

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 839 408**

51 Int. Cl.:

|                     |                             |           |
|---------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>A61K 38/00</b>   | (2006.01) <b>A61P 19/02</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 39/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 35/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/522</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/52</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/519</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/517</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/4985</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/454</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 45/06</b>   | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2017 PCT/IB2017/050198**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17122175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2017 E 17701596 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020 EP 3402503**

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

30 Prioridad:

**13.01.2016 US 201662278374 P**  
**05.08.2016 US 201662371626 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2021**

73 Titular/es:

**ACERTA PHARMA B.V. (100.0%)**  
**Kloosterstraat 9**  
**5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**KAPTEIN, ALLARD;**  
**ROTHBAUM, WAYNE y**  
**LANNUTTI, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 839 408 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 antifolato y un inhibidor de BTK

## 5 Campo de la invención

En el presente documento se desvelan combinaciones terapéuticas de un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK, *Bruton's tyrosine kinase*) y de un compuesto antifolato, y los usos de las combinaciones terapéuticas. En particular, se desvela una combinación de un inhibidor de BTK y un compuesto antifolato y composiciones y usos de las mismas.

## Antecedentes de la invención

La activación de linfocitos B, es clave en la generación de respuestas inmunitarias adaptativas. La activación fracasada de linfocitos B, es un sello distintivo de muchos trastornos autoinmunitarios y, por tanto, la modulación de esta respuesta inmunitaria es de interés terapéutico. Recientemente se ha establecido el éxito de las terapias con células B en los trastornos autoinmunitarios. El tratamiento con rituximab (terapia anti-CD20), de pacientes con artritis reumatoide (AR), es una terapia clínica aceptada. Los ensayos clínicos más recientes muestran que el tratamiento con rituximab también mejora los síntomas de la enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple recurrente remitente (EMRR) y lupus eritematoso sistémico (LES). Este éxito respalda la posibilidad de futuras terapias en trastornos autoinmunitarios dirigidos a la inmunidad de las células B.

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 la BTK en las rutas de señalización activadas por la interacción del receptor de células B (BCR, *B cell receptor*) y FCER1 en mastocitos está bien establecida. Las mutaciones funcionales en la BTK en seres humanos producen una enfermedad de inmunodeficiencia primaria caracterizada por un defecto en el desarrollo de células B con un bloqueo entre los estadios de células pro y pre-B. El resultado es una ausencia casi completa de linfocitos B, causando una reducción pronunciada de la inmunoglobulina sérica de todas las clases. Estos hallazgos respaldan un papel clave de la BTK en la regulación de la producción de autoanticuerpos en trastornos autoinmunitarios.

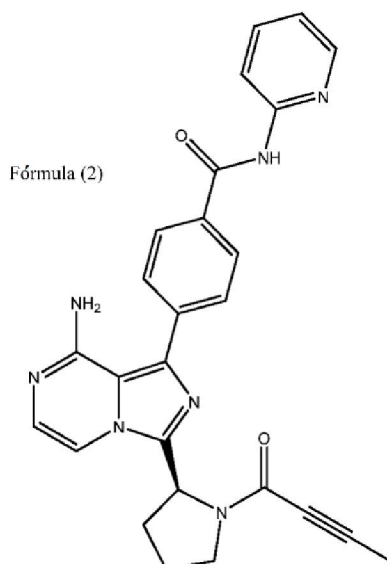
Otras enfermedades con un papel importante para las células B disfuncionales, son las neoplasias malignas de células B. El papel de la BTK indicado en la regulación de la proliferación y la apoptosis de células B, indica el potencial de inhibidores de BTK en el tratamiento de linfomas de células B. Por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

Los antifolatos representan una de las clases de agentes antineoplásicos más minuciosamente estudiadas, demostrando inicialmente la aminopterina una actividad clínica hace aproximadamente 50 años. El metotrexato se desarrolló poco después y en la actualidad es un componente estándar de los regímenes quimioterapéuticos eficaces para neoplasias malignas tales como linfoma, cáncer de mama y cáncer de cabeza y cuello. Bonnadonna, *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 1995, 273, 542-547; Bonnadonna, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 1995, 332, 901-906; y Hong, *et al.*, *Cancer* 1983, 52, 206-210. Los antifolatos inhiben una o varias enzimas clave de las rutas biosintéticas de la timidina y la purina que requieren folato, en particular, timidilato sintasa (TS), dihidrofolato reductasa (DHFR) y glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT), compitiendo con folatos reducidos por los sitios de unión de estas enzimas. Shih, *et al.*, *Advan. Enzyme Regul.* 1998, 38, 135-152 y Shih, *et al.*, *Cancer Res* 1997, 57, 1116-1123. En Xu, D. *et al.* *J. Pharmacol. Exp. Th.*, 2012, 341, 90 -103, se descubrió que el 6-ciclopropil-8-fluoro-2-(2-hidroximetil-3-(1-metil-5-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-piridin-2 -ilamino]-6-oxo-1,6-dihidro-piridin-3-il)-fenil)-2H-isoquinolin-1-ona (RN486), inhibía la enzima BTK y demostró ser eficaz para el tratamiento de la artritis.

La presente invención proporciona el hallazgo inesperado de que la combinación de un compuesto antifolato y un inhibidor de BTK es sinérgicamente eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide.

## Sumario de la invención

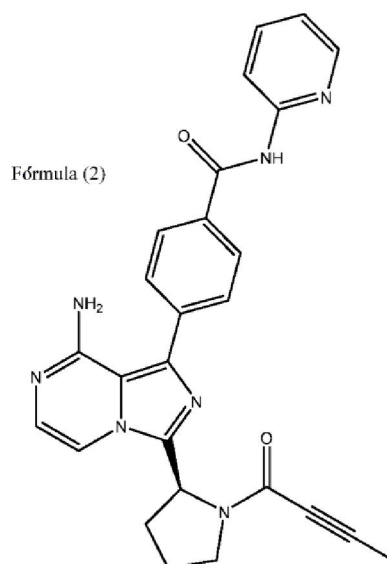
En una realización, la invención proporciona una combinación que comprende un inhibidor de BTK que tiene la estructura de fórmula (2):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de:

(1) un inhibidor de BTK que tiene la estructura de fórmula (2):

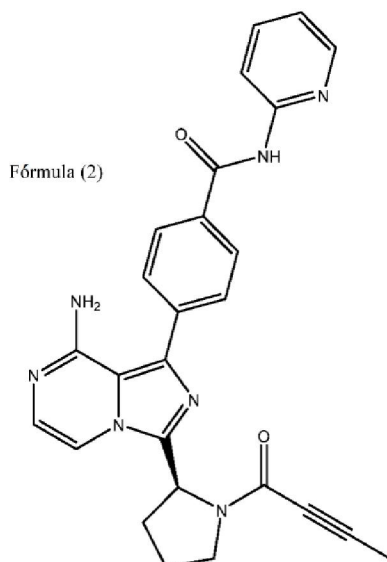


o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y

(2) metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

En otra realización, la invención proporciona un kit que comprende:

una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de BTK que tiene la estructura de fórmula (2):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y una composición farmacéutica que comprende metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para la coadministración del metotrexato y del compuesto de fórmula (2), ya sea simultáneamente o por separado, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

#### Breve descripción de los dibujos

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderán mejor al leerlos junto con los dibujos adjuntos.

En la FIG. 1 se ilustra el efecto del inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg), administrado en solitario o en combinación con metotrexato (0,3 mg/kg) sobre la puntuación de la artritis frente a los días después de la inmunización.

En la FIG. 2 se ilustra el efecto del inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg), administrado en solitario o en combinación con metotrexato (0,5 mg/kg) sobre la puntuación de la artritis frente a los días después de la inmunización.

En la FIG. 3 se ilustra el efecto del inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg), administrado en solitario o en combinación con metotrexato (0,3 mg/kg) sobre la puntuación de la artritis frente a los días después de la inmunización.

En la FIG. 4 se ilustra el efecto del inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg), administrado en solitario o en combinación con metotrexato (0,5 mg/kg) sobre la puntuación de la artritis frente a los días después de la inmunización.

#### Breve descripción del listado de secuencias

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 obinutuzumab.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 obinutuzumab.

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

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

5 La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ofatumumab.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 veltuzumab.

10 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 veltuzumab.

15 La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 tositumomab.

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 tositumomab.

20 La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ibritumomab.

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-CD20 ibritumomab.

25 La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

30 La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) del inhibidor de PD-1 nivolumab.

La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) del inhibidor de PD-1 nivolumab.

35 La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

40 La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 nivolumab.

La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

45 La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 nivolumab.

La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

50 La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

55 La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

60 La SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

65 La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.

- La SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.
- 5 La SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.
- La SEQ ID NO: 34 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-1 pembrolizumab.
- 10 La SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-1 pidilizumab.
- La SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-1 pidilizumab.
- 15 La SEQ ID NO: 37 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) del inhibidor de PD-1 pidilizumab.
- La SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) del inhibidor de PD-1 pidilizumab.
- 20 La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- 25 La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- 30 La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- 35 La SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- La SEQ ID NO: 46 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- 40 La SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- La SEQ ID NO: 48 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 durvalumab.
- 45 La SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- La SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- 50 La SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) secuencia de aminoácidos del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- La SEQ ID NO: 52 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- 55 La SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- La SEQ ID NO: 54 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- 60 La SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- La SEQ ID NO: 56 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.
- 65

La SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

La SEQ ID NO: 58 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 atezolizumab.

La SEQ ID NO: 59 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 60 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 61 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 62 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 63 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 64 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del inhibidor de PD-L1 avelumab.

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

La SEQ ID NO: 66 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 67 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

La SEQ ID NO: 68 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del inhibidor de PD-L1 avelumab.

#### Descripción detallada de la invención

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entendería comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Las expresiones "coadministración", "coadministrar", "administrado en combinación con", "administración en combinación con", "simultánea", y "concurrente", como se usa en el presente documento, incluyen la administración de dos o más principios farmacéuticos activos (en una realización preferida de la presente invención, por ejemplo, al menos un compuesto antifolato y al menos un inhibidor de BTK) a un sujeto de modo que ambos principios farmacéuticos activos y/o sus metabolitos estén presentes en el sujeto al mismo tiempo. La coadministración incluye administración simultánea en composiciones distintas, administración en diferentes momentos en composiciones distintas o administración en una composición en la que hay dos o más principios farmacéuticos. Se prefiere la administración simultánea en composiciones distintas y la administración en una composición en la que estén presentes ambos agentes.

La expresión "*in vivo*" se refiere a un episodio que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

La expresión "*in vitro*" se refiere a un episodio que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos basados en células en los que se emplean células vivas o muertas y también pueden incluir un ensayo sin células en el que no se emplean células intactas.

La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de un compuesto o combinación de compuestos como se describe en el presente documento que es suficiente para efectuar la aplicación prevista, que incluye, pero sin limitación, el tratamiento de enfermedades. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la aplicación prevista (*in vitro* o *in vivo*), o del sujeto y de la enfermedad que se esté tratando (por ejemplo, el peso, la edad y género del sujeto), la gravedad de la afección de la enfermedad, la forma de administración, etc. que puede determinar fácilmente un experto en la materia. La expresión también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana (por ejemplo, reducción de la adhesión plaquetaria y/o migración celular). La dosis específica variará dependiendo de los compuestos particulares elegidos, del régimen de dosificación a seguir, de si el compuesto se administra en combinación con otros compuestos, del momento de la administración, del tejido al que se administra y del sistema de suministro físico en el que se transporta el compuesto.

Un "efecto terapéutico" como se usa ese término en el presente documento, abarca un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o afección, retrasar o eliminar la aparición de síntomas de una enfermedad o afección, ralentizar, detener o invertir el avance de una enfermedad o afección, o cualquier combinación de los mismos.

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. Las expresiones "PO", "po" o "po" significan *per os*, administrado por la boca o por vía oral.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales obtenidas de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la materia. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos de los que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos de los que pueden obtenerse 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. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas de las que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso y aluminio. Las bases orgánicas de las que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico. Los ejemplos específicos incluyen isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. En algunas realizaciones, la sal de adición de base farmacéuticamente aceptable se elige entre amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Las expresiones "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" pretenden incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y principios inertes. En la técnica se conoce bien el uso de dichos vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para principios farmacéuticos activos. Salvo en la medida en que cualquier vehículo o excipiente convencional farmacéuticamente aceptable sea incompatible con el principio farmacéutico activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas para su uso en la invención. En las composiciones y métodos descritos también pueden incorporarse principios farmacéuticos activos adicionales tales como otros fármacos.

Como se usa en el presente documento, el término "ojiva" o la expresión "grupo de ojiva" se refieren a un grupo funcional presente en un compuesto para su uso en la presente invención en donde ese grupo funcional es capaz de unirse de manera covalente a un resto de aminoácido presente en el bolsillo de unión de la proteína diana (tal como cisteína, lisina, histidina, u otros restos que puedan modificarse de manera covalente), inhibiendo así irreversiblemente la proteína.

A menos que se afirme otra cosa, las estructuras químicas representadas en el presente documento pretenden incluir compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, dentro del alcance de la presente invención se incluyen compuestos en los que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan por deuterio o tritio, o en los que uno o más átomos de carbono se reemplazan por carbonos enriquecidos con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ .

Cuando en el presente documento se usan intervalos para describir, por ejemplo, propiedades físicas o químicas, tales como peso molecular o fórmulas químicas, todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y realizaciones específicas en ellas están destinadas a ser incluidas. El uso del término "aproximadamente" cuando se refiere a un número o un intervalo numérico significa que el número o intervalo numérico al que se hace referencia es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error estadístico experimental), y por tanto el número o intervalo numérico puede variar. La variación es normalmente del 0 % al 15 %, preferentemente del 0 % al 10 %, más preferentemente del 0 % al 5 % del número o intervalo numérico indicado. El término "comprendiendo" (y términos relacionados tales como "que comprende" o "comprende" o "que tiene" o "que incluye") incluye aquellas realizaciones tales 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 se diferencian únicamente en la manera en la que los átomos están dispuestos en el espacio, es decir, tienen una configuración estereoquímica diferente. Los "enantiómeros" son un par de estereoisómeros que no son imágenes especulares 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 donde sea adecuado. Los "diaestereoisómeros" 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 Cahn-Ingold-Prelog R-S. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada carbono quiral puede especificarse por (R) o (S). Los compuestos resueltos cuya configuración absoluta se desconoce se pueden designar (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextro- o levorrotatoria) en la que gira la luz polarizada plana en la longitud de onda de la línea D del sodio. Algunos de los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden producir enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica

absoluta, como (*R*) o (*S*). Las entidades químicas, las composiciones y los métodos farmacéuticos presentes están destinados a incluir todos estos posibles isómeros, incluyendo mezclas racémicas, formas ópticamente puras y mezclas de productos intermedios. Pueden prepararse (*R*) y (*S*)-isómeros ópticamente activos usando sintones quirales (quirones) o reactivos quirales, o se resuelven usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen enlaces dobles olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique otra cosa, se entiende que los compuestos incluyen isómeros geométricos tanto *E* como *Z*.

La "pureza enantiomérica" como se usa en el presente documento se refiere a las cantidades relativas, expresadas como un porcentaje, de la presencia de un enantiómero específico en relación con el otro enantiómero. Por ejemplo, si un compuesto, que potencialmente puede tener una configuración isomérica (*R*) o (*S*), está presente como una mezcla racémica, la pureza enantiomérica es de aproximadamente 50 % con respecto al isómero (*R*) o (*S*). Si ese compuesto tiene una forma isomérica predominante sobre la otra, por ejemplo, 80 % de isómero (*S*) y 20 % de isómero (*R*), la pureza enantiomérica del compuesto con respecto a la forma isomérica (*S*) es de 80 %. La pureza enantiomérica de un compuesto se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica, incluyendo, sin limitación, cromatografía usando un soporte quiral, medición polarimétrica de la rotación de luz polarizada, espectroscopía de resonancia magnética nuclear usando reactivos de desplazamiento quirales que incluyen, pero sin limitación, complejos quirales que contienen lantánidos o reactivos de Pirkle, o derivatización de un compuesto usando un compuesto quiral tal como ácido de Mosher seguido de cromatografía o espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

En realizaciones preferidas, la composición enriquecida enantioméricamente tiene una mayor potencia con respecto a la utilidad terapéutica por unidad de masa que la mezcla racémica de esa composición. Los enantiómeros pueden aislarse de las mezclas mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC por las siglas del inglés *high pressure liquid chromatography*) quiral y la formación y cristalización de sales quirales; o los enantiómeros preferidos pueden prepararse mediante síntesis asimétrica. Véanse, por ejemplo, Jacques, *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Wiley Interscience, Nueva York (1981); E. L. Eliel, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, McGraw-Hill, Nueva York (1962); and E. L. Eliel y S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley-Interscience, Nueva York (1994).

Los términos "enriquecido enantioméricamente" y "no racémico", como se usa en el presente documento, se refieren a composiciones en las que el porcentaje en peso de un enantiómero es mayor que la cantidad de ese enantiómero en una mezcla de control de la composición racémica (por ejemplo, mayor que 1:1 en peso). Por ejemplo, una preparación enriquecida enantioméricamente del enantiómero (*S*), significa una preparación del compuesto que tiene más del 50 % en peso del enantiómero (*S*) con respecto al enantiómero (*R*), tal como al menos 75 % en peso, o tal como al menos 80 % en peso. En algunas realizaciones, el enriquecimiento puede ser significativamente superior al 80 % en peso, proporcionando una preparación "sustancialmente enriquecida enantioméricamente" o "sustancialmente no racémica", que se refiere a preparaciones de composiciones que tienen al menos un 85 % en peso de un enantiómero en relación con otro enantiómero, tal como al menos 90 % en peso, o tal como al menos 95 % en peso. Las expresiones "enantioméricamente puro" o "sustancialmente enantioméricamente puro", se refieren a una composición que comprende al menos un 98 % de un enantiómero único y menos de un 2 % del enantiómero opuesto.

"Fracción" se refiere a un segmento o grupo funcional específico de una molécula. Las fracciones químicas a menudo se reconocen como entidades químicas embebidas en una molécula o anexas a una molécula.

Los "tautómeros" son isómeros estructuralmente distintos que se interconvierten por tautomería. La "tautomería" es una forma de isomerización e incluye tautomería prototrópica o de desplazamiento de protones, que se considera un subconjunto de la química ácido-base. La "tautomerización prototrópica" o "tautomerización por desplazamiento de protones" implica la migración de un protón acompañada de cambios en el orden de los enlaces, a menudo el intercambio de un enlace simple por un enlace doble adyacente. Cuando es posible la tautomerización (por ejemplo, en solución), puede alcanzarse un equilibrio químico de los tautómeros. Un ejemplo de tautomerización es la tautomerización ceto-enol. Un ejemplo específico de tautomerización ceto-enol es la interconversión de tautómeros de pentano-2,4-diona y 4-hidroxipent-3-en-2-ona. Otro ejemplo de la tautomerización es la tautomerización fenol-ceto. Un ejemplo específico de tautomerización fenol-ceto es la interconversión de tautómeros de piridin-4-ol y piridin-4(1*H*)-ona.

Un "grupo o átomo saliente" es cualquier grupo o átomo que, en condiciones de reacción seleccionadas, se escinde del material de partida, promoviendo así la reacción en un sitio específico. Como ejemplos de dichos grupos, salvo que se especifique lo contrario, se incluyen átomos de halógeno y grupos mesilo, p-nitrobenzensulfonilo y tosilo.

La expresión "grupo protector" pretende referirse un grupo que bloquea selectivamente uno o más sitios reactivos en un compuesto multifuncional de modo que una reacción química se puede llevar a cabo de forma selectiva en otro sitio reactivo desprotegido y el grupo se puede eliminar o desproteger fácilmente después de finalizar la reacción selectiva. Por ejemplo, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999), se desvelan diversos grupos protectores.

"Sustituido" significa que el grupo de referencia puede haberse unido a uno o más grupos, radicales o fracciones

adicionales seleccionados individual e independientemente de, por ejemplo, acilo, alquilo, alquilarilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, carbohidrato, carbonato, heteroarilo, heterocicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, éster, tiocarbonilo, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, oxo, perhaloalquilo, perfluoroalquilo, fosfato, sililo, sulfinilo, sulfonilo, sulfonamidilo, sulfoxilo, sulfonato, urea y amino, incluyendo grupos amino mono y disustituidos, y derivados protegidos de los mismos. Los propios sustituyentes pueden sustituirse, por ejemplo, un sustituyente de cicloalquilo puede tener propiamente un sustituyente de haluro en uno o más de sus carbonos del anillo. La expresión "opcionalmente sustituido" significa sustitución opcional con los grupos, radicales o fracciones especificados.

Los compuestos desvelados en el presente documento para su uso en la invención, también incluyen formas cristalinas y amorfas de esos compuestos, incluyendo, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos), polimorfos conformacionales y formas amorfas de los compuestos, así como mezclas de los mismos. Las expresiones "forma cristalina" y "polimorfo" pretenden incluir todas las formas cristalinas y amorfas del compuesto, incluyendo, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos), polimorfos conformacionales y formas amorfas, así como sus mezclas, a menos que se haga referencia a una forma cristalina o amorfa particular. La combinación y las composiciones para su uso en la presente invención pueden comprender anticuerpos. El término "anticuerpo" y su forma plural "anticuerpos", se refieren a inmunoglobulinas completas y a cualquier fragmento de unión a antígeno ("parte de unión a antígeno") o a cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere además a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H, *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, *light*) interconectadas por enlaces disulfuro, o a una parte de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviado en el presente documento como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C<sub>L</sub>. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, que se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) o regiones hipervariables (HVR), y que se pueden intercalar con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, *framework regions*). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo 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 interacciona con uno o más epítopos de antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las expresiones "anticuerpo monoclonal", "mAb", "composición de anticuerpo monoclonal", o sus formas plurales, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por un epítipo particular. Pueden fabricarse anticuerpos monoclonales específicos, por ejemplo, contra CD20, PD-1, PD-L1 o PD-L2, utilizando el conocimiento y la habilidad en la técnica de inyectar los antígenos CD20, PD-1, PD-L1 o PD-L2 a sujetos de ensayo y después aislar los hibridomas que expresen los anticuerpos que tengan las secuencias o características funcionales deseadas. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que no producen de otra manera la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá más adelante con más detalle.

Las expresiones "parte de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-1), PD-L1 o PD-L2). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Como ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo 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<sub>H</sub> o en un dominio V<sub>L</sub>; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Por otro lado, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, estén codificados por genes distintos, estos pueden unirse, usando métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv monocatenario (scFv, *single chain Fv*); véanse, 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 pretende que dichos anticuerpos scFv estén incluidos en las expresiones "parte de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se exploran para determinar su utilidad del

mismo modo que los anticuerpos intactos.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR provienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Por otro lado, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco conservadas humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR provienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanas fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrmosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos, combinatoria y recombinante y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco conservadas y las CDR provienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de, y están relacionadas con, secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

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

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

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

Las expresiones "anticuerpo humano", "anticuerpos humanizados", y "humanizado", pretenden referirse a anticuerpos en los que las secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco conservadas humanas. Dentro de las secuencias marco conservadas humanas pueden realizarse modificaciones adicionales de la región marco conservada. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable 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 restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Por otro lado, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, 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.

La expresión "anticuerpo quimérico" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable provienen de una especie y las secuencias de la región constante provienen de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable provienen de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante provienen de un anticuerpo humano.

Un "diacuerpo" es un pequeño fragmento de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado con un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H-V_L$  o  $V_L-V_H$ ). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos de manera más completa, por ejemplo, en la patente europea N.º EP 404.097; en la publicación de patente internacional N.º WO 93/11161, y en Bolliger, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6444-6448.

El término "glicosilación" se refiere a un derivado de un anticuerpo modificado. Un anticuerpo aglicosilado carece de glicosilación. La glicosilación se puede alterar para aumentar, por ejemplo, la afinidad del anticuerpo por un antígeno. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden realizar, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región marco conservada variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. La aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.714.350 y 6.350.861. Adicionalmente o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de los anticuerpos. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden realizar, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709, carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6)fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709, carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8<sup>-/-</sup>, se crearon mediante la alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0110704 o Yamane-Onuki, *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 2004, 87, 614-622). Como ejemplo adicional, en la patente europea N.º 1.176.195 se describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación al reducir o eliminar la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6, y también describe líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). En la publicación de patente internacional WO 03/035835 se describe una línea celular CHO variante, células Lec 13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono unidos a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, *et al.*, J. Biol. Chem. 2002, 277, 26733-26740). En el documento de publicación de patente internacional WO 99/54342 se describen líneas celulares genomodificadas para expresar glicosiltransferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de tal manera que dichos anticuerpos expresados en las líneas celulares genomodificadas presentan estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas que dan como resultado una actividad de ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.*, Nat. Biotech. 1999, 17, 176-180). Como alternativa, los restos de fucosa del anticuerpo se pueden escindir usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina restos de fucosilo de los anticuerpos como se describe en Tarentino, *et al.*, Biochem. 1975, 14, 5516-5523.

"Pegilación" se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento del mismo, modificado, que normalmente reacciona con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG comienzan a unirse al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. La pegilación puede, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende incluir cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi ( $C_1-C_{10}$ ) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. El anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. En la técnica se conocen métodos de pegilación y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención, como se describe, por ejemplo, en las patentes europeas N.º EP 0154316 y EP 0401384.

La expresión "sustituciones de aminoácidos conservativas" significa modificaciones de la secuencia de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo con el antígeno. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, en donde una clase se define por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral de aminoácidos y las altas frecuencias de sustitución en

las proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza, según se determina, por ejemplo, mediante una matriz de intercambio de frecuencias Dayhoff o una matriz BLOSUM estándar. 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 una Asp por otro resto de la clase III, tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservativa. Por tanto, en un anticuerpo contra PD-1 o PD-L1, un resto de aminoácido no esencial previsto se reemplaza preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma clase. En la técnica se conocen bien métodos para identificar sustituciones conservativas de aminoácidos que no eliminan la unión con el antígeno (véase, 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.

Las expresiones "identidad de secuencia", "porcentaje de Identidad", e "identidad porcentual 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 que tienen un porcentaje específico de restos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, en caso necesario) para lograr una correspondencia máxima, sin tener en cuenta ninguna sustitución de aminoácidos conservativa como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse usando programas informáticos o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen diversos algoritmos y programas informáticos que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Los programas adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia incluyen, por ejemplo, el conjunto de programas BLAST disponibles en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica BLAST del Gobierno de los Estados Unidos. Las comparaciones entre dos secuencias se pueden realizar usando el algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácidos nucleicos, Blastp se usa para comparar secuencias de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Sur de San Francisco, California) o MegAlign, disponible en DNASTAR, son programas informáticos adicionales disponibles al público que se pueden usar para alinear secuencias. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para la alineación máxima mediante un programa informático de alineación particular. En determinadas realizaciones, se usan los parámetros por defecto del programa informático de alineación.

Determinadas realizaciones de la presente invención comprenden una variante de un anticuerpo, por ejemplo, un compuesto antifolato que sea 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 el presente documento, el término "variante" abarca, pero no se limita a, anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia mediante una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de referencia, o adyacentes a ella. La variante puede comprender una o más sustituciones conservativas en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia. Las sustituciones conservativas pueden implicar, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. La variante conserva la capacidad de unirse específicamente con el antígeno del anticuerpo de referencia.

La expresión "complejo marcado con radioisótopo" se refiere a la unión covalente y no covalente de un isótopo radiactivo, tal como  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{131}\text{I}$ , con un anticuerpo, incluidos los conjugados.

El término "biosimilar" significa un producto biológico que es muy similar a un producto biológico de referencia autorizado en 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 fuerza del producto. Por otro lado, un medicamento biológico similar o "biosimilar" es un medicamento biológico que es similar a otro medicamento biológico cuyo uso ya ha sido autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos. El término "biosimilar" también se usa como sinónimo por otros organismos públicos nacionales y regionales. Los productos biológicos o medicamentos biológicos son medicamentos fabricados a partir de una fuente biológica o procedentes de una fuente biológica, tal como una bacteria o una levadura. Estos pueden consistir en moléculas relativamente pequeñas, tales como la insulina o la eritropoyetina humanas, o en moléculas complejas tales como los 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 de" rituximab o es un "biosimilar del mismo" de rituximab. En Europa, un medicamento biológico similar o "biosimilar" es un medicamento biológico que es similar a otro medicamento biológico cuyo uso ya ha sido autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por las siglas del inglés *European Medicines Agency*). La base jurídica pertinente para aplicaciones biológicas similares en Europa es el artículo 6 del Reglamento (CE) N.º 726/2004 y el artículo 10(4) de la Directiva 2001/83/CE, modificados y, por lo tanto, en Europa, el biosimilar puede autorizarse, aprobarse para su autorización o ser objeto de una solicitud de autorización en virtud del artículo 6 del Reglamento (CE) n.º 726/2004 y del artículo 10(4) de la Directiva 2001/83/CE. El medicamento biológico original ya autorizado en Europa puede denominarse "medicamento de referencia". Para que un producto se considere biosimilar, algunos de los requisitos se resumen en las Directrices del CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*, comité de medicamentos de uso humano) sobre medicamentos biológicos similares. Además, las directrices específicas de cada producto, incluidas las directrices relativas a los biosimilares de los anticuerpos monoclonales, las proporciona la EMA producto por producto y las publica su página web. Un biosimilar como se describe en el presente documento, puede ser similar al medicamento de referencia por sus características

de calidad, actividad biológica, mecanismo de acción, perfiles de seguridad y/o eficacia. Además, el biosimilar puede usarse o estar destinado a usarse para tratar las mismas afecciones que el medicamento de referencia. Por tanto, un biosimilar como se describe en el presente documento puede considerarse que tiene características de calidad similares o muy similares a las de un medicamento de referencia. Como alternativa, o además, se puede considerar que un biosimilar como se describe en el presente documento tiene una actividad biológica similar o muy similar a la de un medicamento de referencia. Como alternativa, o además, se puede considerar que un biosimilar como se describe en el presente documento, tiene un perfil de seguridad similar o muy similar al de un medicamento de referencia. Como alternativa, o además, se puede considerar que un biosimilar como se describe en el presente documento tiene una eficacia similar o muy similar a la de un medicamento de referencia. Como se describe en el presente documento, un biosimilar en Europa se compara con un medicamento de referencia que ha sido autorizado por la EMA. Sin embargo, en algunos casos, el biosimilar puede compararse con un medicamento biológico que se haya autorizado fuera del Espacio Económico Europeo (un "comparador" no autorizado por el EEE) en determinados estudios. Dichos estudios incluyen, por ejemplo, determinados estudios clínicos y no clínicos *in vivo*. Como se usa en el presente documento, el término "biosimilar" también se refiere a un medicamento biológico que se ha comparado o que puede compararse con un comparador no autorizado por el EEE. Algunos biosimilares como se describe en el presente documento tienen una estructura de anticuerpo (por ejemplo, partes de unión a antígeno) y proteínas de fusión. Una biosimilar proteico puede tener una secuencia de aminoácidos que tenga modificaciones minoritarias en la estructura de aminoácidos (incluidas, por ejemplo, deleciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos) que no afecten significativamente a la función del polipéptido. El biosimilar puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de 97 % o mayor, con la secuencia de aminoácidos de su medicamento de referencia, por ejemplo, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. El biosimilar puede comprender una o más modificaciones postraduccionales, por ejemplo, aunque sin limitación, glicosilación, oxidación, desamidación y/o truncamiento que sea/sean diferente(s) a las modificaciones postraduccionales del medicamento de referencia, siempre que las diferencias no produzcan ningún cambio en la seguridad y/o eficacia del medicamento. El biosimilar puede tener un patrón de glicosilación idéntico o diferente al del medicamento de referencia. Particularmente, aunque no exclusivamente, el biosimilar puede tener un patrón de glicosilación diferente si las diferencias abordan o están destinadas a abordar los problemas de seguridad asociados al medicamento de referencia. Adicionalmente, el biosimilar puede desviarse del medicamento de referencia, por ejemplo, en su concentración, forma farmacéutica, formulación, excipientes y/o presentación, siempre que no se vea comprometida la seguridad y la eficacia del medicamento. El biosimilar puede comprender diferencias, por ejemplo, en los perfiles farmacocinéticos (FC) y/o farmacodinámicos (FD) en comparación con el medicamento de referencia, pero se sigue considerando suficientemente similar al medicamento de referencia como para ser autorizado o considerado adecuadamente para su autorización. En determinadas circunstancias, el biosimilar presenta diferentes características de unión en comparación con el medicamento de referencia, en donde las diferentes características de unión son consideradas por una autoridad reguladora tal como la EMA como una barrera para la autorización como producto biológico similar. El término "biosimilar" también se usa como sinónimo por otros organismos públicos nacionales y regionales.

El término "compuesto antifolato" como se usa en el presente documento incluye un compuesto que inhibe una o más enzimas de las rutas biosintéticas de timidina y purina que requieren folato, incluyendo timidilato sintasa (TS), dihidrofolato reductasa (DHFR) y glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT).

Para disipar cualquier duda, en el presente documento se pretende que los rasgos distintivos particulares (por ejemplo, números enteros, características, valores, usos, enfermedades, fórmulas, compuestos o grupos) descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención, deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento a menos que sea incompatible con los mismos. Por tanto, dichos rasgos distintivos pueden usarse cuando sea apropiado junto con cualquiera de las definiciones, reivindicaciones o realizaciones definidas en el presente documento. Todos los rasgos distintivos desvelados en esta memoria descriptiva (incluyendo cualquiera de las reivindicaciones, resumen y dibujos adjuntos) y/o todas las etapas de cualquier método o proceso que se desvela de este modo, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunos de los rasgos distintivos y/o etapas se excluyan mutuamente. La invención no está limitada a ningún detalle de ninguna realización desvelada.

#### Coadministración de compuestos

En una realización, la invención incluye una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende una combinación de un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Otro aspecto de la invención es un kit que contiene un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, en donde cada uno del inhibidor y el metotrexato se formula en una composición farmacéutica distinta, y en donde dichas composiciones farmacéuticas distintas se formulan para la coadministración.

Otro aspecto de la invención es una combinación de un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. En una realización, el uso anterior presenta efectos sinérgicos que pueden proporcionar una mayor eficacia, menos efectos secundarios, el uso de un principio farmacéutico menos activo para obtener un resultado clínico determinado u otros efectos sinérgicos. Una combinación de un inhibidor de BTK de

fórmula (2) y metotrexato es una realización preferida. La composición farmacéutica que comprende la combinación y el kit, son ambos para su uso en el tratamiento de dicha enfermedad o afección.

En una realización, la combinación del inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato se administra por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o transdérmica.

En una realización, el inhibidor de BTK de fórmula (2) está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el metotrexato está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el metotrexato se administra al sujeto antes de la administración del inhibidor de BTK de fórmula (2).

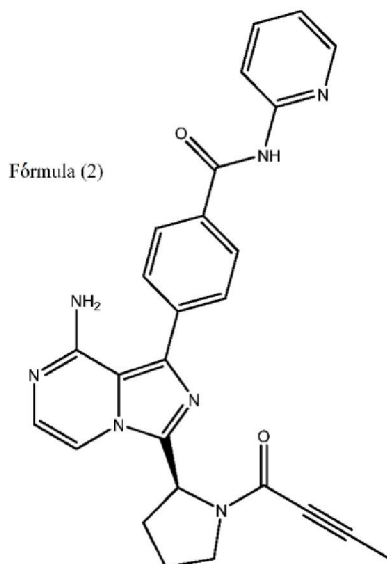
En una realización, el metotrexato se administra al mismo tiempo que la administración del inhibidor de BTK de fórmula (2).

En una realización, el metotrexato se administra al sujeto después de la administración del inhibidor de BTK de fórmula (2).

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

#### Inhibidores de BTK

El inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (2) como se describe con más detalle en los siguientes párrafos. El inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (2):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. La preparación de este compuesto se describe en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2013/010868 y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0155385 A1.

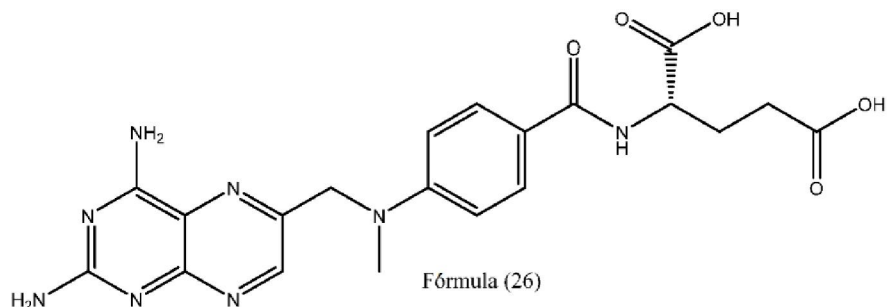
En una realización preferida, el inhibidor de BTK es (S)-4-(8-amino-3-(1-(but-2-inoil)pirrolidin-2-il)imidazo[1,5-a]pirazin-1-ilo)-N-(piridin-2-il)benzamida o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable.

#### Antifolatos

El compuesto antifolato es el compuesto antifolato descrito con más detalle en el siguiente párrafo. En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento proporcionan una combinación de metotrexato con un inhibidor de BTK de fórmula (2) y un uso de la combinación en el tratamiento de la artritis reumatoide. En una realización, un compuesto antifolato inhibe la timidilato sintasa (TS), dihidrofolato reductasa (DHFR), glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT) y combinaciones de las mismas.

El compuesto antifolato es ácido (2S)-2-[(4-[[[(2,4-Diaminopteridin-6-il)metil](metil)amino} benzoil]amino]pentanodioico

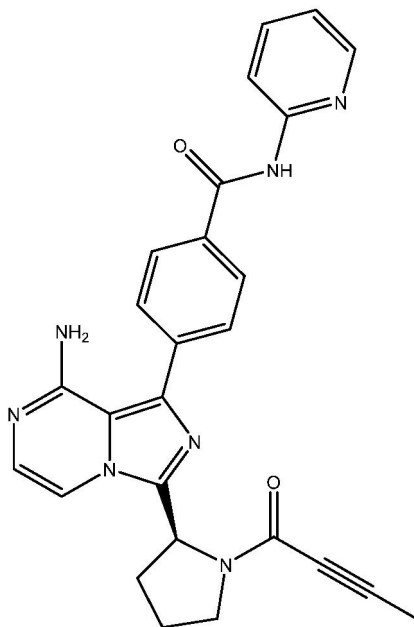
("metotrexato", también conocido como ametofterina) que tiene la estructura de fórmula (26):



- 5 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. La síntesis y propiedades del metotrexato se describen en la patente de Estados Unidos N.º 2.512.572. El metotrexato está disponible en el comercio de múltiples proveedores bajo marcas comerciales tales como TREXALL, RHEUMATREX, OTREXUP y RASUVO.

#### Composiciones farmacéuticas

- 10 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.
- 15 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de (1) metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y (2) un inhibidor de BTK que tiene la estructura:



- 20 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Esta composición es normalmente una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de (1) metotrexato y sales del mismo farmacéuticamente aceptables; y (2) un inhibidor de BTK de fórmula (2) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. Esta

- 25 composición es normalmente una composición farmacéutica.
- Las composiciones farmacéuticas se formulan normalmente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación como se describe en el presente documento, es decir, una combinación de metotrexato y un inhibidor de BTK de fórmula (2) como principios activos, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables. Cuando
- 30 se desee, las composiciones farmacéuticas contienen una sal y/o un complejo de coordinación farmacéuticamente aceptable de uno o más de los principios activos. Normalmente, las composiciones farmacéuticas también comprenden uno o más excipientes, vehículos, farmacéuticamente aceptables, incluyendo cargas y diluyentes sólidos inertes, diluyentes, incluyendo una solución acuosa estéril y diversos disolventes orgánicos, potenciadores de infiltración, solubilizantes y coadyuvantes.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente son para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como una combinación de metotrexato y un inhibidor de BTK de fórmula (2). Cuando se desee, en una preparación pueden mezclarse uno o más principios farmacéuticos activos o se pueden formular dos o más componentes de la combinación en preparaciones distintas para su uso en combinación por separado o al mismo tiempo. También se proporciona un kit para su uso en la invención que contiene los componentes de la combinación, formulada en preparaciones distintas para dicho uso.

En una realización, la relación molar del metotrexato con respecto al inhibidor de BTK de fórmula (2) en las composiciones farmacéuticas está en el intervalo de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:20, 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 metotrexato con respecto al inhibidor de BTK de fórmula (2) 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 uno cualquiera o dos de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) proporcionada en las composiciones farmacéuticas para su uso 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 uno cualquiera o dos de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) proporcionada en las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención, es independientemente mayor del 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.

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

En algunas realizaciones, la concentración de uno cualquiera o dos de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) proporcionada en las composiciones farmacéuticas está independientemente en el intervalo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 4,5 %, de aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 4 %, de aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 3,5 %, de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 2,5 %, de aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 1,5 %, de aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,9 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la cantidad de uno cualquiera o dos de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) proporcionada en las composiciones farmacéuticas es independientemente igual a 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 uno cualquiera o dos de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) proporcionada en las composiciones farmacéuticas es independientemente mayor que 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,

Tanto el metotrexato como el inhibidor de BTK de fórmula (2) son eficaces en un amplio rango de dosificación. Por ejemplo, en el tratamiento de seres humanos adultos, las dosificaciones que varían independientemente de 0,01 a 1000 mg, de 0,5 a 100 mg, de 1 a 50 mg al día, y de 5 a 40 mg al día, son ejemplos de dosificaciones que pueden usarse. La dosificación exacta dependerá de la vía de administración, de la forma en la que se administra el compuesto, del género y de la edad del sujeto que se va a tratar, del peso corporal del sujeto que se va a tratar, y de la preferencia y experiencia del médico tratante.

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 metotrexato y un inhibidor de BTK de fórmula (2) y un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición farmacéutica sólida para administración oral que contiene: (i) una cantidad eficaz de cada uno de metotrexato y un inhibidor de BTK de fórmula (2) en combinación y (ii) un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. En algunas realizaciones, la composición contiene además (iii) una cantidad eficaz de un tercer o cuarto principio farmacéutico activo.

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

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención, adecuadas para la administración oral, pueden presentarse como formas de dosificación diferenciadas, tales como cápsulas, sobres, comprimidos, líquidos, pulverizaciones de aerosol, conteniendo cada uno de ellos una cantidad predeterminada de un principio activo en forma de 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 reconstituir, polvos para consumo oral, frascos (que incluyen polvos o líquidos en un frasco), películas que se disuelven por vía oral, pastillas para chupar, pastas, tubos, gomas y envases. Dichas formas de dosificación pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos de farmacia, aunque todos los métodos incluyen la etapa de asociar el/los principio(s) activo(s) con el vehículo, que constituye uno o más principios necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente el/los principio(s) activo(s) con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, de manera opcional con uno o más principios auxiliares. Los comprimidos creados por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma que fluye libremente, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un excipiente tal como, pero sin limitación, un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte, y/o un agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos creados por moldeo pueden prepararse moldeando 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 y formas de dosificación anhidras ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, en las técnicas farmacéuticas se puede añadir agua (por ejemplo, al 5 %) como un medio de simulación de la conservación a largo plazo para determinar características tales como la vida útil o la estabilidad de las formulaciones a lo largo del tiempo. Para su uso en la invención, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras pueden prepararse usando principios anhidros o que contienen baja condensación y condiciones de baja condensación o baja humedad. Para su uso en la invención, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen lactosa pueden hacerse anhidras si se espera un contacto sustancial con la condensación y/o la humedad durante la fabricación, el envasado y/o la

conservación. Una composición farmacéutica anhidra se puede preparar y conservar de manera que se mantenga su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras se pueden envasar usando materiales que se sabe que impiden la exposición al agua de manera que se pueden incluir en kits de formulación adecuados. Como ejemplos de envases adecuados se incluyen, aunque sin limitación, láminas herméticamente selladas, plásticos o similares, recipientes de dosis unitaria, envases alveolados (de tipo blíster) y envases de tiras.

Tanto el metotrexato como el inhibidor de BTK de fórmula (2) pueden combinarse como principios activos en una mezcla íntima con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas farmacéuticas convencionales de formulación magistral. El vehículo 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 dosificación oral, como vehículo puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como suspensiones, soluciones y elixires) o aerosoles; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y en el caso de preparaciones sólidas orales pueden usarse agentes disgregantes, en algunas realizaciones sin emplear el uso de lactosa. Por ejemplo, como vehículos adecuados se incluyen polvos, cápsulas y comprimidos, con las preparaciones orales sólidas. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar.

Como aglutinantes adecuados para su uso en composiciones y formas de dosificación farmacéuticas se incluyen, aunque sin limitación, almidón de maíz, almidón de patata u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, alginato de sodio, ácido alginico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (p. ej., etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, celulosa microcristalina, y sus mezclas.

Como ejemplos de cargas adecuadas para su uso en las composiciones y formas de dosificación farmacéuticas desveladas en el presente documento se incluyen, aunque sin limitación, talco, carbonato cálcico (por ejemplo, gránulos o polvos), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, y mezclas de los mismos.

En las composiciones para su uso en la invención pueden usarse disgregantes para proporcionar comprimidos que se disgregan cuando se exponen a un entorno acuoso. Demasiado disgregante puede producir comprimidos que se disgregan en el frasco. Demasiado poco puede ser insuficiente para que se produzca la disgregación, alterando así la velocidad y el grado de liberación de los principios activos de la forma de dosificación. Por tanto, puede usarse una cantidad suficiente de disgregante que no sea demasiado pequeña ni demasiado grande como para alterar perjudicialmente la liberación del principio o principios activos para formar las formas de dosificación de los compuestos desvelados en el presente documento. La cantidad de disgregante utilizada puede variar en función del tipo de formulación y modo de administración, y puede ser fácilmente discernible para los expertos en la materia. En la composición farmacéutica puede usarse de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de disgregante o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de disgregante. Los disgregantes que pueden usarse para formar las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación de la invención incluyen, aunque sin limitación, agar-agar, ácido alginico, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polacrilina potásica, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas o mezclas de las mismas.

Los lubricantes que se pueden usar para formar composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, aunque sin limitación, estearato de calcio, estearato de magnesio, estearil fumarato de sodio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato 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, laurato de etilo, agar o mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice de sílice, un aerosol coagulado de sílice sintética, celulosa microcristalina silicificada, o mezclas de los mismos. Opcionalmente, se puede añadir un lubricante en una cantidad de menos de aproximadamente 0,5 % o de menos de aproximadamente 1 % (en peso) de la composición farmacéutica.

Cuando se desean suspensiones y/o elixires acuosos para administración oral, el/los principio(s) activo(s) puede(n) combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes y, si así se desea, agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y varias combinaciones de los mismos.

Los comprimidos pueden o no recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y, por tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período de tiempo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal 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 cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o con un medio oleaginoso, por

ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Los tensioactivos que pueden usarse para formar las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, aunque sin limitación, tensioactivos hidrófilos, tensioactivos lipófilos, y sus mezclas. Es decir, se puede emplear una mezcla de tensioactivos hidrófilos, se puede emplear una mezcla de tensioactivos lipófilos, o se puede emplear una mezcla de al menos un tensioactivo hidrófilo y al menos un tensioactivo lipófilo.

Un tensioactivo hidrófilo adecuado puede tener generalmente un valor de HLB de al menos 10, mientras que los tensioactivos lipófilos adecuados pueden tener generalmente un valor de HLB de menos de aproximadamente 10. Un parámetro empírico utilizado para caracterizar la hidrofilia e hidrofobia relativas de los compuestos anfifílicos no iónicos es el equilibrio hidrófilo-lipófilo (valor "HLB", por las siglas del inglés *hydrophilic-lipophilic balance*). Los tensioactivos con valores más bajos de HLB son más lipófilos o hidrófobos y tienen una mayor solubilidad en aceites, mientras que los tensioactivos con valores más altos de HLB son más hidrófilos y tienen una mayor solubilidad en soluciones acuosas. Generalmente se considera que los tensioactivos hidrófilos son aquellos compuestos que tienen un valor de HLB mayor que aproximadamente 10, así como los compuestos aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos para los cuales la escala de HLB no es generalmente aplicable. De manera similar, los tensioactivos lipófilos (es decir, hidrófobos) son compuestos que tienen un valor de HLB igual o inferior a aproximadamente 10. Sin embargo, el valor de HLB de un tensioactivo no es más que una guía aproximada que se utiliza generalmente para permitir la formulación de emulsiones industriales, farmacéuticas y cosméticas.

Los tensioactivos hidrófilos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos iónicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, 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 éster de ácidos grasos de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; acilactilatos; ésteres de ácido tartárico mono y diacetilado 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 tensioactivos iónicos incluyen, por ejemplo: lecitinas, lisolecitina, fosfolípidos, lisofosfolípidos y derivados de los mismos; sales de éster de ácidos grasos de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; acilactilatos; ésteres de ácido tartárico mono y diacetilado de mono y diglicéridos; mono y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

Los 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 lactílicos de ácidos grasos, estearoil-2-lactilato, lactilato de estearoil, 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 tensioactivos hidrófilos no iónicos pueden incluir, pero sin limitación, alquilglucósidos; alquilmaltosidos; alquiltioglucoídos; lauril macroglicéridos; polioxialquilenos alquil éteres tales como polietilenglicol alquil éteres; polioxialquilenos alquilfenoles tales como polietilenglicol alquilfenoles; ésteres de ácidos grasos de polioxialquilenos alquil fenol tales 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 polioxialquilenos sorbitán tales como ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán; productos de transesterificación hidrófila de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos, y esteroides; polioxietileno esteroides, derivados, y análogos de los mismos; vitaminas polioxietiladas y sus derivados; copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; y mezclas de los mismos; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán y productos de transesterificación hidrófila 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 tensioactivos hidrófilos no iónicos incluyen, sin limitación, PEG-10 laurato, PEG-12 laurato, PEG-20 laurato, PEG-32 laurato, PEG-32 dilaurato, PEG-12 oleato, PEG-15 oleato, PEG-20 oleato, PEG-20 dioleato, PEG-32 oleato, PEG-200 oleato, PEG-400 oleato, PEG-15 estearato, PEG-32 diestearato, PEG-40 estearato, PEG-100 estearato, PEG-20 dilaurato, PEG-25 trioleato de glicerilo, PEG-32 dioleato, PEG-20 laurato de glicerilo, PEG-30 laurato de glicerilo, estearato de glicerilo PEG-20, PEG-20 oleato de glicerilo, PEG-30 oleato de glicerilo, PEG-30 laurato de glicerilo, PEG-40 laurato de glicerilo, PEG-40 aceite de almendra de palma, PEG-50 aceite de ricino hidrogenado, PEG-40 aceite de ricino, PEG-35 aceite de ricino, PEG-60 aceite de ricino, PEG-40 aceite de ricino hidrogenado, PEG-60 aceite de ricino hidrogenado, PEG-60 aceite de maíz, PEG-6 caprato/caprilato glicéridos, PEG-8 caprato/caprilato glicéridos, poligliceril-10 laurato, PEG-30 colesterol, PEG-25 fitoesterol, PEG-30 esteroide de soja, PEG-20 trioleato, PEG-40 oleato de sorbitán, PEG-80 laurato de sorbitán, polisorbato 20, polisorbato 80, POE-9 lauril éter, POE-23 lauril

éter, POE-10 oleil éter, POE-20 oleil éter, POE-20 estearil éter, PEG-100 succinato de tocoferilo, PEG-24 colesterol, oleato de poliglicerilo-10, Tween 40, Tween 60, monoestearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, serie PEG 10-100 nonilfenol, serie PEG 15-100 octilfenol, y poloxámeros.

- 5 Los tensioactivos lipófilos adecuados incluyen, a modo de ejemplo solamente: alcoholes grasos; ésteres de ácidos grasos de glicerol; ésteres de ácidos grasos de glicerol acetilado; ésteres de ácidos grasos de alcohol inferior; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos de sorbitano; poli(ésteres de ácidos grasos de sorbitán y etilenglicol); esteroides y derivados de esteroles; esteroides polioxietilados y derivados de esteroles; poli(ésteres alquílicos de etilenglicol); ésteres de azúcar; éteres de azúcar; derivados de ácido láctico de mono y diglicéridos; productos de transesterificación hidrófoba 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 vitamínicos solubles en aceite; y mezclas de los mismos. Dentro de este grupo, los tensioactivos lipófilos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos de glicerol, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, y sus mezclas, o son productos de transesterificación hidrófoba de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados y triglicéridos.

- En una realización, para garantizar una buena solubilización y/o disolución del compuesto para su uso en la presente invención y para minimizar la precipitación del compuesto para su uso en la presente invención, la composición puede incluir un solubilizante. Esto puede ser especialmente importante para composiciones de uso no oral, por ejemplo, composiciones inyectables. También se puede añadir un solubilizante para aumentar la solubilidad del fármaco hidrófilo y/o de otros componentes, tales como tensioactivos, o para conservar la composición como una solución o dispersión estable u homogénea.

- Los ejemplos de solubilizantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: alcoholes y polioles, tales como etanol, isopropanol, butanol, alcohol bencílico, etilenglicol, propilenglicol, butanodiolos e isómeros de los mismos, glicerol, pentaeritritol, sorbitol, manitol, transcitol, dimetil isosorbida, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa 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 éter de PEG de alcohol tetrahidrofurfurílico o metoxi PEG; amidas y otros compuestos que contienen nitrógeno tales como 2-pirrolidona, 2-piperidona,  $\epsilon$ -caprolactama, N-alquilpirrolidona, N-hidroxiálquilpirrolidona, N-alquilpiperidona, N-alquilcaprolactama, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona; ésteres tales como propionato de etilo, citrato de tributilo, trietilcitrato de acetilo, tributilcitrato de acetilo, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, butirato de etilo, triacetina, monoacetato de propilenglicol, diacetato de propilenglicol,  $\epsilon$ -caprolactona y sus isómeros,  $\delta$ -valerolactona y sus isómeros,  $\beta$ -butirolactona y sus isómeros; y otros solubilizantes conocidos en la técnica, tales como dimetil acetamida, dimetil isosorbida, N-metil pirrolidonas, monooctanoína, dietilenglicol monoetil éter, y agua.

- También se pueden usar mezclas de solubilizantes. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, triacetina, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxietilpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilciclodextrinas, etanol, polietilenglicol 200-100, glicofulol, transcitol, propilenglicol y dimetil isosorbida. Los solubilizantes particularmente preferidos incluyen sorbitol, glicerol, triacetina, alcohol etílico, PEG-400, glicofulol y propilenglicol.

- La cantidad de solubilizante que se puede incluir no está particularmente limitada. La cantidad de un solubilizante determinado puede limitarse a una cantidad bioaceptable, que puede determinar fácilmente un experto en la materia. En algunas circunstancias, puede ser ventajoso incluir cantidades de solubilizantes muy superiores a las cantidades bioaceptables, por ejemplo para maximizar la concentración del fármaco, eliminando el exceso de solubilizante antes de proporcionar la composición a un paciente utilizando técnicas convencionales, tales como destilación o evaporación. Por tanto, en caso de estar presente, el solubilizante puede estar en una relación en peso de 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, o de hasta aproximadamente 200 % en peso, basándose en el peso combinado del fármaco y de otros excipientes. Si se desea, también se pueden usar cantidades muy pequeñas de solubilizante, tal como un 5 %, 2 %, 1 % o incluso menores. Normalmente, el solubilizante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 100 %, más normalmente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % en peso.

- La composición puede incluir además uno o más aditivos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos aditivos y excipientes incluyen, sin limitación, separadores, agentes antiespumantes, agentes tamponantes, polímeros, antioxidantes, conservantes, agentes quelantes, viscomoduladores, tónicos, aromatizantes, colorantes, odorantes, opacificantes, agentes de suspensión, aglutinantes, cargas, plastificantes, lubricantes, y mezclas de los mismos.

- Además, se puede incorporar un ácido o una base a 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 cálcico, 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, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y similares.

También son adecuadas bases que son sales de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido acético, ácido acrílico, ácido adípico, ácido algínico, 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, ácido úrico, y similares. También pueden usarse sales de ácidos polipróticos, tales como fosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico y dihidrogenofosfato sódico. Cuando la base es una sal, el catión puede ser cualquier catión conveniente y farmacéuticamente aceptable, tal como amonio, metales alcalinos y metales alcalinotérreos. Como ejemplos se puede incluir, pero sin limitación, 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, ácido fosfórico y similares. 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 el uso de una composición farmacéutica para inyección que contiene la combinación de metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2), y un excipiente farmacéutico adecuado para inyección. Los componentes y las cantidades de agentes en las composiciones son como se describen en el presente documento.

Las formas en las que las composiciones para su uso en la presente divulgación pueden incorporarse para administración por inyección incluyen suspensiones acuosas u oleaginosas, o emulsiones, 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.

También se usan convencionalmente soluciones acuosas en solución salina para inyección. También puede emplearse etanol, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido (y mezclas adecuadas de los mismos), derivados de ciclodextrina y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, para conservar el tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede llevarse a cabo con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) en las cantidades necesarias en el disolvente apropiado con diversos otros principios enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros principios necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, determinados métodos de preparación deseables son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier principio adicional deseado, a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

#### Composiciones farmacéuticas para suministro por vía tópica

En realizaciones preferidas, para el suministro por vía transdérmica, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica que contiene la combinación de metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2), y un excipiente farmacéutico adecuado para el suministro por vía transdérmica.

Para su uso en la presente invención, las composiciones pueden formularse en preparaciones en forma sólida, semisólida o líquida adecuadas para la administración local o tópica, tales como geles, jaleas solubles en agua, cremas, lociones, suspensiones, espumas, polvos, suspensiones acuosas, pomadas, soluciones, aceites, pastas, supositorios, pulverizadores, emulsiones, soluciones salinas, soluciones basadas en dimetilsulfóxido (DMSO). En general, los vehículos con densidades más altas son capaces de proporcionar una zona con una exposición prolongada a los principios activos. En cambio, una formulación en solución puede proporcionar una exposición más inmediata del principio activo en la zona elegida.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes adecuados de fase sólida o de gel, que son compuestos que permiten una mayor penetración de las moléculas terapéuticas a través de la barrera de permeabilidad del estrato córneo de la piel, o que ayudan a su suministro. Las personas con formación en la técnica saben que existen muchas de estas moléculas potenciadoras de la penetración. Los ejemplos de dichos vehículos y

excipientes incluyen, aunque sin limitación, humectantes (p. ej., urea), glicoles (p. ej., propilenglicol), alcoholes (p. ej. etanol), ácidos grasos (p. ej., ácido oleico), tensioactivos (p. ej., miristato de isopropilo y lauril sulfato de sodio), pirrolidona, monolaurato de glicerol, sulfóxidos, terpenos (p. ej., mentol), aminas, amidas, alcanos, alcoholes, agua, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Otra formulación ilustrativa para su uso en la presente invención emplea dispositivos de suministro transdérmico ("parches"). Dichos parches transdérmicos se pueden usar para proporcionar infusión continua o discontinua de la combinación de metotrexato e inhibidores de BTK de fórmula (2) en cantidades controladas, con o sin otro principio farmacéutico activo.

En la técnica se conocen bien la construcción y el uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.023.252; 4.992.445 y 5.001.139. Dichos parches pueden construirse para el suministro continuo, pulsátil o a demanda de los agentes farmacéuticos.

#### Composiciones farmacéuticas para inhalación

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos, farmacéuticamente aceptables. Como se ha descrito anteriormente, las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, para obtener un efecto local o sistémico, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal. Preferentemente, las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse usando de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar unido a una mascarilla facial o a un respirador con presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferentemente, por vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada. Para proporcionar el suministro inhalado de las composiciones, también pueden usarse inhaladores de polvo seco.

#### Otras composiciones farmacéuticas

También pueden prepararse composiciones farmacéuticas a partir de las composiciones descritas en el presente documento y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para administración sublingual, bucal, rectal, intraósea, intraocular, intranasal, administración epidural o intraespinal. En la técnica se conocen bien preparaciones para dichas composiciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Anderson, Philip O.; Knoben, James E.; Troutman, William G, eds., Handbook of Clinical Drug Data, décima edición, McGraw-Hill, 2002; y Pratt y Taylor, eds., Principles of Drug Action, tercera edición, Churchill Livingstone, N.Y., 1990.

La administración de la combinación de metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2) o la composición farmacéutica de estos compuestos, se puede efectuar mediante cualquier método que permita el suministro de los compuestos al sitio de acción. Estos métodos incluyen vías orales, vías intraduodenales, inyección parenteral (incluyendo intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o por infusión), tópica (p. ej., aplicación transdérmica), administración rectal, mediante suministro local por catéter o *stent* o a través de inhalación. La combinación de compuestos también se puede administrar por vía intraadiposa o intratecal.

Las composiciones para su uso en la invención también pueden suministrarse a través de un dispositivo impregnado o recubierto, tal como un *stent*, por ejemplo, o un polímero cilíndrico insertado en la arteria. Dicho método de administración puede, por ejemplo, ayudar en la prevención o mejora de la restenosis después de procedimientos tales como angioplastia con globo. Sin limitarse a la teoría, los compuestos para su uso en la invención pueden ralentizar o inhibir la migración y la proliferación de las células de músculo liso en la pared arterial que contribuyen a la restenosis. Para su uso en la invención, un compuesto puede administrarse, por ejemplo, mediante suministro local a partir de los pilares de un *stent*, de un injerto de *stent*, de injertos o de la cubierta o funda de un *stent*. En algunas realizaciones, un compuesto para su uso en la invención se mezcla con una matriz. Dicha matriz puede ser una matriz polimérica y puede servir para unir el compuesto con el *stent*. Las matrices poliméricas adecuadas para dicho uso, incluyen, por ejemplo, poliésteres o copoliésteres a base de lactona tales como polilactida, glicólido de policaprolactona, poliortoésteres, polianhídridos, poliaminoácidos, polisacáridos, polifosfacenos, copolímeros de poli(éter-éster) (por ejemplo, PEO-PLLA); polidimetilsiloxano, poli(etileno-acetato de vinilo), polímeros o copolímeros a base de acrilato (p. ej., polihidroxietil metacrilato de metilo, polivinilpirrolidinona), polímeros fluorados tales como politetrafluoroetileno y ésteres de celulosa. Las matrices adecuadas pueden degradarse o no con el tiempo, liberando el compuesto o los compuestos. La combinación de metotrexato e inhibidores de BTK de fórmula (2) se puede aplicar a la superficie del *stent* mediante varios métodos, tales como recubrimiento por inmersión/centrifugación, revestimiento por pulverización, recubrimiento por inmersión y/o recubrimiento con brocha. Los compuestos se pueden aplicar en un disolvente y se puede dejar que el disolvente se evapore, formando así una capa de compuesto sobre el *stent*. Como alternativa, el compuesto puede colocarse 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* y se pone en contacto con la pared arterial. Dichos *stents* pueden prepararse sumergiendo, en un disolvente adecuado, un *stent* fabricado que contenga en dichos microporos o microcanales, una solución del compuesto para su uso en la invención, seguido de la evaporación del

disolvente. El exceso de fármaco en la superficie del *stent* puede eliminarse mediante un lavado adicional rápido con disolvente. Incluso en otras realizaciones, los compuestos para su uso en la invención pueden unirse de manera covalente a un *stent* o injerto. Se puede usar un enlazador covalente que degrade *in vivo*, conduciendo a la liberación del compuesto para uso en la invención. Para dicha finalidad puede usarse cualquier enlace biolábil, tal como enlaces de éster, amida o anhídrido. La combinación de metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2) se puede administrar adicionalmente por vía intravascular desde un globo usado durante una angioplastia. La administración extravascular de la combinación de metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2) a través del pericardio o mediante aplicación adventicia de formulaciones para uso en la invención, también se puede realizar para disminuir la restenosis.

Las formas de administración parenteral ilustrativas incluyen soluciones o suspensiones de compuesto activo en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Si se desea, dichas formas de dosificación pueden tamponarse adecuadamente.

La invención también proporciona kits como los definidos anteriormente para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. Los kits incluyen, en un envase adecuado, cada uno de metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2), en solitario o en combinación, y material escrito que puede incluir instrucciones de uso, análisis de estudios clínicos y una lista de efectos secundarios. Dichos kits también pueden incluir información, tal como referencias de bibliografía científica, materiales del prospecto del envase, resultados de ensayos clínicos y/o resúmenes de estos y similares, que indican o establecen las actividades y/o las ventajas de la composición, y/o que describen la dosificación, la administración, los efectos secundarios, las interacciones farmacológicas u otra información útil para el personal sanitario. Dicha información puede basarse en los resultados de varios estudios, por ejemplo, estudios que utilizan animales de laboratorio que implican modelos *in vivo* y estudios basados en ensayos clínicos en seres humanos. El kit puede contener además otro principio farmacéutico activo. En realizaciones seleccionadas, el metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2) y otro principio farmacéutico activo se proporcionan como composiciones distintas en recipientes distintos dentro del kit. En realizaciones seleccionadas, el metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2) y el agente, se proporcionan como una sola composición dentro de un recipiente en el kit. En la técnica se conocen envases y artículos adicionales adecuados para su uso (p. ej., una copa medidora para preparaciones líquidas, envoltorios de papel de aluminio para minimizar la exposición al aire y similares) y pueden incluirse en el kit. Los kits descritos en el presente documento se pueden proporcionar, comercializar y/o publicitar a personal sanitario, incluidos los médicos, personal de enfermería, farmacéuticos, funcionarios encargados de las listas de medicamentos y similares. En realizaciones seleccionadas, los kits también pueden comercializarse directamente al consumidor.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, que comprende (1) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y (2) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BTK de fórmula (2) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones son normalmente composiciones farmacéuticas. El kit es para la coadministración del metotrexato y del inhibidor de BTK de fórmula (2), ya sea simultáneamente o por separado.

Los kits descritos anteriormente se utilizan en el tratamiento de la artritis reumatoide.

#### Dosificaciones y regímenes de dosificación

Las cantidades de inhibidor de BTK de fórmula (2) y de metotrexato administradas, dependerán del ser humano o mamífero que se esté tratando, de la gravedad del trastorno o afección, de la tasa de administración, de la disposición de los compuestos y del criterio del médico prescriptor. Sin embargo, una dosis eficaz de cada uno de ellos, está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal al día, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis individuales o divididas. Para un ser humano de 70 kg, esto equivaldría a aproximadamente de 0,05 a 7 g/día, tal como aproximadamente de 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día. En algunos casos, niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos mencionados anteriormente, pueden ser más que adecuados, mientras que, en otros casos, se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial, por ejemplo, dividiendo dichas dosis mayores en varias dosis pequeñas para la administración a lo largo del día. La dosificación de inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato se puede proporcionar en unidades de mg/kg de masa corporal o en mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal. En una realización, la relación entre la dosis de metotrexato y la dosis del inhibidor de BTK de fórmula (2) en mg/kg o en mg/m<sup>2</sup>, está en el intervalo de 10:1 a 1:10, preferentemente de 2,5:1 a 1:2,5 y más preferentemente de aproximadamente 1:1. En una realización, la relación entre metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) en mg/kg o en mg/m<sup>2</sup>, 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 de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) se administra en una sola dosis. Dicha administración puede ser por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, para introducir rápidamente el metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2). Sin embargo, según sea apropiado, pueden usarse otras vías, incluida la vía oral preferida. Para el tratamiento de una afección aguda, también puede usarse una sola dosis de la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2).

En algunas realizaciones, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) se administra en dosis múltiples. En una realización preferida, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2) se administra en dosis múltiples. La dosificación puede ser una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, o más de seis veces al 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 de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra aproximadamente de una vez al día a aproximadamente 6 veces al día. En algunas realizaciones, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra una vez al día, mientras que, en otras realizaciones, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra dos veces al día, y en otras realizaciones, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra tres veces al día.

La administración de los principios farmacéuticos activos puede continuar tanto tiempo como sea necesario. En realizaciones seleccionadas, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 o 28 días. En algunas realizaciones, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra durante menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días. En realizaciones seleccionadas, la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), se administra crónicamente de manera continua, p. ej., para el tratamiento de efectos crónicos. En otra realización, la administración de la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), 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, se logra una dosificación continua y se mantiene durante todo el tiempo que sea necesario.

En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de un inhibidor de BTK de fórmula (2) desvelado en el presente documento, está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 90 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 45 mg a aproximadamente 55 mg, de aproximadamente 48 mg a aproximadamente 52 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg, de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 90 mg a aproximadamente 110 mg, de aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, de aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, de aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, de aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg o de aproximadamente 198 a aproximadamente 202 mg. En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de un inhibidor de BTK de fórmula (2) desvelado en el presente documento, es de 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 de aproximadamente 250 mg.

En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de un inhibidor de BTK de fórmula (2) desvelado en el presente documento, está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, de aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 2,15 mg/kg, de aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1,15 mg/kg, de aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,55 mg/kg a aproximadamente 0,85 mg/kg, de aproximadamente 0,65 mg/kg a aproximadamente 0,8 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, de aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, de aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, de aproximadamente 1,3 mg/kg a aproximadamente 1,6 mg/kg, de aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, de aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, de aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, de aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, de aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg o de aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de un inhibidor de BTK de fórmula (2) desvelado en el presente documento, 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 de aproximadamente 3,6 mg/kg.

En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de metotrexato está en el rango de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 45 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 23 mg a aproximadamente 28 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg, de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 90 mg a aproximadamente 110 mg, o de aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, de aproximadamente 98 mg a aproximadamente 102 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, de aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, de aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, de aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg o de aproximadamente 198 a aproximadamente 207 mg. En algunas realizaciones, una dosis eficaz de metotrexato es de 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 de aproximadamente 250 mg.

En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de metotrexato está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, de aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,7 mg/kg, de aproximadamente 0,07 mg/kg a aproximadamente 0,65 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, de aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, de aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, de aproximadamente 1,3 mg/kg a aproximadamente 1,6 mg/kg, de aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 1,4 mg/kg a aproximadamente 1,45 mg/kg, de aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, de aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, de aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, de aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, de aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg o de aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosificación eficaz de metotrexato 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 de aproximadamente 3,6 mg/kg.

En algunas realizaciones, una combinación de un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato, se administra a una dosificación de 10 a 200 mg dos veces al día, incluyendo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 mg dos veces al día, para el inhibidor de BTK de fórmula (2), y de 10 a 200 mg dos veces al día, incluyendo 25, 50, 75, 100, 150 o 200 mg dos veces al día para el metotrexato.

En algunas realizaciones, una combinación de un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato, se administra a una dosificación de 10 a 200 mg dos veces al día, incluyendo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o 150 mg dos veces al día, para el inhibidor de BTK de fórmula (2), y de 1 a 500 mg dos veces al día, incluyendo 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500 mg dos veces al día para el inhibidor de metotrexato.

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

Una cantidad eficaz de la combinación de metotrexato e inhibidor de BTK de fórmula (2), puede administrarse en dosis únicas o múltiples mediante cualquiera de los modos de administración aceptados de agentes que tienen utilidades similares, incluyendo la vía rectal, bucal, intranasal y transdérmica, mediante inyección intraarterial, por vía intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, oral, tópica, o como una inhalación.

#### Tratamiento de la inflamación, Trastornos inmunitarios y autoinmunitarios y otras enfermedades

Las composiciones y combinaciones de inhibidores descritas anteriormente pueden usarse en el tratamiento de trastornos y enfermedades mediados por BTK. Específicamente, la presente invención proporciona composiciones y combinaciones descritas en el presente documento para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

La eficacia de los métodos, compuestos y combinaciones de los compuestos descritos en el presente documento, en el tratamiento, la prevención y/o la gestión de las enfermedades o trastornos indicados, puede someterse a ensayo usando varios modelos animales conocidos en la técnica. La eficacia en el tratamiento, la prevención y/o la gestión de

la artritis (p. ej., artritis reumatoide o psoriásica), se puede evaluar usando los modelos animales autoinmunitarios descritos, por ejemplo, en Williams, *et al.*, Chem. Biol. 2010, 17, 123-34, y en los documentos WO 2009/088986, WO 2009/088880 y WO 2011/008302.

#### 5 Uso en el tratamiento de pacientes intolerantes a episodios hemorrágicos

En realizaciones seleccionadas, la invención proporciona composiciones y combinaciones para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un ser humano sensible o intolerante a episodios hemorrágicos, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BTK de fórmula (2), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

#### Combinaciones de inhibidores de BTK, compuestos antifolato y anticuerpos anti-CD20

El inhibidor de BTK con un compuesto antifolato para uso en la presente invención, también puede coadministrarse de forma segura con anticuerpos inmunoterapéuticos tales como los anticuerpos anti-CD20 rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab e ibritumomab, y o fragmentos de unión a antígeno, derivados, conjugados, variantes y complejos marcados con radioisótopos de los mismos. En una realización, las combinaciones anteriores presentan efectos sinérgicos que pueden dar como resultado una mayor eficacia, menos efectos secundarios, el uso de un principio farmacéutico menos activo para obtener un resultado clínico determinado u otros efectos sinérgicos.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 se clasifican como de tipo I o tipo II, como se describe en Klein, *et al.*, mAbs 2013, 5, 22-33. Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de tipo I se caracterizan por su unión con el epítipo de clase I, por la localización de CD20 en balsas lipídicas, por una alta citotoxicidad dependiente del complemento, por una capacidad de unión completa, por una agregación homotípica débil y una inducción moderada de muerte celular. Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de tipo II se caracterizan por su unión con el epítipo de clase I, por carecer de localización de CD20 en balsas lipídicas, por una baja citotoxicidad dependiente del complemento, por una capacidad de unión reducida a la mitad, por una agregación homotípica y una inducción de muerte celular fuerte. Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 tanto de Tipo I como de Tipo II, presentan citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) y, por tanto, son útiles con el inhibidor de BTK de fórmula (2) descrito en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de tipo I incluyen, pero sin limitación, rituximab, ocrelizumab y ofatumumab. Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de tipo II incluyen, pero sin limitación, obinutuzumab y tositumomab. En una realización, los métodos anteriores presentan efectos sinérgicos que pueden dar como resultado una mayor eficacia, menos efectos secundarios, el uso de un principio farmacéutico menos activo para obtener un resultado clínico determinado u otros efectos sinérgicos.

En una realización, la invención proporciona combinaciones y composiciones para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un ser humano, comprendiendo el uso la etapa de administrar a dicho ser humano un inhibidor de BTK de fórmula (2) y una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y metotrexato, y comprendiendo además la etapa de administrar 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 un complejo del mismo marcado con radioisótopos.

En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) con metotrexato, y el anticuerpo monoclonal anti-CD20, se administran secuencialmente. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) con metotrexato, y el anticuerpo monoclonal anti-CD20, se administran simultáneamente. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) con metotrexato, se administran antes que el anticuerpo monoclonal anti-CD20. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) con metotrexato, se administran después del anticuerpo monoclonal anti-CD20. En realizaciones seleccionadas, las combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) con metotrexato y el anticuerpo monoclonal anti-CD20, se administran durante el mismo período de tiempo, y la administración del inhibidor de BTK de fórmula (2) continúa después de finalizar 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 un complejo del mismo marcado con radioisótopos. El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano 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 está compuesto por dos cadenas pesadas de 451 aminoácidos y dos cadenas ligeras de 213 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de rituximab se expone en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras de rituximab se expone en la SEQ ID NO: 2. El rituximab está disponible en el comercio y sus propiedades y uso en el cáncer y en otras enfermedades, se describen con más detalle en Rastetter, *et al.*, Ann. Rev. Med. 2004, 55, 477-503 y en Plosker y 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 de más del 90 % con la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 90 % con la SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 95 % con la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia

de cadena ligera de más del 95 % con la SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 98 % con la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 98 % con la SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 99 % con la SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 99 % con la SEQ ID NO: 2.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es obinutuzumab, o un fragmento de unión al antígeno, derivado, conjugado, variante, o un complejo del mismo marcado con radioisótopos. El obinutuzumab también se conoce como afutuzumab o GA-101. El obinutuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD20. La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de obinutuzumab se expone en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras de obinutuzumab se expone en la SEQ ID NO: 4. El obinutuzumab está disponible en el comercio y sus propiedades y uso en el cáncer y en 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 de más del 90 % con la SEQ ID NO: 3. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 90 % con la SEQ ID NO: 4. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 95 % con la SEQ ID NO: 3. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 95 % con la SEQ ID NO: 4. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 98 % con la SEQ ID NO: 3. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 98 % con la SEQ ID NO: 4. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 99 % con la SEQ ID NO: 3. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 99 % con la SEQ ID NO: 4. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20, obinutuzumab, es un dímero de inmunoglobulina G1, anti-(antígeno CD20 de linfocitos B humanos (antígeno de superficie B1 de linfocitos B con 4 dominios transmembrana, de la subfamilia A, miembro 1, Leu-16 o Bp35), anticuerpo de cadena pesada  $\gamma$ 1 con puentes disulfuro en (222-219') de obinutuzumab des-CH3107-K monoclonal de ratón humanizado con cadena ligera  $\kappa$ , con puentes bisdisulfuro en (228-228":231-231") de obinutuzumab monoclonal de ratón humanizado.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es ofatumumab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante, o un complejo del mismo marcado con radioisótopos. El ofatumumab se describe en Cheson, J. Clin. Oncol. 2010, 28, 3525-30. La estructura cristalina del fragmento Fab de ofatumumab se ha indicado en la referencia 3GIZ del banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*) y en Du, *et al.*, Mol. Immunol. 2009, 46, 2419-2423. El ofatumumab está disponible en el comercio y su preparación, propiedades y uso en cáncer y otras enfermedades se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos N.º 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 de más del 90 % con la SEQ ID NO: 5. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable de más del 90 % con la SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable de más del 95 % con la SEQ ID NO: 5. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable de más del 95 % con la SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable de más del 98 % con la SEQ ID NO: 5. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable de más del 98 % con la SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada variable de más del 99 % con la SEQ ID NO: 5. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera variable de más del 99 % con la SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada del fragmento Fab de más del 90 % con la SEQ ID NO: 7. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera del fragmento Fab de más del 90 % con la SEQ ID NO: 8. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada del fragmento Fab de más del 95 % con la SEQ ID NO: 7. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera del fragmento Fab de más del 95 % con la SEQ ID NO: 8. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada del fragmento Fab de más del 98 % con la SEQ ID NO: 7. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera del fragmento Fab de más del 98 % con la SEQ ID NO: 8. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada del fragmento Fab de más del 99 % con la SEQ ID NO: 7. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera del fragmento Fab de más del 99 % con la SEQ ID NO: 8. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 monoclonal, ofatumumab, es un dímero de inmunoglobulina G1, anti-(antígeno CD20 de linfocitos B humanos) (antígeno de superficie B1 de linfocitos B con 4 dominios transmembrana, de la subfamilia A, miembro 1, Leu-16 o Bp35); anticuerpo de cadena pesada  $\gamma$ 1 con puentes disulfuro en (225-214') de ofatumumab-CD20 monoclonal humano con cadena ligera  $\kappa$  con puentes bisdisulfuro en (231-231":234-234") de ofatumumab-CD20 monoclonal humano.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es veltuzumab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante, o un complejo del mismo marcado con radioisótopos. 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 de más del 90 % con la SEQ ID NO: 9. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 90 % con la SEQ ID NO: 10. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 95 % con la SEQ ID NO: 9. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 95 % con la SEQ ID NO: 10. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 98 % con la SEQ ID NO: 9. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 98 % con la SEQ ID NO: 10. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 99 % con la SEQ ID NO: 9. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 99 % con la SEQ ID NO: 10. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20, ofatumumab, es un dímero de inmunoglobulina G1, anti-(antígeno CD20 de linfocitos B humanos (miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios transmembrana, Leu-16, Bp35)); [218-arginina, 360-ácido glutámico, 362-metionina]monoclonal humanizado de ratón con cadena pesada  $\gamma$ 1 hA20 con puentes disulfuro en (224-213') con cadena ligera  $\kappa$  hA20 con puentes bisdisulfuro en (230-230":233-233") monoclonal humanizado de ratón.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es tositumomab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante, o un complejo del mismo marcado con radioisótopos. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es tositumomab marcado con  $^{131}\text{I}$ . 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 de más del 90 % con la SEQ ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 90 % con la SEQ ID NO: 12. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 95 % con la SEQ ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 95 % con la SEQ ID NO: 12. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 98 % con la SEQ ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 98 % con la SEQ ID NO: 12. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 99 % con la SEQ ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 99 % con la SEQ ID NO: 12.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es ibritumomab, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante, o un complejo del mismo marcado con radioisótopos. La forma activa de ibritumomab usada en terapia es ibritumomab tiuxetán. Cuando se usa con ibritumomab, el quelante tiuxetán (ácido dietilentriaminopentaacético) forma un complejo con un isótopo radiactivo tal como  $^{90}\text{Y}$  o  $^{111}\text{In}$ . En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es ibritumomab tiuxetán, o un complejo del mismo marcado con radioisótopos. 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 de más del 90 % con la SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 90 % con la SEQ ID NO: 14. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 95 % con la SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 95 % con la SEQ ID NO: 14. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 98 % con la SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 98 % con la SEQ ID NO: 14. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena pesada de más del 99 % con la SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 tiene una identidad de secuencia de cadena ligera de más del 99 % con la SEQ ID NO: 14.

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 del mismo marcados con radioisótopos, se administra a un sujeto infundiendo 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 aumenta cuando se administra a intervalos posteriores administrados mensualmente. Por ejemplo, la primera infusión puede suministrar 300 mg de anticuerpo anti-CD20, y las dosis semanales posteriores podrían suministrar 2000 mg de anticuerpo anti-CD20 durante ocho semanas, seguido de dosis mensuales de 2.000 mg de anticuerpo anti-CD20. Durante cualquiera de las realizaciones anteriores, los inhibidores de BTK de fórmula (2) con metotrexato pueden administrarse diariamente, dos veces al día, o a diferentes intervalos como se describe anteriormente, a las dosificaciones descritas anteriormente.

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, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab o ibritumomab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-CD20 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab o ibritumomab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-CD20 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-CD20 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab o ibritumomab. El anticuerpo anti-CD20 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, tositumomab o ibritumomab. En algunas realizaciones, el biosimilar comprende uno o más excipientes seleccionados de tris-clorhidrato, cloruro de sodio, manitol, ácido pentético, polisorbato 80, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

Las secuencias del anticuerpo anti-CD20 a las que se hace referencia anteriormente se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1. Secuencias del anticuerpo anti-CD20.

| Identificador                                              | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)                       |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1<br>cadena pesada de<br>rituximab              | QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYNHWVVKQT PGRGLEWIGA IYPGNGDTSY 60   |
|                                                            | NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST YGGDWYFNV WGAGTIVTVS 120   |
|                                                            | AASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAAAGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180  |
|                                                            | SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKEP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PFCPAPELLG 240 |
|                                                            | GPSVFLFPPK PKDILMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300  |
|                                                            | NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD 360  |
|                                                            | ELTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 |
|                                                            | WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451                                 |
|                                                            |                                                                        |
|                                                            |                                                                        |
| SEQ ID NO: 2<br>cadena ligera de<br>rituximab              | QIVLSQSPAI LSASPGKEVT MTRASSSVS YIHWFQKQPG SSPKPWIYAT SNLASGVPVR 60    |
|                                                            | FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW TSNPTIFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120  |
|                                                            | DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYLSLSTLT 180   |
|                                                            | SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213                               |
| SEQ ID NO: 3<br>cadena pesada de<br>obinutuzumab           | QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDITY 60   |
|                                                            | NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVIYWG QGTLVTVSSA 120 |
|                                                            | STKGPSVFLP APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTISW NSGALTSGVH TFPAPVLQSSG 180 |
|                                                            | LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP 240  |
|                                                            | SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300  |
|                                                            | TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL 360  |
|                                                            | TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ 420  |
|                                                            | QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449                                    |
|                                                            |                                                                        |
|                                                            |                                                                        |
| SEQ ID NO: 4<br>cadena ligera de<br>obinutuzumab           | DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL LHSNGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLV 60   |
|                                                            | SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVG YYCAQNLELP YTFGGGKVE IKRTVAAPSV 120   |
|                                                            | FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL 180    |
|                                                            | SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC 219                         |
| SEQ ID NO: 5<br>cadena pesada<br>variable de<br>ofatumumab | EVQLVESGGG LVQPGRSRLR SCAASGFTFN DYAMHWVRQA PGKGLEWVST ISWNSGSGIGY 60  |
|                                                            | ADSVKGRFTI SRDNAKKSly LQMNSLRAED TALYYCAKDI QYGNYYYGMD VWGQGTTIVT 120  |
|                                                            | SS 122                                                                 |

(continuación)

| Identificador                                                       | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra) |                           |                          |                          |                          |                           |            |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------|
| SEQ ID NO: 6<br>cadena ligera<br>variable de<br>ofatumumab          | EIVLTQSPAT<br>RFGSGSGTDT                         | LSLSPGERAT<br>FTLTISSELEP | LSCRASQSVS<br>EDFAVYYCQQ | SYLAWYQQKP<br>RSNWPITFGQ | GQAPRLLIYD<br>GTRLEIK    | ASNRATGIPA                | 60<br>107  |
| SEQ ID NO: 7<br>cadena pesada<br>del fragmento Fab<br>de ofatumumab | EVQLVESGGG<br>ADSVKGRFTI                         | LVQPGRSLRL<br>SRDNAKKSLEY | SCAASGFTFN<br>LQMNSLRAED | DYAMHWVRQA<br>TALYYCAKDI | PGKGLEWVST<br>QYGNYYYGMD | ISWNSGSIGY<br>VWGQGTITVTV | 60<br>120  |
|                                                                     | SSASTKGPSV<br>SSGLYSLSV                          | FPLAPGSSKS<br>VTVPSSSLGT  | TSGTAALGCL<br>QTYICNVNHK | VKDYFPEPVT<br>PSNTKVDKKV | VSWNSGALTS<br>EP         | GVHTFPAVLQ                | 180<br>222 |
| SEQ ID NO: 8<br>cadena ligera del<br>fragmento Fab de<br>ofatumumab | EIVLTQSPAT<br>RFGSGSGTDT                         | LSLSPGERAT<br>FTLTISSELEP | LSCRASQSVS<br>EDFAVYYCQQ | SYLAWYQQKP<br>RSNWPITFGQ | GQAPRLLIYD<br>GTRLEIKRTV | ASNRATGIPA<br>AAPSVFIFFP  | 60<br>120  |
|                                                                     | SDEQLKSGTA<br>LSKADYEKHK                         | SVVCLLNNFY<br>VYACEVTHQG  | PREAKVQWKV<br>LSSPVTKSFN | DNALQSGNSQ<br>R          | ESVTEQDSKD               | STYLSSTLT                 | 180<br>211 |
| SEQ ID NO: 9<br>cadena pesada de<br>veltuzumab                      | QVQLQQSGAE<br>NQKFKGKATL                         | VKKPGSSVKV<br>TADSTNTAY   | SCKASGYTFT<br>MELSSLRSED | SYNMHWVKQA<br>TAFYYCARST | PGQGLEWIGA<br>YGGDWYFDV  | IYPGMGDTSY<br>WGQGTITVIVS | 60<br>120  |
|                                                                     | SASTKGPSVF<br>SGLYSLSVSV                         | PLAPSSKSTS<br>TVPSSSLGTQ  | GGTAALGCLV<br>TYICNVNHKE | KDYFPEPVT<br>SNTKVDKRV   | SWNSGALTSG<br>PKSCDKTHIC | VHTFPAVLQS<br>PPCPAPPELLG | 180<br>240 |
|                                                                     | GPSTVFLFPK<br>NSTYRVVSVL                         | PKDTLMISRT<br>TVLHQDWLNG  | PEVTCVVVDV<br>KEYCKVSNK  | SHEDPEVKFN<br>ALPAIEKTI  | WYVDGVEVHN<br>SKAKGQPREP | AKTKPREEQY<br>QVYTLPPSRE  | 300<br>360 |
|                                                                     | EMTKNQVSLT<br>WQQGNVFCSS                         | CLVKGFYPSD<br>VMHEALHNHY  | IAVEWESNGQ<br>TQKSLSLSPG | PENNYKTIPT<br>K          | VLDSDGSFLL               | YSKLTVDKSR                | 420<br>451 |
| SEQ ID NO: 10<br>cadena ligera de<br>veltuzumab                     | DIQLTQSPSS<br>FSGSGSGTIDY                        | LSASVGDRVT<br>TFTISSLQPE  | MTCRASSSVS<br>DIATYYCQQW | YIHWFQQKPG<br>TSNPPTFGGG | KAPKPWIYAT<br>TKLEIKRTVA | SNLASGVVPR<br>APSVFIFFPS  | 60<br>120  |
|                                                                     | DEQLKSGTAS<br>SKADYEKHKV                         | VVCLLNNFYF<br>YACEVTHQGL  | REAKVQWKVD<br>SSPVTKSFN  | NALQSGNSQE<br>GEC        | SVTEQDSKDS               | TYSLSSTLT                 | 180<br>213 |
| SEQ ID NO: 11<br>cadena pesada de<br>tositumomab                    | QAYLQQSGAE<br>NQKFKGKATL                         | LVRPGASVKM<br>TVDKSSSTAY  | SCKASGYTFT<br>MQLSSLTSED | SYNMHWVKQT<br>SAVYFCARVV | PRQGLEWIGA<br>YYSNSYWFYD | IYPGNGDTSY<br>VWGTTITVTV  | 60<br>120  |
|                                                                     | SAPSVYPLAP<br>SLSVSVTVPS                         | SSKSTSGGTA<br>SSLGTQTYIC  | ALGCLVKDYF<br>NVNHKPSNTK | PEPVTISWNS<br>VDKKAEPKSC | GALTSGVHTF<br>DKTHTCPPCP | PAVLQSSGLY<br>APELGGPSV   | 180<br>240 |
|                                                                     | FLFPPKPKDT<br>RVVSVLTIVLH                        | LMISRTPEVT<br>QDWLNGKEYK  | CVVVDVSHED<br>CKVSNKALPA | PEVKFNWYVD<br>PIEKTISKAK | GVEVHNAKTK<br>GQPREPQVYT | FREEQYNSTY<br>LPPSRDELTK  | 300<br>360 |
|                                                                     | NQVSLTCLVK<br>NVFSCSVME                          | GFYPSDIAVE<br>ALHNHYTQKS  | WESNGQPENN<br>LSLSPGK    | YKTPPVLDL                | DGSFFLYSKL               | TVDKSRWQQG                | 420<br>447 |
| SEQ ID NO: 12<br>cadena ligera de<br>tositumomab                    | QIVLSQSPA<br>FSGSGSGTSY                          | LSASPGKEKVT<br>SLTISRVEAE | MTCRASSSVS<br>DAATYYCQQW | YMHWYQQKPG<br>SFNPPTFGAG | SSPKPWIYAP<br>TKLELKRTVA | SNLASGVVPR<br>APSVFIFFPS  | 60<br>120  |
|                                                                     | DEQLKSGTAS<br>SKADYEKHKV                         | VVCLLNNFYF<br>YACEVTHQGL  | REAKVQWKVD<br>SSPVTKSFN  | NALQSGNSQE               | SVTEQDSKDS               | TYSLSSTLT                 | 180<br>210 |
| SEQ ID NO: 13<br>cadena pesada de<br>ibritumomab                    | QAYLQQSGAE<br>NQKFKGKATL                         | LVRPGASVKM<br>TVDKSSSTAY  | SCKASGYTFT<br>MQLSSLTSED | SYNMHWVKQT<br>SAVYFCARVV | PRQGLEWIGA<br>YYSNSYWFYD | IYPGNGDTSY<br>VWGTTITVTV  | 60<br>120  |
|                                                                     | SAPSVYPLAP<br>LSSSVTVTSS                         | VCGDTTGSSV<br>TWPSQSITCN  | TLGCLVKGYF<br>VAHPASSTKV | PEPVILTWN<br>DKKIEPRGFT  | GSLSSGVHTF<br>IKPCPPCKCP | PAVLQSDLYT<br>APNLLGGPSV  | 180<br>240 |
|                                                                     | FIFPPKIKDV<br>RVVSALPIQH                         | LMISLSPITV<br>QDWMGKEFK   | CVVVDVSEDD<br>CKVNNKDLPA | PDVQISWVN<br>PIERTISKPK  | NVEVHTAQTQ<br>GSRVAPQVYV | THREDYNSTL<br>LPPPEEMTK   | 300<br>360 |
|                                                                     | KQVTLTICMT<br>NSYSCSVVHE                         | DFMPEDIVYE<br>GLHNHHTTKS  | WINNGKTELN<br>FSR        | YKNTPEVLDL               | DGSYFMYSKL               | RVEKKNWVER                | 420<br>443 |
| SEQ ID NO: 14<br>cadena ligera de<br>ibritumomab                    | QIVLSQSPA<br>FSGSGSGTSY                          | LSASPGKEKVT<br>SLTISRVEAE | MTCRASSSVS<br>DAATYYCQQW | YMHWYQQKPG<br>SFNPPTFGAG | SSPKPWIYAP<br>TKLELKRTVA | SNLASGVVPR<br>APSVFIFFPS  | 60<br>120  |
|                                                                     | DEQLKSGTAS<br>SKADYEKHKV                         | VVCLLNNFYF<br>YACEVTHQGL  | REAKVQWKVD<br>SSPVTKSFN  | NALQSGNSQE               | SVTEQDSKDS               | TYSLSSTLT                 | 180<br>209 |

Combinaciones de inhibidores de BTK, compuestos antifolato e inhibidores de PD-1 y PD-L1

- 5 Las combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) con metotrexato también se pueden combinar con anticuerpos o inhibidores (es decir, bloqueadores) que se unen a la proteína 1 de muerte programada (PD-1), al ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y/o al ligando 2 de muerte programada (PD-L2). En una realización preferida, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 para su uso en combinación con metotrexato y un inhibidor de BTK de fórmula (2), 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 preferida, la invención
- 10 proporciona una combinación o composiciones para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un ser humano que comprende la etapa de administrar a dicho ser humano un inhibidor de BTK de fórmula (2), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y que comprende además la etapa de administrar un inhibidor de PD-1 o PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno, derivado,

conjugado, variante, o biosimilar del mismo. En una realización, el inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (2), o sales del mismo farmacéuticamente aceptables.

La proteína 1 de muerte programada (PD-1) es una proteína receptora transmembrana de puntos de control inmunitario de 288 aminoácidos expresada por células T, células B, linfocitos T citotóxicos 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 seres 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 inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, siglas del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) y un motivo intercambiable inmunorreceptor basado en tirosina (ITSM, *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*). 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 en células estromales, que pueden encontrar las células T activadas que expresan PD-1, lo que conduce a la inmunosupresión de las células T. La proteína PD-L1 es una proteína transmembrana de 290 aminoácidos codificada por el gen *Cd274* en el cromosoma humano 9. El bloqueo de la interacción entre PD-1 y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, usando 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, tales como el descrito en Topalian, *et al.*, N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443-54. PD-L1 se expresa en muchas líneas de células tumorales, mientras que PD-L2 se expresa principalmente en células dendríticas y en algunas líneas tumorales. Además de las células T (que expresan de manera inducible PD-1 después de la activación), PD-1 también se expresa en células B, linfocitos citotóxicos naturales, macrófagos, monocitos activados y células dendríticas.

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 el presente documento en referencia a inhibidores de PD-1. Para evitar dudas, las referencias citadas en el presente documento a un inhibidor de PD-1 que es un anticuerpo, pueden referirse a un compuesto o a fragmentos de unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares de los mismos. Para evitar dudas, las referencias citadas en el presente documento a un inhibidor de PD-1 también pueden referirse a un compuesto o a una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento 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, incluyendo fragmentos Fab, o un fragmento variable monocatenario (scFv) del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo policlonal. En una realización preferida, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 compite por la unión con PD-1 y/o se une a un epítipo en PD-1. En una realización, el anticuerpo compite por la unión con PD-1 y/o se une a un epítipo en PD-1. En algunas realizaciones, en una composición se incluye un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 y además se combina con un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato. En algunas realizaciones, los inhibidores de PD-1 proporcionados en el presente documento son selectivos para PD-1, ya que los compuestos se unen o interactúan con PD-1 en concentraciones sustancialmente más bajas que las que se unen o interactúan con otros receptores.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 100 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 90 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 80 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 70 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 60 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 50 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 40 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 30 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 20 pM o menor, se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 10 pM o menor, o se une a la PD-1 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 1 pM o menor.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $7,5 \times 10^5$  l/M-s o a mayor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $7,5 \times 10^5$  l/M-s o a mayor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $8 \times 10^5$  l/M-s o a mayor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $8,5 \times 10^5$  l/M-s o a mayor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $9 \times 10^5$  l/M-s o a mayor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $9,5 \times 10^5$  l/M-s o a mayor velocidad, o se une a la PD-1 humana con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $1 \times 10^6$  l/M-s o a mayor velocidad.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,1 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,2 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,3 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,4 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana

con una  $k_{\text{disoc}}$  de aproximadamente  $2,6 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad o se une a la PD-1 humana con una  $k_{\text{disoc}}$  de aproximadamente  $2,7 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{\text{disoc}}$  de aproximadamente  $2,8 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{\text{disoc}}$  de aproximadamente  $2,9 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, o se une a la PD-1 humana con una  $k_{\text{disoc}}$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-1 que bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 10 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 9 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 8 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 7 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 6 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 5 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 4 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 3 nM o menor, bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 2 nM o menor, o bloquea o inhibe la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 1 nM o menor.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende nivolumab (también conocido como OPDIVO y disponible en el comercio de Bristol-Myers Squibb Co.), o biosimilares, fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. El nivolumab se denomina 5C4 en la publicación de patente internacional N.º WO 2006/121168. Nivolumab tiene asignado el número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS) 946414-94-4 y también se conoce como BMS-936558, MDX-1106 u ONO-4538. Nivolumab es un anticuerpo de IgG4 completamente humano que bloquea el receptor de PD-1. La seguridad y la eficacia clínica 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 en Weber, *et al.*, J. Clin. Oncology, 2013, 31, 4311-4318. El anticuerpo monoclonal nivolumab incluye una cadena pesada determinada por la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera determinada por la SEQ ID NO: 16. Nivolumab tiene enlaces disulfuro intra cadena pesada en 22-96, 140-196, 254-314, 360-418, 22"-96", 140"-196", 254"-314" y 360"-418"; enlaces disulfuro intra cadena pesada en 23'-88', 134'-194', 23'''-88''', and 134'''-194'''"; enlaces disulfuro inter cadena pesada-ligera en 127-214', 127"-214''', enlaces disulfuro inter cadena pesada-pesada en 219-219" y 222-222"; y sitios de N-glicosilación (H CH<sub>2</sub> 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 la SEQ ID NO: 15 y en la SEQ ID NO: 16, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 15 y en la SEQ ID NO: 16, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a nivolumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es nivolumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es nivolumab. El anticuerpo anti-PD-1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es nivolumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto

biológico de referencia es nivolumab.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las CDR o las regiones variables (VR) de cadena pesada y ligera de nivolumab. En una realización, la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) del anticuerpo anti-PD-1 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 17, y la región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) del anticuerpo anti-PD-1 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 18. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende las regiones V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21, respectivamente, y dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo desvelado y/o preparado de acuerdo con la patente de Estados Unidos N.º 8.008.449 o con las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0217401 A1 o 2013/0133091 A1. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo monoclonal incluye 5C4 (denominado en el presente documento nivolumab), 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, descritos en la patente de Estados Unidos N.º 8.008.449. Todos los anticuerpos anti-PD-1, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11, que están dirigidos contra la PD-1 humana, se unen específicamente a PD-1 y no se unen a otros miembros de la familia CD28. Las secuencias y regiones CDR de estos anticuerpos se proporcionan en la patente de Estados Unidos N.º 8.008.449, en particular en la Figura 1 a la Figura 12 de la misma.

El anticuerpo anti-PD-1 nivolumab se puede preparar mediante el siguiente procedimiento, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 8.008.449. Los protocolos de inmunización utilizaron como antígeno (i) una proteína de fusión recombinante que comprende la parte extracelular de PD-1 y (ii) PD-1 de longitud completa unida a la membrana. Ambos antígenos se generaron mediante métodos de transfección recombinante en una línea celular CHO. Usando la cepa HCo7 de ratones transgénicos HuMab y la cepa KM de ratones transgénicos cromosómicos, se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos contra PD-1, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen endógeno de cadena ligera kappa de ratón se había alterado homocigotamente como se describe en Chen, *et al.* EMBO J. 1993, 12, 811-820 y el

gen endógeno de cadena pesada de ratón se había alterado homocigotamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación de patente internacional N.º WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón lleva un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild, *et al.* Nat. Biotechnology 1996, 14, 845-851. La cepa HCo7 lleva el transgén de cadena pesada humana de HCo7 como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. La cepa KM contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la publicación de patente internacional N.º WO 02/43478. Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra PD-1, se inmunizaron ratones HuMab y KM Mice™ con la proteína de fusión PD-1 recombinante purificada y células CHO transfectadas con PD-1 como antígeno. Los esquemas generales de inmunización para ratones HuMab se describen en Lonberg, *et al.*, Nature 1994, 368, 856-859; Fishwild, *et al.*, Nat. Biotechnology 1996, 14, 845-851 y en la publicación de patente internacional N.º WO 98/24884. Los ratones tenían entre 6 y 16 semanas de vida tras la primera infusión de antígeno. Para inmunizar a los ratones HuMab y KM Mice™, se usó una preparación recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno de la proteína de fusión PD-1 y 5-10×10<sup>6</sup> células, por vía intraperitoneal, subcutánea (Sc) o mediante inyección en las almohadillas plantares. Los ratones transgénicos se inmunizaron dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante Ribi, IP (intraperitoneal), 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 mediante hemorragias retroorbitales. El plasma se exploró mediante ensayo ELISA (como se describe más adelante) y para las fusiones se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-PD-1. Los ratones se recibieron inyecciones de refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y de la extracción del bazo. Normalmente, se realizaron 10-35 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno. Para seleccionar ratones HuMab y KM Mice™ productores de anticuerpos que se unan a PD-1, los sueros de los ratones inmunizados se analizaron mediante ELISA como describen Fishwild, *et al.*, Nat. Biotechnology 1996, 14, 845-851. Resumiendo, 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/pocillo y se incubaron a 4 °C durante la noche y después se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero bovino fetal al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). A cada pocillo uno de los pocillos se añadieron diluciones de sueros de ratones inmunizados con PD-1 y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después del lavado, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron con un espectrofotómetro a una DO de 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 a continuación y los sobrenadantes de hibridomas se analizaron mediante un ensayo ELISA para determinar la actividad anti-PD-1. Los esplenocitos de ratón, aislados de los de ratones HuMab o KM, se fusionaron a una línea celular de mieloma de ratón usando PEG basado en protocolos estándar o electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión celular de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). A continuación, los hibridomas resultantes se exploraron con respecto a la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Suspensiones de células individuales de esplenocitos de ratones inmunizados se fusionaron con PEG al 50 % (Sigma) a una cuarta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581). Las células se sembraron en placas a una densidad de aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup>/pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene suero bovino fetal al 10 %, medio acondicionado P388D1 al 10 % (ATCC, CRL TIB-63), origen al 3-5 % (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alto contenido en glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) y HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y 1 × HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en un medio en el que el HAT se reemplazó por HT. A continuación, se exploraron los pocillos individuales mediante ELISA (descrito anteriormente) para detectar anticuerpos de IgG monoclonales anti-PD-1 humanos. Una vez que se produce el crecimiento extenso del hibridoma, el medio se controló normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se volvieron a sembrar en placa, se exploraron de nuevo y, si seguían siendo positivos con respecto a la IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 se subclonaban al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, para una caracterización adicional, los subclones estables se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular. El anticuerpo nivolumab puede producirse de esta manera, o por otros medios conocidos, dada la divulgación de las secuencias de aminoácidos del presente documento.

En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende pembrolizumab (también conocido como KEYTRUDA), que está disponible en el comercio de Merck, o fragmentos de unión a antígeno, conjugados o variantes de los mismos. Al anticuerpo pembrolizumab se le asigna 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 N.º WO 2008/156712 A1, en la patente de Estados Unidos N.º 8.354.509 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 y US 2013/0109843 A2. Pembrolizumab tiene una estructura de dímero de inmunoglobulina G4, anti-(proteína humana PDCD1 (proteína 1 de muerte celular programada)) (cadena pesada monoclonal de ser humano-*Mus musculus*), con enlaces disulfuro con cadena ligera monoclonal de ser humano-*Mus musculus*. La estructura de pembrolizumab también puede describirse como un dímero de inmunoglobulina G4, anti-(proteína 1 de muerte celular programada humana); cadena pesada γ4[228-L-prolina(H10-S>P)] monoclonal de ratón humanizado con enlaces disulfuro en (134-218') con cadena ligera κ monoclonal de ratón humanizada con enlaces bisdisulfuro en (226-226''-229-229''). La seguridad y la eficacia clínica de pembrolizumab en diversas formas de cáncer se describen 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 pembrolizumab incluye una cadena pesada determinada por la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera determinada por la SEQ ID NO: 26, e incluye los siguientes puentes 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 glicosilación (N): Asn-297 y Asn-297". Pembrolizumab es un anticuerpo de isotipo IgG4/kappa con una mutación estabilizadora S228P en la región Fc; la inserción de esta mutación en la región bisagra de la IgG4 impide la formación de hemimoléculas que normalmente se observan en los anticuerpos de IgG4. Pembrolizumab se glicosila heterogéneamente en Asn297 dentro del dominio Fc de cada cadena pesada, produciendo un peso molecular de aproximadamente 149 kDa para el anticuerpo intacto. La glicofoma dominante de pembrolizumab es la forma de glicano diantenario agalacto fucosilada (G0F).

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 25 y en la SEQ ID NO: 26, 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, cada de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, 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, cada de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, 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, cada de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, 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, cada de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, 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, cada de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a pembrolizumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pembrolizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pembrolizumab. El anticuerpo anti-PD-1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pembrolizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pembrolizumab.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las CDR o las VR de cadena pesada y ligera de pembrolizumab. En una realización, la región V<sub>H</sub> del anticuerpo anti-PD-1 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 27 y la región V<sub>L</sub> del anticuerpo anti-PD-1 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 28. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 99 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 98 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 97 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 96 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 95 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente. En una realización alternativa, el anticuerpo comprende regiones V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 27 y/o SEQ ID NO: 28, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, respectivamente, y dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33

y SEQ ID NO:34, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo desvelado en la patente de Estados Unidos N.º 8.354.509 o en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2010/0266617 A1, 2013/0108651 A1 y 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 desvela en la patente de Estados Unidos N.º 8.686.119 B2. La eficacia de pidilizumab en el tratamiento de cánceres, tales como neoplasias hemáticas, se describe en Berger, *et al.*, Clin. Cancer Res. 2008, 14, 3044-51. El anticuerpo monoclonal pidilizumab incluye una cadena pesada determinada por la SEQ ID NO: 35 y una cadena ligera determinada por la SEQ ID NO: 36. Pidilizumab tiene enlaces disulfuro intra cadena pesada en 22-96, 144-200, 261-321, 367-425, 22"-96", 144"-200", 261"-321" y 367"-425"; enlaces disulfuro intra cadena ligera en 23'-87', 133'-193', 23'''-87''' y 133'''-193'''; enlaces disulfuro inter cadena pesada-ligera en 220-213' y 220"-213", enlaces disulfuro inter cadena pesada-pesada en 226-226" 229-229"; y sitios de N-glicosilación (H CH<sub>2</sub> 84,4) en 297, 297".

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo de inmunoglobulina G1 kappa, anti-(CD274 humano) monoclonal humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a pidilizumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pidilizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de

un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pidilizumab. El anticuerpo anti-PD-1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pidilizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es pidilizumab.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 99 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 98 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 97 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 96 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 95 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente.

En una realización, los anticuerpos anti-PD-1 y otros inhibidores de PD-1 incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 8.287.856, 8.580.247 y 8.168.757 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 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 por unirse a PD-1. En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo desvelado en la patente de Estados Unidos N.º 8.735.553 B1.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal disponible en el comercio, como los clones anti-m-PD-1 J43 (Cat n.º BE0033-2) y RMP1-14 (Cat n.º BE0146) (Bio X Cell, Inc., Libano occidental, NH, USA). Los expertos en la materia conocen diversos anticuerpos anti-PD-1 disponibles en el comercio.

Los anticuerpos monoclonales que inhiben o bloquean la PD-1 pueden prepararse mediante procedimientos conocidos por expertos habituales conocedores e instruidos en la materia, por ejemplo, inyectando PD-1 a los sujetos de ensayo y después aislando los hibridomas que expresen los anticuerpos que tengan la secuencia o las características funcionales deseadas. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales 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 producirían la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. En las referencias citadas anteriormente pueden encontrarse detalles de la producción recombinante de anticuerpos específicos. Los anticuerpos monoclonales que inhiben a PD-1 pueden prepararse mediante métodos de biología molecular estándar usando las secuencias proporcionadas en el presente documento mediante traducción inversa e inserción en vectores de ADN o ARN apropiados.

En una realización, el inhibidor de PD-1 puede ser una molécula o un péptido de pequeño tamaño, o un derivado peptídico, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 8.907.053; 9.096.642; y 9.044.442 y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2015/0087581; compuestos y derivados de 1,2,4-oxadiazol tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2015/0073024; derivados y compuestos cíclicos peptidomiméticos tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2015/0073042; compuestos y derivados cíclicos tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2015/0125491; compuestos y derivados de 1,3,4-oxadiazol y 1,3,4-tiadiazol, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/033301; compuestos y derivados basados en péptidos tales como los descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/036927 y WO 2015/04490, o compuestos y derivados basados en péptidos macrocíclicos tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2014/0294898.

En la Tabla 2 se resumen las secuencias de los anticuerpos anti-PD-1 comentados y mencionados en algunas de las realizaciones.

TABLA 2. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-PD-1.

| Identificador                                        | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra) |             |             |             |             |             |     |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| SEQ ID NO: 15<br>cadena pesada de nivolumab          | QVQLVESGGG                                       | VVQPGRSRLRL | DKKASGITFS  | NSGMHWVRQA  | PGKGLEWVAV  | IWYDGSKRYY  | 60  |
|                                                      | ADSVKGRFTI                                       | SRDNSKNILF  | LQMNSLRAED  | TAVYYCATND  | DYWGQGTLVT  | VSSASTKGPS  | 120 |
|                                                      | VFPLAPCSRS                                       | TSESTAALGC  | LVKDYFPEPV  | TVSWNSGALT  | SGVHTFPAVL  | QSSGLYSLSS  | 180 |
|                                                      | VVTVPSSSLG                                       | TKTYTCNVDH  | KPSNFKVDKR  | VESKYGPPCP  | PCPAPEFLGG  | PSVFLFPPKP  | 240 |
|                                                      | KDTLMISRTP                                       | EVTCVVVDVS  | QEDPEVQFNW  | YVDGVEVHNA  | KTKPREEQFN  | STYRVVSVLT  | 300 |
|                                                      | VLHQDWLNGK                                       | EYKCKVSNKG  | LPSSIEKTIIS | KAKGQPREPQ  | VYTLPPSQEE  | MTKNQVSLTC  | 360 |
|                                                      | LVKGFYPSDI                                       | AVEWESNGQP  | ENNYKTTPPV  | LDSDGSFFLY  | SRLTVDKSRW  | QEGNVFSCSV  | 420 |
|                                                      | MHEALHNHYT                                       | QKSLSLSLGK  |             |             |             |             | 440 |
|                                                      |                                                  |             |             |             |             |             |     |
|                                                      |                                                  |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 16<br>cadena ligera de nivolumab          | EIVLTQSPAT                                       | LSLSPGERAT  | LSCRASQSVS  | SYLAWYQQKP  | GQAPRLLIYD  | ASNRATGIPA  | 60  |
|                                                      | RFSGSGSGTD                                       | FTLTISSELP  | EDFAVYYCQQ  | SSNWPRTFGQ  | GTKVEIKRTV  | AAPSVFIIPP  | 120 |
|                                                      | SDEQLKSGTA                                       | SVVCLLNIFY  | PREAKVQWKV  | DNALQSGNSQ  | ESVTEQDSKD  | STYLSLSTLT  | 180 |
|                                                      | LSKADYEKHK                                       | VYACEVTHQG  | LSSPVTKSFN  | RGEC        |             |             | 214 |
| SEQ ID NO: 17<br>cadena pesada variable de nivolumab | QVQLVESGGG                                       | VVQPGRSRLRL | DKKASGITFS  | NSGMHWVRQA  | PGKGLEWVAV  | IWYDGSKRYY  | 60  |
|                                                      | ADSVKGRFTI                                       | SRDNSKNILF  | LQMNSLRAED  | TAVYYCATND  | DYWGQGTLVT  | VSS         | 113 |
| SEQ ID NO: 18<br>cadena ligera variable de nivolumab | EIVLTQSPAT                                       | LSLSPGERAT  | LSCRASQSVS  | SYLAWYQQKP  | GQAPRLLIYD  | ASNRATGIPA  | 60  |
|                                                      | RFSGSGSGTD                                       | FTLTISSELP  | EDFAVYYCQQ  | SSNWPRTFGQ  | GTKVEIK     |             | 107 |
| SEQ ID NO: 19<br>CDR1 de cadena pesada de nivolumab  | NSGMH 5                                          |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 20<br>CDR2 de cadena pesada de nivolumab  | VIWYDGSKRY YADSVKG 17                            |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 21<br>CDR3 de cadena pesada de nivolumab  | NDDY 4                                           |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 22<br>CDR1 de cadena ligera de nivolumab  | RASQSVSSYL A 11                                  |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 23<br>CDR2 de cadena ligera de nivolumab  | DASNRAT 7                                        |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 24<br>CDR3 de cadena ligera de nivolumab  | QQSSNWPRT 9                                      |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 25<br>cadena pesada de pembrolizumab      | QVQLVQSGVE                                       | VKKPGASVKV  | SKKASGYTFT  | NYMYWVRQA   | PGQGLEWMGG  | INPSNGGTNF  | 60  |
|                                                      | NEKFKNRVTL                                       | TTDSSTTTAY  | MELKSLQFDD  | TAVYYCARRD  | YRFDMGFDYW  | GQGTITVTVSS | 120 |
|                                                      | ASTKGPSVFP                                       | LAPCSRSTSE  | STAALGCLVK  | DYFPEPVTIS  | WNSGALTSGV  | HTFPAVLQSS  | 180 |
|                                                      | GLYSLSSVVT                                       | VPSSSLGTKT  | YTCNVDHKPS  | NTKVDKRVES  | KYGPPCPPCP  | APEFLGGPSV  | 240 |
|                                                      | FLFPPKPKDT                                       | LMISRTPEVT  | CVVVDVSQED  | PEVQFNWYVD  | GVEVHNAKTK  | PREEQFNSTY  | 300 |
|                                                      | RVVSVLTVLH                                       | QDWLNGKEYK  | CKVSNKGLPS  | SIEKTIISKAK | GQPREPQVYT  | LPPSQEEMTK  | 360 |
|                                                      | NQVSLTCLVK                                       | GFYPSDIAVE  | WESNGQPENN  | YKTTTPVLDL  | DGSFFLYSRL  | TVDKSRWQEG  | 420 |
|                                                      | NVVFSCSVME                                       | ALHNHYTQKS  | LSLSLGK     |             |             |             | 447 |
|                                                      |                                                  |             |             |             |             |             |     |
|                                                      |                                                  |             |             |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 26<br>cadena ligera de pembrolizumab      | EIVLTQSPAT                                       | LSLSPGERAT  | LSCRASKGVS  | TSGYSYLHWY  | QQKPGQAPRL  | LIYLASYLES  | 60  |
|                                                      | GVPARFSGSG                                       | SGTDFTLTIS  | SLEPEDFAVY  | YCQHSRDLEL  | TFGGGTKEVEI | KRTVAAPSVF  | 120 |
|                                                      | IFPPSDEQLK                                       | SGTASVCLL   | NNFYPREAKV  | QWKVDNALQS  | GNSQESVTEQ  | DSKDSYSLSL  | 180 |
|                                                      | STLTLSKADY                                       | EKHVYACEV   | THQGLSSPVT  | KSFNRGEC    |             |             | 218 |

(continuación)

| Identificador                                                  | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 27<br>cadena pesada<br>variable de<br>pembrolizumab | QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60<br>NEKFKNRVTL TTDSSITTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTIVVSS 120                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 28<br>cadena ligera<br>variable de<br>pembrolizumab | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60<br>GVPARFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLP LTFGGGKVEI K 111                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 29<br>CDR1 de cadena<br>pesada de<br>pembrolizumab  | NYMY 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 30<br>CDR2 de cadena<br>pesada de<br>pembrolizumab  | GINPSNGGTN FNEKFK 16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 31<br>CDR3 de cadena<br>pesada de<br>pembrolizumab  | RDYRFDMGFD Y 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 32<br>CDR1 de cadena<br>ligera de<br>pembrolizumab  | RASKGVSTSG YSYLH 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 33<br>CDR2 de cadena<br>ligera de<br>pembrolizumab  | LASYLES 7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 34<br>CDR3 de cadena<br>ligera de<br>pembrolizumab  | QHSRDLP L 9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 35<br>cadena pesada de<br>pidilizumab               | QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW INTDSGESTY 60<br>AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG YDALDYWGQG TLVTVSSAST 120<br>KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY 180<br>SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV 240<br>FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY 300<br>RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 360<br>NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG 420<br>NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK 447 |
| SEQ ID NO: 36<br>cadena ligera de<br>pidilizumab               | EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT SNLASGVPSR 60<br>FSGSGSGTSY CLTINSLOPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120<br>DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180<br>SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 37<br>cadena pesada<br>variable de<br>pidilizumab   | QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW INTDSGESTY 60<br>AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG YDALDYWGQG TLVTVSS 117                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| SEQ ID NO: 38<br>cadena ligera<br>variable de<br>pidilizumab   | EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT SNLASGVPSR 60<br>FSGSGSGTSY CLTINSLOPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG TKLEIK 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 que se describen con más detalle en los siguientes párrafos. Los términos "inhibidor" y "bloqueador" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a inhibidores de PD-L1 y PD-L2. Para evitar dudas, las referencias citadas en presente documento en referencia a un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 que es un anticuerpo, pueden referirse a un compuesto o a fragmentos de

unión a antígeno, variantes, conjugados o biosimilares de los mismos. Para evitar dudas, las referencias citadas en el presente documento a un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 pueden referirse a un compuesto o a una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

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 de los mismos, incluyendo fragmentos Fab o fragmentos variables monocatenarios (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 un fragmento de los mismos. 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 además se combina con un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato. En algunas realizaciones, se incluye un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 en una composición y además se combina con un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato. En algunas realizaciones, se incluye un inhibidor de PD-L2 en una composición y además se combina con un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato. En algunas realizaciones, se incluye un anticuerpo monoclonal anti-PD-L2 en una composición y además se combina con un inhibidor de BTK de fórmula (2) y metotrexato.

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

35 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, una  $K_D$  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.

40 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  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $7,5 \times 10^5$  1/M-s o a mayor velocidad, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $8 \times 10^5$  1/M-s o a mayor velocidad, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $8,5 \times 10^5$  1/M-s o a mayor velocidad, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humanos con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $9 \times 10^5$  1/M-s o a mayor velocidad, se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $9,5 \times 10^5$  1/M-s y/o a mayor velocidad, o se une a PD-L1 y/o PD-L2 humano con una  $k_{asoc}$  de aproximadamente  $1 \times 10^6$  1/M-s o a mayor velocidad.

50 En algunas realizaciones, las composiciones descritas incluyen un inhibidor de PD-L1 y/o PD-L2 que se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,1 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,2 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,3 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,4 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a la PD-1 humana con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,6 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $2,7 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad, o se une a PD-L1 o PD-L2 humano con una  $k_{disoc}$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-5}$  1/s o a menor velocidad.

60 En algunas realizaciones, las composiciones 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 con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 10 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 9 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 8 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 7 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 6 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 5 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1

humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 4 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 3 nM o menor; bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano con PD-1 humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 2 nM o menor; o bloquea a la PD-1 humana, o bloquea la unión del PD-L1 humano o PD-L2 humano con la PD-1 humana con un  $CI_{50}$  de aproximadamente 1 nM o menor.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es durvalumab, también conocido como MEDI4736 (que está disponible en el comercio de Medimmune, LLC, Gaithersburg, Maryland, una filial 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 desvelado en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108 o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2013/0034559. La eficacia clínica de durvalumab (SEQ ID NO: 403 y SEQ ID NO: 404) se ha descrito en: Page, *et al.*, Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202; Brahmer, *et al.*, J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (suplemento, resumen 8021); y en McDermott, *et al.*, Cancer Treatment Rev., 2014, 40, 1056-64. El anticuerpo monoclonal durvalumab incluye una región  $V_H$  determinada por la SEQ ID NO: 41 (correspondiente a la SEQ ID NO: 72 en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108) y una región  $V_L$  determinada por la SEQ ID NO: 42 (correspondiente a la SEQ ID NO: 77 en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108). El anticuerpo monoclonal durvalumab incluye enlaces 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-glicosilación en Asn-301 y Asn-301".

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un dímero de inmunoglobulina G1, anti-(antígeno CD CD274 humano) (cadena pesada monoclonal humana), con enlaces disulfuro con cadena  $\kappa$  monoclonal humana. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las cadenas pesada y ligera de durvalumab (MEDI4736). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a durvalumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, p. ej., una de identidad de secuencia de 97 %, 98 % 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es durvalumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-L1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es durvalumab. El anticuerpo anti-PD-L1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es durvalumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es durvalumab.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$  que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 41 (correspondiente a la SEQ ID NO: 72 en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108) y la SEQ ID NO: 42 (correspondiente a la SEQ ID NO: 77 en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108), respectivamente, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108 o en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2013/0034559, cuyas divulgaciones se han incorporado como referencia en el presente documento, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, conjugados y variantes de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 98 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y

V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 97 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 96 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 95 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cada una de ellas con una identidad de al menos 90 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 43 SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, respectivamente y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, los anticuerpos anti-PD-L1 y otros inhibidores de PD-L1 incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108 y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2013/0034559A1. En otra realización, también se incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos por unirse a PD-L1.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab, también conocido como MPDL3280A o RG7446 (disponible en el comercio de Genentech, Inc., una filial 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 desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 8.217.149. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo desvelado en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2010/0203056 A1, 2013/0045200 A1, 2013/0045201 A1, 2013/0045202 A1 o 2014/0065135 A1. El anticuerpo monoclonal atezolizumab incluye una cadena pesada determinada por la SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera determinada por la SEQ ID NO: 50. Atezolizumab tiene enlaces disulfuro intra cadena pesada (C23-C104) en 22-96, 145-201, 262-322, 368-426, 22"-96", 145"-201", 262"-322" y 368"-426"; enlaces disulfuro intra cadena ligera (C23-C104) en 23'-88', 134'-194', 23'''-88''' y 134'''-194'''; enlaces disulfuro intra cadena pesada-ligera (h 5-CL 126) en 221-214' y 221"-214'''; enlaces disulfuro intra cadena pesada-pesada (h 11, h 14) en 227-227" y 230-230"; y sitios de N-glicosilación (H CH<sub>2</sub> N84.4>A) en 298 y 298'.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo de inmunoglobulina G1 kappa, anti-(PD-L1 humano) monoclonal humanizado. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las cadenas pesada y ligera de atezolizumab (MPDL3280A). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, respectivamente.

50, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a atezolizumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es atezolizumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-L1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es atezolizumab. El anticuerpo anti-PD-L1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es atezolizumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es atezolizumab.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las CDR o las VR de cadena pesada y ligera de atezolizumab (MPDL3280A). En una realización, la región  $V_H$  del anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 51 (correspondiente a la SEQ ID NO: 20 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149), y la región  $V_L$  del anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 52 (correspondiente a la SEQ ID NO: 21 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 99 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 98 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 97 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas las SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 95 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, 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 viene determinada por la SEQ ID NO: 53 (GFTFSX<sub>1</sub>SWIH) (correspondiente a la SEQ ID NO: 1 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149), la secuencia de CDR2 es la SEQ ID NO: 54 (AWIX<sub>2</sub>PYGGSX<sub>3</sub>YYADSVKG) (correspondiente a la SEQ ID NO: 2 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149) y la secuencia de CDR3 es la SEQ ID NO: 55 (RHWPGGFDY) (correspondiente a la SEQ ID NO: 3 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149) en donde además  $X_1$  es D o G,  $X_2$  es S o L y  $X_3$  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 viene determinada por la SEQ ID NO: 56 (RASQX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>A) (correspondiente a la SEQ ID NO: 8 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149), la secuencia de CDR2 viene determinada por la SEQ ID NO: 57 (SASX<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S) (correspondiente a la SEQ ID NO: 9 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149) y la secuencia de CDR3 es la SEQ ID NO: 58 (QQX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>PX<sub>15</sub>T) (correspondiente a la SEQ ID NO: 10 en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149), en donde además:  $X_4$  es D o V;  $X_5$  es V o I;  $X_6$  es S o N;  $X_7$  es A o F;  $X_8$  es V o L;  $X_9$  es F o T;  $X_{10}$  es Y o A;  $X_{11}$  es Y, G, F o S;  $X_{12}$  es L, Y, F o W;  $X_{13}$  es Y, N, A, T, G, F o I;  $X_{14}$  es H, V, P, T o I; y  $X_{15}$  es A, W, R, P o T.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab, también conocido como MSB0010718C (disponible en el comercio 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 desvelado en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1. El anticuerpo monoclonal avelumab incluye una cadena pesada determinada por la SEQ ID NO: 59 y una cadena ligera determinada por la SEQ ID NO: 60. Avelumab tiene enlaces disulfuro intra cadena pesada (C23-C104) en 22-96, 147-203, 264-324, 370-428, 22"-96", 147"-203", 264"-324" y 370"-428"; enlaces disulfuro intra cadena ligera (C23-C104) en 22'-90', 138'-197', 22'''-90''' y 138'''-197'''; enlaces disulfuro intra cadena pesada-ligera (h 5-CL 126) en 223-215' y 223"-215'''; enlaces disulfuro intra cadena pesada-pesada (h 11, h 14) en 229-229" y 232-232"; sitios de N-glicosilación (H CH<sub>2</sub> N84.4) en 300, 300"; glicanos biantenarios complejos

fucosilados de tipo CHO; y recorte de lisina C-terminal de H CHS K2 en 450 y 450'.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo de inmunoglobulina G1 lambda-1, anti-(PD-L1 humano) monoclonal humano. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende las cadenas pesada y ligera de avelumab (MSB0010718C). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o conjugados de los mismos. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 98 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 97 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 96 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende cadenas pesadas y ligeras, cada de ellas con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a avelumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es avelumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD-L1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es avelumab. El anticuerpo anti-PD-L1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es avelumab. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es avelumab.

En una realización, la región  $V_H$  del anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 61 (correspondiente a la SEQ ID NO: 24 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1) y la región  $V_L$  del anticuerpo anti-PD-L1 comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 62 (correspondiente a la SEQ ID NO: 25 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1). En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 99 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 98 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 97 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 96 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende regiones  $V_H$  y  $V_L$ , cada una de ellas con una identidad de al menos 95 % a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, 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 viene determinada por la SEQ ID NO: 63 (correspondiente a la SEQ ID NO: 15 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1), la secuencia de CDR2 viene determinada por la SEQ ID NO: 64 (correspondiente a SEQ ID NO: 16 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1) y la secuencia de CDR3 viene determinada por la SEQ ID NO: 65 (correspondiente a SEQ ID NO: 17 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 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 viene determinada por la SEQ ID NO: 66 (correspondiente a la SEQ ID NO: 18 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1), la secuencia de CDR2 viene determinada por la SEQ ID NO: 67 (correspondiente a la SEQ ID NO: 19 en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1) y la secuencia de CDR3 viene dada por la SEQ ID NO: 68 (correspondiente a la SEQ ID NO: 20

en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2014/0341917 A1).

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO:63 SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 95 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO:67 y SEQ ID NO:68, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 90 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO:67 y SEQ ID NO:68, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 85 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO:67 y SEQ ID NO:68, respectivamente. En una realización, un anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que comprende dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, cada uno de ellos con una identidad de al menos 80 % con las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO:67 y SEQ ID NO:68, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo compite por la unión con y/o se une al mismo epítipo en PD-L1 que los anticuerpos mencionados anteriormente.

En una realización, los anticuerpos anti-PD-L1 y otros inhibidores de PD-L1 incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2014/0341917 A1. En otra realización, también se incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos por unirse a PD-L1.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, también conocido como BMS-935559, que se desvela en la patente de Estados Unidos N.º US 7.943.743 B2. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona de los anticuerpos anti-PD-L1 desvelados en la patente de Estados Unidos N.º US 7.943.743 B2.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal disponible en el comercio, tal como INVIVOMAB anti-m-PD-L1 clon 10F.9G2 (Catálogo n.º BE0101, Bio X Cell, Inc., Líbano occidental, NH, USA). En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal disponible en el comercio, tal como AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1). Los expertos en la materia conocen diversos anticuerpos anti-PD-L1 disponibles en el comercio.

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

Los anticuerpos monoclonales que inhiben al PD-L1 y/o PD-L2 pueden prepararse mediante procedimientos conocidos por expertos habituales conocedores e instruidos en la materia, por ejemplo, inyectando PD-L1 o PD-L2 a los sujetos de ensayo y después aislando los hibridomas que expresen los anticuerpos que tengan la secuencia o las características funcionales deseadas. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales 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 producirían la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. En las referencias citadas anteriormente pueden encontrarse detalles de la producción recombinante de anticuerpos específicos. Los anticuerpos monoclonales que inhiben a PD-1 pueden prepararse mediante métodos de biología molecular estándar usando las secuencias proporcionadas en el presente documento mediante traducción inversa e inserción en vectores de ADN o ARN apropiados.

En la Tabla 3 se resumen las secuencias de anticuerpos anti-PD-L1 a las que se hace referencia en algunas de las realizaciones anteriores.

TABLA 3. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-PD-L1.

| Identificador                                                    | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra) |            |            |             |             |             |     |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| SEQ ID NO: 39<br>cadena pesada de<br>durvalumab<br>(MEDI4736)    | EVQLVESGGG                                       | LVQPGGSLRL | SCAASGFTFS | RYWMSWVRQA  | PGKGLEWVAN  | IKQDGSEKYY  | 60  |
|                                                                  | VDSVKGRFTI                                       | SRDNAKNSLY | LQMNSLRAED | TAVYYCAREG  | GWFGELAFDY  | WGQGLTVTVS  | 120 |
|                                                                  | SASTKGPSVF                                       | PLAPSSKSTS | GGTAALGCLV | KDYFPEPVT   | SWNSGALTSG  | VHTFPAVLQS  | 180 |
|                                                                  | SGLYSLSSVV                                       | TVPSSSLGTQ | TYICNVNHKP | SNTKVDKRV   | PKSCDKHTC   | PPCPAPEFEG  | 240 |
|                                                                  | GPSVFLFPPK                                       | PKDILMISRT | PEVTCVVDV  | SHEDPEVKFN  | WYVDGVEVHN  | AKTKPREEQY  | 300 |
|                                                                  | NSTYRVVSVL                                       | TVLHQDWLNG | KEYKCKVSNK | ALPASIEKTI  | SKAKGQPREP  | QVYTLPPSRE  | 360 |
|                                                                  | EMTKNQVSLT                                       | CLVKGFYPSD | IAVEWESNGQ | PENNYKTTTP  | VLDSDGSFFL  | YSKLTVDKSR  | 420 |
|                                                                  | WOOGNVFSCS                                       | VMHEALHNHY | TOKSLSLSPG | K           |             |             | 451 |
|                                                                  |                                                  |            |            |             |             |             |     |
|                                                                  |                                                  |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 40<br>cadena ligera de<br>durvalumab<br>(MEDI4736)    | EVQLVESGGG                                       | LVQPGGSLRL | SCAASGFTFS | RYWMSWVRQA  | PGKGLEWVAN  | EIVLTQSPGT  | 60  |
|                                                                  | LSLSPGERAT                                       | LSCRASQRVS | SSYLAWYQQK | PGQAPRLLIY  | DASSRATGIP  | DRFSGSGSGT  | 120 |
|                                                                  | DFTLTISRLE                                       | PEDFAVYYCQ | QYGSLLPWTG | QGTKEVEIKRT | VAAPSVFIFP  | PSDEQLKSGT  | 180 |
|                                                                  | ASVVCLLNNE                                       | YPREAKVQWK | VDNALQSGNS | QESVIEQDSK  | DSITYSLSTL  | TLSKADYEKH  | 240 |
|                                                                  | KVYACEVTHQ                                       | GLSSPVTKSF | NRGEC      |             |             |             | 265 |
| SEQ ID NO: 41<br>cadena pesada<br>variable de<br>durvalumab      | EVQLVESGGG                                       | LVQPGGSLRL | SCAASGFTFS | RYWMSWVRQA  | PGKGLEWVAN  | IKQDGSEKYY  | 60  |
|                                                                  | VDSVKGRFTI                                       | SRDNAKNSLY | LQMNSLRAED | TAVYYCAREG  | GWFGELAFDY  | WGQGLTVTVS  | 120 |
|                                                                  | S                                                |            |            |             |             |             | 121 |
| SEQ ID NO: 42<br>cadena ligera<br>variable de<br>durvalumab      | EIVLTQSPGT                                       | LSLSPGERAT | LSCRASQRVS | SSYLAWYQQK  | PGQAPRLLIY  | DASSRATGIP  | 60  |
|                                                                  | DRFSGSGSGT                                       | DFTLTISRLE | PEDFAVYYCQ | QYGSLLPWTG  | QGTKEVEIK   |             | 108 |
| SEQ ID NO: 43<br>CDR1 de cadena<br>pesada de<br>durvalumab       | RYWMS 5                                          |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 44<br>CDR2 de cadena<br>pesada de<br>durvalumab       | NIKQDGSEKY YVDSVKG 17                            |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 45<br>CDR3 de cadena<br>pesada de<br>durvalumab       | EGGWFGELAF DY 12                                 |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 46<br>CDR1 de cadena<br>ligera de<br>durvalumab       | RASQRVSSSY LA 12                                 |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 47<br>CDR2 de cadena<br>ligera de<br>durvalumab       | DASSRAT 7                                        |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 48<br>CDR3 de cadena<br>ligera de<br>durvalumab       | QQYGSLLPWT 9                                     |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 49<br>cadena pesada de<br>atezolizumab<br>(MPDL3280A) | EVQLVESGGG                                       | LVQPGGSLRL | SCAASGFTFS | DSWIHWVRQA  | PGKGLEWVAN  | ISPYGGSTYY  | 60  |
|                                                                  | ADSVKGRFTI                                       | SADISKNTAY | LQMNSLRAED | TAVYYCARRH  | WPGGFDYWGQ  | GTLTVTVSSAS | 120 |
|                                                                  | TKGPSVFPLA                                       | PSSKSTSGGT | AALGCLVKDY | FPEPVTVSWN  | SGALTSGVHT  | FPAVLQSSGL  | 180 |
|                                                                  | YSLSSVVTVP                                       | SSSLGTQTYI | CNVNHKPSNT | KVDKKVEPKS  | CDKTHTCPPC  | PAPELLGGPS  | 240 |
|                                                                  | VFLFPPKPKD                                       | TLMISRTPEV | TCVVDVDSHE | DPEVKFNWYV  | DGVEVHNAKT  | KPREEQYAST  | 300 |
|                                                                  | YRVVSVLTVL                                       | HQDWLNGKEY | KCKVSNKALP | APIEKTISK   | KGQPREPQVY  | TLPPSREEMT  | 360 |
|                                                                  | KNQVSLTCLV                                       | KGFYPSDIAV | EWESNGQPEN | NYKTTTPVLD  | SDGSFFFLYSK | LTVDKSRWQQ  | 420 |
|                                                                  | GNVFSCSVMH                                       | EALHNHYTQK | SLSLSPGK   |             |             |             | 448 |
|                                                                  |                                                  |            |            |             |             |             |     |
|                                                                  |                                                  |            |            |             |             |             |     |
| SEQ ID NO: 50<br>cadena ligera de<br>atezolizumab<br>(MPDL3280A) | DIQMTQSPSS                                       | LSASVGDRVT | ITCRASQDVS | TAVAWYQQKP  | GKAPKLLIYS  | ASFLYSGVPS  | 60  |
|                                                                  | RFSGSGSGTD                                       | FTLTISLQP  | EDFATYYCQ  | YLYHPATFGQ  | GTKVEIKRTV  | AAPSVFIFPP  | 120 |
|                                                                  | SDEQLKSGTA                                       | SVVCLLNIFY | PREAKVQWKV | DNALQSGNSQ  | ESVTEQDSKD  | STYLSSTLT   | 180 |
|                                                                  | LSKADYEKHK                                       | VYACEVTHOG | LSSPVTKSFN | RGEC        |             |             | 214 |

(continuación)

| Identificador                                                  | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 51<br>cadena pesada<br>variable de<br>atezolizumab  | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAV ISPYGGSTYY 60<br>ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLTVTSA 118                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 52<br>cadena ligera<br>variable de<br>atezolizumab  | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60<br>RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SEQ ID NO: 53<br>CDR1 de cadena<br>pesada de<br>atezolizumab   | GFTFSXSWIH 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 54<br>CDR2 de cadena<br>pesada de<br>atezolizumab   | AWIXPYGGSX YYADSVKG 18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SEQ ID NO: 55<br>CDR3 de cadena<br>pesada de<br>atezolizumab   | RHWPGGFDY 9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 56<br>CDR1 de cadena<br>ligera de<br>atezolizumab   | RASQXXXTXX A 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 57<br>CDR2 de cadena<br>ligera de<br>atezolizumab   | SASXLXS 7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| SEQ ID NO: 58<br>CDR3 de cadena<br>ligera de<br>atezolizumab   | QXXXXXPXT 9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 59<br>cadena pesada de<br>avelumab<br>(MSB0010718C) | EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60<br>ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLTVTVSS 120<br>ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180<br>GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTHCP PCPAPELLGG 240<br>PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300<br>STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360<br>LTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW 420<br>QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450 |
| SEQ ID NO: 60<br>cadena ligera de<br>avelumab<br>(MSB0010718C) | QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60<br>SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGTVTVL GQPKANPTVT 120<br>LFPSPSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180<br>YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTES 216                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 61<br>cadena pesada<br>variable de<br>avelumab      | EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60<br>ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLTVTVSS 120                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 62<br>cadena ligera<br>variable avelumab            | QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60<br>SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGTVTVL 110                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SEQ ID NO: 63<br>CDR1 de cadena<br>pesada de<br>avelumab       | SYIMM 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

(continuación)

| Identificador                                      | Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra) |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 64<br>CDR2 de cadena pesada de avelumab | SIYPSGGITF YADTVKG 17                            |
| SEQ ID NO: 65<br>CDR3 de cadena pesada de avelumab | IKLGTVTTVD Y 11                                  |
| SEQ ID NO: 66<br>CDR1 de cadena ligera de avelumab | TGTSSDVGGY NYVS 14                               |
| SEQ ID NO: 67<br>CDR2 de cadena ligera de avelumab | DVSNRPS 7                                        |
| SEQ ID NO: 68<br>CDR3 de cadena ligera de avelumab | SSYTSSSTRV 10                                    |

La preparación, propiedades y usos de los inhibidores de PD-1 y PD-L1 adecuados, se describen, p. ej., en la patente de Estados Unidos N.º 8.008.449 o en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0217401 A1 o 2013/0133091 A1; en la patente de Estados Unidos N.º 8.354.509 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 y US 2013/0109843 A2; en las patentes de Estados Unidos N.º 8.287.856; 8.580.247 y 8.168.757 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2009/0028857 A1, US 2010/0285013 A1, US 2013/0022600 A1 y US 2011/0008369 A1; en la patente de Estados Unidos N.º 8.779.108 o en publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2013/0034559 A1; en la patente de Estados Unidos N.º 8.217.149 y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2010/0203056 A1, US 2013/0045200 A1, US 2013/0045201 A1, US 2013/0045202 A1 o US 2014/0065135 A1; y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2014/0341917 A1.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, los inhibidores de PD-1 y/o PD-L1 o combinaciones de los mismos, pueden administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración del metotrexato y el inhibidor de BTK de fórmula (2).

En una realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es un anticuerpo monoclonal biosimilar anti-PD-1 o anti-PD-L1 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, durvalumab, atezolizumab o avelumab. En una realización, el biosimilar comprende un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97 %, por ejemplo, una identidad de secuencia de 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, durvalumab, atezolizumab o avelumab. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas realizaciones, el biosimilar es un anticuerpo anti-PD1 o anti-PD-L1 autorizado o presentado para su autorización, en donde el anticuerpo anti-PD1 o anti-PD-L1 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, durvalumab, atezolizumab o avelumab. El anticuerpo anti-PD1 o anti-PD-L1 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de medicamentos como la FDA de los Estados Unidos y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas realizaciones, el biosimilar se proporciona como una composición que además comprende uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, durvalumab, atezolizumab o avelumab. En algunas realizaciones, el biosimilar comprende uno o más excipientes seleccionados de tris-clorhidrato, cloruro de sodio, manitol, ácido pentético, polisorbato 80, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

En una realización, la invención proporciona una combinación o composición para su uso en la artritis reumatoide en un ser humano que comprende la etapa de administrar a dicho ser humano un inhibidor de BTK de fórmula (2), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y metotrexato y además comprende la etapa de administrar un inhibidor

de PD-1 o PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno, derivado, conjugado, variante, complejo marcado con radioisótopos, o biosimilar del mismo. En una realización, 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.

Aunque en el presente documento se muestran y se describen realizaciones preferidas de la invención, dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo y no pretenden limitar de otro modo el alcance de la invención. Se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones descritas de la invención en la práctica de la invención.

## Ejemplos

Las realizaciones incluidas en el presente documento, se describen ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con el propósito de ilustrar y la divulgación incluida en el presente documento no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a estos ejemplos, sino que debe interpretarse que incluye todas y cada una de las variaciones que resulten obviadas como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

### Ejemplo 1: Combinaciones sinérgicas de inhibidores de BTK y Antifolatos

En un modelo de ratón, se analizó el uso *in vivo* del inhibidor de BTK de Fórmula (2) y metotrexato ("MTX") para determinar la eficacia de la combinación para inhibir la inflamación, la destrucción de cartílago, la formación de panículo adiposo y la reabsorción ósea asociada a artritis inducida por colágeno de tipo II. Se anestesiaron ratones DBA/1J con isoflurano y recibieron inyecciones intradérmicas de un total de 100 µl de 2 mg/ml de colágeno de tipo II en 2,5 mg/ml de adyuvante completo de Freund en la base de la cola los días de estudio cero y 21. Los tratamientos con MTX comenzaron el día 18 y los tratamientos con inhibidor de BTK de fórmula (2) comenzaron el día 28 de los animales tratados con vehículo (puntuación de artritis entre 0,5 y 1) y continuaron durante el resto del estudio. El inhibidor de BTK de fórmula (2) de los tratamientos con vehículo se dosificó 6 horas después de la dosificación de MTX.

La fórmula (2) y el MTX se formularon con metilcelulosa al 0,5 % p/v; 4000 cps (DOW, Methocel A4M o equivalente); Polisorbato 80 (Tween 80) al 0,1 % v/v y agua DI o RO. La fórmula (2) se formuló a concentraciones de 0,1 mg/ml y 0,5 mg/ml y el MTX se formuló a 0,03 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,5 mg/ml. El MTX se administró por las mañanas a través de sonda oral (PO) a dosis de 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg QD (una vez al día). Seis horas después, se administró la fórmula (2) a través de sonda oral a dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg QD. Todos los ratones sobrevivieron hasta la finalización del estudio.

Las puntuaciones clínicas diarias se basaron en puntuaciones diarias de las patas, en un cálculo del área bajo la curva (ABC) de la puntuación de las patas a lo largo del tiempo y en la histopatología de las patas traseras, tobillos y, opcionalmente, de las rodillas, las mediciones de peso corporal y el cambio de peso corporal desde el inicio de la dosificación se evaluarán para detectar signos de efectos tóxicos del artículo o artículos de ensayo y/o del vehículo o vehículos. Los días 18-43 del estudio, se determinaron las puntuaciones clínicas diarias de cada pata. La puntuación se basó en los siguientes criterios: 0 = normal; 1= una articulación de la pata trasera y delantera afectada o con eritema difuso mínimo e hinchazón; 2= dos articulaciones de la pata trasera y/o delantera afectadas o con eritema difuso leve e hinchazón; 3= tres articulaciones de la pata trasera y/o delantera afectadas o con eritema difuso moderado e hinchazón; 4= marcado eritema difuso e hinchazón, o articulaciones de cuatro dedos afectadas; 5= fuerte eritema difuso y fuerte hinchazón en toda la pata, incapacidad para flexionar los dedos.

Los días 18-43 del estudio, se dieron puntuaciones clínicas para cada una de las patas (derecha delantera, izquierda delantera, derecha trasera, izquierda trasera). A continuación, se analizaron los datos clínicos de las puntuaciones de las patas (medias para el animal) determinando el área bajo la curva (ABC) de dosificación. El ABC se calculó desde el inicio de la dosificación de MTX (día 18) hasta la finalización del estudio (día 43) y desde el inicio de la dosificación del inhibidor de BTK de fórmula (2) (día 28) hasta la finalización del estudio. Para el cálculo del ABC, las puntuaciones medias diarias de cada ratón se introdujeron en Microsoft Excel y se calculó el área entre los días de tratamiento y el día final. Se determinaron las medias de cada grupo. Para evaluar los datos recopilados en este estudio, se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA de 1 vía) junto con un análisis *a posteriori* de Dunnett o Sidak o una prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) junto con un análisis *a posteriori* de Dunn. Para la validación del modelo, se utilizó una prueba bilateral de la t de Student para comparar controles normales frente a enfermedad. A menos que se indique lo contrario, Bolder BioPATH, Inc. realiza análisis estadísticos sólo con datos en bruto (no transformados). En las pruebas estadísticas se hacen determinadas suposiciones sobre la normalidad y homogeneidad de la varianza, y es posible que se requieran nuevos análisis si las pruebas vulneran estas suposiciones. Los valores de p se redondearon a tres decimales. La significación de todas las pruebas se estableció a un valor de  $p < 0,050$ . El análisis estadístico se realizó usando el programa informático GraphPad de Prism 6.0d. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cambio} = \frac{B}{A} \times 100A = \text{Media normal} - \text{Media de control de la enfermedad donde } B = \text{Media de tratados} - \text{Media de control de la enfermedad}$$

El día de estudio 43, los ratones se sacrificaron y se obtuvieron muestras de necropsia. Después de las hemorragias terminales, los animales se sacrificaron mediante luxación cervical. Se recogieron las patas delanteras, traseras y las rodillas, y se colocaron en formol tamponado neutro (NBF, *neutral buffered formalin*) al 10 % para observar al microscopio. Se extrajeron los bazo de un subconjunto de ratones y se procesaron para determinar los esplenocitos.

Después de 1-2 días en fijador y de 4-5 días en ácido fórmico al 5 % para la descalcificación, los tejidos se recortaron y procesaron para su inclusión en parafina. Las patas se incluyeron en parafina en el plano frontal y las rodillas con la rótula hacia abajo. Los tobillos, si se dejaban unidos a las patas traseras, también se incluían en el plano frontal, pero en algunos casos, con fines especiales, se separaban y se seccionaban en el plano sagital. Normalmente, los pares izquierdo/derecho se incluían en el mismo bloque. A continuación, se cortaron las secciones y se tiñeron con azul de toluidina.

Al puntuar las patas o los tobillos de los ratones con lesiones de artritis inducida por colágeno de tipo II, se tuvo en cuenta la gravedad de los cambios, así como el número de articulaciones individuales afectadas. Cuando solo se encontraban afectadas de una a tres articulaciones de las patas o los tobillos de una posibilidad de numerosas articulaciones metacarpianas/metatarsianas/digitales o tarsianas/tibiotarsianas, se asignaba arbitrariamente una puntuación máxima de 0,5, 1,2 o 3 para los parámetros que se indican a continuación, en función de la gravedad de los cambios. Si estaban implicadas más de tres articulaciones, se aplicaban los criterios que se indican a continuación a la mayoría de las articulaciones más gravemente afectadas. En el caso de las rodillas, se tuvo en cuenta la gravedad de los cambios en la parte media y lateral, así como en los espacios femorrotulianos.

Según los criterios indicados, se puntuaron los siguientes parámetros: puntuación de inflamación, puntuación de panículo adiposo, puntuación de daños en cartílago, puntuación de reabsorción ósea y puntuación y mediciones de formación de nuevo hueso perióstico. A menos que se indique otra cosa, los criterios se aplican tanto a las patas como a las rodillas. Los valores medios de cada parámetro se determinaron independientemente para las patas, rodillas y todo el animal (si corresponde).

La puntuación de la inflamación se determinó basándose en los siguientes criterios para la puntuación de la pata y de la rodilla.

La puntuación de la pata se clasificó basándose los siguientes criterios: 0 = Normal; 0,5 = Muy mínima, afecta solo a 1 articulación o infiltración periarticular multifocal mínima de células inflamatorias; 1 = Infiltración mínima de células inflamatorias en la membrana sinovial y el tejido periarticular de las articulaciones afectadas; 2 = Infiltración leve de células inflamatorias. En lo que respecta a las patas, generalmente se restringe a las articulaciones afectadas (1-3 afectadas); 3 = Infiltración moderada con edema moderado. En lo que respecta a las patas, se restringe a las articulaciones afectadas, generalmente 3-4 articulaciones y la muñeca o el tobillo; 4 = Infiltración marcada que afecta a la mayoría de las áreas con edema marcado, puede haber 1 o 2 articulaciones no afectadas; 5 = Infiltración difusa fuerte con edema grave que afecta a todas las articulaciones (hasta cierto punto) y tejidos periarticulares.

La puntuación de la rodilla se clasificó basándose en los siguientes criterios: 0 = Normal; 0,5 = Muy mínima, afecta solo a un área de la membrana sinovial o infiltración periarticular multifocal mínima de células inflamatorias; 1 = Infiltración mínima de células inflamatorias en la membrana sinovial y el tejido periarticular de las áreas sinoviales afectadas; 2 = Infiltración difusa leve de células inflamatorias; 3 = Infiltración difusa moderada de células inflamatorias; 4 = Infiltración difusa marcada de células inflamatorias; 5 = Infiltración difusa fuerte de células inflamatorias.

El infiltrado inflamatorio en ratones y ratas con artritis inducida por colágeno de tipo II, consiste en neutrófilos y macrófagos con menor número de linfocitos cuando las lesiones se encuentran en la fase aguda a subaguda. El edema tisular y los exudados neutrofilicos dentro del espacio articular son comunes en la fase aguda a subaguda. A medida que la inflamación se va haciendo crónica, predominan las células inflamatorias mononucleares (monocitos, linfocitos) y se produce la proliferación de fibroblastos, a menudo con deposición de matriz metacromática, en la membrana sinovial y el tejido periarticular. El exudado es menos común en el espacio articular. A menos que se indique en la parte de comentarios, el tipo de inflamación varía de aguda a subaguda.

Los ratones DBA tienen una mayor incidencia de dactilitis y onicoperiostitis que afectan al lecho ungueal y a la falange distal, como se indica en Lories, *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 2004, 63, 595-598. Estas lesiones se registraron pero no se incluyeron en la puntuación de inflamación.

La puntuación del panículo adiposo se basó en los siguientes criterios: 0 = Normal; 0,5 = Muy mínima, En el caso de las patas, solo afecta a una articulación en la zona marginal; 1 = Infiltración mínima de panículo adiposo en cartílago y hueso subcondral, zonas marginales. En el caso de las patas, afecta a dos o más articulaciones; 2 = Infiltración leve con destrucción de tejido duro de la zona marginal en las articulaciones afectadas; 3 = infiltración moderada con destrucción moderada de tejido duro en las articulaciones afectadas; 4 = Infiltración marcada con destrucción marcada de la arquitectura articular, afectando a la mayoría de las articulaciones; 5 = Infiltración fuerte asociada a una destrucción total o casi total de la arquitectura articular, afecta a todas las articulaciones.

La puntuación de daños en cartílago se basó en los siguientes criterios: 0 = Normal; 0,5 = Muy mínima = Solo afecta

a zonas marginales de una a varias áreas (rodillas) o articulaciones (patas); 1 = Mínima = En general, la pérdida de tinción con azul de toluidina (proteoglicano) es de mínima a leve, sin pérdida evidente de condrocitos o alteración de colágeno en las articulaciones/áreas afectadas; 2 = Leve = En general, la pérdida de tinción con azul de toluidina (proteoglicano) es mínima con áreas focales de pérdida de condrocitos y/o alteración de colágeno en algunas articulaciones/áreas afectadas. Las patas pueden tener articulaciones de uno o dos dedos con una pérdida casi total o total de cartílago; 3 = Moderada = En general, la pérdida de tinción con azul de toluidina (proteoglicano) es moderada con pérdida de condrocitos multifocales y/o alteración de colágeno en articulaciones/áreas afectadas. Las patas pueden tener tres o cuatro articulaciones con pérdida casi total o total. En la rodilla, queda algo de matriz en cualquier superficie afectada con áreas de pérdida fuerte de matriz; 4 = Marcada = Pérdida marcada de tinción con azul de toluidina (proteoglicano) con pérdida de condrocitos multifocal marcada (desde la profundidad a la zona profunda o línea de flujo) y/o alteración del colágeno en la mayoría de las articulaciones con unas pocas no afectadas o ligeramente afectadas. En la rodilla, una superficie con pérdida de cartílago total o casi total; 5 = Fuerte = Pérdida difusa fuerte de tinción con azul de toluidina (proteoglicano) con pérdida fuerte de condrocitos (desde la profundidad hasta la línea de flujo) y/o alteración del colágeno en la mayoría o en todas las articulaciones. En la rodilla, dos o más superficies con pérdida de cartílago total o casi total.

La puntuación de la reabsorción ósea se determinó basándose en los siguientes criterios para la puntuación de la pata y de la rodilla.

La puntuación de la pata se basó en los siguientes criterios: 0 = Normal; 0,5 = Muy Mínima = Afecta solo a 1 articulación o está restringido a áreas corticales/subperiósticas; 1 = Mínima = Pequeñas/pocas áreas de reabsorción definida, no fácilmente aparentes a bajo aumento, osteoclastos raros en las articulaciones afectadas, restringidos a zonas marginales; 2 = Leve = Áreas de reabsorción más numerosas/más grandes, osteoclastos más numerosos en las articulaciones afectadas, principalmente en zonas marginales pero con cierta extensión a las áreas de carga, puede tener proliferación endóstica en áreas de reabsorción; 3 = Moderada = Reabsorción evidente de hueso esponjoso trabecular y cortical sin defectos generalizados de espesor total en la corteza, pérdida de trabéculas esponjosas, lesión aparente a bajo aumento, osteoclastos más numerosos en las articulaciones afectadas, puede tener proliferación endóstica en áreas de reabsorción; 4 = Marcado = Defectos de espesor total en el hueso cortical, a menudo con distorsión del perfil de la superficie cortical restante, marcada pérdida de hueso esponjoso, numerosos osteoclastos, afecta a la mayoría de las articulaciones, puede tener proliferación endóstica en áreas de reabsorción; 5 = Fuerte = Defectos de espesor total en el hueso cortical y destrucción de la arquitectura articular de todas las articulaciones, puede tener proliferación endóstica en áreas de reabsorción.

La puntuación de la rodilla se basó en los siguientes criterios: 0 = Normal; 0,5 = Muy Mínima = La reabsorción mínima afecta sólo a zonas marginales; 1 = Mínima = Pequeñas áreas de reabsorción, no fácilmente aparentes a bajo aumento, aproximadamente del 1 al 10 % de la anchura total de la articulación del hueso subcondral resulta estar afectada; 2 = Leve = Áreas de reabsorción más numerosas, pérdida definitiva de hueso subcondral, aproximadamente del 11 al 25 % de la anchura total de la articulación del hueso subcondral resulta estar afectada; 3 = Moderada = Reabsorción evidente de hueso subcondral, aproximadamente del 26 al 50 % de la anchura total de la articulación del hueso subcondral resulta estar afectada; 4 = Marcada = Reabsorción evidente de hueso subcondral, aproximadamente del 51 al 75 % de la anchura total de la articulación del hueso subcondral resulta estar afectada; 5 = Grave = Distorsión de toda la articulación debido a la destrucción, aproximadamente del 76 al 100 % de la anchura total de la articulación del hueso subcondral resulta estar afectada.

También se evaluó la puntuación y las mediciones de la formación de nuevo hueso perióstico. Los estudios que van más allá del estadio inflamatorio agudo a menudo muestran diversos grados de formación de nuevo hueso perióstico. La anchura del área más grande de formación de hueso nuevo en una sección no tangencial ("puntuación de formación de nuevo hueso perióstico") se midió y se usó para determinar una puntuación basada en los siguientes criterios para la puntuación de la pata y de la rodilla.

La puntuación de la pata se basó en los siguientes criterios: 0 = Normal, sin proliferación perióstica; 0,5 = Proliferación temprana focal o multifocal mínima, mide menos de 40 µm de anchura (<1 unidad en 25x); 1 = Proliferación temprana multifocal mínima, mide 40-80 µm de anchura (1-2 unidades en 25x); 2 = Multifocal leve a difusa con anchuras que miden aproximadamente 120-200 µm (3-5 unidades en 25x); 3 = Difusa moderada con anchuras que miden 240-280 µm (6-7 unidades en 25x); 4 = Difusa marcada con anchuras que miden 320-400 µm (8-10 unidades en 25x); 5 = Fuerte, difusa con anchuras que miden más de 400 µm (>10 unidades en 25x).

La puntuación de la rodilla se basó en los siguientes criterios: 0 = Normal, sin proliferación perióstica; 0,5 = Proliferación temprana focal o multifocal mínima, mide 40 µm de anchura o menor (1-2 unidades en 50x); 1 = Proliferación temprana multifocal mínima, mide aproximadamente 40-80 µm de ancho (3-4 unidades en 50x); 2 = Multifocal leve a difusa con anchuras que miden aproximadamente 100-140 µm (5-7 unidades en 50x); 3 = Difusa moderada con anchuras que miden aproximadamente 160-220 µm (8-11 unidades en 50x); 4 = Difusa marcada con anchuras que miden aproximadamente 240-300 µm (12-15 unidades en 50x); 5 = Fuerte, difusa con anchuras que miden más de 300 µm (>15 unidades en 50x).

También se calculó la suma de las cinco puntuaciones histopatológicas de cada articulación.

5

Se determinaron los parámetros de la fase viva y de la necropsia para diversos datos clínicos e histopatológicos que incluían (i) cambio en el peso corporal durante los días 18-43; (ii) ABC de la puntuación de la artritis clínica durante los días 18-43; (iii) ABC de la puntuación de artritis clínica durante los días 28-43; (iv) porcentaje de incidencia; y (v) suma de las puntuaciones histopatológicas de todas las articulaciones. Los datos se resumen en la Tabla 4. A continuación se ofrece un análisis detallado de cada conjunto de datos.

TABLA 4. Sumario de datos clínicos e histopatológicos

| Grupo | Tratamiento                                                                                 | Cambio en el peso corporal (g) Día 18-43 | ABC de la puntuación de artritis clínica Día 18-43 | ABC de la puntuación de artritis clínica Día 28-43 | Porcentaje de Incidencia | Suma de las puntuaciones histopatológicas (de todas las articulaciones) |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1     | Normal + Vehículo, VO, QD                                                                   | †0,67 (0,20)                             | †0,00 (0,00)                                       | †0,00 (0,00)                                       | 0 %                      | †0,04 (0,04)                                                            |
| 2     | MTX Vehículo VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) Vehículo VO, QD (d28-43)     | -0,94 (0,26)                             | 71,73 (4,38)                                       | 65,70 (3,73)                                       | 100 %                    | 15,02 (1,32)                                                            |
| 3     | MTX Vehículo VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg) VO, QD (d28-43)    | -0,19 (0,18)                             | 61,41 (3,58)                                       | 54,81 (3,58)                                       | 100 %                    | 11,03 (1,01)                                                            |
| 4     | MTX Vehículo VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg) VO, QD (d28-43)    | *0,12 (0,28)                             | *27,30 (6,04)                                      | *21,27 (5,39)                                      | 42 %                     | *4,15 (1,01)                                                            |
| 5     | MTX (0,3 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) Vehículo VO, QD (d28-43)  | -1,16 (0,48)                             | 51,72 (5,38)                                       | 48,82 (4,96)                                       | 100 %                    | 10,24 (1,66)                                                            |
| 6     | MTX (0,5 mg/kg), VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) Vehículo VO, QD (d28-43) | -0,83 (0,19)                             | 46,79 (5,73)                                       | 45,51 (5,56)                                       | 100 %                    | 8,46 (1,36)                                                             |
| 7     | MTX (0,3 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg) VO, QD (d28-43) | -0,17 (0,21)                             | *‡33,82 (6,59)                                     | *30,84 (5,88)                                      | 83 %                     | *5,37 (1,35)                                                            |
| 8     | MTX (0,5 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg) VO, QD (d28-43) | -0,31 (0,30)                             | *‡29,04 (6,24)                                     | *‡27,59 (5,95)                                     | 75 %                     | *‡3,88 (1,16)                                                           |
| 9     | MTX (0,3 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg) VO, QD (d28-43) | -0,39 (0,16)                             | *§15,54 (3,26)                                     | *§12,61 (3,00)                                     | 42 %                     | *§1,39 (0,40)                                                           |
| 10    | MTX (0,5 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg) VO, QD (d28-43) | -0,21 (0,16)                             | *§9,74 (3,61)                                      | *§8,16 (3,22)                                      | 17 %                     | *§1,77 (0,68)                                                           |

(EE) = error estándar mostrado entre paréntesis, ABC = área bajo la curva

\* $p < 0,05$  ANOVA (con la prueba *a posteriori* de Dunnett) o prueba de K-W (con la prueba *a posteriori* de Dunn) frente a MTX vehículo + inhibidor de BTK de fórmula (2) vehículo.

† $p < 0,05$  prueba de la *t* de Student frente a MTX Vehículo + inhibidor de BTK de fórmula (2) vehículo.

‡ $p < 0,05$  ANOVA (con la prueba *a posteriori* de Sidak) o prueba de K-W (con la prueba *a posteriori* de Dunn) frente a MTX vehículo + inhibidor de BTK de fórmula (2) (misma dosis).

§ $p < 0,05$  ANOVA (con la prueba *a posteriori* de Sidak) o prueba de K-W (con la prueba *a posteriori* de Dunn) frente a MTX (misma dosis) + inhibidor de BTK de fórmula (2) vehículo

Los ratones de control tratados con vehículo tuvieron una pérdida de peso corporal (medida como cambio porcentual desde el valor inicial) que alcanzó un máximo de -16,47 % el Día 30 del estudio. La pérdida de peso corporal inducida por la enfermedad se inhibió significativamente en comparación con los controles tratados con vehículo el día 36 en ratones tratados con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), los días 32-38 y 43 en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), los días 28-40 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), los días 26-40 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2), los días 28-42 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2) y los días 30-42 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2). La pérdida de peso corporal se inhibió significativamente en comparación con el tratamiento con inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario los días 26-32 en ratones tratados con MTX (0,3 o 0,5 mg/kg) + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) y los días 28-30 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2). La pérdida de peso corporal se inhibió significativamente en comparación con el tratamiento con MTX en solitario los días 32-42 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), los días 30-34 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2), los Días 30-42 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2) y los Días 32 -38 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2).

A la finalización del estudio, los ratones de control tratados con vehículo tuvieron una pérdida absoluta de peso corporal media de -0,94 g. La pérdida absoluta de peso corporal se inhibió significativamente (66 %) en ratones tratados con 5 mg/kg de inhibidor de BTK de Fórmula (2) en solitario en comparación con los controles tratados con vehículo.

Las puntuaciones diarias de la artritis clínica difirieron significativamente de las de los controles tratados con vehículo a lo largo del tiempo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) o con 0,5 mg/kg de MTX en solitario y en todos los grupos de terapia de combinación. Las puntuaciones de la artritis clínica se redujeron significativamente los días de estudio 30-43 en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), los días 25-29 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX, los días 28-43 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + el inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 o 5 mg/kg) y los días 25-43 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 o 5 mg/kg). En los ratones que recibieron terapia de combinación, las puntuaciones de la artritis clínica se redujeron significativamente los días 25-27 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en solitario. Las puntuaciones de la artritis clínica se redujeron significativamente el día 28 en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en solitario y los días 30-43 en comparación con el tratamiento con 0,3 mg/kg de MTX en solitario. Las puntuaciones de la artritis clínica se redujeron significativamente los días 24-43 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en solitario. Las puntuaciones de la artritis clínica se redujeron significativamente los días 25-29 en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario y los días 30-43 en comparación con el tratamiento con 0,5 mg/kg de MTX administrado en solitario.

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se ilustra la puntuación diaria de la artritis (puntuación promedio de las patas) frente a los días después de la inmunización.

En la figura 1, las leyendas de cada curva corresponden a: línea negra = vehículo; línea azul = MTX a 0,3 mg/kg; línea roja = fórmula (2) a 1 mg/kg; línea rosa continua = MTX a 0,3 mg/kg y Fórmula (2) a 1 mg/kg; línea rosa discontinua = valor teórico para MTX a 0,3 mg/kg y fórmula (2) a 1 mg/kg basándose en datos para MTX a 0,3 mg/kg y Fórmula (2) a 1 mg/kg.

En la figura 2, las leyendas de cada curva corresponden a: línea negra = vehículo; línea azul = MTX a 0,5 mg/kg; línea roja = fórmula (2) a 1 mg/kg; línea rosa continua = MTX a 0,5 mg/kg y Fórmula (2) a 1 mg/kg; línea rosa discontinua = valor teórico para MTX a 0,5 mg/kg y fórmula (2) a 1 mg/kg basándose en datos para MTX a 0,5 mg/kg y Fórmula (2) a 1 mg/kg.

En la figura 3, las leyendas de cada curva corresponden a: línea negra = vehículo; línea azul = MTX a 0,3 mg/kg; línea roja = fórmula (2) a 5 mg/kg; línea rosa continua = MTX a 0,3 mg/kg y Fórmula (2) a 5 mg/kg; línea rosa discontinua = valor teórico para MTX a 0,3 mg/kg y fórmula (2) a 5 mg/kg basándose en datos para MTX a 0,3 mg/kg y Fórmula (2) a 5 mg/kg.

En la figura 4, las leyendas de cada curva corresponden a: línea negra = vehículo; línea azul = MTX a 0,5 mg/kg; línea roja = fórmula (2) a 5 mg/kg; línea rosa continua = MTX a 0,5 mg/kg y Fórmula (2) a 5 mg/kg; línea rosa discontinua = valor teórico para MTX a 0,5 mg/kg y fórmula (2) a 5 mg/kg basándose en datos para MTX a 0,5 mg/kg y Fórmula (2) a 5 mg/kg.

Los datos de las figuras 1 a la 4 ilustran que la combinación de MTX y Fórmula (2) da como resultado una reducción de la incidencia de la enfermedad, puesto de manifiesto por las bajas puntuaciones de la artritis, en comparación con

la administración en solitario de cada uno de MTX y fórmula (2). Por otro lado, los datos demuestran un sorprendente efecto sinérgico entre MTX y fórmula (2). Esto se pone de manifiesto por la puntuación de la artritis para la combinación, que fue inferior en cada combinación de concentración cuando se comparó con la del efecto aditivo teórico del MTX y la Fórmula (2) basándose en los datos obtenidos para cada principio activo cuando se administra por separado.

Las puntuaciones de la artritis expresadas como área bajo la curva (ABC) durante los días 18-43 se redujeron significativamente en comparación con las de los controles tratados vehículo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (reducción del 62 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (53%), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (60 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (78 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (86 %). El tratamiento de combinación con MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario, y el tratamiento con MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con MTX (0,3 o 0,5 mg/kg) administrado en solitario. Los resultados del tratamiento sobre el ABC de las puntuaciones clínicas los días 28-43 fueron en su mayoría similares, aunque las reducciones del tratamiento con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) no fueron significativas en comparación con las del tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario.

La incidencia de la enfermedad se redujo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2) (42 % de incidencia al finalizar el estudio), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (83 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (75 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2) (42 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (17 %) en comparación con la de los controles tratados con vehículo, que tuvo una incidencia del 100 % el día 28.

Los resultados de la patología morfológica son los siguientes. Los animales de control tratados con vehículo y con isotipo tuvieron cambios histopatológicos, en consonancia con los observados en la artritis inducida por colágeno de tipo II, en la mayoría de las articulaciones, con puntuaciones que variaban de mínimas a fuertes. Las alteraciones microscópicas incluían la infiltración de la membrana sinovial y del tejido periarticular con neutrófilos y células inflamatorias mononucleares (inflamación), panículo adiposo en zona marginal y reabsorción ósea y daños en cartílago (pérdida de proteoglicanos, muerte de condrocitos y destrucción de la matriz de colágeno).

Los parámetros histopatológicos medios de las seis articulaciones se redujeron significativamente en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (reducciones del 63-82 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (55-72 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (66-81 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (83-97 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2) (83-96 %) en comparación con los controles tratados con vehículo. En los ratones que recibieron terapia de combinación, los parámetros histopatológicos medios de las seis articulaciones se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario y en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 0,3 mg/kg de MTX administrado en solitario. Todos los parámetros medios de seis articulaciones, excepto las puntuaciones de daños en cartílago, se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 0,5 mg/kg de MTX administrado en solitario.

La suma de las puntuaciones medias histopatológicas de seis articulaciones, se redujo significativamente en comparación con la de los controles tratados con vehículo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (reducción del 73 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (64 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (74 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg de ACP-196 (91 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (88 %). El tratamiento de combinación con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario, y el tratamiento con MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con MTX (0,3 o 0,5 mg/kg) administrado en solitario.

Todos los parámetros histopatológicos de la pata se redujeron significativamente en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (reducciones del 59-82 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (53-72 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (61-79 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (86-97 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (83-97 %) en comparación con los controles tratados con vehículo. En los ratones que recibieron terapia de combinación, todos los parámetros histopatológicos de la pata se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 0,3 mg/kg de MTX administrado en solitario y en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 0,5 mg/kg de MTX administrado en solitario. Todos los parámetros de la pata, excepto las puntuaciones de formación de hueso perióstico, se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg

del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario.

La suma de las puntuaciones histopatológicas de la pata, se redujo significativamente en comparación con los controles tratados con vehículo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (reducción del 72 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (64 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (72 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (93 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (90 %). El tratamiento de combinación con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario, y el tratamiento con MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con MTX (0,3 o 0,5 mg/kg) administrado en solitario.

Los ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujeron significativamente la inflamación en rodilla (reducción del 72 %), la formación de panículo adiposo (85 %) y la reabsorción ósea (90 %) en comparación con los controles tratados con vehículo. Los ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), redujeron significativamente la inflamación en rodilla (60 %) y los daños en cartílago (61 %). Los ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), redujeron significativamente la inflamación en rodilla (80 %), la formación de panículo adiposo (92 %), daños en cartílago (83 %) y reabsorción ósea (92 %). Los ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg de ACP-196 redujeron significativamente la inflamación en rodilla (77 %), la formación de panículo adiposo (98 %), daños en cartílago (82 %) y reabsorción ósea (98 %). Los ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg de ACP-196 redujeron significativamente la inflamación en rodilla (84 %), la formación de panículo adiposo (85 %), daños en cartílago (81 %) y reabsorción ósea (88 %). En los ratones que recibieron terapia de combinación, las puntuaciones de formación de hueso perióstico se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario. Todos los parámetros de la rodilla se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario. Los ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2), redujeron significativamente la formación de panículo adiposo en rodilla, la reabsorción ósea y la formación de hueso perióstico en comparación con el tratamiento con 0,3 mg/kg de MTX administrado en solitario.

La suma de las puntuaciones histopatológicas de la rodilla, se redujo significativamente en comparación con la de los controles tratados con vehículo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (reducción del 74 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (64 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (84 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (84 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (84 %). El tratamiento de combinación con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) redujo significativamente el ABC en comparación con el tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario.

Las anchuras medias de hueso perióstico de la pata y de las seis articulaciones, se redujo significativamente en comparación con las de los controles tratados vehículo en ratones tratados con 5 mg/kg del inhibidor de BTK de Fórmula (2) (reducciones del 82-83 %), 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (68-69 %), 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (80 %), 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (97 %) o 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) (93-95 %). En los ratones que recibieron terapia de combinación, las anchuras de hueso perióstico de la rodilla se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con las del tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario. Las anchuras medias de hueso perióstico de la pata, rodilla y de las seis articulaciones, se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con las del tratamiento con 1 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) administrado en solitario. Las anchuras medias de hueso perióstico de la pata, rodilla y de las seis articulaciones, se redujeron significativamente en ratones tratados con 0,3 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con las del tratamiento con 0,3 mg/kg de MTX administrado en solitario. Las anchuras medias de hueso perióstico de la pata y de las seis articulaciones, se redujeron significativamente en los ratones tratados con 0,5 mg/kg de MTX + 5 mg/kg del inhibidor de BTK de fórmula (2) en comparación con las del tratamiento con 0,5 mg/kg de MTX administrado en solitario.

Después de la eutanasia, los esplenocitos se recogieron y analizaron para determinar el nivel de ocupación de BTK. Los resultados muestran que el nivel de ocupación de Btk con el inhibidor de BTK de fórmula (2), es el mismo en presencia o en ausencia de MTX. Esto significa que existe un efecto sinérgico entre la combinación del inhibidor de BTK de fórmula (2) y el MTX y que el comportamiento de la combinación de fármacos no se debe a que el MTX afecte a la exposición/aclaramiento del inhibidor de BTK de fórmula (2).

Ejemplo 2: Evaluación de la sinergia en combinaciones del inhibidor de BTK de fórmula (2) y MTX

Para determinar el comportamiento sinérgico, aditivo o antagonista de combinaciones de fármacos de inhibidor de BTK de fórmula (2) y MTX, se realizaron experimentos de combinación como se ha descrito anteriormente. Los efectos

sinérgicos de la terapia de combinación se pueden evaluar usando el método de independencia de Bliss o de producto fraccionado como se indica en Yan *et al.*, BMC Syst Biol., 2010, 4, 50. El modelo de independencia de Bliss se define mediante la ecuación  $E_{xy} = E_x + E_y - (E_x E_y)$ , donde ( $E_{xy}$ ) es el efecto aditivo de los fármacos x e y según lo previsto por sus efectos individuales ( $E_x$  y  $E_y$ ). El método de independencia de Bliss supone que los dos inhibidores actúan a través de mecanismos independientes. Si el efecto combinado real de los dos inhibidores es igual a  $E_{xy}$ , se trata de un caso de efecto aditivo y no hay interacción entre los dos inhibidores. Si el efecto combinado real es menor que  $E_{xy}$ , recibe el nombre de antagonismo. Si el efecto combinado real es mayor que  $E_{xy}$ , recibe el nombre de sinergismo. Yan *et al.*, BMC Syst Biol., 2010, 4, 50. La terapia de combinación a todas las dosis produjo efectos sinérgicos sobre el ABC de las puntuaciones de la artritis (días 28-43) y la suma de las puntuaciones histopatológicas (de todas las articulaciones), como se indica mediante la evaluación de la inhibición teóricamente prevista (esperada) y la inhibición observada experimentalmente del aumento de la puntuación.

La terapia de combinación a todas las dosis produjo efectos sinérgicos sobre el ABC de las puntuaciones de la artritis (días 28-43) y la suma de las puntuaciones histopatológicas (de todas las articulaciones), como se indica mediante la evaluación de la inhibición esperada (es decir, teóricamente prevista) y la inhibición observada experimentalmente del aumento de la puntuación, tal como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. Efectos sinérgicos teóricos y observados de la terapia combinada

| Grupo | Tratamiento                                                                                 | ABC de la puntuación de artritis clínica Día 28-43 |                          | Suma de las puntuaciones histopatológicas (de todas las articulaciones) |                          |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|       |                                                                                             | Inhibición esperada (%)                            | Inhibición observada (%) | Inhibición esperada (%)                                                 | Inhibición observada (%) |
| 7     | MTX (0,3 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg) VO, QD (d28-43) | 39 %                                               | 53 %                     | 50 %                                                                    | 64 %                     |
| 8     | MTX (0,5 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (1 mg/kg) VO, QD (d28-43) | 43 %                                               | 58 %                     | 59 %                                                                    | 74 %                     |
| 9     | MTX (0,3 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg) VO, QD (d28-43) | 76 %                                               | 81 %                     | 82 %                                                                    | 91 %                     |
| 10    | MTX (0,5 mg/kg) VO, QD (d18-43) + inhibidor de BTK de fórmula (2) (5 mg/kg) VO, QD (d28-43) | 78 %                                               | 88 %                     | 85 %                                                                    | 88 %                     |

Ejemplo 3: Estudio preliminar de eficacia y seguridad en fase 2A, de 4 semanas, con ocultación, del inhibidor de BTK de fórmula (2) frente a placebo en sujetos con artritis reumatoide activa sobre tratamiento de fondo con metotrexato

El objetivo principal del estudio será evaluar la eficacia del inhibidor de BTK de fórmula (2) en sujetos con artritis reumatoide ("AR") activa a pesar del tratamiento con metotrexato ("MTX"). Los objetivos secundarios serán: (i) evaluar la seguridad y tolerabilidad de la fórmula (2) cuando se coadministra con metotrexato ("MTX") en sujetos con AR activa; (ii) evaluar los parámetros PC (farmacocinéticos) y FD (farmacodinámicos) de la fórmula (2) con la coadministración con MTX; y (iii) valorar el efecto de la coadministración de la fórmula (2) con MTX, sobre diversos biomarcadores inmunológicos.

El algoritmo de tratamiento actual para la AR incluye un primer tratamiento con AINE (antiinflamatorios no esteroideos), seguido de FARME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad) sintéticos, tales como MTX, una vez que los AINE se vuelven ineficaces. En caso de no responder a los FARME y a sus combinaciones, a continuación, los pacientes se tratan con productos biológicos anti-factor de necrosis tumoral (anti-TNF). En última instancia, cuando los pacientes ya no responden a los productos biológicos anti-TNF, se inicia la administración de rituximab (anti-CD20) o abatacept (CTLA4-Ig). En la actualidad, el desarrollo farmacológico de inhibidores de tirosina cinasa orales para el tratamiento de la AR se centra en la producción de moléculas con un mejor perfil de eficacia/seguridad que el del MTX y con un perfil de eficacia/seguridad similar al de los productos biológicos.

La eficacia de rituximab en el tratamiento de pacientes con AR, esclerosis múltiple recurrente remitente, lupus eritematoso sistémico o síndrome de Sjogren, ha validado a las células B como una diana importante en los trastornos autoinmunitarios. La BTK es una proteína cinasa no receptora de la familia Tec, que se expresa en células B, células mieloides, osteoclastos, mastocitos y plaquetas. La función de la BTK en rutas de señalización activadas por la participación del BCR (receptor de células B) está bien establecida. Buggy, *et al.*, Int. Rev. Immunol. 2012, 31, 119-

132. La eficacia de la inhibición de BTK en otras enfermedades impulsadas por células B, tales como neoplasias malignas de células B, está representada por la reciente aprobación de ibrutinib (IMBRUYICA™), el inhibidor de BTK de primera generación aprobado para el tratamiento de la LLC (leucemia linfocítica crónica) y el linfoma de células del manto. Sin embargo, el posible beneficio de la inhibición de BTK para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios no se limita a su efecto sobre la activación de células B. La BTK participa en diversos procesos biológicos, muchos de los cuales afectan al avance de la enfermedad en los trastornos autoinmunitarios. La BTK regula la señalización de FcγR en las células mieloides y en los mastocitos juega un papel clave en la desgranulación de los mastocitos después de la activación de FcεR1. Jongstra-Bilen, *et al.*, J Immunol. 2008, 181, 288-298; Ellmeier, *et al.*, FEBS J. 2011, 278, 1990-2000. La BTK regula la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL. Shinohara, *et al.*, Cell 2008, 132, 794-806. La BTK regula la señalización del TLR (receptor de linfocitos T) y la inhibición de BTK es capaz de bloquear la activación de células B cuando dichas células se estimulan a través del BCR y el TLR9. Kenny, *et al.*, PLoS One, 2013, 8, e74103. La BTK afecta la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, inducida por el BCR, por parte de las células B. de Rooij, *et al.*, Blood, 2012, 119, 2590-2594; di Paolo, *et al.*, Nat. Chem. Biol., 2011, 7, 41-50.

La AR es una enfermedad autoinmunitaria crónica que afecta al 1 por ciento de la población mundial general. Causa dolor, rigidez, hinchazón y limitación en el movimiento y la función de múltiples articulaciones. Si no se trata adecuadamente, la AR puede producir la destrucción de una o más articulaciones provocando deformidad y discapacidad permanente. Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de la AR ha incluido tradicionalmente AINE, corticosteroides y FARM. Aunque estas terapias brindan algunos beneficios, su eficacia ha sido limitada. Las nuevas terapias basadas en productos biológicos incluyen moléculas que inhiben la actividad de las citocinas (inhibidores de TNF, IL-1 Ra o mAb (anticuerpos monoclonales) contra el receptor de IL-6 (IL-6 R)), bloquean la coestimulación mediada por células T (abatacept) o reducir las células B (rituximab). Los inhibidores de cinasa de nueva generación (tofacitinib) han proporcionado beneficios comparables a los de las terapias basadas en productos biológicos. Estas terapias han sido eficaces para el tratamiento de la AR de moderada a grave y han ralentizado el avance de la enfermedad, según se ha determinado radiográficamente, particularmente cuando se combinan con MTX. Sin embargo, los sujetos que utilizan estas terapias no consiguen lograr, habitualmente, una respuesta ≥ 50 %. Adicionalmente, estas terapias pueden estar asociadas a efectos secundarios desfavorables, tales como un mayor riesgo de infección grave.

Se realizará un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, con doble ocultación, con grupos en paralelo y controlado con placebo. El período de tratamiento será de cuatro semanas con visitas semanales al centro de salud. También habrá un período de seguimiento de seguridad de cuatro semanas después de la última dosis de la fórmula (2) o del placebo. Los sujetos que cumplan con los criterios de elegibilidad serán asignados al azar a una proporción de 1:1. Durante cuatro semanas, el grupo de tratamiento 1 recibirá una dosis de 15 mg de la fórmula (2) una vez al día (QD) mientras que recibirá una dosis estable de MTX de entre 7,5 y 25 mg/semana. Al mismo tiempo, el grupo de tratamiento 2 recibirá placebo QD mientras que recibirá una dosis estable de MTX de entre 7,5 y 25 mg/semana. Después de las cuatro semanas, la inclusión se detendrá mientras que un comité de vigilancia de datos y seguridad (CVDS) revisa los parámetros farmacocinéticos no ocultos y los resultados de seguridad de los 20 primeros sujetos tratados. Después de la revisión, 50 sujetos serán asignados al azar a una proporción de 1:1. El grupo de tratamiento 1 recibirá una dosis de 15 mg de fórmula (2) una vez al día (QD) mientras que recibirá una dosis estable de MTX de entre 7,5 y 25 mg/semana durante cuatro semanas. Al mismo tiempo, el grupo de tratamiento 2 recibirá placebo QD mientras que recibirá una dosis estable de MTX de entre 7,5 y 25 mg/semana durante cuatro semanas.

Los criterios de inclusión para la elegibilidad de los pacientes son los siguientes. Los sujetos deben cumplir los siguientes criterios: (1) los sujetos deben poder leer y comprender el formulario de consentimiento, completar los procedimientos relacionados con el estudio y comunicarse con el personal del estudio; (2) los sujetos pueden ser hombres o mujeres y deben tener entre 18 y 75 años (inclusive); (3) los sujetos deben tener un diagnóstico de AR de acuerdo con los criterios de clasificación del *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR) de 2010 durante ≥ tres meses antes de la selección y no antes de los 16 años; (4) los sujetos con un diagnóstico de AR antes de 2011 deben cumplir con los criterios del ACR 1987 para el diagnóstico de AR; (5) los sujetos deben tener AR activa en el momento de la aleatorización donde la AR activa se define como: ≥ tres articulaciones inflamadas de un total de 28 articulaciones; ≥ tres articulaciones sensibles de un total de 28 articulaciones; > límite superior de la normalidad (LSN) para la CRP (proteína reactiva con C, del inglés C-reactive protein); ≥ una articulación inflamada debe estar en la articulación interfalángica proximal (PIP)/metacarpofalángica (MCP)/muñeca, donde la extremidad superior con el mayor número de articulaciones inflamadas en PIP/MCP/muñeca se definirá como la mano índice y se evaluará mediante IRM (obtención de imágenes por resonancia magnética); (6) los sujetos deben haber comenzado el tratamiento con MTX durante ≥ tres meses antes de la aleatorización y deben estar con una dosis estable de MTX (7,5 a 25 mg/semana) durante ≥ ocho semanas antes de la aleatorización y permanecer con una dosis estable durante el período de tratamiento; (7) se permiten la sulfasalazina y la hidroxiquina; sin embargo, los sujetos deben estar con una dosis estable durante ≥ ocho semanas antes de la aleatorización y permanecer con una dosis estable durante el período de tratamiento; (8) los sujetos deben recibir complementación oral de ácido fólico o folínico ≥ 5 mg/semana; (9) si usan corticosteroides orales, los sujetos deben estar con una dosis estable equivalente a ≤ 10 mg de prednisona/día durante ≥ 4 semanas antes de la aleatorización y permanecer con una dosis estable durante el período de tratamiento; (10) si usan fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los sujetos deben estar con una dosis estable durante ≥ 2 semanas antes de la aleatorización y permanecer con una dosis estable durante el período de tratamiento; (11) los sujetos deben tener el siguiente resultado

de las prueba analíticas de exploración: (i) Hemoglobina  $\geq 8,5$  g/dl (Sistema Internacional de Unidades [SI]:  $\geq 85$  g/l); (ii) Glóbulos blancos (GB)  $\geq 3,0 \times 10^3$  células/ $\mu$ l (SI:  $\geq 3,0 \times 10^9$  células/l); (iii) Neutrófilos  $\geq 1,5 \times 10^3$  células/ $\mu$ l (SI:  $\geq 1,5 \times 10^9$  células/l); (iv) Plaquetas  $\geq 100 \times 10^3$  células/ $\mu$ l (SI:  $\geq 100 \times 10^9$  células/l); (v) Niveles séricos de transaminasas que no superen de  $2,5 \times$  LSN; y (vi) creatinina sérica que no supere  $1,5$  mg/dl (SI:  $\leq 25$   $\mu$ mol/l); (12) acuerdo para utilizar formas de métodos anticonceptivos aceptables durante el estudio y durante un mínimo de 90 días después de la última dosis de MTX o 30 días después de la última dosis de BTK de fórmula (2)/placebo, el que sea más largo, si es sexualmente activa y puede tener o engendrar hijos. Como ejemplos de métodos anticonceptivos aceptables se incluyen condones, implantes, inyectables, anticonceptivos orales combinados, dispositivos intrauterinos, verdadera abstinencia sexual, o tener una pareja esterilizada. Debe tenerse en cuenta que la abstinencia periódica (p. ej., los métodos de calendario, de óvulos, sintotérmicos, de postovulación o de abstinencia), no son métodos anticonceptivos aceptables; (13) las mujeres en edad fértil que sean sexualmente activas con un compañero masculino deben aceptar usar simultáneamente dos formas de métodos anticonceptivos aceptables (por ejemplo, condón y anticonceptivos) durante el estudio y durante 30 días después de la última dosis de BTK de fórmula (2)/placebo; (14) los hombres deben comprometerse a abstenerse de donar esperma durante el estudio y durante 30 días después de la última dosis de BTK de fórmula (2)/placebo; (15) están dispuestos y son capaces de adherirse al programa de visitas del estudio y entienden y cumplen con otros requisitos del protocolo.

Los criterios de exclusión para la elegibilidad de los pacientes son: (1) neoplasia maligna previa, excepto para el cáncer de piel de células basales o de células escamosas tratado adecuadamente, cáncer de cuello uterino *in situ* u otro cáncer del cual el sujeto haya estado sin enfermedad durante  $\geq 5$  años; (2) indicios de tuberculosis (TB), según lo documentado mediante un ensayo específico (ensayo de derivado proteico purificado [PPD] o QuantiFERON®-TB Gold), historial médico o radiografía de tórax, donde las excepciones incluyen sujetos que han documentado tratamiento con isoniazida (INH) durante  $\geq 6$  meses, han completado el tratamiento y no tiene signos o síntomas de TB activa; (3) índice de masa corporal (IMC)  $> 35$  kg/m<sup>2</sup>; (4) sujetos que no pueden moverse (p. ej., confinados en una cama o en una silla de ruedas) o que son de la clase funcional IV del ACR (*American College of Rheumatology*); (5) se han expuesto a una vacuna viva en los 2 meses de la aleatorización; (6) problema de salud, dolencia potencialmente mortal o disfunción de aparatos y sistemas que, en opinión del investigador, podría comprometer la seguridad del sujeto, interferir con la absorción o el metabolismo de la fórmula (2) o poner los resultados del estudio en un riesgo indebido; (7) cualquier afección que pueda afectar a la absorción de la fórmula (2), incluyendo restricciones gástricas y cirugía bariátrica, como el bypass gástrico; (8) gestantes, mujeres que estén amamantando o planificando un embarazo (tanto hombres como mujeres) en los seis meses posteriores a la aleatorización (9) sujetos que tengan otras enfermedades inflamatorias que podrían confundir las evaluaciones del beneficio de la terapia con la fórmula (2) (incluyendo, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome de Felty, enfermedad de Lyme, psoriasis o esclerosis múltiple) con síndrome de Sjogren secundario, el asma o las enfermedades de la tiroides son aceptables; (10) sujetos que han tomado algún fármaco en investigación en los 30 días anteriores a la aleatorización; (11) sujetos con contraindicaciones para la IRM de cuerpo entero; (12) sujetos con insuficiencia renal grave aguda o crónica (tasa de filtración glomerular [TFG]  $< 30$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>); (13) cualquier terapia previa con BTK; (14) falta de respuesta previa a un agente biológico o inhibidor de la cinasa Janus (JAK); (15) uso de todos los demás fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) sintéticos, tales como, pero sin limitación, leflunomida, azatioprina, ciclosporina, penicilamina o sales de oro en las ocho semanas de aleatorización; (16) uso de etanercept, anakinra, tofacitinib en las cuatro semanas a la aleatorización; (17) uso de abatacept, humira, infliximab o tocilizumab en las ocho semanas de aleatorización; (18) sujetos que tienen, o han tenido, una infección grave durante las ocho semanas anteriores a la aleatorización (incluyendo, pero sin limitación, hepatitis, neumonía, celulitis, herpes zóster o pielonefritis), o hayan sido hospitalizados y/o hayan recibido antibióticos por vía intravenosa (IV) para una infección; (19) antecedentes conocidos de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de la hepatitis B (VHB) o infección activa por el virus de la hepatitis C (VHC) (19) sujetos con signos o síntomas actuales de enfermedad renal, hepática, hematológica, gastrointestinal, endocrina, pulmonar, cardíaca, neurológica o psiquiátrica, clínicamente significativa, progresiva o incontrolada; (20) cirugía mayor en las 4 semanas previas a la aleatorización o cirugía electiva planificada durante la duración del estudio; (21) antecedentes de ictus, hemorragia intracraneal o infarto de miocardio en los 6 meses anteriores a la aleatorización; (22) sujetos que requieren anticoagulación con warfarina o un antagonista de la vitamina K; (23) sujetos que tienen, o han tenido, un problema de drogodependencia (fármacos, productos químicos o alcohol) en los 2 años anteriores; (24) sujetos que no pueden someterse a múltiples venopunciones debido a una mala tolerabilidad o a una falta de fácil acceso venoso; y (25) participación simultánea en otro ensayo clínico terapéutico.

Para evaluar a los participantes se usarán los siguientes parámetros de eficacia. En el criterio de valoración principal: la semana 4 se accederá a la puntuación de actividad de la enfermedad de 28 articulaciones - proteína reactiva con C ("DAS28-CRP", del inglés *disease activity score 28 C-reactive protein*). Los criterios de valoración secundarios se evaluarán de la siguiente manera: (i) DAS28-CRP en las semanas 1, 2 y 3; (ii) *American College of Rheumatology* ("ACR") ACR20 en las semanas 1, 2, 3, 4; (iii) ACR50 en las semanas 1, 2, 3, 4; (iv) ACR70 en las semanas 1, 2, 3 y 4; (v) dominios ACR individuales en las semanas 1, 2, 3 y 4, tales como: recuento de articulaciones inflamadas ("SJC", *swollen joint count*), recuento de articulaciones sensibles ("TJC", *tender joint count*), índice de discapacidad del cuestionario de evaluación de salud ("HAQ-DI", *health assessment questionnaire disability index*), valoración global del médico, valoración global del sujeto, valoración del dolor del sujeto, proteína reactiva con C ("CRP"), velocidad de sedimentación eritrocítica ("ESR", *erythrocyte sedimentation rate*), ACR-N en las semanas 1, 2, 3 y 4, índice de actividad clínica de la enfermedad ("CDAI", *clinical disease activity index*) en las semanas 1, 2, 3 y 4, SDAI (*Simplified*

*Disease Activity Index*, índice simplificado de actividad de la enfermedad) en las semanas 1, 2, 3 y 4.

La obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) de la mano índice, también pueden evaluarse usando el sistema de puntuación por IRM de artritis reumatoide ("RAMRIS", *rheumatoid arthritis MRI scoring system*) entre el inicio del estudio y la semana 4. Se realizará una IRM en la mano y en la muñeca más gravemente afectadas al inicio del estudio y en la semana 4. Se adquirirán imágenes GRE tridimensionales con y sin contraste de gadolinio e imágenes STIR. Dos radiólogos experimentados e independientes que desconocerán la asignación del tratamiento y la secuencia de las imágenes, leerán centralmente las imágenes de la RM. Las imágenes se puntuarán usando el método RAMRIS estándar.

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de la fórmula (2) y del MTX y su metabolito, se medirán en plasma y orina. Los parámetros farmacocinéticos se medirán en un subconjunto de sujetos (N=20) en centros de estudio seleccionados. Los parámetros FC en plasma y orina de la fórmula (2), el MTX y el 7-hidroximetotrexato (un metabolito del MTX), se caracterizarán mediante un análisis no compartimental. Siempre que sea posible, a partir de concentraciones de analitos en plasma y/u orina, se calcularán los siguientes parámetros farmacocinéticos: (i) ABC0-último: Área bajo la curva de la concentración plasmática función del tiempo calculada mediante la suma trapezoidal lineal desde el momento cero hasta el último momento, donde "último" es el momento de la última concentración medible; (ii) AUC0-24: Área bajo la curva de la concentración plasmática función del tiempo de cero a 24 horas, calculada mediante la suma trapezoidal lineal; (iii) AUC0-inf: Área bajo la curva de la concentración plasmática en función del tiempo de cero a infinito, calculada usando la fórmula:  $ABC0-inf = ABC0-último + Ct / \lambda_z$ , donde  $\lambda_z$  es la constante de velocidad de eliminación terminal aparente; (iv)  $C_{m\acute{a}x}$ : Concentración plasmática máxima observada; (v)  $T_{m\acute{a}x}$ : Tiempo hasta la concentración máxima de fármaco (obtenido sin interpolación); y (v)  $t_{0.5}$ : Semivida de eliminación terminal (siempre que sea posible).

Usando una exploración análoga a la de la fórmula (2) marcada con biotina, se medirán los parámetros farmacodinámicos para determinar el nivel de ocupación del inhibidor de BTK de Fórmula (2) en CMSP (células mononucleares de sangre periférica). También se evaluará el efecto de la fórmula (2) sobre los marcadores biológicos de la función de células B, donde los parámetros biomarcadores incluyen: (i) metaloproteinasa 3 de matriz (MMP3); (ii) interleucina 6 (IL-6); (iii) interleucina 8 (IL-8); (iv) telopéptido reticulado C-terminal (CTX) y telopéptido reticulado N-terminal (NTX); (v) factor reumatoide (RF); (vi) osteocalcina; (vii) proteína de matriz oligomérica de cartílago (COMP); y (viii) fosfatasa alcalina ósea (BAP).

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Acerta Pharma B.V.

<120> COMBINACIONES TERAPÉUTICAS DE UN ANTIFOLATO Y UN INHIBIDOR DE BTK

<130> 055112-5038-WO

<140> Presentado en este documento

<141> 13/01/2017

<160> 68

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de rituximab

<400> 1

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

405

410

415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

Pro Gly Lys  
450

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de rituximab

<400> 2

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 3

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de obinutuzumab

# ES 2 839 408 T3

<400> 3

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

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

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

Lys

<210> 4

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de obinutuzumab

<400> 4

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

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

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

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

# ES 2 839 408 T3

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada variable de ofatumumab

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

# ES 2 839 408 T3

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cadena ligera variable de ofatumumab

<400> 6

10

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 7  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> cadena pesada de Fragmento Fab de ofatumumab

20

<400> 7

# ES 2 839 408 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Arg | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asn | Asp | Tyr | 20  | 25  | 30  |     |
| Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | 35  | 40  | 45  |     |
| Ser | Thr | Ile | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ser | Ile | Gly | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | 50  | 55  | 60  |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Lys | Ser | Leu | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Leu | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Lys | Asp | Ile | Gln | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Tyr | Tyr | Gly | Met | Asp | Val | Trp | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Gly | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Thr | 130 | 135 | 140 |     |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | 165 | 170 | 175 |     |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | 180 | 185 | 190 |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | 195 | 200 | 205 |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | 210 | 215 | 220 |     |     |     |

<210> 8

<211> 211

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera del fragmento Fab de ofatumumab

&lt;400&gt; 8

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg
          210

```

5

<210> 9  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de veltuzumab

5

<400> 9

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

Pro Gly Lys  
450

<210> 10

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de veltuzumab

<400> 10

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 11  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de tositumomab

5

<400> 11

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ala | Tyr | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Lys | Met | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 12  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena ligera de ositumomab

<400> 12

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 13  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena pesada de ibritumomab

<400> 13

# ES 2 839 408 T3

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

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

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser  
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro  
340 345 350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met  
355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn  
370 375 380

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn  
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu  
420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg  
435 440

<210> 14  
<211> 209  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena ligera de ibritumomab

<400> 14

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

# ES 2 839 408 T3

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn

<210> 15  
<211> 440  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena pesada de nivolumab

<400> 15

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

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

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 16  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena ligera de nivolumab  
  
 <400> 16

# ES 2 839 408 T3

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

5 <210> 17  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada variable de nivolumab

5 <400> 17

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

10 <210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cadena ligera variable nivolumab

<400> 18

# ES 2 839 408 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada de nivolumab

<400> 19

Asn Ser Gly Met His  
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de nivolumab

<400> 20

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de nivolumab

<400> 21

Asn Asp Asp Tyr  
1

5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera de nivolumab

15 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 23

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> CDR2 de cadena ligera de nivolumab

<400> 23

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

30

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de nivolumab

<400> 24

40

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr  
1 5

<210> 25

45 <211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de pembrolizumab

50

<400> 25

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | 130 | 135 | 140 |
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | 145 | 150 | 155 |
| Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | 165 | 170 | 175 |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | 180 | 185 | 190 |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | 195 | 200 | 205 |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | 210 | 215 | 220 |
| Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | 225 | 230 | 235 |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | 245 | 250 | 255 |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | 260 | 265 | 270 |
| Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | 275 | 280 | 285 |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | 290 | 295 | 300 |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | 305 | 310 | 315 |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | 325 | 330 | 335 |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | 340 | 345 | 350 |
| Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | 355 | 360 | 365 |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |     |     |     |

# ES 2 839 408 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 370 |     | 375 |     | 380 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Leu | Gly | Lys |     |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |

<210> 26

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de pembrolizumab

<400> 26

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 27  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena pesada variable de pembrolizumab

<400> 27

# ES 2 839 408 T3

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

- 5 <210> 28  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> cadena ligera variable de pembrolizumab
- <400> 28

# ES 2 839 408 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR1 de cadena pesada de pembrolizumab  
<400> 29

Asn Tyr Tyr Met Tyr  
1 5

<210> 30  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR2 de cadena pesada de pembrolizumab  
<400> 30

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

<210> 31  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR3 de cadena pesada de pembrolizumab

<400> 31

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr  
1 5 10

5

<210> 32  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> CDR1 de cadena ligera de pembrolizumab

<400> 32

15

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

<210> 33  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> CDR2 de cadena ligera de pembrolizumab

25

<400> 33

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser  
1 5

30

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> CDR3 de cadena ligera de pembrolizumab

<400> 34

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr  
1 5

40

<210> 35  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> cadena pesada de pidilizumab

50

<400> 35

# ES 2 839 408 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ser | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Gln | Trp | Met |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Asp | Ser | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Ala | Glu | Glu | Phe |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Val | Asn | Thr | Ala | Tyr |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Leu | Gln | Ile | Thr | Ser | Leu | Thr | Ala | Glu | Asp | Thr | Gly | Met | Tyr | Phe | Cys |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Val | Arg | Val | Gly | Tyr | Asp | Ala | Leu | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |

# ES 2 839 408 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | 245 | 250 | 255 |     |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | 260 | 265 | 270 |     |
| Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | 275 | 280 | 285 |     |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | 290 | 295 | 300 |     |
| Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | 325 | 330 | 335 |     |
| Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | 340 | 345 | 350 |     |
| Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | 355 | 360 | 365 |     |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | 370 | 375 | 380 |     |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | 405 | 410 | 415 |     |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | 420 | 425 | 430 |     |
| His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     | 435 | 440 | 445 |     |

<210> 36  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

<223> cadena ligera de pidilizumab

<400> 36

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

5

<210> 37

<211> 117

# ES 2 839 408 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena pesada variable de pidilizumab

<400> 37

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

<210> 38  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena ligera variable de pidilizumab

<400> 38

# ES 2 839 408 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 39

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de durvalumab (MEDI4736)

<400> 39

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415

# ES 2 839 408 T3

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

Pro Gly Lys  
450

5 <210> 40  
<211> 265  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cadena ligera de durvalumab (MED14736)

<400> 40

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

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

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

Ala Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser  
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser  
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg  
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg  
115 120 125

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser  
130 135 140

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
145 150 155 160

# ES 2 839 408 T3

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
165 170 175

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
180 185 190

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
195 200 205

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
210 215 220

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
225 230 235 240

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
245 250 255

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
260 265

- 5 <210> 41  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> cadena pesada variable de durvalumab (MEDI4736)
- <400> 41

ES 2 839 408 T3

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

<210> 42  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena ligera variable de durvalumab (MEDI4736)  
<400> 42

# ES 2 839 408 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada de durvalumab (MEDI4736)

<400> 43

Arg Tyr Trp Met Ser  
1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de durvalumab (MEDI4736)

<400> 44

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

# ES 2 839 408 T3

<220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada de durvalumab (MEDI4736)  
 <400> 45  
 5                   Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr  
                   1                   5                   10  
 <210> 46  
 <211> 12  
 10   <212> PRT  
      <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera de durvalumab (MEDI4736)  
 15   <400> 46  
                   Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
                   1                   5                   10  
 20   <210> 47  
      <211> 7  
      <212> PRT  
      <213> Secuencia artificial  
 25   <220>  
      <223> CDR2 de cadena ligera de durvalumab (MEDI4736)  
      <400> 47  
                   Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
                   1                   5  
 30   <210> 48  
      <211> 9  
      <212> PRT  
 35   <213> Secuencia artificial  
      <220>  
      <223> CDR3 de cadena ligera de durvalumab (MEDI4736)  
 40   <400> 48  
                   Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr  
                   1                   5  
 45   <210> 49  
      <211> 448  
      <212> PRT  
      <213> Secuencia artificial  
 50   <220>  
      <223> cadena pesada de atezolizumab (MPDL3280A)  
      <400> 49

# ES 2 839 408 T3

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

# ES 2 839 408 T3

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

|    | 435                                                                      | 440 | 445 |
|----|--------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | <210> 50<br><211> 214<br><212> PRT<br><213> Secuencia artificial         |     |     |
| 10 | <220><br><223> cadena ligera de atezolizumab (MPDL3280A)<br><br><400> 50 |     |     |

# ES 2 839 408 T3

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

<210> 51  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena pesada variable de atezolizumab (MPDL3280A)

# ES 2 839 408 T3

<400> 51

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

5

<210> 52  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> cadena ligera variable de atezolizumab (MPDL3280A)

15

<400> 52

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |   |    |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|----|----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Asp | Val | Ser | Thr | Ala |   |   |    |    |

# ES 2 839 408 T3

20

25

30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala  
85 90 95

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

<210> 53  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR1 de cadena pesada de atezolizumab (MPDL3280A)

<220>  
<221> variante  
<222> (6).. (6)  
<223> el resto es D o G

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His  
1 5 10

<210> 54  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR2 de cadena pesada de atezolizumab (MPDL3280A)

<220>  
<221> variante  
<222> (4).. (4)  
<223> el resto es S o L

<220>  
<221> variante  
<222> (10)..(10)  
<223> el resto es T o S

<400> 54

Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
1 5 10 15

Lys Gly

5 <210> 55  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
10 <220>  
<223> CDR3 de cadena pesada de atezolizumab (MPDL3280A)  
  
<400> 55

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr  
1 5

15 <210> 56  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
20 <220>  
<223> CDR1 de cadena ligera de atezolizumab (MPDL3280A)  
  
25 <220>  
<221> variante  
<222> (5)..(5)  
<223> el resto es D o V  
  
30 <220>  
<221> variante  
<222> (6)..(6)  
<223> el resto es V o I  
  
35 <220>  
<221> variante  
<222> (7)..(7)  
<223> el resto es S o N  
  
40 <220>  
<221> variante  
<222> (9)..(9)  
<223> el resto es A o F  
  
45 <220>  
<221> variante  
<222> (10)..(10)  
<223> el resto es V o L  
  
<400> 56

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala  
1 5 10

50 <210> 57  
<211> 7  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR2 de cadena ligera de atezolizumab (MPDL3280A)

5 <220>  
<221> variante  
<222> (4).. (4)  
<223> el resto es F o T

10 <220>  
<221> variante  
<222> (6).. (6)  
<223> el resto es Y o A

15 <400> 57

Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser  
1 5

<210> 58  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> CDR3 de cadena ligera de atezolizumab (MPDL3280A)

25 <220>  
<221> variante  
<222> (3)..(3)  
<223> el resto es Y, G, F o S

30 <220>  
<221> variante  
<222> (4)..(4)  
<223> el resto es L, Y, F o W

35 <220>  
<221> variante  
<222> (5)..(5)  
<223> el resto es Y, N, A, T, G, F o I

40 <220>  
<221> variante  
<222> (6).. (6)  
<223> el resto es H, V, P, T o I

45 <220>  
<221> variante  
<222> (8)..(8)  
<223> el resto es A, W, R, P o T

50 <400> 58

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr  
1 5

55 <210> 59  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> cadena pesada de avelumab (MSB0010718C)

# ES 2 839 408 T3

<400> 59

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

ES 2 839 408 T3

[illegible]

<210> 60  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cadena ligera de avelumab (MSB0010718C)

10

<400> 60

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

# ES 2 839 408 T3

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 61  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena pesada variable de avelumab (MSB0010718C)

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 62  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena ligera variable de avelumab (MSB0010718C)

<400> 62

# ES 2 839 408 T3

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
20 25 30

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

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser  
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 63  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR1 de cadena pesada de avelumab (MSB0010718C)  
<400> 63

Ser Tyr Ile Met Met  
1 5

<210> 64  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR2 de cadena pesada de avelumab (MSB0010718C)  
<400> 64

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 65  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de avelumab (MSB0010718C)

<400> 65

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr  
1 5 10

5

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera de avelumab (MSB0010718C)

15 <400> 66

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser  
1 5 10

20

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> CDR2 de cadena ligera de avelumab (MSB0010718C)

<400> 67

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser  
1 5

30

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de avelumab (MSB0010718C)

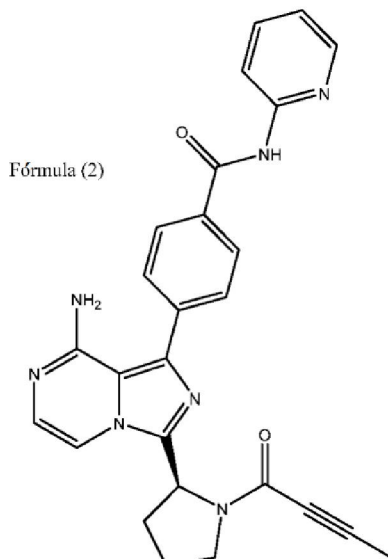
<400> 68

40

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val  
1 5 10

# REIVINDICACIONES

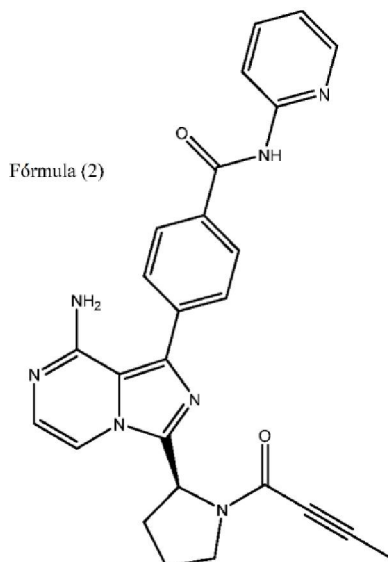
1. Una combinación que comprende un inhibidor de BTK que tiene la estructura de Fórmula (2):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

2. Una composición que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de:

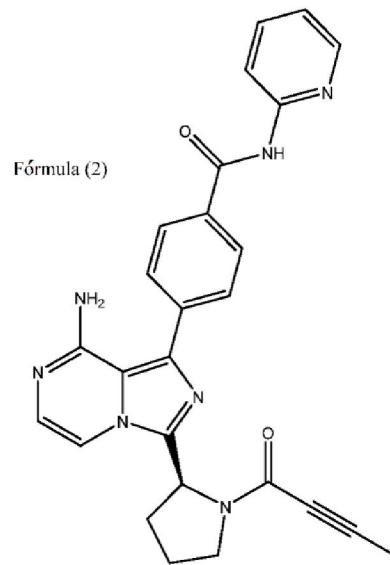
(1) un inhibidor de BTK que tiene la estructura de fórmula (2):



o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y (2) metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

3. Un kit que comprende:

una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de BTK que tiene la estructura de Fórmula (2):



5 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y  
 una composición farmacéutica que comprende metotrexato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable,  
 para la coadministración del metotrexato y del compuesto de fórmula (2), ya sea simultáneamente o por separado,  
 para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

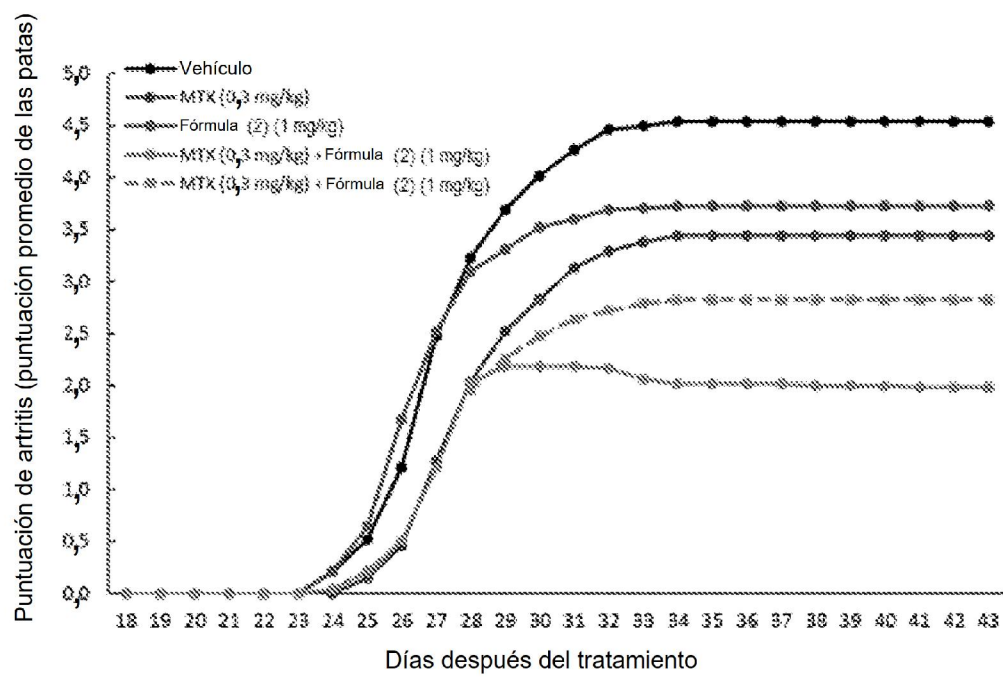


FIG. 1

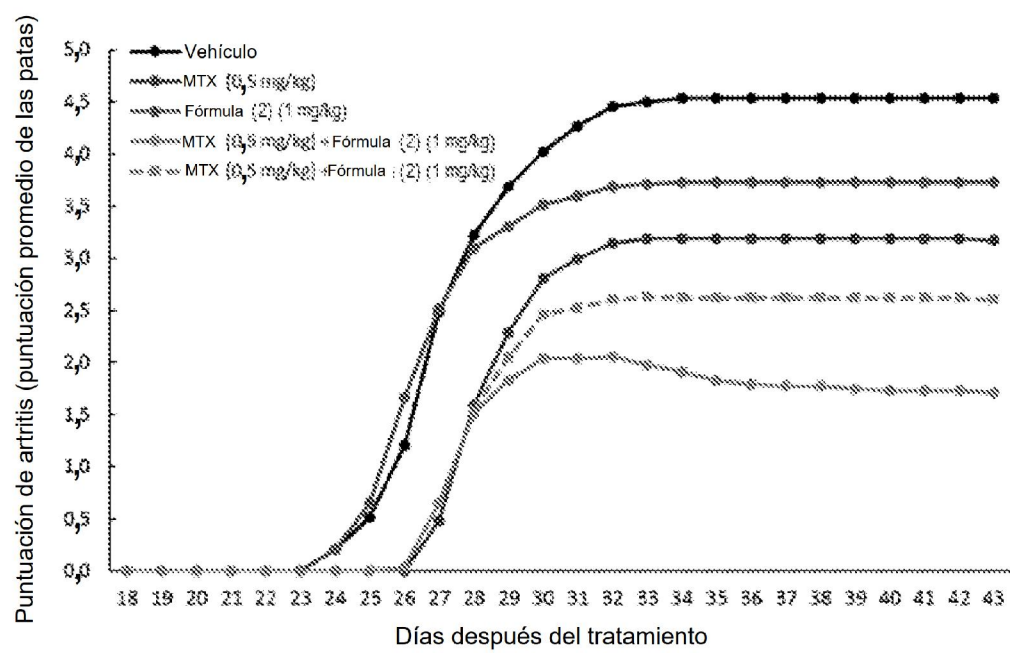


FIG. 2

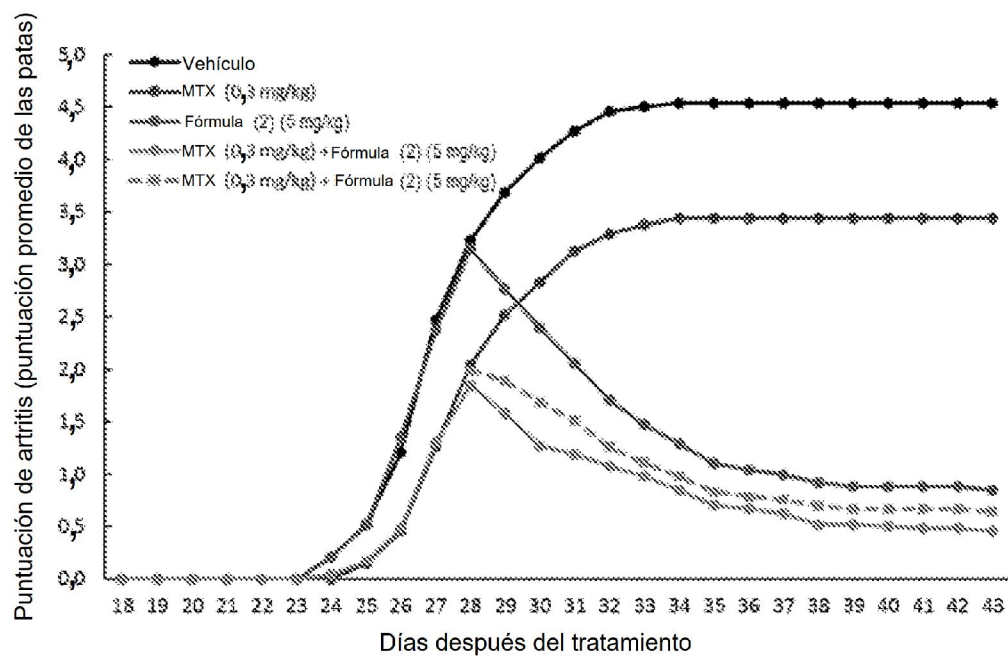


FIG. 3

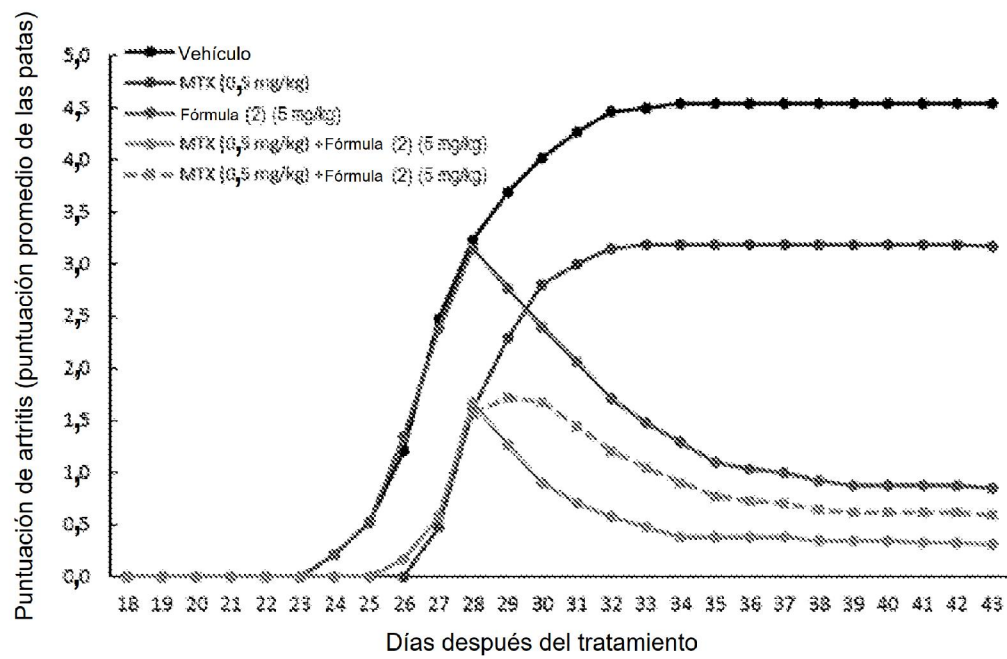


FIG. 4