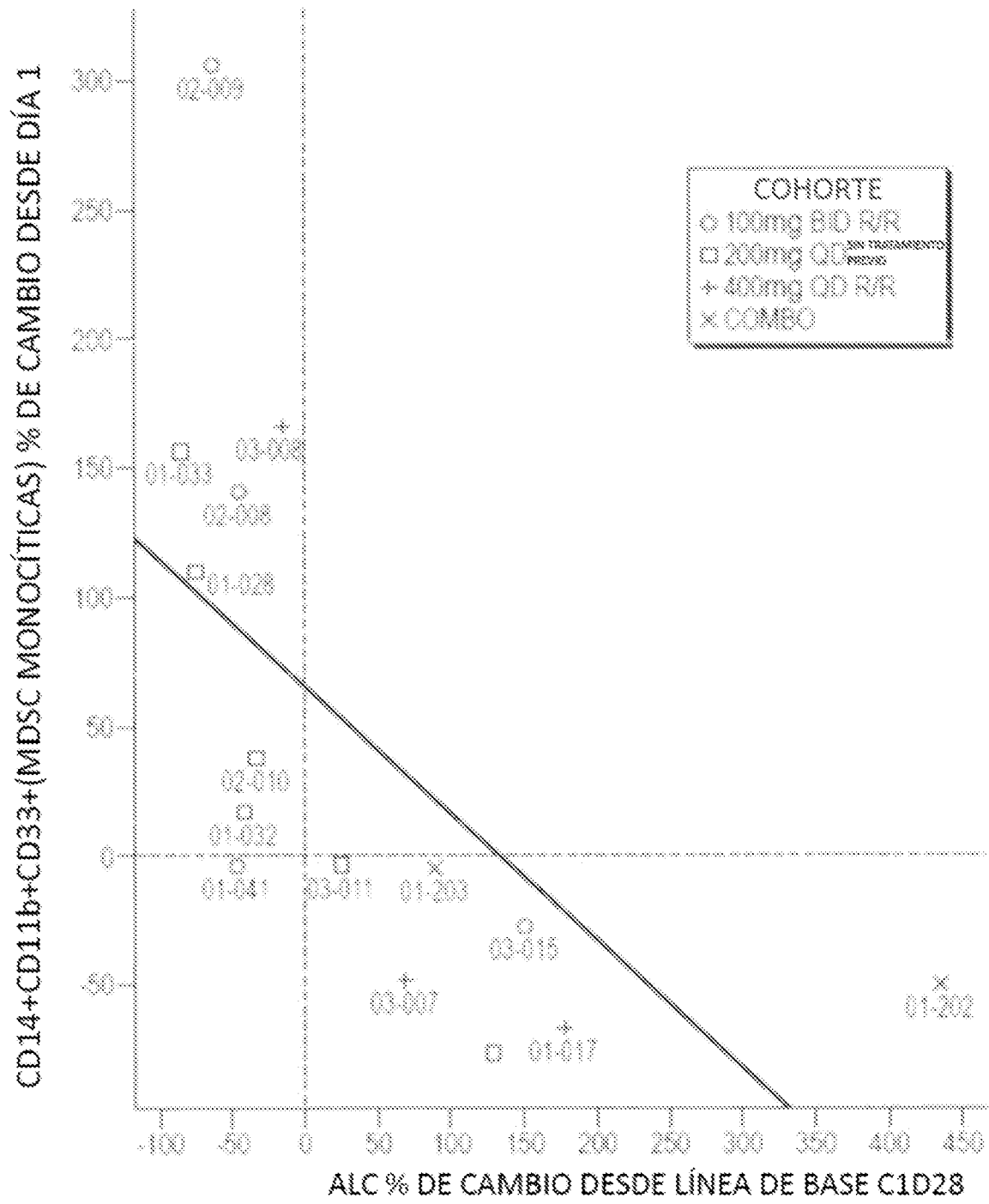


Figura 28

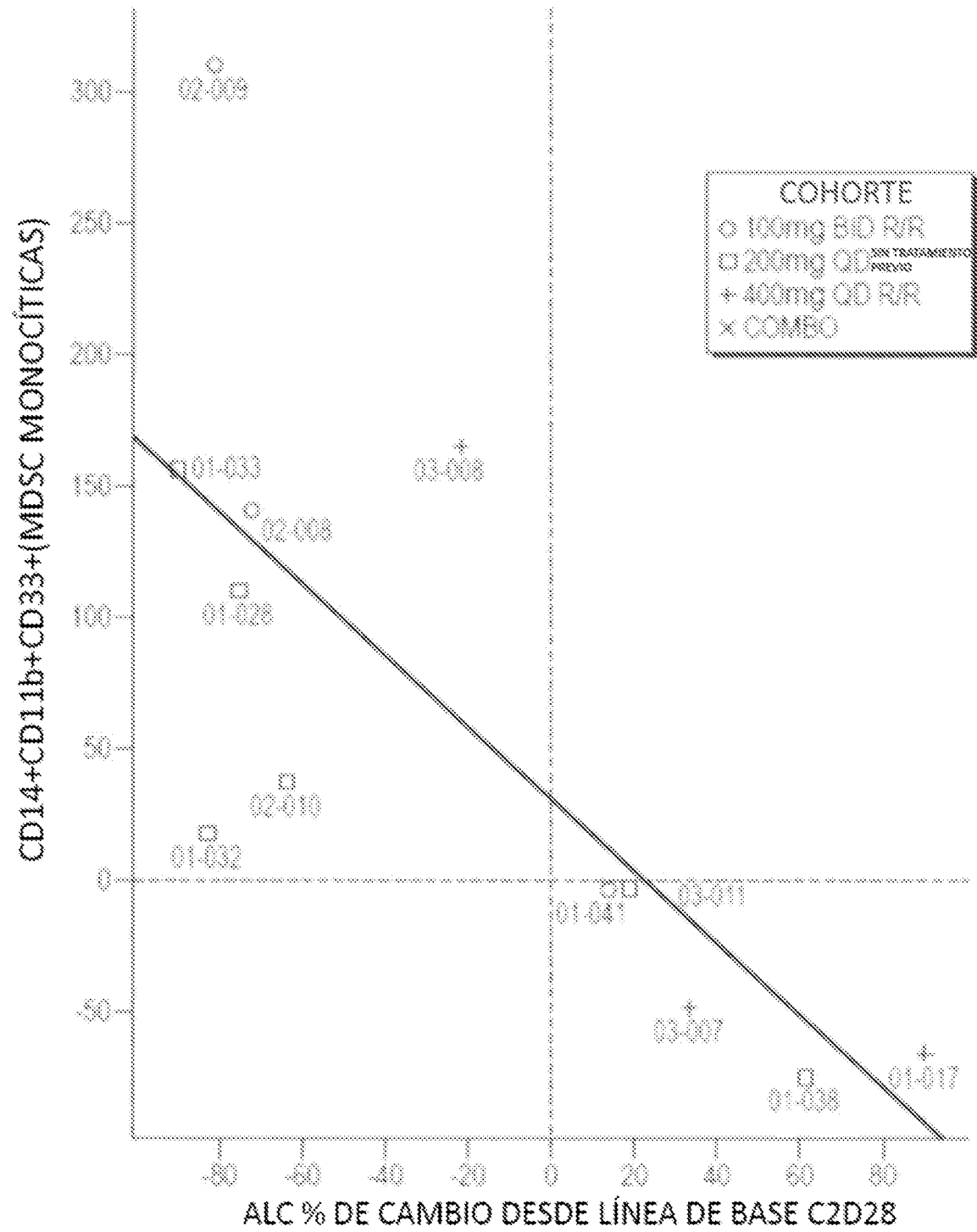


Figura 29

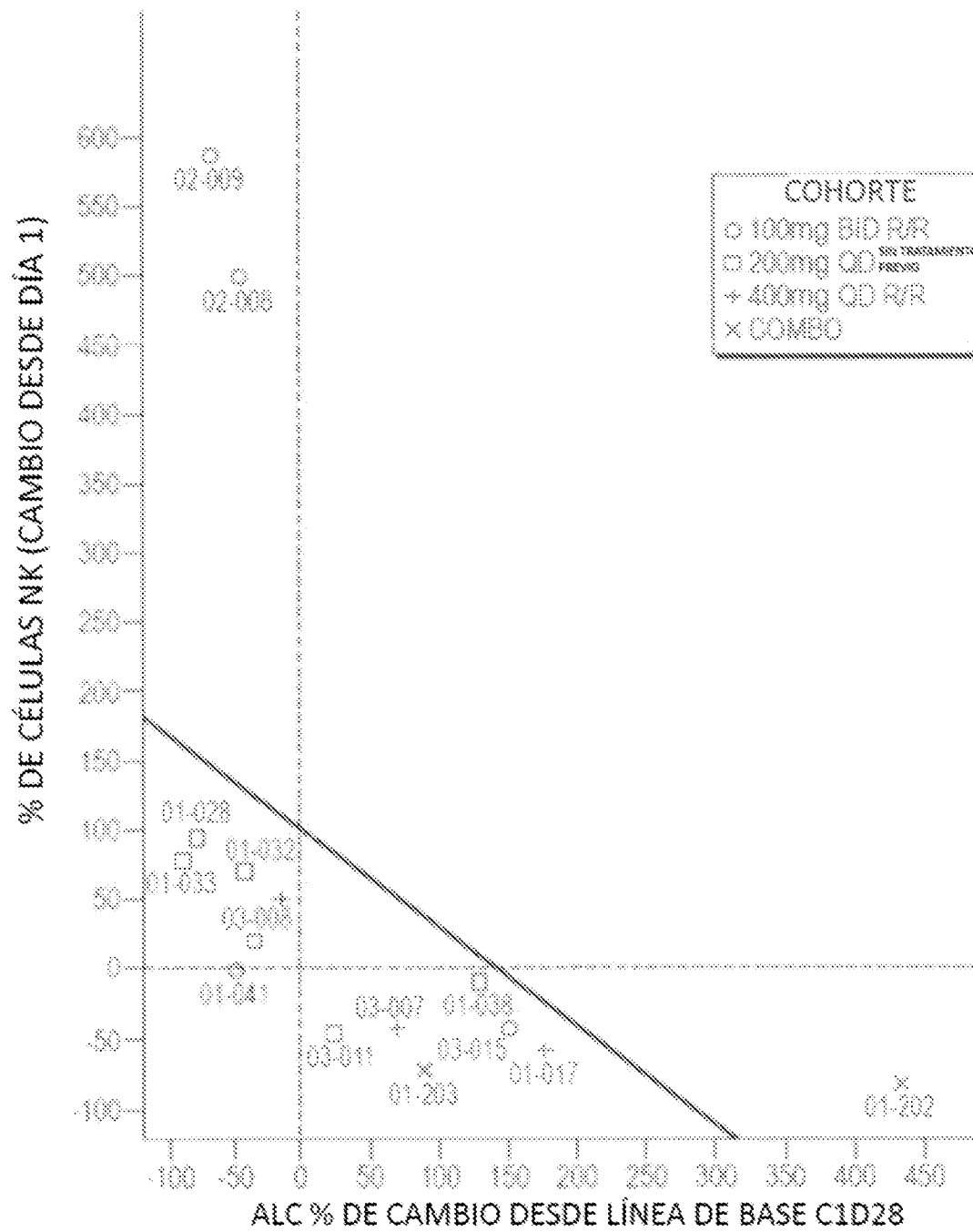


Figura 30

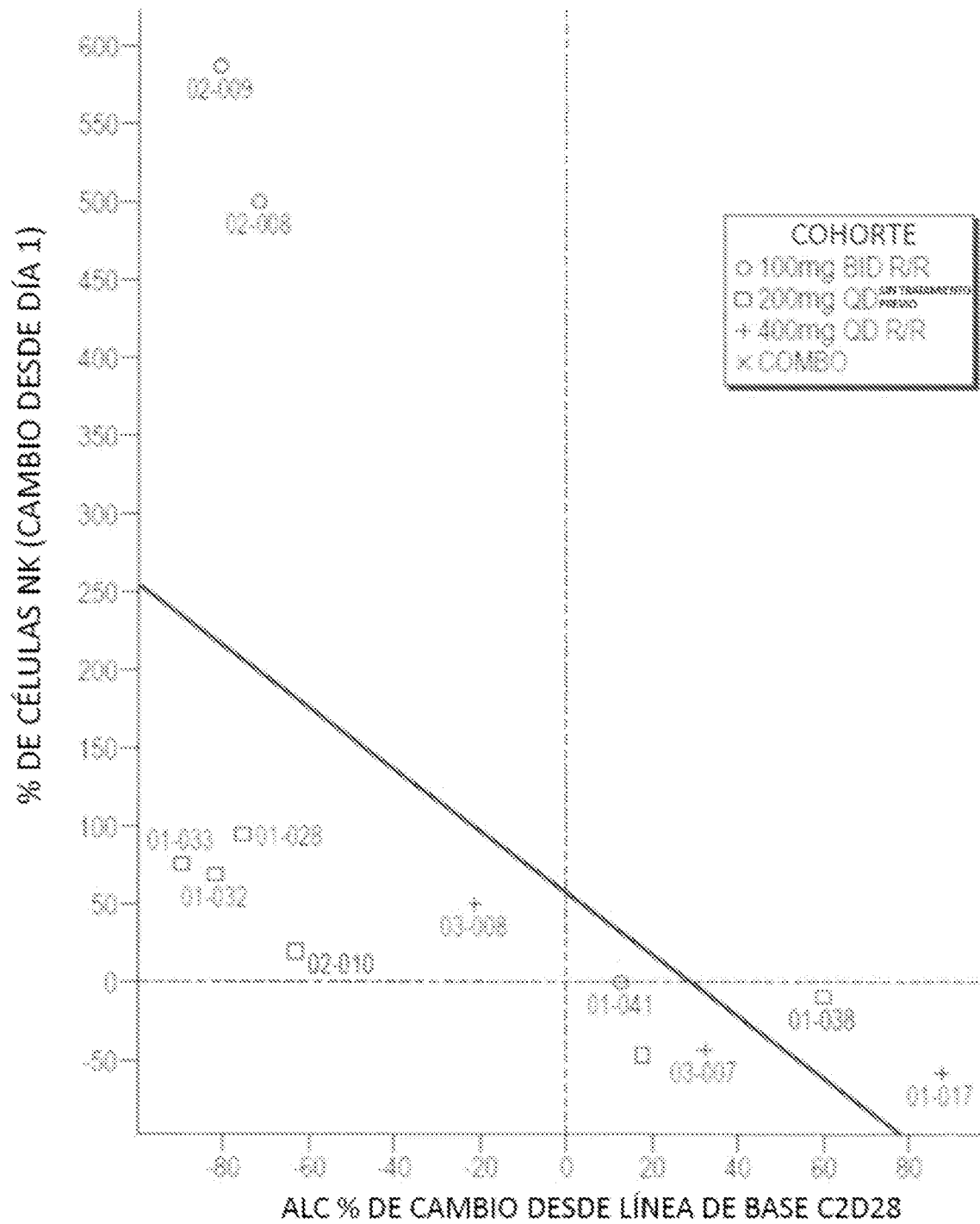


Figura 31

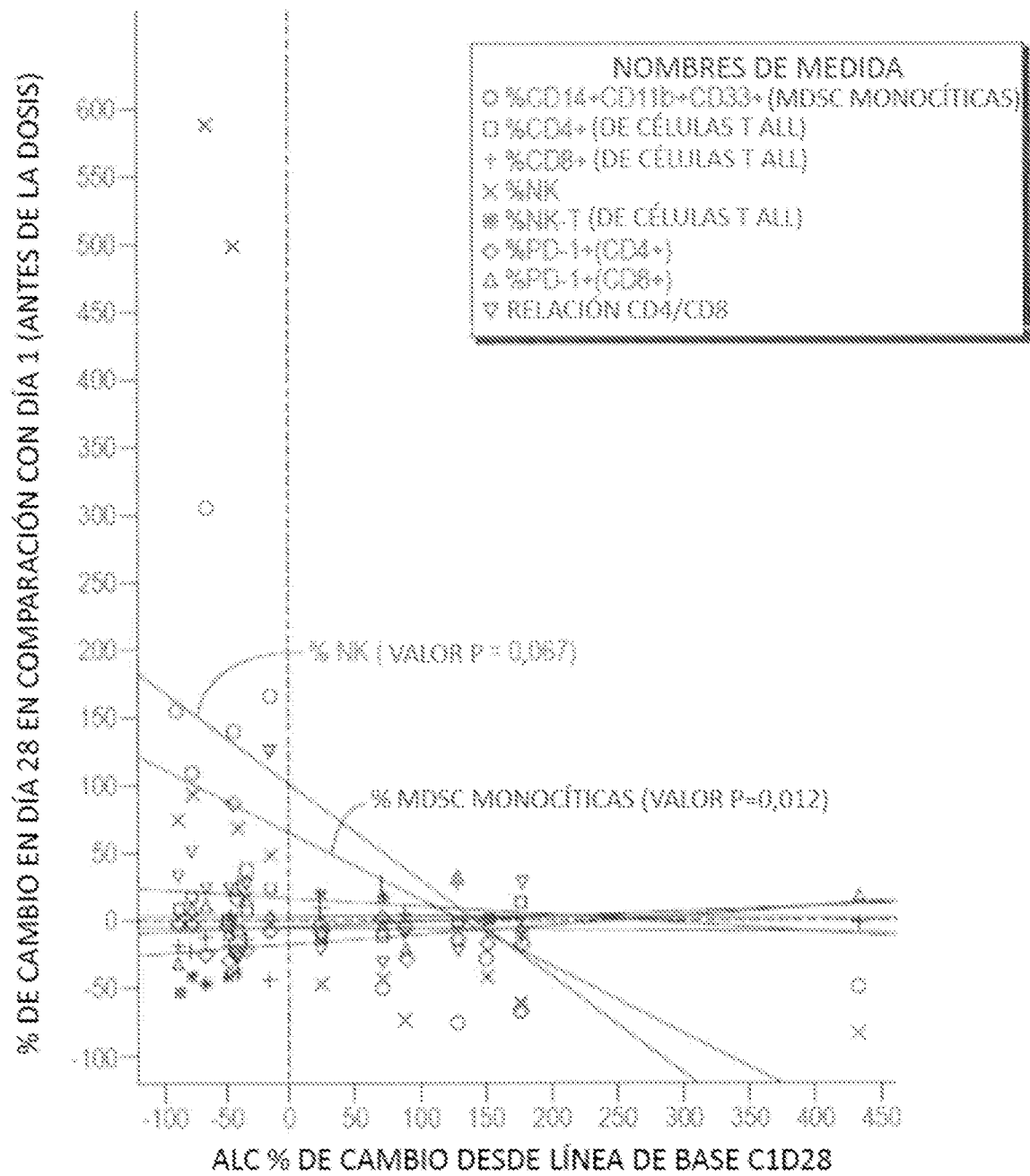


Figura 32

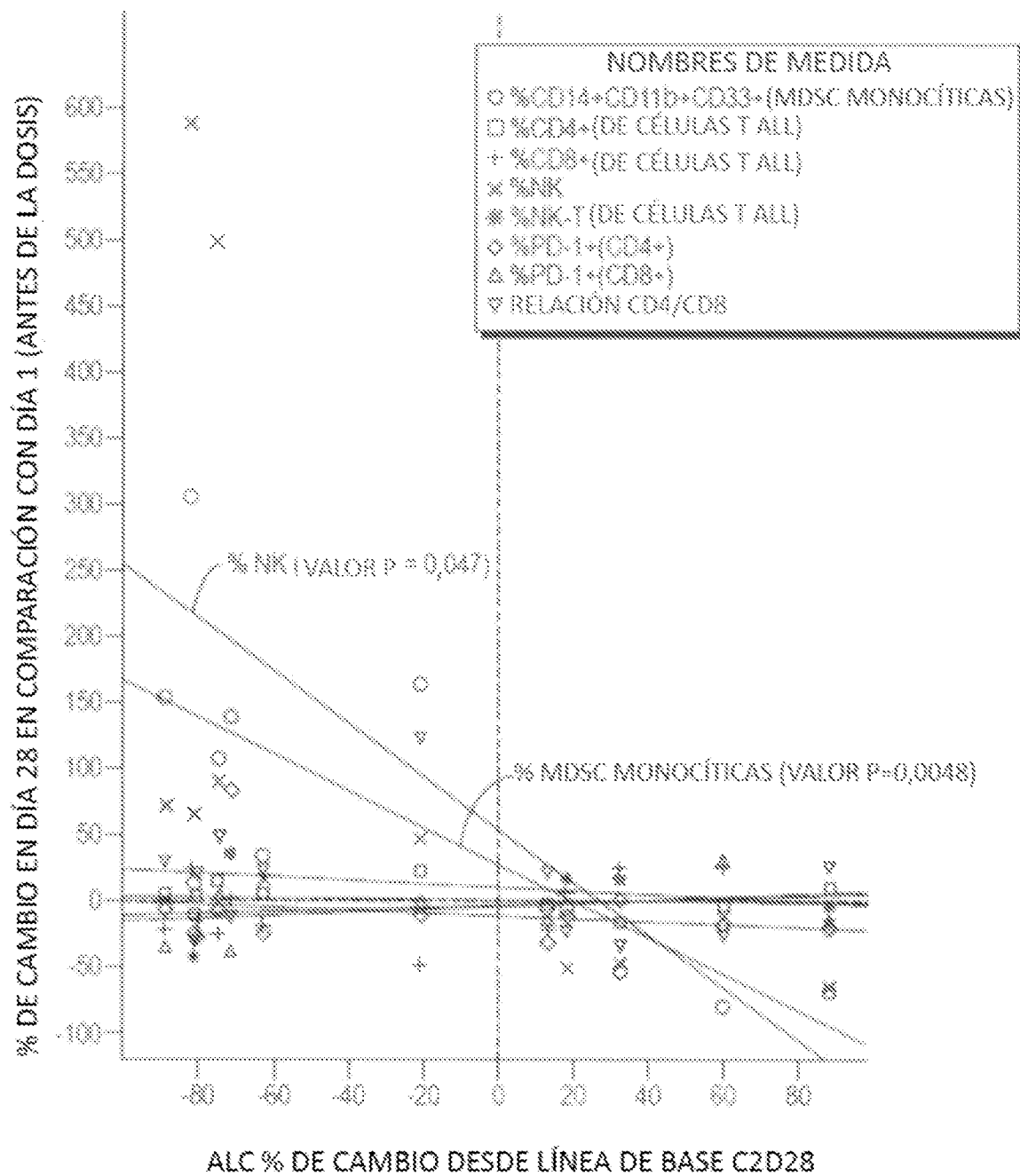


Figura 33

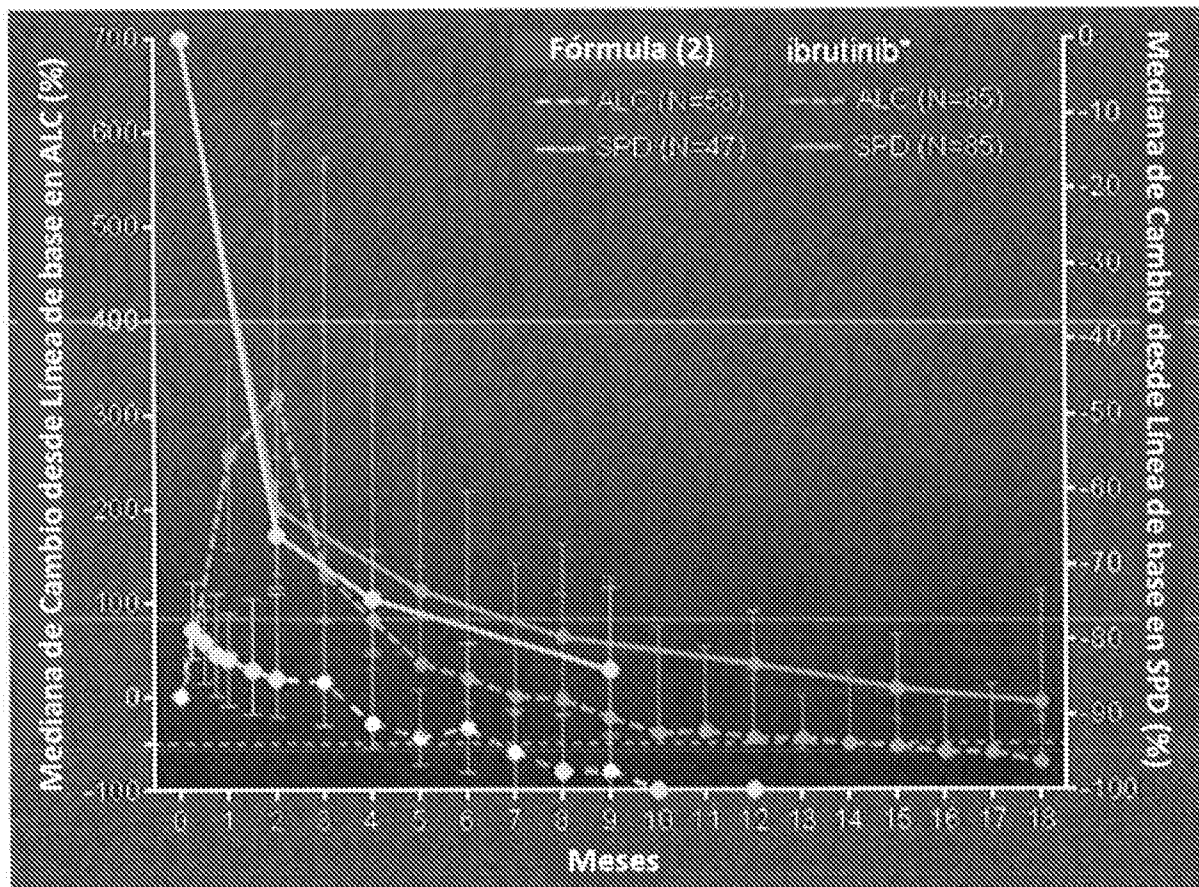


Figura 34

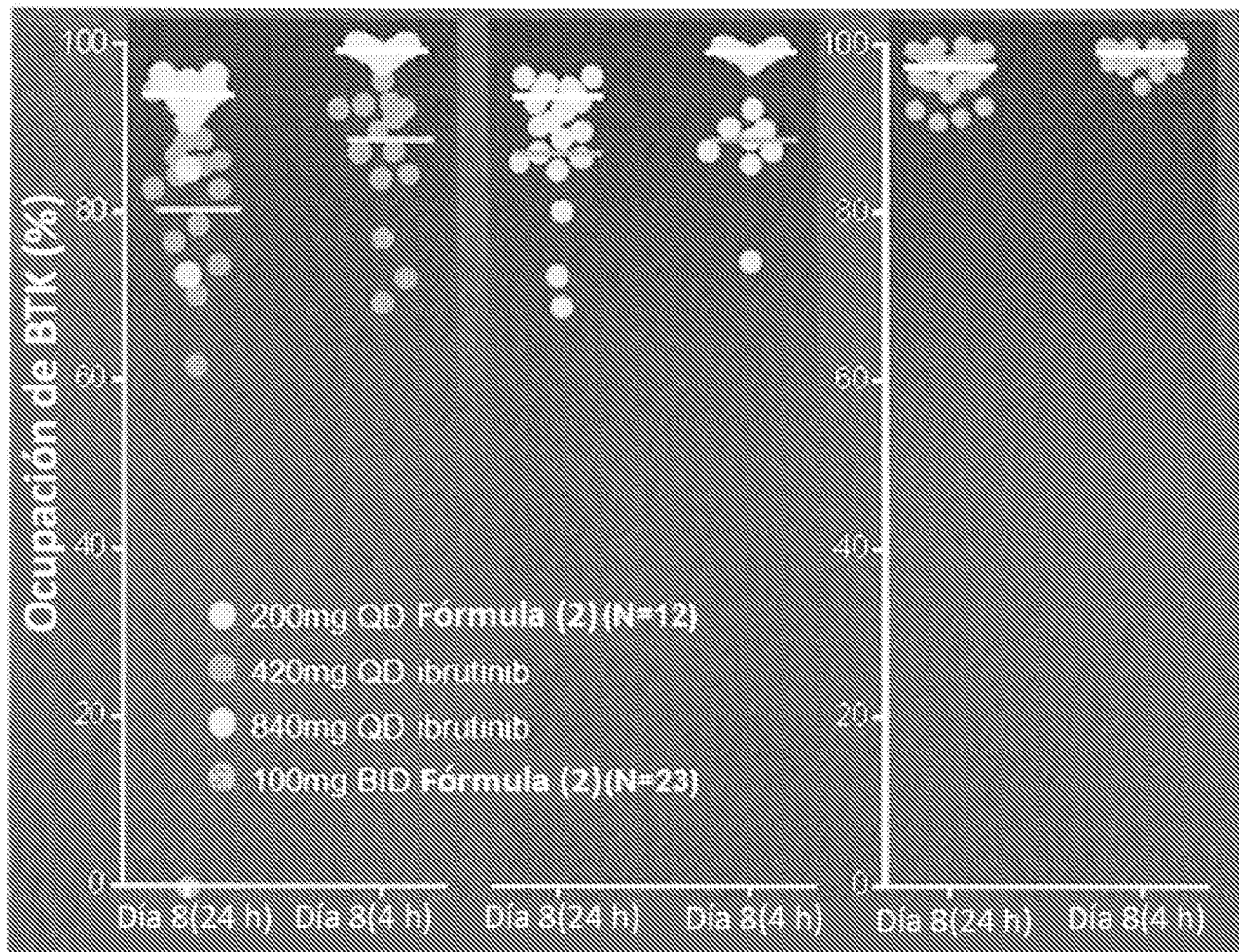
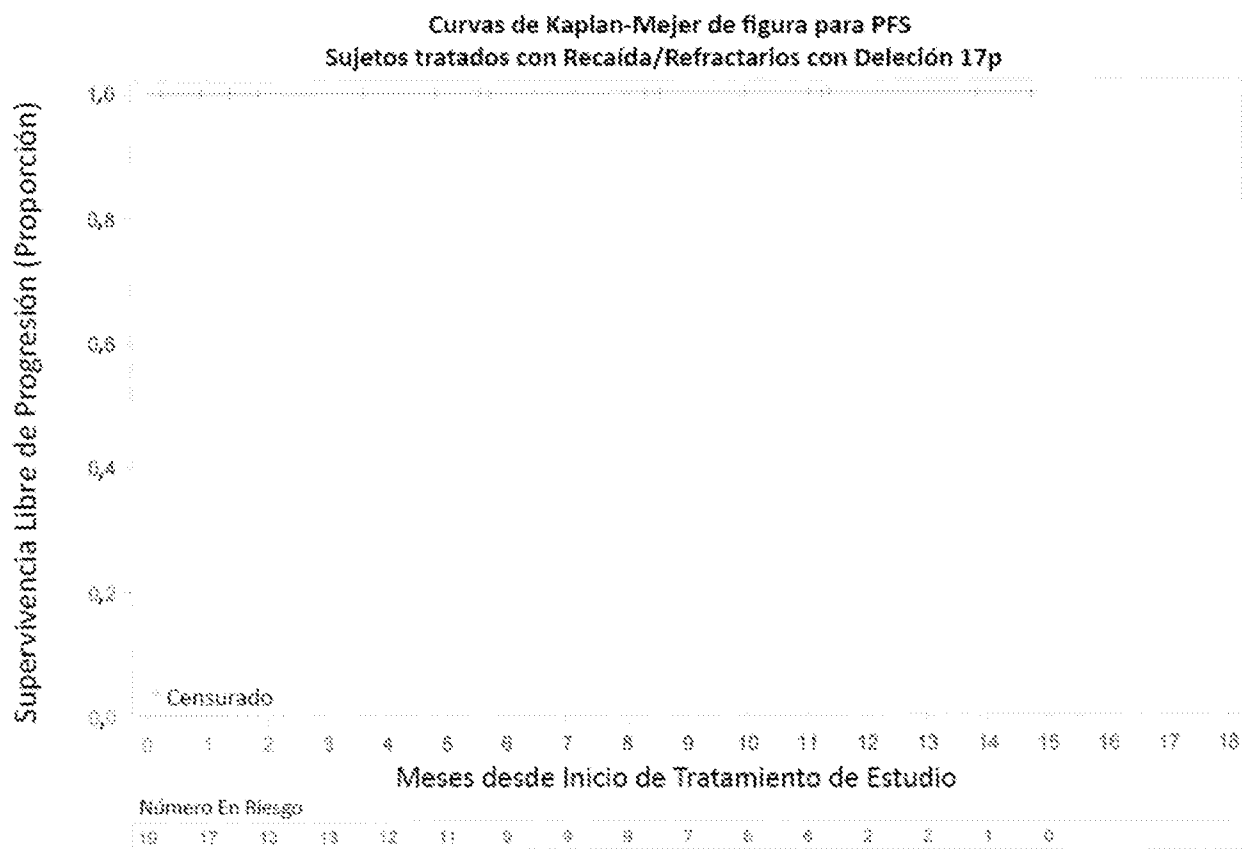


Figura 35



Nota: Esta figura incluye cohortes con Recaída/Refractarias 1, 2a/2b/2c, 3 y 4a/4b.

Figura 36

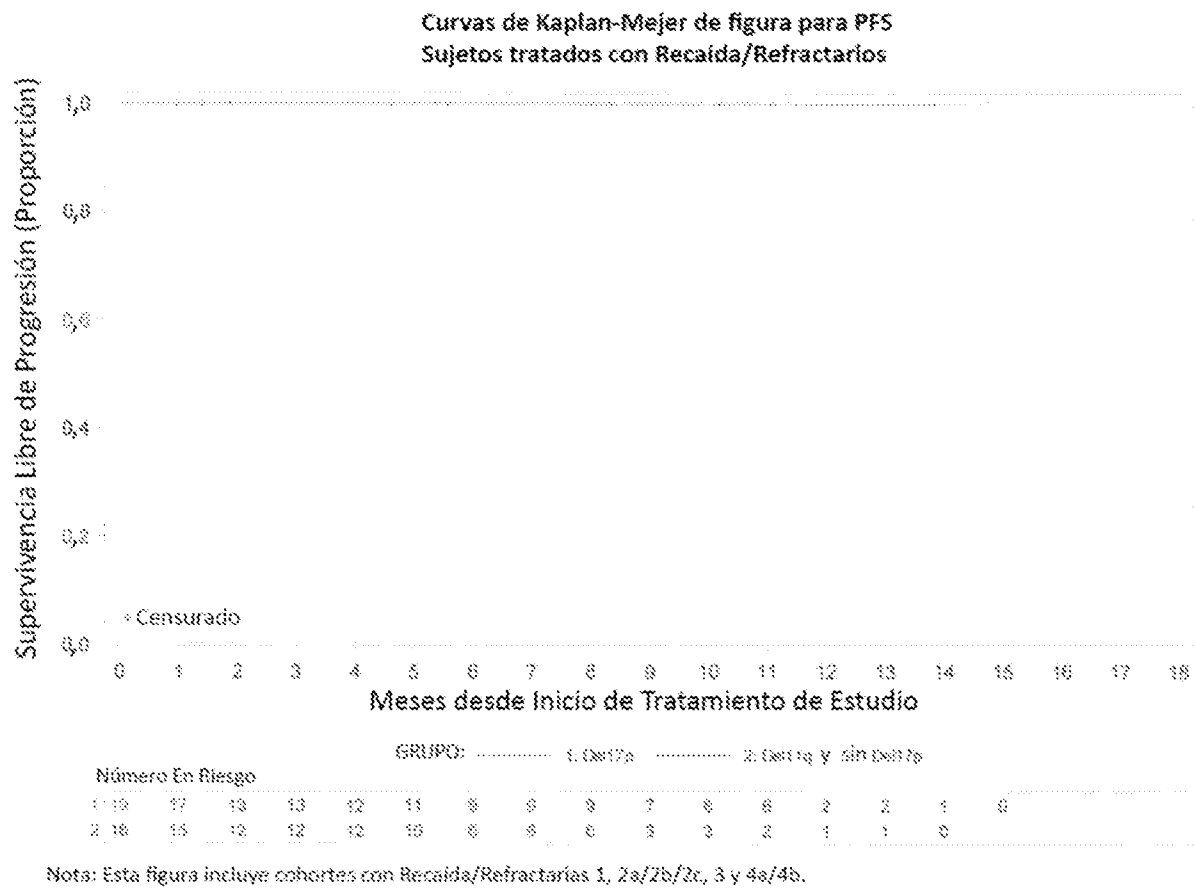
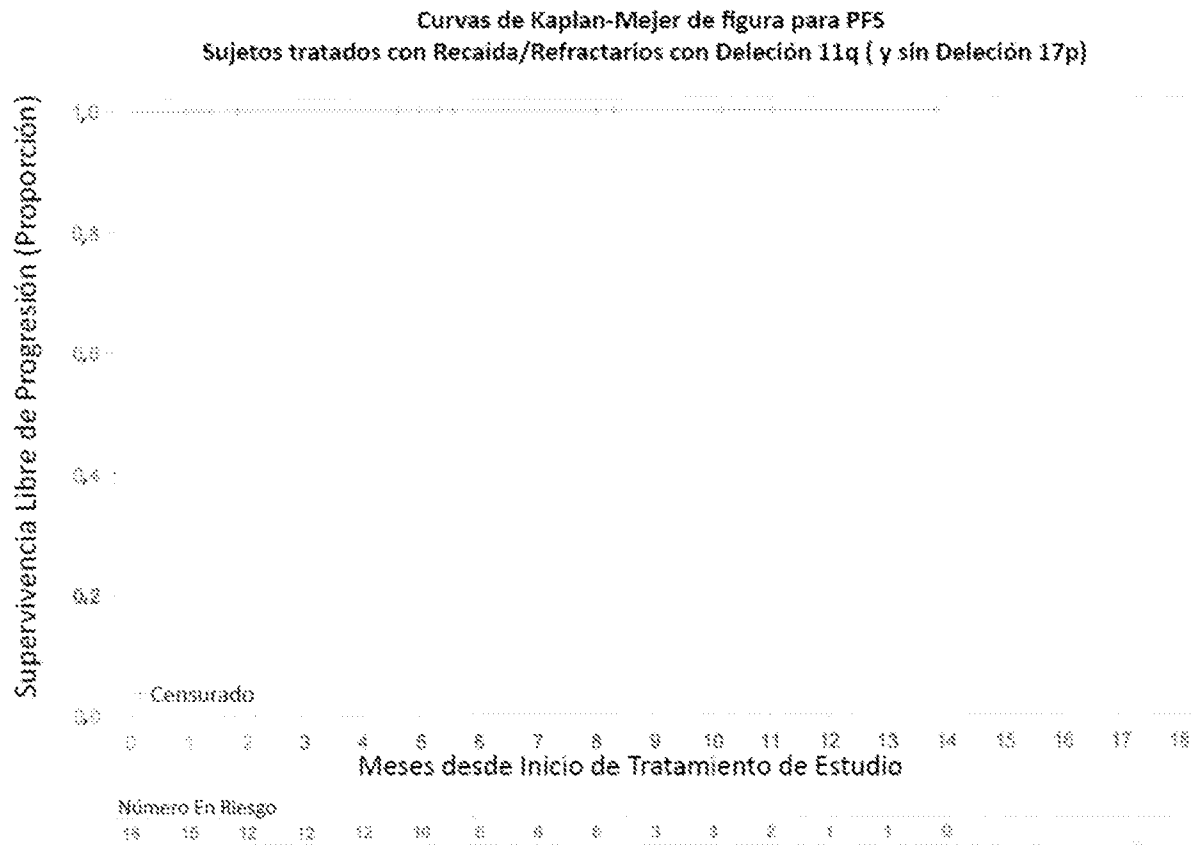
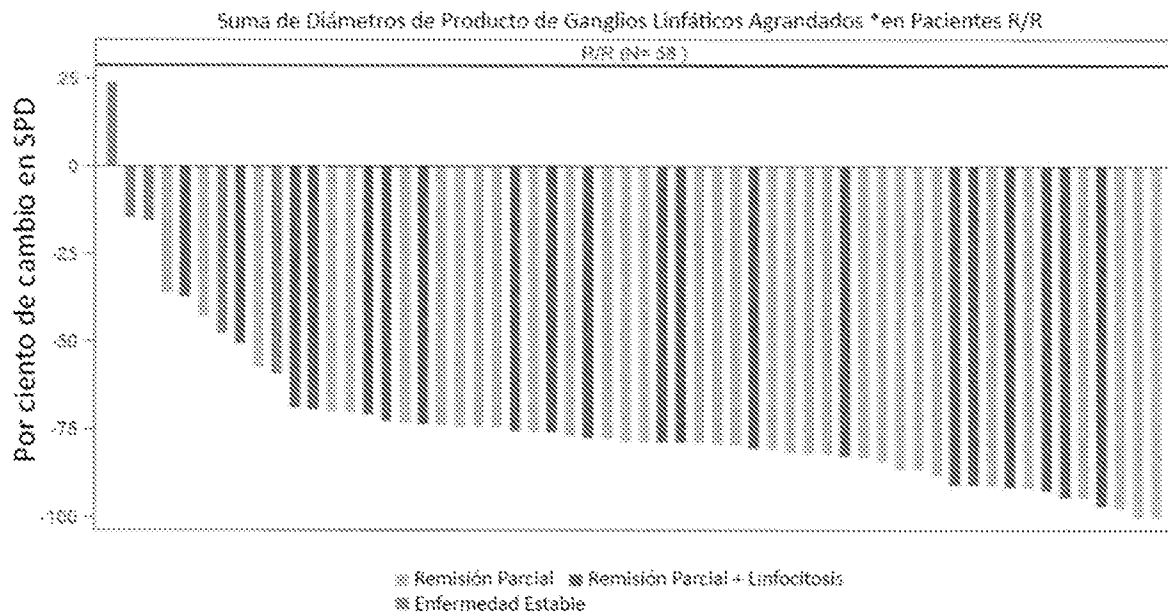


Figura 37



Nota: Esta figura incluye cohortes con Recaída/Refractarias 1, 2a/2b/2c, 3 y 4a/4b.

Figura 38



*Cualquier ganglio con un diámetro > 1,5 cm.

N son sujetos con Linfadenopatía observada y datos de respuesta total.

Sujetos con respuesta total pero sin Linfadenopatía observada, 01-025 = PR, 06-002 = PR, 06-003 = PR, 03-015 = PRL, 05-001 = PRL, 05-002 = PRL, 25-001 = PRL, 01-026 = SD, 01-035 = SD, 06-004 = SD

Figura 39

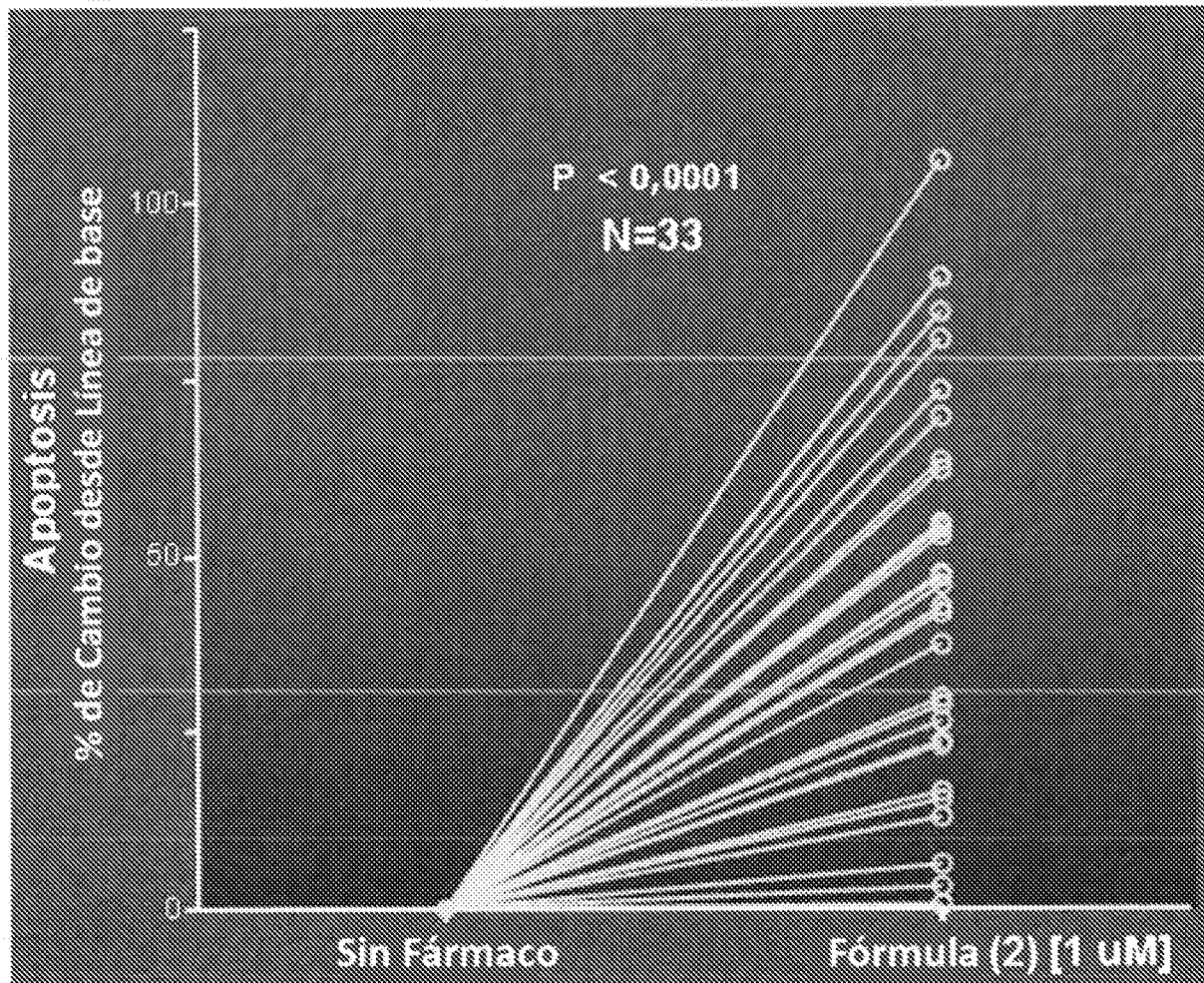


Figura 40

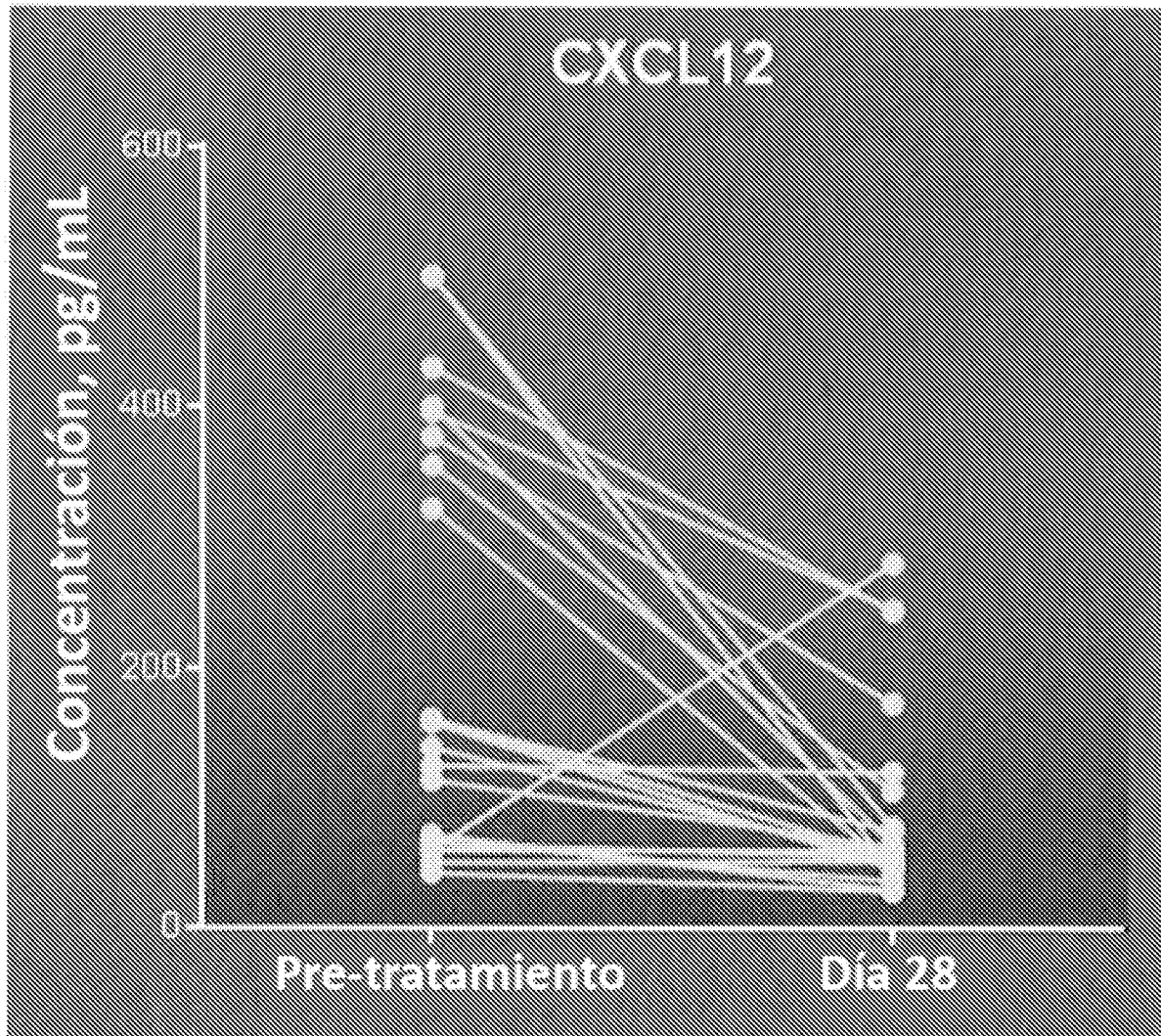


Figura 41

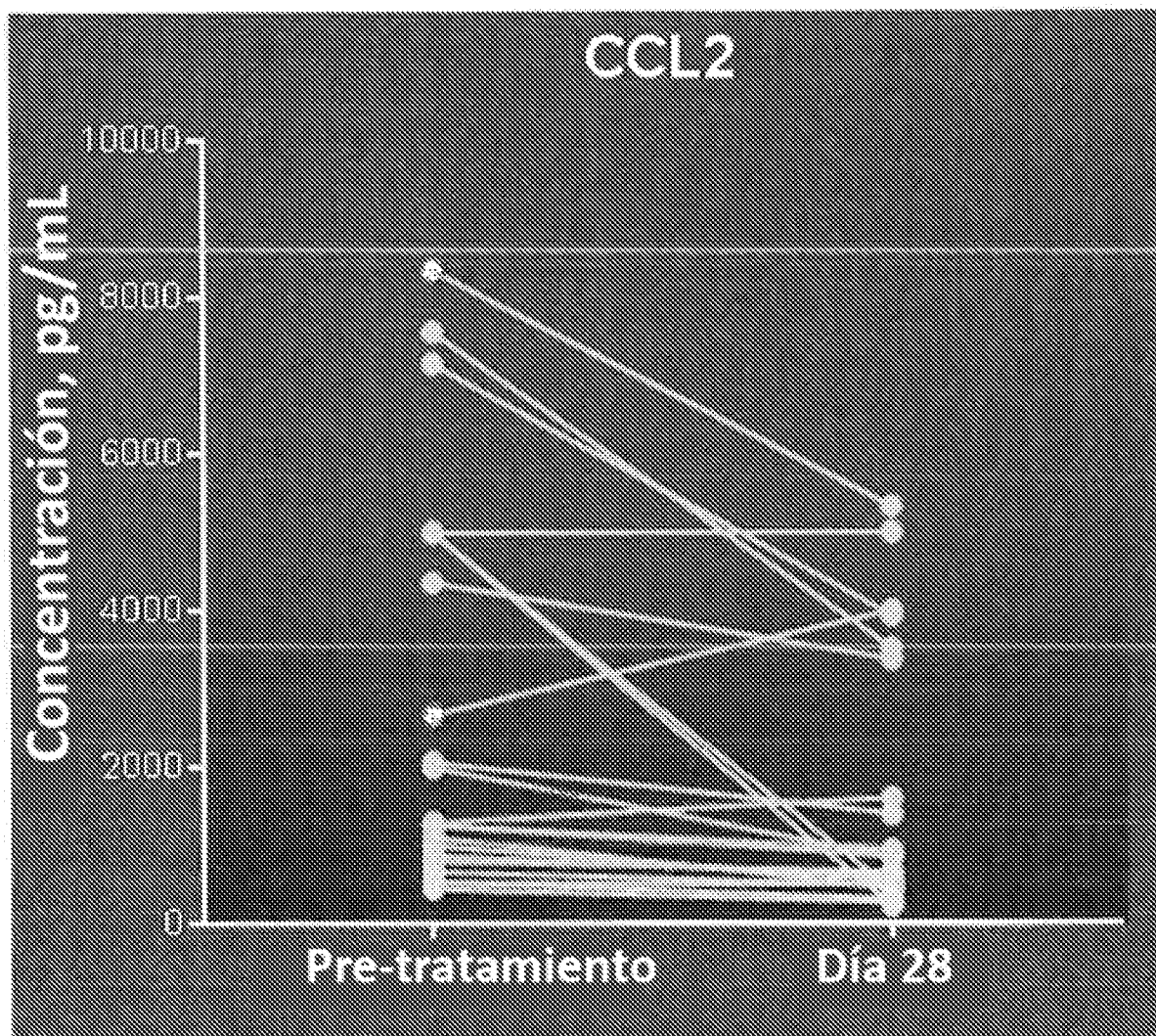


Figura 42

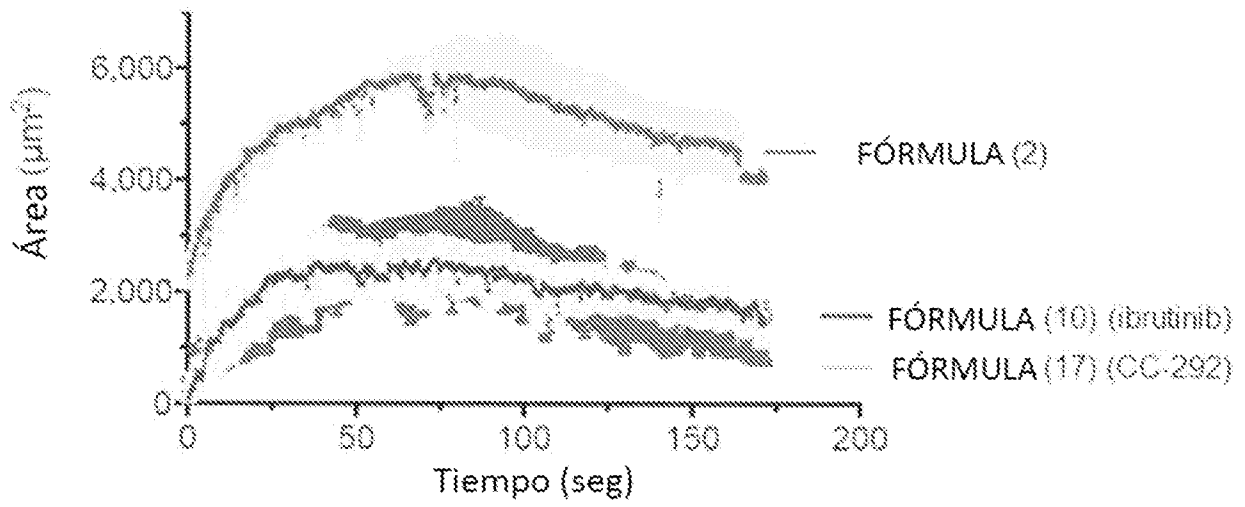


Figura 43

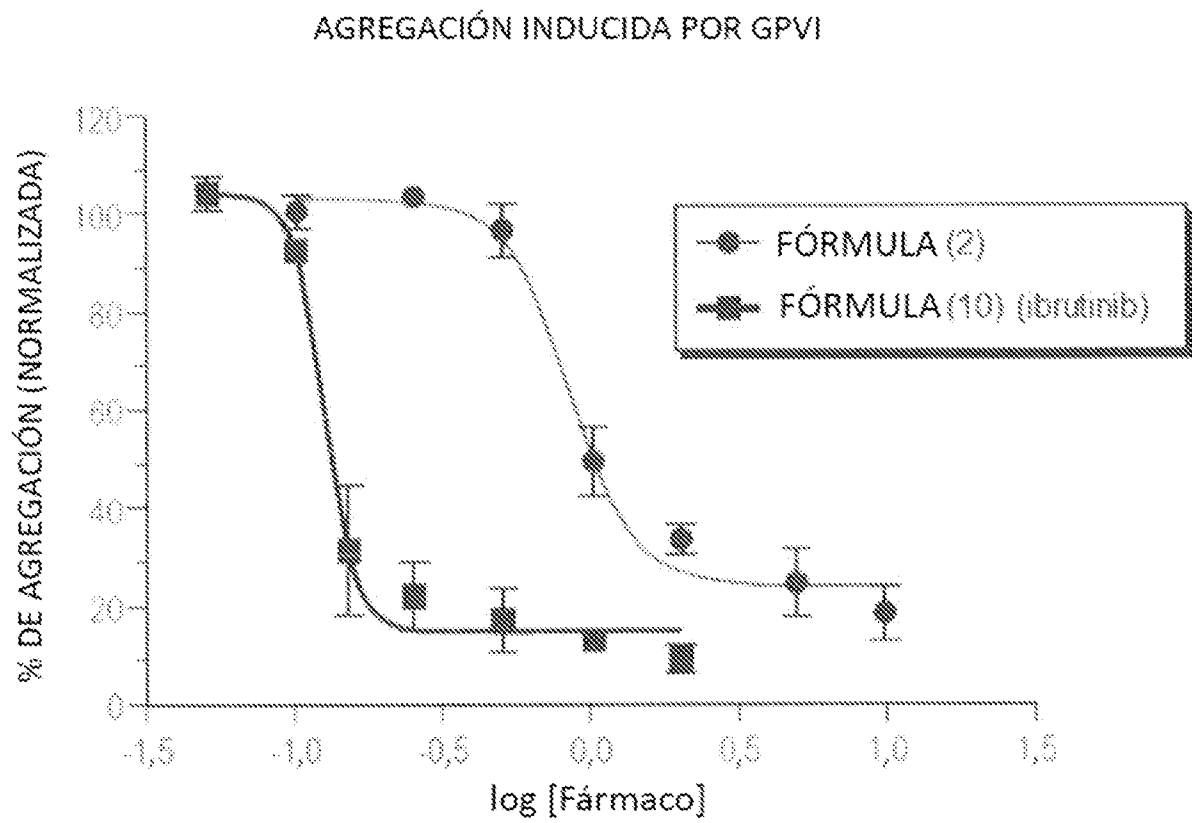


Figura 44

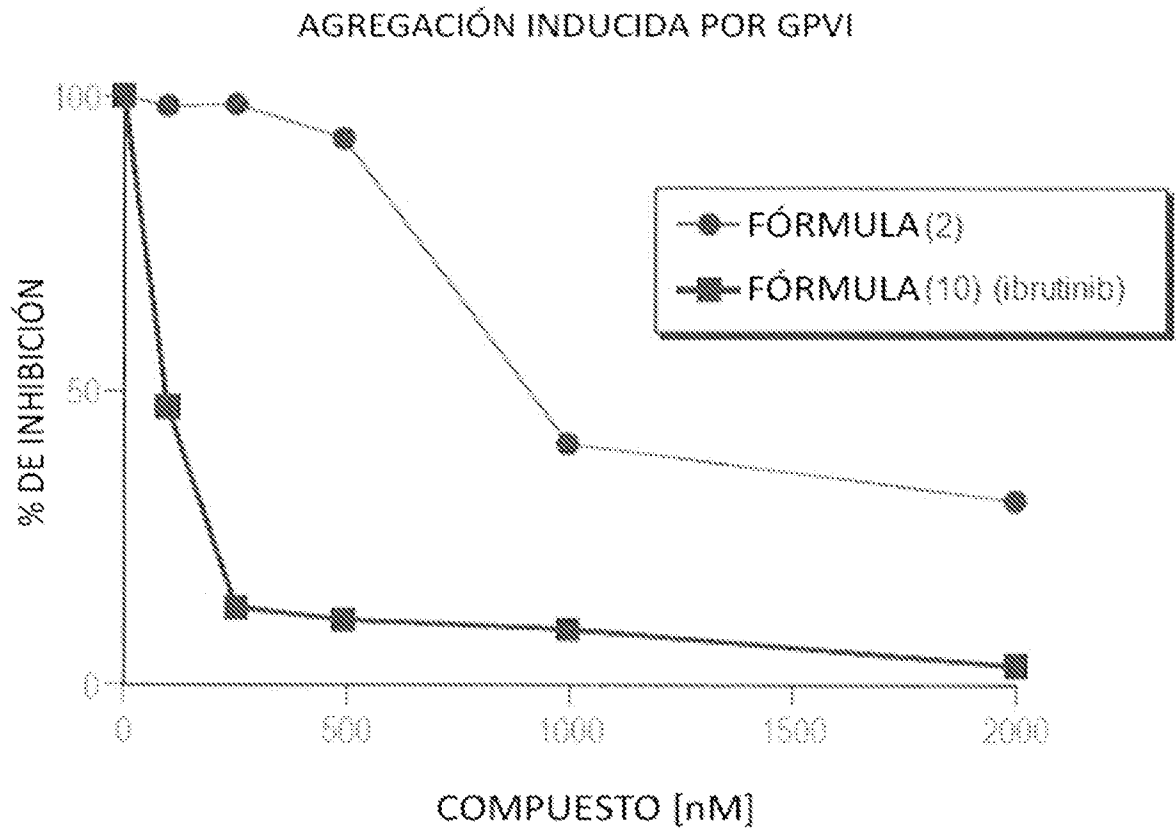


Figura 45