

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 674**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 33/243 (2009.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2019** **PCT/EP2019/076116**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2020** **WO20064971**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2019** **E 19783237 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3856251**

54 Título: **Combinación de un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

26.09.2018 US 201862736699 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2025

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (50.00%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE y
PFIZER INC. (50.00%)

72 Inventor/es:

ALIMZHANOV, MARAT;
SOULARD, PATRICIA;
ZENKE, FRANK;
DAHMEN, HEIKE;
ZIMMERMANN, ASTRID;
SCHROEDER, ANDREAS;
TADJALLI MEHR, KEYVAN y
FALK, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 009 674 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino para el tratamiento de cáncer

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una combinación terapéutica útil para el tratamiento de cáncer. En particular, la invención se refiere a una combinación terapéutica que comprende un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino.

Antecedentes de la invención

El mecanismo de coestimulación de células T ha ganado interés terapéutico significativo en los últimos años por su potencial para mejorar la respuesta inmunitaria basada en células. Las moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígeno (APC) promueven e inducen células T para promover la expansión clonal, secreción de citocinas y función efectora. En la ausencia de coestimulación, las células T pueden volverse refractarias a la estimulación de antígeno, no montar una respuesta inmunitaria efectiva y además, pueden dar por resultado el agotamiento o tolerancia a antígenos extraños (Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. (1996) 14: 233). Recientemente, se ha descubierto que la disfunción o anergia de células T se presenta simultáneamente con una expresión inducida y sostenida del receptor inhibidor, polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). El receptor de muerte programada 1 (PD-1) y los ligandos 1 y 2 de PD-1 (PD-L1 y PD-L2, respectivamente) desempeñan funciones integrales en la regulación inmunitaria. Expresado en células T activadas, PD-1 se activa por PD-L1 (también conocido como B7-H1) y PD-L2 expresado por células estromales, células tumorales o ambas, iniciando la muerte de células T y la supresión inmunitaria localizada (Dong et al. (1999) Nat Med 5: 1365; Freeman et al. (2000) J Exp Med 192: 1027), proporcionando potencialmente un ambiente inmunotolerante para el desarrollo y crecimiento tumoral. Por el contrario, la inhibición de esta interacción puede mejorar las respuestas locales de células T y mediar la actividad antitumoral en modelos animales no clínicos (Iwai et al. (2002) PNAS USA 99: 12293). Como resultado, se están estudiando varios agentes de anticuerpos monoclonales (mAb) que se dirigen al eje PD-1/ PD-L1 para diferentes cánceres, y cientos de ensayos clínicos sobre mAb anti-PD-1 y anti-PD-L1 están en desarrollo activo.

PD-L1 se expresa en una amplia variedad de cánceres con una alta frecuencia, hasta 88 % en algunos tipos de cáncer. En varios de estos cánceres, incluidos cánceres de pulmón, renal, de páncreas y de ovario, la expresión de PD-L1 se asocia con una supervivencia reducida y un pronóstico desfavorable. Curiosamente, la mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumores expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que el aumento de forma regulada de PD-1 en células T reactivas a tumores puede contribuir a respuestas inmunitarias antitumorales alteradas (Ahmadzadeh et al. (2009) Blood 14(8): 1537). Esto se puede deber a la explotación de la señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que expresan PD-L1 que interactúan con células T que expresan PD-1 para dar por resultado la atenuación de la activación de células T y evasión de la vigilancia inmunitaria (Keir et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26: 677).

El estrés genotóxico, como se provoca por agentes que contienen platino, conduce a un aumento de forma regulada de la expresión de PD-L1 en las células cancerosas, lo que puede limitar la inmunidad antitumoral. De acuerdo con varios informes, el aumento de forma regulada de PD-L1 se invierte nuevamente por la inhibición concurrente de la cinasa ATR, que se implica en la vía de reparación de rupturas de doble hebra de ADN (Sato et al. (2017) Nat Commun. Nov 24;8(1):1751; Schaaf et al. AACR, Cancer Res 2016;76(14 Suppl): Abstract nr 2223; Teng et al. (2017) Gynecologic Oncology 145(1):37-38). Por consiguiente, se cree que la inhibición de ATR no solo sensibiliza las células cancerosas a los agentes que contienen platino al inhibir la reparación del ADN, sino también al inhibir la expresión de PD-L1 para restaurar la respuesta inmunitaria antitumoral.

Sun et al. describen que la inhibición de ATR disminuye de forma regulada PD-L1 y sensibiliza a las células tumorales a la aniquilación mediada por células T (Sun et al., Am J Cancer Res. 2018 Jul 1;8(7):1307-1316).

Sigue existiendo la necesidad de desarrollar opciones terapéuticas novedosas para el tratamiento de cánceres. Además, existe la necesidad de terapias que tengan mayor eficacia que las terapias existentes. Las terapias de combinación preferidas de la presente invención muestran mayor eficacia que el tratamiento con cualquier agente terapéutico solo.

Sumario de la invención

Cada una de las realizaciones descritas más adelante se puede combinar con cualquier otra realización descrita en la presente que no sea inconsistente con la realización con la que se combina. Además, cada una de las realizaciones descritas en la presente prevé dentro de su alcance sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente. Por consiguiente, la frase "o una sal farmacéuticamente aceptable de lo

mismo" está implícita en la descripción de todos los compuestos descritos en la presente. Las realizaciones dentro de un aspecto como se describe más adelante se pueden combinar con cualquier otra realización que no sea inconsistente dentro del mismo aspecto o un aspecto diferente.

A pesar de los descubrimientos de la técnica anterior de que el aumento de forma regulada de PD-L1, que se induce por el agente que contiene platino, se puede revertir por el tratamiento concurrente con un inhibidor de ATR, los inventores descubrieron sorprendentemente que la actividad antitumoral de la administración combinada de un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR se puede aumentar aún más por la administración de estos en combinación con un inhibidor de la vía de PD-1.

Sin que se limite por teoría, las posibles explicaciones para el efecto mejorado incluyen mecanismos que conducen a presentación/generación de antígeno tumoral mejorada o la inducción de citocinas/quimioquinas que atraen linfocitos citotóxicos para aniquilar las células tumorales. En combinación con quimioterapias como un agente que contiene platino, la inhibición de ATR puede mejorar la aniquilación celular y la exposición de patrones moleculares asociados con daño (ATP, calreticulina, HMGB1, HSP70) que conducen a la activación de células dendríticas y una respuesta de células T mejorada, también conocida como muerte celular inmunogénica. Como un regulador clave de la respuesta al daño de ADN durante el estrés de replicación, la inhibición de ATR puede conducir a aberraciones genómicas que a su vez pueden incrementar la carga mutacional de las células tumorales que conducen a la generación de nuevos antígenos. El ADN dañado puede activar mecanismos de detección intracelular que a su vez estimulan una cascada de señalización que conduce a la liberación de citocinas en el microambiente tumoral que puede atraer potencialmente células inmunitarias para atacar las células tumorales.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino para su uso en un método para tratar un cáncer, donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, y donde el inhibidor de ATR se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidoil)ciclopropil]pirimidin-2-il]-1H-pirrol-2,3-b}piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En algunas realizaciones, el cáncer se identifica como enfermedad cancerosa positiva para PD-L1.

Los tipos específicos de cáncer que se van a tratar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, peritoneo, trompas de Falopio, pulmón, cabeza y cuello, colon, sistema neuroendocrino, urotelio, próstata, esófago, vejiga, estómago, mesénquima, mama, páncreas y subtipos histológicos de los mismos. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), cáncer colorrectal (CRC), tumores neuroendocrinos primarios y sarcoma o cáncer recurrente resistente a PARPi seleccionado de cáncer de ovario, peritoneal primario y de trompas de Falopio. En algunas realizaciones preferidas, el cáncer es un cáncer recurrente resistente a PARPi seleccionado de cáncer de ovario, peritoneal primario y de trompas de Falopio.

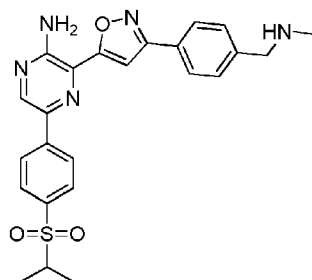
La combinación triple mencionada anteriormente se puede administrar en un tratamiento de primera línea, de segunda línea o superior (es decir, más allá de la terapia en sujetos) del cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer de ovario, cáncer peritoneal primario, cáncer de trompas de Falopio, enfermedad extensa (ED) de SCLC, NSCLC y SCCHN se seleccionan para el tratamiento de primera línea. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente o se volvió resistente a la terapia previa contra cáncer. La terapia de combinación de la invención también se puede usar en el tratamiento de un sujeto con el cáncer que se ha tratado previamente con una o más quimioterapias o se ha sometido a radioterapia pero no con el tratamiento previo. El cáncer para el tratamiento de segunda línea o más allá puede ser cáncer de ovario, cáncer peritoneal primario, cáncer de trompa de Falopio, NSCLC metastásico recidivante pretratado, NSCLC localmente avanzado irresecable, SCLC ED, SCLC ED pretratado, SCLC inadecuado para tratamiento sistémico, SCCHN recidivante o metastásico pretratado, SCCHN recurrente elegible para re-irradiación, cáncer colorrectal metastásico (mCRC) inestable de estado de microsatélites bajo (MSI-L) o de estado de microsatélites estable (MSS) pretratado, subconjunto pretratado de pacientes con mCRC (es decir, MSI-L o MSS) y tumores sólidos inestables de microsatélites altos (MSI-H) o deficientes en reparación de malapareamiento irresecables o metastásicos que progresan después del tratamiento previo y que no tienen opciones de tratamiento alternativas satisfactorias. En algunas realizaciones, un cáncer recurrente resistente a PARPi seleccionado de cáncer de ovario, peritoneal primario y de trompa de Falopio se trata con la combinación del antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino.

En algunas realizaciones, la combinación triple se usa en el tratamiento de un sujeto humano.

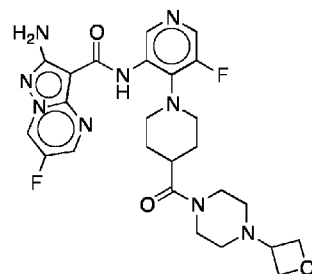
En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, que comprende una cadena pesada, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y una cadena ligera, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. El anticuerpo anti-PD-L1 comprende preferentemente la cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 u 8 y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab.

En alguna realización, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, se administra de manera intravenosa (por ejemplo, como una infusión intravenosa) o de manera subcutánea, preferentemente de manera intravenosa. Más preferentemente, el anticuerpo se administra como una infusión intravenosa. Más preferentemente, el anticuerpo se administra durante 50-80 minutos, muy preferentemente como una infusión intravenosa de una hora. En alguna realización, el anticuerpo se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal una semana sí, una semana no (es decir, cada dos semanas, o "Q2W"). En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra a un régimen de dosificación fijo de 800 mg como una infusión IV de 1 hora Q2W. En otra realización, el anticuerpo se administra a una dosis de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal cada tres semanas ("Q3W"). En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra a un régimen de dosificación fijo de 1600 mg como una infusión IV Q3W.

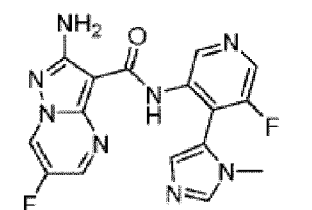
En algunos aspectos, el inhibidor de ATR se representa por una de las siguientes fórmulas:



Compuesto 1,



Compuesto 2,



Compuesto 3

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En algunas realizaciones, el agente que contiene platino es carboplatino.

En otras realizaciones, el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR y agente que contiene platino se usan en combinación con radioterapia (RT), una quimioterapia (CT) adicional o quimiorradioterapia (CRT).

En la presente también se proporciona una composición farmacéutica que comprende el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR y agente que contiene platino y al menos un excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR y agente que contiene platino.

En diferentes realizaciones, el antagonista de PD-1 de la combinación terapéutica es avelumab, el inhibidor de

ATR es cualquiera de los compuestos 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo, y el agente que contiene platino es carboplatino.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de cadena pesada de avelumab. (A) SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de cadena pesada de longitud completa de avelumab. Las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se marcan por subrayado. (B) SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de cadena pesada de avelumab sin la lisina C-terminal. Las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se marcan por subrayado.

La figura 2 (SEQ ID NO: 9) muestra la secuencia de cadena ligera de avelumab. Las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 se marcan por subrayado.

La figura 3 muestra el efecto de combinación de dos inhibidores de ATR con diferentes agentes quimioterapéuticos, incluidos los agentes que contienen platino, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino sobre el crecimiento celular de 35 líneas de células cancerosas. El efecto de combinación se expresa como exceso de BLISS sobre los efectos aditivos de monoterapia. Los valores de exceso de BLISS positivos son efectos sinérgicos, y los valores de exceso de BLISS negativos son efectos antagónicos. Los valores entre -0,1 y 0,1 se consideran cercanos al efecto de combinación lineal.

La figura 4 muestra el cambio relativo de pesos corporales (%) de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 hembra que portan tumores establecidos MC38. El cambio de peso corporal se calculó con base en el peso animal en el primer día de dosificación (D0). Los puntos de datos representan el por ciento de cambio medio de grupo en el peso corporal. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los datos se muestran hasta la fecha 17, después de lo cual los animales con tumores grandes se sacrificaron y los promedios de los grupos de estudio se afectaron en consecuencia.

La figura 5 muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 que portan tumores establecidos MC38. Los puntos de datos representan la media de grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los datos se muestran hasta la fecha 17, después de lo cual los animales con tumores grandes se sacrificaron y los promedios de los grupos de estudio se afectaron en consecuencia.

La figura 6 muestra las curvas de supervivencia de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 que portan tumores establecidos MC38. Los animales se sometieron a eutanasia cuando alcanzaron una carga tumoral de 3.000 mm³.

La figura 7 muestra el cambio relativo de pesos corporales (%) de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 hembra que portan tumores establecidos MC38. El cambio de peso corporal se calculó con base en el peso animal en el primer día de dosificación (D0). Los puntos de datos representan el por ciento de cambio medio de grupo en el peso corporal. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los datos se muestran hasta la fecha 17, después de lo cual los animales con tumores grandes se sacrificaron y los promedios de los grupos de estudio se afectaron en consecuencia.

La figura 8 muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 que portan tumores establecidos MC38. Los puntos de datos representan la media de grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los datos se muestran hasta la fecha 17, después de lo cual los animales con tumores grandes se sacrificaron y los promedios de los grupos de estudio se afectaron en consecuencia.

La figura 9 muestra las curvas de supervivencia de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 que portan tumores establecidos MC38. Los animales se sometieron a eutanasia cuando alcanzaron una carga tumoral de 3.000 mm³.

La figura 10 muestra el cambio relativo de pesos corporales (%) de diferentes grupos de ratones C57BL/6 hembra reexpuestos con MB49. El cambio se calculó con base en el peso animal en el primer día de inoculación celular. Los puntos de datos representan el por ciento de cambio medio de grupo en el peso corporal. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

La figura 11 muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de ratones C57BL/6 hembra reexpuestos con MB49. Los puntos de datos representan la media de grupo, las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

La figura 12 muestra las curvas de supervivencia de diferentes grupos de tratamiento de ratones C57BL/6 que portan tumores establecidos MB49. Los animales se sometieron a eutanasia cuando alcanzaron una carga tumoral

de 2.000 mm³.

La figura 13 muestra (A) la modulación de las vías de IFN gamma y (B) alfa/beta *in vitro* - tratamiento de combinación de ATRI/carboplatino versus vehículo o agente individual a 48 horas.

La figura 14 muestra (A) la modulación de las vías de IFN gamma y (B) alfa/beta *in vivo* - tratamiento de combinación de ATRI/carboplatino/avelumab versus agente individual o doblete después de 3 días de tratamiento.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

"Un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un anticuerpo se refiere a uno o más anticuerpos o al menos un anticuerpo. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se usan indistintamente en la presente.

"Aproximadamente" cuando se usa para modificar un parámetro numéricamente definido (por ejemplo, la dosis de un compuesto, o la duración del tiempo de tratamiento con una terapia de combinación descrita en la presente) significa que el parámetro puede variar hasta en 10 % por debajo o por arriba del valor numérico señalado para ese parámetro. Por ejemplo, una dosis de aproximadamente 10 mg/kg puede variar entre 9 mg/kg y 11 mg/kg.

"Administrar" o "administración de" un fármaco a un paciente (y equivalentes gramaticales de esta frase) se refiere a administración directa, que puede ser la administración a un paciente por un profesional médico o puede ser autoadministración y/o administración indirecta, que puede ser el acto de prescribir un fármaco. Por ejemplo, un médico que instruye a un paciente para autoadministrarse un fármaco o proporciona a un paciente una prescripción para un fármaco está administrando el medicamento al paciente.

"Anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también, a menos que se especifique de otro modo, cualquier fragmento de unión a antígeno o fragmento de anticuerpo del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno (por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco), cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno, composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

"Fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo o "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que aún es capaz de unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los fragmentos de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv, anticuerpos de dominio (dAb, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido), fragmentos que incluyen regiones determinantes de complementariedad (CDR), anticuerpos de fragmento variable de cadena individual (scFv), moléculas de anticuerpo de cadena individual, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv, anticuerpos lineales (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5,641,870, Ejemplo 2; Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8HO: 1057), y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido. La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un sitio de unión a antígeno individual. El tratamiento de pepsina de un anticuerpo produce un fragmento F(ab')₂ grande individual, que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tienen diferente actividad de unión a antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_H1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab' en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

"Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula objetivo que porta antígeno y posteriormente aniquilen la célula objetivo por citotoxinas. Los anticuerpos arman las células citotóxicas y se requieren para aniquilación de la célula objetivo por este mecanismo. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, en tanto

que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991).

“Anticuerpo anti-PD-L1” o “anticuerpo anti-PD-1” significa un anticuerpo que bloquea la unión de PD-L1 expresado en una célula cancerosa a PD-1. En cualquiera de los métodos de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención en los que se está tratando a un sujeto humano, el anticuerpo anti-PD-L1 se une específicamente a PD-L1 humano y bloquea la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano y el anticuerpo anti-PD-1 se une específicamente a PD-1 humano y bloquea la unión de PD-1 humano a PD-L1 humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico, y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante de IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que se unen a PD-L1 humano, y útiles en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención, se describen en WO 2007/005874, WO 2010/036959, WO 2010/077634, WO 2010/089411, WO 2013/019906, WO 2013/079174, WO 2014/100079, WO 2015/061668 y patente de Estados Unidos No. 8,552,154, 8,779,108 y 8,383,796. Los anticuerpos monoclonales específicos anti-PD-L1 humano o anti-PD-1 humano útiles como antagonista de PD-1 en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención incluyen, por ejemplo, sin limitación, avelumab (MSB0010718C), nivolumab (BMS- 936558), pembrolizumab, mAb7 (también referido como RN888 o PF-6801591) como se describe en WO2016/092419, atezolizumab, durvalumab, cemiplimab, MPDL3280A (un anticuerpo anti-PD-L1 modificado por IgG1), BMS-936559 (un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1, de IgG4 completamente humano), MEDI4736 (un anticuerpo monoclonal kappa de IgG1 modificado con mutaciones triples en el dominio Fc para remover la actividad citotóxica mediada por células, dependiente de anticuerpos) y un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 21, respectivamente, de WO 2013/019906.

“Inhibidor de ATR” o “ATRI” se refiere a un inhibidor de la vía de cinasa ATR, que media la respuesta de daño de ADN. Preferentemente, el inhibidor de ATR es una molécula que inhibe la actividad enzimática de la cinasa ATR. Los ejemplos de inhibidores de ATR que son útiles en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la presente invención incluyen cualquiera de los compuestos 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo. Se describen inhibidores de ATR adicionales en WO 2013/049726, WO 2013/152298, WO 2013/049859, US-2013-0089625, US-2013-0115312, US-2014-0107093, US- 2013-0096139, WO 2011/143426, US-2013-0095193, WO 2014/055756, WO 2011/143419, WO 2011/143422, WO 2011/143425, US-2013-0115311, US-2013-0115312, US-2013-0115313, US-2013-0115314, WO 2011/163527, WO 2012/178123, WO 2012/178124, WO 2012/178125, US-2014-0113005, WO2013/049726, WO 2013/071085, WO 2010/071837, WO 2014/089379, WO 2014/143242, WO 2014/143241, WO 2015/084384, WO 2014/143240, WO 2015/187451, WO 2015/085132, WO 2014/062604, WO 2014/143240, WO 2013/071094, WO 2013/071093, WO 2013/071090, WO 2013/071088, WO 2013/049859, WO 2013/049719, WO 2013/049720, WO 2013/049722, WO 2012/138,938, WO 2011/163527, WO 2011/143,423, WO 2011/143,426, WO 2011/143,399 y/o WO 2010/054398.

“Biomarcador” se refiere en general a moléculas biológicas, y mediciones cuantitativas y cualitativas de las mismas, que son indicativas de un estado de enfermedad. Los “biomarcadores de pronóstico” se correlacionan con el resultado de enfermedad, independientemente de la terapia. Por ejemplo, la hipoxia tumoral es un marcador de pronóstico negativo, cuanto mayor sea la hipoxia tumoral, mayor será la probabilidad de que el resultado de la enfermedad sea negativo. Los “biomarcadores predictivos” indican si es probable que un paciente responda positivamente a una terapia particular. Por ejemplo, el perfil de HER2 se usa comúnmente en pacientes con cáncer de mama para determinar si es probable que aquellos pacientes respondan a Herceptin (trastuzumab, Genentech). Los “biomarcadores de respuesta” proporcionan una medida de la respuesta a una terapia y, por lo tanto, proporcionan una indicación de si una terapia está funcionando. Por ejemplo, la disminución de los niveles de antígeno específico de próstata en general indica que la terapia anti-cáncer para un paciente con cáncer de próstata está funcionando. Cuando se usa un marcador como base para identificar o seleccionar un paciente para un tratamiento descrito en la presente, el marcador se puede medir antes y/o durante el tratamiento, y los valores obtenidos se usan por un médico en la valoró de cualquiera de lo siguiente: (a) adecuación probable o posible de un individuo para recibir inicialmente tratamientos; (b) inadecuación probable o posible de un individuo para recibir inicialmente tratamientos; (c) capacidad de respuesta al tratamiento; (d) adecuación probable o posible de un individuo para continuar recibiendo tratamientos; (e) inadecuación probable o posible de un individuo para continuar recibiendo tratamientos; (f) ajuste de dosis; (g) predicción de probabilidad de beneficios clínicos; o (h) toxicidad. Como se entendería bien por un experto en la técnica, la medición de un biomarcador en un ambiente clínico es una clara indicación de que este parámetro se usó como una base para iniciar, continuar, ajustar y/o cesar la administración de los tratamientos descritos en la presente.

“Cáncer”, “canceroso” o “maligno” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de estos cánceres incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple,

cáncer gastrointestinal (tracto), cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, cáncer urotelial y cáncer de cabeza y cuello.

“Quimioterapia” es una terapia que implica un agente quimioterapéutico, que es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tal como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tal como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; briostatina; pemetrexed; callistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofílico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inhibidor oral de integrina alfa-4; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tal como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tal como los antibióticos enediinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gammall y calicheamicina omegall (ver, por ejemplo, Nicolaou et al. (1994) *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.* 33: 183); dinemicina incluida dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos enediinos de cromoproteínas relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluida morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorubicina; antimetabolitos tal como metotrexato, gemcitabina, tegafur, capecitabina, una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina y tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-Kit; antiadrenales tal como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; reponedores de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tal como maitansina y ansamitocinas; mitoguantrona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel, formulación de nanopartículas de paclitaxel modificadas con albúmina y doxetaxel; cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tal como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tal como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, o FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino combinado con 5-FU y leucovovina.

“Resultado clínico”, “parámetro clínico”, “respuesta clínica” o “criterio de valoración clínico” se refiere a cualquier observación o medición clínica relacionada con la reacción de un paciente a una terapia. Los ejemplos no limitantes de resultados clínicos incluyen respuesta tumoral (TR), supervivencia total (OS), supervivencia libre de progresión (PFS), supervivencia libre de enfermedad, tiempo hasta recurrencia tumoral (TTR), tiempo hasta progresión tumoral (TTP), riesgo relativo (RR), toxicidad o efecto secundario.

“Respuesta completa” o “remisión completa” se refiere a la desaparición de todos los signos de cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

“Que comprende”, como se usa en la presente, se propone que signifique que las composiciones y métodos incluyen los elementos mencionados, pero no se excluyen otros. “Que consiste esencialmente en”, cuando se usa para definir composiciones y métodos, debe significar excluir otros elementos de cualquier significancia esencial para la composición o método. “Que consiste en” debe significar excluir más que oligoelementos de otros ingredientes para las composiciones reivindicadas y los pasos sustanciales de método.

Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta

invención. Por consiguiente, se propone que los métodos y composiciones puedan incluir pasos y componentes adicionales (que comprenden) o de manera alternativa, que incluyen pasos y composiciones sin significancia (que consisten esencialmente en) o de manera alternativa, que pretenden solo los pasos o composiciones del método señalados (que consisten en).

"Dosis" y "dosificación" se refieren a una cantidad específica de agentes activos o terapéuticos para administración. Estas cantidades se incluyen en una "forma de dosis", que se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de agente activo calculada para producir el inicio, tolerabilidad y efectos terapéuticos deseados, en asociación con uno o más excipientes farmacéuticos adecuados tal como portadores.

"Mejorar la función de células T" significa inducir, provocar o estimular una célula T para que tenga una función biológica sostenida o amplificada, o renovar o reactivar células T agotadas o inactivas. Los ejemplos de mejora de la función de células T incluyen: secreción incrementada de interferón y de células T CD8+, proliferación incrementada, capacidad de respuesta de antígeno incrementada (por ejemplo, depuración viral, patógena o tumoral) con respecto a estos niveles antes de la intervención. En una realización, el nivel de mejora es al menos 50 %, de manera alternativa 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. La manera de medir esta mejora se conoce por un experto en la técnica.

"Fc" es un fragmento que comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, la región que también se reconoce por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

"Fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que en general incluye la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene o tiene capacidad de unión a FcR modificada. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo funcional incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena individual y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo, que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Este fragmento consiste de un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable individual (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha elaborado usando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se divulga en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diferentes técnicas conocidas en la técnica, incluidas bibliotecas de visualización en fagos (ver, por ejemplo, Hoogenboom and Winter (1991), JMB 227: 381; Marks et al. (1991) JMB 222: 581). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77; Boerner et al. (1991), J. Immunol 147(I): 86; van Dijk and van de Winkel (2001) Curr. Opin. Pharmacol 5: 368). Los anticuerpos humanos se pueden preparar al administrar el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir estos anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, ratones inmunizados (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 6,075,181; y 6,150,584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE). Ver también, por ejemplo, Li et al. (2006) PNAS USA, 103: 3557, con respecto a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de células B humanas.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la capacidad, afinidad y/o especificidad deseada. En algunos casos, los residuos marco ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente el rendimiento de anticuerpo, tal como afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de residuos FR individuales que mejoran el rendimiento de anticuerpo, tal como afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. El número de estas

sustituciones de aminoácidos en la FR habitualmente no es mayor que 6 en la cadena H y no mayor que 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver, por ejemplo, Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522; Riechmann et al. (1988), *Nature* 332: 323; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593; Vaswani and Hamilton (1998), *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105; Harris (1995) *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035; Hurle and Gross (1994) *Curr. Op. Biotech.* 5: 428; y patente de Estados Unidos No. 6,982,321 y 7,087,409.

"Inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en la presente. La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades de heterotetrámero básicas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, en tanto que los anticuerpos IgA comprenden de 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas que pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es en general de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L se enlaza a una cadena H por un enlace de disulfuro covalente, en tanto que las dos cadenas H se enlazan entre sí por uno o más enlaces de disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes de disulfuro intracadena separados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L conjuntamente forma un sitio de unión a antígeno individual. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Sties et al. (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, con base en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases con base en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgK1.

"Infusión" o "infundir" se refiere a la introducción de una solución que contiene fármaco en el cuerpo a través de una vena para propósitos terapéuticos. En general, esto se logra mediante una bolsa intravenosa (IV).

"En combinación con" o "junto con" se refiere a la administración de un compuesto además de uno o más compuestos diferentes. Como tal, "en combinación con" o "junto con" se refiere a la administración de un compuesto además de la administración de uno o más compuestos diferentes en cualquier orden. Por ejemplo, el un compuesto se puede administrar antes, durante o después de la administración del uno o más compuestos diferentes al individuo. Como se usa en la presente, el término "en combinación" con respecto a la administración de la combinación triple que comprende el antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino significa que estos compuestos se administran al paciente en cualquier orden. Por ejemplo, todos los compuestos se pueden administrar de manera simultánea o secuencial. También, se pueden administrar dos compuestos simultáneamente, seguido de la administración secuencial del tercer compuesto. También, los compuestos se pueden administrar como composiciones, formulaciones o formas de dosis unitarias individuales o separadas. Además, se pueden administrar dos compuestos como una composición, formulación o forma de dosis unitaria individual, en tanto que el tercer compuesto se administra como una composición, formulación o forma de dosis unitaria separada. Se apreciará que el antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino se administran el mismo día o en días diferentes y en cualquier orden de acuerdo con un protocolo de dosificación apropiado.

El cáncer "metastásico" se refiere al cáncer que se ha diseminado desde una parte del cuerpo (por ejemplo, el pulmón) a otra parte del cuerpo.

"Anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se presentan de manera natural y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones y amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que se dirigen contra un sitio antigénico individual. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante individual en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan por el cultivo de hibridoma, y no se contaminan por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se va a considerar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método

particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar por una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495; Hongo et al. (1995) *Hybridoma* 14 (3): 253; Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.; Hammerling et al. (1981) In: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 (Elsevier, N.Y.), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4,816,567), tecnologías de visualización en fagos (ver, por ejemplo, Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624; Marks et al. (1992) *JMB* 222: 581; Sidhu et al. (2004) *JMB* 338(2): 299; Lee et al. (2004) *JMB* 340(5): 1073; Fellouse (2004) *PNAS USA* 101(34): 12467; y Lee et al. (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o tipo humano en animales que tienen parte o todos los loci o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al. (1993) *PNAS USA* 90: 2551; Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362: 255; Bruggemann et al. (1993) *Year in Immunol.* 7: 33; patente de Estados Unidos No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 779; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368: 856; Morrison (1994) *Nature* 368: 812; Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 845; Neuberger (1996), *Nature Biotechnol.* 14: 826; y Lonberg and Huszar (1995), *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93). Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente anticuerpos quiméricos (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, en tanto que el resto de la o las cadenas son idénticas con u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de estos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison et al. (1984) *PNAS USA*, 81: 6851).

"Respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, que incluye respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR).

Los tumores o cánceres "resistentes a PARPi" son tumores o cánceres que no pueden, o ya no pueden, tratarse con inhibidores de PARP. La resistencia a PARPi puede ya estar presente antes del primer intento de tratamiento con un PARPi. La resistencia a PARPi también se puede adquirir después del tratamiento inicial con un PARPi, en algunos casos como resultado del tratamiento.

"Respuesta parcial" se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento.

"Paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente para referirse a un mamífero en necesidad de tratamiento para un cáncer. En general, el paciente es un humano diagnosticado o en riesgo de padecer uno o más síntomas de un cáncer. En ciertas realizaciones, un "paciente" o "sujeto" puede referirse a un mamífero no humano, tal como un primate no humano, un perro, gato, conejo, cerdo, ratón o rata, o animales usados en el examen, caracterización y evaluación de fármacos y terapias.

"Antagonista de PD-1" se refiere a un agente que inhibe la vía de PD-1 al bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1. Preferentemente, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo. Más preferentemente, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PDL1. Más preferentemente, el antagonista de PD-1 es avelumab.

"Expresión de PD-L1", como se usa en la presente, significa cualquier nivel detectable de expresión de la proteína PD-L1 en la superficie celular o del ARNm de PD-L1 dentro de una célula o tejido. La expresión de la proteína PD-L1 se puede detectar con un anticuerpo PD-L1 de diagnóstico en un ensayo IHC de una sección de tejido tumoral o por citometría de flujo. De manera alternativa, la expresión de proteína PD-L1 por células tumorales se puede detectar por imagenología PET, usando un agente de unión (por ejemplo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo y similares) que se une específicamente a PD-L1. Las técnicas para detectar y medir la expresión de ARNm de PD-L1 incluyen RT-PCR y RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

El cáncer "positivo a PD-L1", incluida una enfermedad cancerosa "positiva a PD-L1", es uno que comprende células, que tienen PD-L1 presente en su superficie celular. El término "positivo para PD-L1" también se refiere a un cáncer que produce niveles suficientes de PD-L1 en la superficie de las células del mismo, de modo que un anticuerpo anti-PD-L1 tiene un efecto terapéutico, mediado por la unión del anticuerpo anti-PD-L1 a PD-L1.

"Farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente adecuada para el tratamiento de mamíferos.

El término "adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera y todas las sustancias que mejoran la respuesta inmunitaria del cuerpo a un antígeno. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes farmacéuticamente aceptables son: Alumbre, adyuvante incompleto de Freund, MF59, análogos sintéticos de ARNs tal como poli(I:C), LPS bacteriano, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas, oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG específicos, fragmentos de paredes celulares bacterianas tal como muramil dipéptido y Quil-A®.

Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" o "diluyente farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y sin limitar el alcance de la presente invención, incluyen: agentes amortiguadores adicionales; conservadores; cosolventes; antioxidantes, incluido ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tal como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); polímeros biodegradables, tal como poliésteres; contraiones formadores de sal, tal como sodio, alcoholes de azúcar polihídricos; aminoácidos, tal como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tal como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tal como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tal como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tal como polivinilpirrolidona. Otros estabilizadores, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, tal como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980) también se pueden incluir en una composición farmacéutica descrita en la presente, siempre que no afecten negativamente las características deseadas de la composición farmacéutica.

"Sal farmacéuticamente aceptable" de una molécula se refiere a la forma de sal de la molécula. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabiliza la carga en el compuesto de origen. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos donde múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones. Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar por cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidílico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa hidroxilo, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares. Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar por cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tal como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tal como piperidina, morfina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

Un "agente que contiene platino" es un agente alquilante que, entre otras cosas, se une covalentemente al ADN y reticula las hebras de ADN, dando por resultado la inhibición de la síntesis y función de ADN, así como la inhibición de la transcripción. Un agente que contiene platino puede ser cualquier agente quimioterapéutico basado en platino. En algunas realizaciones, el agente que contiene platino se selecciona de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, lobaplatino, triplatino, tetranitrato, heptaplatino, picoplatino, ProLindac (número CAS 674289-90-8), lipoplatino (forma encapsulada liposomalmente de cisplatino), aroplatino y satraplatino.

El cáncer "recurrente" es uno que ha vuelto a crecer, ya sea en el sitio inicial o en un sitio distante, después de una respuesta a la terapia inicial, tal como cirugía. Un cáncer localmente "recurrente" es cáncer que regresa después del tratamiento en el mismo lugar que un cáncer tratado previamente.

"Reducción" de un síntoma o síntomas (y equivalentes gramaticales de esta frase) se refiere a la disminución de la severidad o frecuencia del o de los síntomas, o la eliminación del o de los síntomas.

"Suero" se refiere al líquido claro que se puede separar de la sangre coagulada. El suero difiere del plasma, la porción líquida de sangre normal no coagulada que contiene las células rojas y blancas y las plaquetas. El suero es el componente que no es una célula sanguínea (el suero no contiene glóbulos blancos o rojos) ni un factor de coagulación. Es el plasma sanguíneo, sin incluir los fibrinógenos, el que ayuda en la formación de coágulos de sangre. Es el coágulo el que hace la diferencia entre suero y plasma.

"Fv de cadena individual", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una cadena de polipéptido individual. Preferentemente, el

polipéptido sFv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión del sFv, ver, por ejemplo, Pluckthun (1994), In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 269.

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

El tratamiento "sistémico" es un tratamiento, en el que la sustancia farmacológica viaja a través del torrente sanguíneo, alcanzando y afectando a las células de todo el cuerpo.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" de un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR o un agente que contiene platino, en cada caso de la invención, se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, que, cuando se administra a un paciente con un cáncer, tendrá el efecto terapéutico deseado, por ejemplo, alivio, mejora, paliación o eliminación de una o más manifestaciones del cáncer en el paciente, o cualquier otro resultado clínico en el curso del tratamiento de un paciente con cáncer. Un efecto terapéutico no se presenta necesariamente por la administración de una dosis y puede presentarse solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva se puede administrar en una o más administraciones. Esta cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tal como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR o un agente que contiene platino para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR o un agente que contiene platino se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

"Tratar" o "tratamiento de" una condición o paciente se refiere a tomar pasos para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos. Para propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio, mejora de uno o más síntomas de un cáncer; disminución de grado de enfermedad; retraso o desaceleración de progresión de enfermedad; mejora, paliación o estabilización del estado de enfermedad; u otros resultados beneficiosos. Se va a apreciar que las referencias a "tratar" o "tratamiento" incluyen profilaxis así como el alivio de síntomas establecidos de una condición. "Tratar" o "tratamiento" de un estado, trastorno o condición por lo tanto incluye: (1) prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos del estado, trastorno o condición que se desarrolla en un sujeto que se puede afectar con o se predispone al estado, trastorno o condición pero aún no experimenta o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o condición, (2) inhibir el estado, trastorno o condición, es decir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma (en caso de tratamiento de mantenimiento) o al menos un síntoma clínico o subclínico del mismo, o (3) aliviar o atenuar la enfermedad, es decir, provocar regresión del estado, trastorno o condición o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

"Tumor", como se aplica a un sujeto diagnosticado con, o que se sospecha que tiene, un cáncer, se refiere a una neoplasia maligna o potencialmente maligna o masa de tejido de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasias secundarias. Un tumor sólido es una masa o crecimiento anormal de tejido que usualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Se nombran diferentes tipos de tumores sólidos por el tipo de células que los forman. Ejemplos de tumores sólidos son sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) en general no forman tumores sólidos.

"Forma de dosis unitaria", como se usa en la presente, se refiere a una unidad físicamente discreta de formulación terapéutica apropiada para el sujeto que se va a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico tratante dentro del alcance de un juicio médico sólido. El nivel de dosis efectivo específico para cualquier sujeto u organismo particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la severidad del trastorno; actividad del agente activo específico empleado; composición específica empleada; edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; tiempo de administración y velocidad de excreción del agente activo específico empleado; duración del tratamiento; fármacos y/o terapias adicionales usadas en combinación o coincidencia con compuestos específicos empleados y factores similares conocidos en las artes médicas.

"Variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de todo el intervalo de los dominios variables. En cambio, se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables se llaman regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la

estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen conjuntamente en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver, por ejemplo, Kabat et al. (1991) Sequences of Immunological Interest, 5th edition, National Institute of Health, Bethesda, MD). Los dominios constantes no se implican directamente en la unión de anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diferentes funciones efectoras, tal como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

"Región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera se pueden referir como "V_H" y "V_L", respectivamente. Estos dominios son en general las partes más variables del anticuerpo (con respecto a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.

Como se usa en la presente, una pluralidad de artículos, elementos estructurales, elementos de composición y/o materiales se pueden presentar en una lista común por conveniencia. Sin embargo, estas listas se deben interpretar como si cada miembro de la lista se identificara individualmente como un miembro separado y único. Por lo tanto, ningún miembro individual de esta lista se debe interpretar como un equivalente de facto de cualquier otro miembro de la misma lista únicamente con base en su presentación en un grupo común sin indicaciones en contrario.

Las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden expresar o presentar en la presente en un formato de intervalo. Se va a entender que este formato de intervalo se usa simplemente por conveniencia y brevedad y por lo tanto, se debe interpretar de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente mencionados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subintervalos abarcados dentro del intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se mencionara explícitamente. Como ilustración, se debe interpretar que un intervalo numérico de "aproximadamente 1 a aproximadamente 5" incluye no solo los valores mencionados explícitamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, sino que también incluye valores individuales y subintervalos dentro del intervalo indicado. Por lo tanto, se incluyen en este intervalo numérico valores individuales tal como 2, 3 y 4 y subintervalos tal como de 1-3, de 2-4 y de 3-5, etc., así como 1, 2, 3, 4 y 5, individualmente. Este mismo principio se aplica a los intervalos que mencionan solo un valor numérico como mínimo o máximo. Además, esta interpretación debe aplicarse independientemente de la amplitud del intervalo o las características que se describan.

Abreviaturas

Algunas abreviaturas usadas en la descripción incluyen:

ADCC: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
 ATR: Ataxia Telangiectasia y proteína relacionada con RAD3
 BID: Dos veces al día
 CDR: Región determinante de complementariedad
 CRC: Colorectal cancer
 CRT: Quimiorradioterapia
 CT: Quimioterapia
 ADN: Ácido desoxirribonucleico
 DSB: Ruptura de doble hebra
 Ig: Inmunoglobulina
 IHC: Inmunohistoquímica
 IV: Intravenoso
 mCRC: Cáncer colorectal metastásico
 MSI-H: Estado de microsatélite inestable alto
 MSI-L: Estado de microsatélite inestable bajo
 MSS: Estado de microsatélite estable
 NK: Asesinas naturales
 NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas
 OS: Supervivencia total
 PARPi: inhibidor de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP)
 PD-1: Muerte programada 1
 PD-L1: Ligando de muerte programada 1
 PFS: Supervivencia libre de progresión
 QD: Una vez al día
 QID: Cuatro veces al día
 Q2W: Cada dos semanas
 Q3W: Cada tres semanas
 ARN: Ácido ribonucleico
 RR: Riesgo relativo
 RT: Radioterapia

SCCHN: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

SCLC: Cáncer de pulmón de células pequeñas

SoC: Estándar de atención

TID: Tres veces al día

5 TR: Respuesta tumoral

TTP: Tiempo hasta progresión de tumor

TTR: Tiempo hasta recurrencia de tumor

Realizaciones descriptivas

10

Sin limitarse a ninguna teoría, los inventores asumen que el tratamiento de tumores con un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR sensibiliza a los tumores al tratamiento con antagonista de PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una cadena pesada, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y una cadena ligera, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6. La inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1 mejora las respuestas de células T y media la actividad antitumoral clínica. PD-1 es un receptor de punto de control inmunitario clave expresado por células T activadas, que media la inmunosupresión y funciona principalmente en tejidos periféricos, donde las células T pueden encontrar los ligandos de PD-1 inmunosupresores PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), que se expresan por células tumorales, células estromales o ambas.

15

20

25

La presente invención surgió en parte del descubrimiento de un beneficio de combinación para un antagonista de PD-1, un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR. Sorprendentemente, se demostró que la combinación triple de la presente invención es superior al tratamiento combinado con un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR solamente. Por ejemplo, la combinación triple incrementó aún más la supervivencia en un modelo de tumor de ratón. La potenciación puede ser aditiva, o puede ser sinérgica. El efecto potenciador de la terapia de combinación es al menos aditivo. Los inventores han mostrado que el efecto potenciador de la combinación es sinérgico en un modelo de ratón (ver, por ejemplo, figura 6). Además, los resultados iniciales indican que la terapia de combinación se tolera bien (ver figuras 4, 7, 10).

30

35

40

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de PD-1, un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR para su uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto en necesidad de lo mismo, que comprende administrar al sujeto el antagonista de PD-1, el agente que contiene platino y el inhibidor de ATR, donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonil)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-{4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il}piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidoil)ciclopropil]pirimidin-2-il]-1H-pirrol-2,3-b}piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-{(3R)-3-metilmorfolin-4-il}-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

45

Se entenderá que en todas las realizaciones de la invención se aplica una cantidad terapéuticamente efectiva del antagonista de PD-1, el agente que contiene platino y el inhibidor de ATR.

50

En una realización preferida, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, más preferentemente un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una cadena pesada, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y una cadena ligera, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

55

En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 ejerce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo aislado. En diferentes realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se caracteriza por una combinación de una o más de las características anteriores, como se definió anteriormente.

60

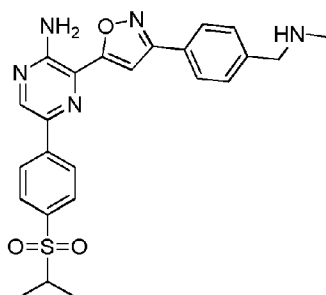
En diferentes realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab. Avelumab (anteriormente designado MSB0010718C) es un anticuerpo monoclonal completamente humano del isotipo G1 de inmunoglobulina (Ig) (ver, por ejemplo, WO 2013/079174). Avelumab se une selectivamente a PD-L1 y bloquea competitivamente su interacción con PD-1. Los mecanismos de acción se basan en la inhibición de la interacción PD-1/PD-L1 y en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) basada en asesinas naturales (NK) (ver, por ejemplo, Boyerinas et al. (2015) Cancer Immunol Res 3: 1148). En comparación con los anticuerpos anti-PD-1 que

65

se dirigen a las células T, avelumab se dirige a las células tumorales y por lo tanto, se espera que tenga menos efectos secundarios, incluido un menor riesgo de problemas de seguridad relacionados con la autoinmunidad, ya que el bloqueo de PD-L1 deja intacta la vía PD-L2/PD-1 para promover la autotolerancia periférica (ver, por ejemplo, Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2(3): 261).

Avelumab, su secuencia y muchas de sus propiedades se han descrito en WO 2013/079174, donde se designa A09-246-2 que tiene las secuencias de cadena pesada y ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 32 y 33, como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 7) y figura 2 (SEQ ID NO: 9), de esta solicitud de patente. Se observa con frecuencia, sin embargo, que en el curso de la producción de anticuerpos, la lisina C-terminal (K) de la cadena pesada se escinde. Esta modificación no influye en la unión anticuerpo-antígeno. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la lisina C-terminal (K) de la secuencia de cadena pesada de avelumab está ausente. La secuencia de cadena pesada de avelumab sin la lisina C-terminal se muestra en la figura 1B (SEQ ID NO: 8), en tanto que la figura 1A (SEQ ID NO: 7) muestra la secuencia de cadena pesada de longitud completa de avelumab. Además, como se muestra en WO 2013/079174, una de las propiedades de avelumab es su capacidad para ejercer citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), actuando así directamente sobre las células tumorales que portan PD-L1 al inducir su lisis sin mostrar ninguna toxicidad significativa. En una realización preferida, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab, que tiene las secuencias de cadena pesada y ligera mostradas en la figura 1A o 1B (SEQ ID NO: 7 u 8) y figura 2 (SEQ ID NO: 9), o un fragmento de unión a antígeno de lo mismo.

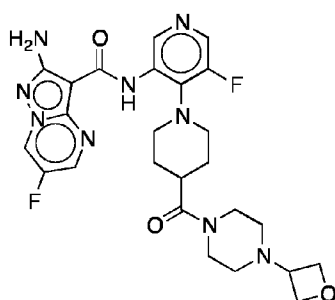
En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de ATR es un compuesto representado por la siguiente fórmula (compuesto 1):



Compuesto 1

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo. El compuesto 1 también se refiere como 3-[3-(4-metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina.

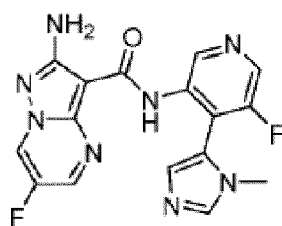
En otras realizaciones preferidas, el inhibidor de ATR es un compuesto representado por la siguiente fórmula (compuesto 2):



Compuesto 2

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo. El compuesto 2 también se refiere como 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-{4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il}piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida.

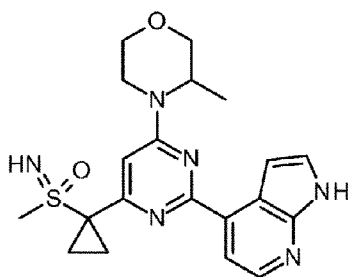
En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de ATR es un compuesto representado por la siguiente fórmula (compuesto 3):



Compuesto 3

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo. El compuesto 3 también se refiere como 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida.

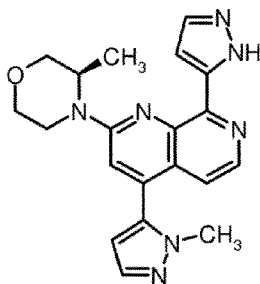
Otro inhibidor de ATR preferido es AZD6738, que también se conoce como ceralasertib (número de registro CAS 1352226-88-0), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tiene la fórmula química 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidol)ciclopropil]pirimidin-2-il]-1H-pirrol-2,3-b}piridina y se representa por la siguiente fórmula (compuesto 4):



Compuesto 4

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo.

Otro inhibidor de ATR preferido tiene la fórmula química 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina y se representa por la siguiente fórmula (compuesto 5):



Compuesto 5

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo.

En un aspecto, el agente que contiene platino es carboplatino.

En una realización, la combinación terapéutica de la invención se usa en el tratamiento de un sujeto humano. El principal beneficio esperado en el tratamiento con la combinación terapéutica es una ganancia en la relación riesgo/beneficio para estos pacientes humanos.

En una realización, el cáncer se identifica como una enfermedad cancerosa positiva para PD-L1. Los análisis farmacodinámicos muestran que la expresión tumoral de PD-L1 puede ser predictiva de la eficacia de tratamiento. De acuerdo con la invención, el cáncer se considera preferentemente positivo para PD-L1 si entre al menos 0,1 % y al menos 10 % de las células del cáncer tienen PD-L1 presente en su superficie celular, más preferentemente entre al menos 0,5 % y 5 %, más preferentemente al menos 1 %. En una realización, la expresión de PD-L1 se determina por inmunohistoquímica (IHC). La inmunohistoquímica con anticuerpos primarios anti-PDL1 se puede realizar en cortes en serie de especímenes fijados con formalina e incrustados en parafina de pacientes tratados con el antagonista de PD-1, tal como avelumab, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino.

En otra realización, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cabeza y cuello, colon, urotelio, próstata, esófago, vejiga, estómago, sistema neuroendocrino, mesénquima, mama, ovario, peritoneo primario, trompas de

Falopio, páncreas y subtipos histológicos de los mismos (por ejemplo, adeno, escamoso, de células grandes). En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), cáncer colorrectal (CRC), tumores neuroendocrinos primarios y sarcoma. En una realización preferida, el cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer peritoneal primario, cáncer de trompas de Falopio, en particular, aquellos que son un cáncer recurrente resistente a PARPi.

En diferentes realizaciones, la combinación terapéutica de la invención se emplea como una primera, segunda, tercera o última línea de tratamiento. Una línea de tratamiento se refiere a un lugar en el orden de tratamiento con diferentes medicamentos u otras terapias recibidas por un paciente. Los regímenes de terapia de primera línea son tratamientos dados primero, en tanto que la terapia de segunda o tercera línea se da después de la terapia de primera línea o después de la terapia de segunda línea, respectivamente. Por lo tanto, la terapia de primera línea es el primer tratamiento para una enfermedad o condición. En pacientes con cáncer, la terapia de primera línea, algunas veces referida como terapia primaria o tratamiento primario, puede ser cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de estas terapias. Habitualmente, a un paciente se le da un régimen de quimioterapia posterior (terapia de segunda o tercera línea), ya sea debido a que el paciente no mostró un resultado clínico positivo o solo mostró una respuesta subclínica a una terapia de primera o segunda línea o mostró una respuesta clínica positiva pero luego experimentó una recaída, algunas veces con enfermedad ahora resistente a la terapia anterior que provocó la respuesta positiva anterior.

Si se confirma la seguridad y beneficio clínico que ofrece la combinación terapéutica de la invención, esta combinación del antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino garantiza un entorno de primera línea en pacientes con cáncer. En particular, la combinación puede convertirse en un nuevo tratamiento estándar para pacientes que padecen un cáncer que se selecciona del grupo de enfermedad extensa (ED) de SCLC, NSCLC, SCCHN, cáncer de ovario, cáncer peritoneal primario y cáncer de trompas de Falopio.

Puesto que el modo de acción difiere entre los inhibidores de ATR, agentes que contienen platino y antagonistas de PD-1, son bajas las posibilidades de tener eventos adversos inmunorrelacionados mejorados. La ausencia de características inmunitarias superpuestas en los descubrimientos no clínicos o en los resultados clínicos publicados hace que el riesgo sea bajo de que la terapia de combinación de la invención muestre eventos adversos mejorados por arriba de lo que en general se observa en estos agentes cuando se administran solos. Se considera que los riesgos identificados y potenciales para el antagonista de PD-1 de la invención, preferentemente avelumab, el inhibidor de ATR, preferentemente el compuesto 1 o 2, y el agente que contiene platino de la invención, preferentemente carboplatino, en cada caso como agente individual, también representan los riesgos potenciales para el tratamiento de combinación.

Se prefiere que la combinación terapéutica de la invención se aplique en una línea de tratamiento posterior, particularmente un tratamiento de segunda línea o superior del cáncer. No hay limitación al número previo de terapias siempre que el sujeto se haya sometido al menos a una ronda de terapia previa contra cáncer. La ronda de terapia previa contra cáncer se refiere a un programa/fase definida para tratar a un sujeto con, por ejemplo, uno o más agentes quimioterapéuticos, radioterapia o quimiorradioterapia, y el sujeto falló con el tratamiento previo, que se completó o terminó antes del programa. Una razón puede ser que el cáncer era resistente o se volvió resistente a la terapia previa. El estándar de atención (SoC) actual para el tratamiento de pacientes con cáncer frecuentemente implica la administración de regímenes de quimioterapia tóxicos y antiguos. El SoC se asocia con altos riesgos de eventos adversos fuertes que probablemente interfieran con la calidad de vida (tal como cánceres secundarios). En una realización, la combinación del antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino puede ser tan efectiva y mejor tolerada que la quimioterapia con SoC en pacientes con cáncer resistente a mono y/o poliquimioterapia, radioterapia o quimiorradioterapia.

En una realización preferida, el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR y agente que contiene platino se administran en un tratamiento de segunda línea o superior, más preferentemente un tratamiento de segunda línea, de un cáncer. En algunas realizaciones, el paciente ha recaído o progresado después de que se le administró una terapia basada en PARPi pero antes de que se le administrara cualquier medicamento de la combinación de la invención. En algunas realizaciones, el paciente se sometió previamente a al menos un ciclo de terapia basado en PARPi. En algunas realizaciones, el paciente se sometió previamente a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis ciclos de terapia basados en PARP. En algunas realizaciones, la terapia basada en PARPi se detuvo después de al menos un ciclo debido a que la enfermedad progresó a pesar de la terapia basada en PARPi. En algunas realizaciones, la terapia basada en PARPi se detuvo después de al menos un ciclo debido a la toxicidad, donde la toxicidad se asocia con la terapia basada en PARPi. En algunas realizaciones, la terapia basada en PARPi se detuvo después de al menos un ciclo debido a una resistencia del paciente a la terapia basada en PARPi. En una realización más preferida, el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR y agente que contiene platino se administran en un tratamiento de segunda línea o superior del cáncer seleccionado del grupo de cáncer de ovario recurrente resistente a PARPi, cáncer de trompas de Falopio recurrente resistente a PARPi, cáncer peritoneal primario recurrente resistente a PARPi, NSCLC metastásico recidivante pretratado, NSCLC localmente avanzado irresecable, SCLC ED pretratado, SCLC inadecuado para tratamiento sistémico, SCCHN recidivante (recurrente) o metastásico pretratado, SCCHN recurrente elegible para re-irradiación y cáncer colorrectal metastásico (mCRC) inestable de

estado de microsatélites bajo (MSI-L) o estado de microsatélites estable (MSS) pretratado. SCLC y SCCHN se pretratan en particular sistémicamente. MSI-L/MSS mCRC se presenta en 85 % de todos los mCRC.

En algunas realizaciones que emplean un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, en la terapia de combinación, el régimen de dosificación comprenderá administrar el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 mg/kg a intervalos de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días) o aproximadamente 21 días ($\pm$ 2 días) o aproximadamente 30 días ($\pm$ 2 días) a lo largo del curso del tratamiento. En otras realizaciones que emplean un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, en la terapia de combinación, el régimen de dosificación comprenderá administrar el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, con aumento de dosis dentro del paciente. En otras realizaciones de dosis en aumento, el intervalo entre dosis se acortará progresivamente, por ejemplo, aproximadamente 30 días ($\pm$ 2 días) entre la primera y segunda dosis, aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días) entre la segunda y tercera dosis. En ciertas realizaciones, el intervalo de dosificación será de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días), para dosis posteriores a la segunda dosis. En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administrará una infusión intravenosa (IV) de un medicamento que comprende el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab. En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1 que se emplea en la terapia de combinación es el anticuerpo anti-PD-L1 avelumab, que se administra de manera intravenosa a una dosis seleccionada del grupo que consiste en: aproximadamente 1 mg/kg Q2W (Q2W = una dosis cada dos semanas), aproximadamente 2 mg/kg Q2W, aproximadamente 3 mg/kg Q2W, aproximadamente 5 mg/kg Q2W, aproximadamente 10 mg/kg Q2W, aproximadamente 1 mg/kg Q3W (Q3W = una dosis cada tres semanas), aproximadamente 2 mg/kg Q3W, aproximadamente 3 mg/kg Q3W, aproximadamente 5 mg/kg Q3W, aproximadamente 10 mg/kg Q3W y aproximadamente 20 mg/kg Q3W. En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1 en la terapia de combinación es el anticuerpo anti-PD-L1 avelumab, que se administra en un medicamento líquido a una dosis seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 1 mg/kg Q2W, aproximadamente 2 mg/kg Q2W, aproximadamente 3 mg/kg Q2W, aproximadamente 5 mg/kg Q2W, aproximadamente 10 mg/kg Q2W, aproximadamente 1 mg/kg Q3W, aproximadamente 2 mg/kg Q3W, aproximadamente 3 mg/kg Q3W, aproximadamente 5 mg/kg Q3W, aproximadamente 10 mg/kg Q3W y aproximadamente 20 mg/kg Q3W. En algunas realizaciones, un ciclo de tratamiento comienza con el primer día de tratamiento de combinación y dura 2 semanas. En estas realizaciones, la terapia de combinación se administra preferentemente durante al menos 12 semanas (6 ciclos de tratamiento), más preferentemente al menos 24 semanas e incluso más preferentemente al menos 2 semanas después de que el paciente logre una CR.

En algunas realizaciones que emplean un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, en la terapia de combinación, el régimen de dosificación comprenderá administrar el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 400-800 mg de dosis fija Q2W. Preferentemente, el régimen de dosificación fijo es 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg u 800 mg de dosis fija Q2W. Más preferentemente, el régimen de dosificación fija es 800 mg de dosis fija Q2W. En algunas realizaciones más preferidas que emplean un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, en la terapia de combinación, el régimen de dosificación será una dosis fija de 800 mg dada de manera intravenosa a intervalos de aproximadamente 14 días ($\pm$ 2 días).

En algunas realizaciones que emplean un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, en la terapia de combinación, el régimen de dosificación comprenderá administrar el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 800-1600 mg de dosis fija Q3W. Preferentemente, el régimen de dosificación fijo es 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 1500 mg u 1600 mg de dosis fija Q3W. Más preferentemente, el régimen de dosificación fija es 1600 mg de dosis fija Q3W. En algunas realizaciones más preferidas que emplean un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, en la terapia de combinación, el régimen de dosificación será una dosis fija de 1600 mg dada de manera intravenosa a intervalos de aproximadamente 21 días ($\pm$ 2 días).

En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, preferentemente avelumab, se dará IV cada dos semanas (Q2W). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra de manera intravenosa durante 50-80 minutos a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal cada dos semanas (Q2W). En una realización más preferida, la dosis de avelumab será 10 mg/kg de peso corporal administrada como infusiones intravenosas de 1 hora cada dos semanas (Q2W). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra de manera intravenosa durante 50-80 minutos a una dosis fija de aproximadamente 800 mg cada dos semanas (Q2W). En una realización más preferida, la dosis de avelumab será de 800 mg administrados como infusiones intravenosas de 1 hora cada 2 semanas (Q2W). Dada la variabilidad de las bombas de infusión de un sitio a otro, se permite una ventana de tiempo de menos 10 minutos y más 20 minutos.

Los estudios farmacocinéticos demostraron que la dosis de 10 mg/kg de avelumab logra una excelente ocupación del receptor con un perfil farmacocinético predecible (ver, por ejemplo, Heery et al. (2015) Proc 2015 ASCO Annual Meeting, abstract 3055). Esta dosis se tolera bien y se han observado signos de actividad antitumoral, incluidas respuestas duraderas. El avelumab se puede administrar hasta 3 días antes o después del día programado de administración de cada ciclo debido a razones administrativas. Las simulaciones farmacocinéticas también

sugirieron que las exposiciones a avelumab en todo el intervalo disponible de pesos corporales son menos variables con 800 mg Q2W en comparación con 10 mg/kg Q2W. Las exposiciones fueron similares cerca del peso medio de población. Los sujetos de bajo peso tendieron a exposiciones marginalmente más bajas en relación con el resto de la población cuando se usó la dosificación basada en peso, y exposiciones marginalmente más altas cuando se aplicó una dosificación fija. No se espera que las implicaciones de estas diferencias de exposición sean clínicamente significativas en ningún peso en toda la población. Además, se espera que el régimen de dosificación de 800 mg Q2W dé por resultado $C_{\text{valle}} > 1$ mg/ml requerido para mantener las concentraciones séricas de avelumab en $> 95\%$ TO a lo largo de todo el intervalo de dosificación Q2W en todas las categorías de peso. En una realización preferida, se utilizará un régimen de dosificación fijo de 800 mg administrado como una infusión IV de 1 hora Q2W para avelumab.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR se administra de manera intravenosa u oral. En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR se administra por infusión continua. El compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra preferentemente de manera intravenosa. El compuesto 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, compuesto 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y compuesto 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran preferentemente de manera oral. En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR que se emplea en la terapia de combinación se puede administrar a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 300 mg/m², entre aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 240 mg/m², entre aproximadamente 40 mg/m² y aproximadamente 240 mg/m², entre aproximadamente 40 mg/m² y aproximadamente 180 mg/m², entre aproximadamente 60 mg/m² y aproximadamente 120 mg/m², entre aproximadamente 80 mg/m² y aproximadamente 120 mg/m², entre aproximadamente 90 mg/m² y aproximadamente 120 mg/m² o entre aproximadamente 80 mg/m² y aproximadamente 100 mg/m². En ciertas realizaciones, el inhibidor de ATR se puede administrar a una dosis entre aproximadamente 40 mg/m² y aproximadamente 300 mg/m² (por ejemplo, aproximadamente 240 mg/m²). En algunos casos, el inhibidor de ATR se puede administrar a una dosis entre aproximadamente 60 mg/m² y aproximadamente 180 mg/m² (por ejemplo, 120 mg/m²). En ciertos casos, el inhibidor de ATR se puede administrar a una dosis entre aproximadamente 80 mg/m² y aproximadamente 100 mg/m² (por ejemplo, aproximadamente 90 mg/m²). En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR se puede administrar a una dosis de aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², aproximadamente 90 mg/m² o aproximadamente 120 mg/m². Preferentemente, el inhibidor de ATR de la combinación terapéutica se administra a una dosis de aproximadamente 90 mg/m².

En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR es el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y se administra a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 300 mg/m², entre aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 240 mg/m², entre aproximadamente 40 mg/m² y aproximadamente 240 mg/m², entre aproximadamente 40 mg/m² y aproximadamente 180 mg/m², entre aproximadamente 60 mg/m² y aproximadamente 120 mg/m², entre aproximadamente 80 mg/m² y aproximadamente 120 mg/m², entre aproximadamente 90 mg/m² y aproximadamente 120 mg/m², o entre aproximadamente 80 mg/m² y aproximadamente 100 mg/m². En algunas realizaciones, el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², aproximadamente 90 mg/m² o aproximadamente 120 mg/m², preferentemente a una dosis de aproximadamente 90 mg/m².

En algunas realizaciones, el agente que contiene platino que se emplea en la terapia de combinación, como se describe en la presente, se administra de manera intravenosa. En algunas realizaciones, el agente que contiene platino se puede administrar a un AUC objetivo de entre aproximadamente 3 mg/ml·min y aproximadamente 7 mg/ml·min, entre aproximadamente 3,5 mg/ml·min y aproximadamente 6 mg/ml·min, entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 6 mg/ml·min, entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 5,5 mg/ml·min, o entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 5 mg/ml·min. En algunas realizaciones, el agente que contiene platino se puede administrar a un AUC objetivo de entre aproximadamente 3 mg/ml·min y aproximadamente 6 mg/ml·min. En ciertas realizaciones, el agente que contiene platino se puede administrar con un AUC objetivo de entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 5 mg/ml·min. En ciertas realizaciones, el agente que contiene platino se puede administrar con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min. Como se usa en la presente, el término "AUC objetivo" se refiere al área bajo la curva objetivo de concentración plasmática versus tiempo. El término "AUC" se refiere al área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo. La dosis de ciertos agentes que contienen platino, tal como carboplatino, se puede determinar a partir de la información de etiqueta de fármaco. Por ejemplo, la dosis en mg de carboplatino se puede determinar a partir del AUC objetivo con base en la fórmula matemática, que se basa en la función renal o función renal preexistente de un paciente y el nadir plaquetario deseado. La fórmula de Calvert, que se muestra más adelante, se usa para calcular la dosis en miligramos, con base en la velocidad de filtración glomerular de un paciente (GFR en ml/min) y el área de carboplatino bajo la curva objetivo de concentración versus tiempo (AUC en mg/ml·min). La GFR se puede medir usando depuración de ⁵¹Cr-EDTA o se puede estimar usando métodos conocidos por el experto en la técnica.

$$\text{Dosis total (mg)} = (\text{AUC objetivo}) \times (\text{GFR} + 25)$$

En alguna realización, el carboplatino se administra de manera intravenosa a un AUC objetivo de entre aproximadamente 3 mg/ml·min y aproximadamente 7 mg/ml·min, entre aproximadamente 3,5 mg/ml·min y aproximadamente 6 mg/ml·min, o entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 5 mg/ml·min. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra de manera intravenosa una vez cada tres semanas a un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min.

En ciertas realizaciones, cisplatino se administra de manera intravenosa. En algunas realizaciones, cisplatino se administra mediante infusión intravenosa durante aproximadamente 1 hora. En ciertas realizaciones, el cisplatino se administra de manera intravenosa en una cantidad de aproximadamente 30 y aproximadamente 90 mg/m², de aproximadamente 40 y aproximadamente 75 mg/m², o de aproximadamente 60 y aproximadamente 90 mg/m². En algunas realizaciones específicas, la dosis de cisplatino es de 40 mg/m², 60 mg/m² o 75 mg/m². Preferentemente, el cisplatino se administra a 75 mg/m². En ciertas realizaciones, el cisplatino se administra mediante infusión intravenosa a aproximadamente 75 mg/m² durante un período de 60 minutos. En algunas realizaciones, el cisplatino se administra una vez cada tres semanas (Q3W), en una cantidad de aproximadamente 75 mg/m².

Se debe entender que todas las combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente para la dosis del antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino para su uso en una terapia de combinación, como se describe en la presente, pueden ser posibles. Además, la dosificación de los tres compuestos empleados en la terapia de combinación se puede adaptar entre sí para mejorar la conveniencia y cumplimiento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente que contiene platino, preferentemente carboplatino, se administra con un AUC objetivo de entre aproximadamente 3 mg/ml·min y aproximadamente 6 mg/ml·min (por ejemplo, entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 6 mg/ml·min, entre aproximadamente 4 mg/ml·min y aproximadamente 5 mg/ml·min o aproximadamente 5 mg/ml·min), el inhibidor de ATR, preferentemente el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra con una dosis entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 300 mg/m² (por ejemplo, entre aproximadamente 40 mg/m² y aproximadamente 180 mg/m², entre aproximadamente 60 mg/m² y aproximadamente 100 mg/m², entre aproximadamente 80 mg/m² y aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 60 mg/m² o aproximadamente 90 mg/m²) y el antagonista de PD-1, preferentemente avelumab, se administra con una dosis entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 3200 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 600 mg y aproximadamente 2500 mg, entre aproximadamente 800 mg y aproximadamente 2000 mg, entre aproximadamente 1500 mg y aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 800 mg o aproximadamente 1600 mg).

En algunas realizaciones, la terapia de combinación emplea avelumab administrado con una dosis de aproximadamente 1600 mg, carboplatino administrado a una dosis con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min y compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrado a una dosis de aproximadamente 90 mg/m². En algunas realizaciones, la terapia de combinación emplea avelumab administrado Q3W con una dosis de aproximadamente 1600 mg, carboplatino administrado Q3W a una dosis con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min y compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrado Q3W a una dosis de aproximadamente 90 mg/m². En algunas realizaciones, avelumab a una dosis de aproximadamente 1600 mg, carboplatino a una dosis con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min y compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a una dosis de aproximadamente 90 mg/m² se administran todos en el día 1 de cada ciclo Q3W.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende una fase principal, opcionalmente seguida de una fase de mantenimiento después de la finalización de la fase principal. Como se usa en la presente, el tratamiento de combinación comprende un período de tratamiento definido (es decir, una primera fase o fase principal). Después de completar el período o fase, puede seguir otro período definido de tratamiento (es decir, una segunda fase o fase de mantenimiento).

En ciertas realizaciones, la fase principal comprende el tratamiento de combinación con el antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino, en tanto que la fase de mantenimiento comprende una monoterapia con el antagonista de PD-1, más preferentemente monoterapia con avelumab.

En algunas realizaciones, la fase principal de, por ejemplo, hasta seis ciclos puede comprender avelumab administrado Q3W con una dosis de aproximadamente 1600 mg, carboplatino administrado Q3W a una dosis con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min y compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrado Q3W a una dosis de aproximadamente 90 mg/m², seguido de una fase de mantenimiento que comprende la administración de 800 mg de avelumab Q2W.

En algunas realizaciones, avelumab, carboplatino y compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se usan en el tratamiento de cáncer de ovario, de trompas de Falopio o peritoneal primario, preferentemente una forma recurrente resistente a PARPi de los mismos, donde la fase principal de, por ejemplo, hasta seis ciclos puede comprender avelumab administrado Q3W con una dosis de aproximadamente 1600 mg,

carboplatino administrado Q3W a una dosis con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml•min y compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrado Q3W a una dosis de aproximadamente 90 mg/m², seguido de una fase de mantenimiento que comprende la administración de 800 mg de avelumab Q2W.

El antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino se pueden administrar en cualquier orden. Por ejemplo, todos se pueden administrar de manera sustancialmente simultánea o secuencial. También, se pueden administrar dos de ellos de forma sustancialmente simultánea, seguido de la administración secuencial del tercero. El antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino se administran al paciente en cualquier orden en composiciones, formulaciones o formas de dosis unitaria separadas, o dos o los tres compuestos se administran juntos en una composición, formulación o forma de dosis unitaria. Se apreciará que el antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino se administran el mismo día o en días diferentes y en cualquier orden de acuerdo con un protocolo de dosificación apropiado. En algunas realizaciones, los tres compuestos se administran por separado en tres días consecutivos de cada ciclo de tratamiento. Por ejemplo, la combinación se administra Q3W con el antagonista de PD-1 que se administra el día 1, el inhibidor de ATR que se administra el día 2 y el agente que contiene platino que se administra el día 3.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende los pasos de: (a) bajo la dirección o control de un médico, el sujeto recibe el antagonista de PD-1 antes de la primera recepción del inhibidor de ATR y el agente que contiene platino; y (b) bajo la dirección o control de un médico, el sujeto recibe el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende los pasos de: (a) prescribir al sujeto para que se autoadministre el antagonista de PD-1; y (b) administrar el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino al sujeto.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende, después de que el sujeto haya recibido el antagonista de PD-1 antes de la primera administración del inhibidor de ATR y el agente que contiene platino, administrar el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino al sujeto.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende los pasos de: (a) bajo la dirección o control de un médico, el sujeto recibe el antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino antes de la primera recepción del inhibidor de ATR; y (b) bajo la dirección o control de un médico, el sujeto recibe el inhibidor de ATR.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende los pasos de: (a) prescribir al sujeto para que se autoadministre el inhibidor de ATR; y (b) administrar el antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino al sujeto.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende, después de que el sujeto haya recibido el inhibidor de ATR antes de la primera administración del antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino, administrar el antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino al sujeto.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende los pasos de: (a) bajo la dirección o control de un médico, el sujeto recibe el inhibidor de ATR antes de la primera recepción del antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino; y (b) bajo la dirección o control de un médico, el sujeto recibe el antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende los pasos de: (a) administrar el antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino al sujeto; y (b) prescribir al sujeto para que se autoadministre el inhibidor de ATR.

En algunas realizaciones, el régimen de combinación comprende, después de que el sujeto haya recibido el antagonista de PD-1 y el agente que contiene platino antes de la primera administración del inhibidor de ATR, administrar el inhibidor de ATR al sujeto.

El tratamiento concurrente que se considere necesario para el bienestar del paciente se puede dar a discreción del médico tratante. En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR y agente que contiene platino se administran en combinación con quimioterapia (adicional) (CT), radioterapia (RT) o quimioterapia y radioterapia (CRT). En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo de doxorubicina, fluorouracilo, una antraciclina y una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el paciente obtiene además radioterapia. En ciertas realizaciones, la radioterapia comprende aproximadamente 35-70 Gy / 20-35 fracciones. En algunas realizaciones, la radioterapia se da con fraccionamiento estándar (1,8 a 2 Gy para el día 5 días a la semana) hasta una dosis total de 50-70 Gy una vez al día. En una realización, se usa radioterapia estereotáctica así como el bisturí gamma. En el entorno paliativo, también se usan ampliamente otros programas de fraccionamiento, por ejemplo, 25 Gy en 5 fracciones o 30 Gy en 10 fracciones. Para la radioterapia, la duración del tratamiento será el marco de tiempo cuando se da la

radioterapia. Estas intervenciones se aplican al tratamiento dado con electrones, fotones y protones, emisores alfa u otros iones, tratamiento con radio-nucleótidos, por ejemplo, tratamiento con ^{131}I dado a pacientes con cáncer de tiroides, así como en pacientes tratados con terapia de neutrones de captura de boro.

El antagonista de PD-1, inhibidor de ATR, agente que contiene platino y agente quimioterapéutico adicional de acuerdo con los métodos de la presente invención, se administran usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración efectiva para tratar o disminuir la severidad de un trastorno proporcionado anteriormente. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, la severidad de la infección, el agente particular, su modo de administración y similares.

También se proporciona una combinación que comprende un antagonista de PD-1, un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR, donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, y donde el inhibidor de ATR se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidoil)ciclopropil]pirimidin-2-il}-1H-pirrol-2,3-b)piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En algunas realizaciones, esta combinación del antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino está en la forma de una composición farmacéuticamente aceptable. En la composición farmacéutica mencionada anteriormente, la composición farmacéutica puede comprender además al menos un excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de ejemplo se describen adicionalmente más adelante y en la presente.

Habitualmente, el antagonista de PD-1, inhibidor de ATR o agente que contiene platino se incorpora en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto, donde la composición farmacéutica comprende el compuesto y un portador farmacéuticamente aceptable. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tal como agentes humectantes o emulsionantes, conservadores o amortiguadores, que mejoran la vida útil o efectividad del compuesto.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosis líquidas, semisólidas y sólidas, tal como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración propuesto y la aplicación terapéutica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 se administra por inyección intramuscular o subcutánea. En una realización preferida, el inhibidor de ATR se administra por infusión intravenosa, inyección o de manera oral.

Las composiciones terapéuticas habitualmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan al incorporar el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada previamente estéril de la misma. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensioactivos. Se puede conseguir absorción prolongada de composiciones inyectables al incluir en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En una realización, avelumab es una solución estéril, clara e incolora propuesta para administración IV. El contenido de los viales de avelumab no es pirogénico y no contiene conservadores bacteriostáticos. Avelumab se formula como una solución de 20 mg/ml y se suministra en viales de vidrio de uso individual, tapados con un septo de goma y sellados con un sello de aluminio y polipropileno. Para propósitos de administración, avelumab se debe

diluir con cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina normal). Se usa una tubería con un filtro de 0,2 micras de baja unión a proteínas en línea elaborado de polietersulfona (PES) durante la administración.

En un aspecto adicional, se proporciona un kit que comprende un antagonista de PD-1, un agente que contiene platino y un inhibidor de ATR, donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, y donde el inhibidor de ATR se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidol)ciclopropil]pirimidin-2-il]-1H-pirrol[2,3-b]piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

El kit puede comprender un primer recipiente, un segundo recipiente, un tercer recipiente y un prospecto de envase, donde el primer recipiente comprende al menos una dosis de un medicamento que comprende el antagonista de PD-1, el segundo recipiente comprende al menos una dosis de un medicamento que comprende el inhibidor de ATR, el tercer recipiente comprende al menos una dosis de un medicamento que comprende el agente que contiene platino y el prospecto de envase comprende instrucciones para tratar a un sujeto para el cáncer usando los medicamentos. Dos o los tres del antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino también se pueden comprender en un recipiente individual. Los recipientes pueden comprender la misma o diferente forma (por ejemplo, viales, jeringas y botellas) y/o material (por ejemplo, plástico o vidrio). El kit puede comprender además otros materiales que pueden ser útiles en la administración de los medicamentos, tal como diluyentes, filtros, bolsas y líneas IV, agujas y jeringas. Las instrucciones pueden indicar que los medicamentos se proponen para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que da positivo para la expresión de PD-L1 por un ensayo inmunohistoquímico (IHC). Por lo tanto, esta divulgación también proporciona un kit para determinar si la combinación de la invención es adecuada para el tratamiento terapéutico de un paciente con cáncer, que comprende medios para determinar un nivel de proteína de PD-L1, o el nivel de expresión de su ARN, en una muestra aislada del paciente e instrucciones para su uso. En otro aspecto, el kit comprende además un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y/o un agente que contiene platino. En un aspecto de la invención, la determinación de un nivel alto de PD-L1 indica PFS u OS incrementada cuando el paciente se trata con la combinación terapéutica de la invención. En una realización del kit, los medios para determinar el nivel de péptido PD-L1 son anticuerpos con unión específica a PD-L1, respectivamente.

En un aspecto de referencia adicional, se proporciona un biomarcador para medir la respuesta al tratamiento con un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y/o un agente que contiene platino. En algunas realizaciones, el biomarcador mide la respuesta al tratamiento con un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino. Preferentemente, el biomarcador mide la respuesta al tratamiento con un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino. El tratamiento con el antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y/o el agente que contiene platino puede presentarse de acuerdo con los regímenes de tratamiento divulgados anteriormente. El biomarcador es preferentemente un interferón, más preferentemente un interferón humano. En algunas realizaciones, el interferón se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa, interferón beta e interferón gamma. En algunas realizaciones, se miden tanto el interferón alfa como el interferón beta. En algunas realizaciones, se mide el interferón-gamma. La expresión del biomarcador de interferón se correlaciona con la respuesta al tratamiento, donde una expresión incrementada del biomarcador indica que el paciente responde al tratamiento. Por consiguiente, en algunas realizaciones se proporciona un método para medir la respuesta al tratamiento de un paciente que tiene cáncer con un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y/o un agente que contiene platino, donde se mide el nivel de expresión de interferón. En algunas realizaciones, el método comprende un segundo paso de comparar el nivel de expresión de interferón del paciente con un valor estándar, por ejemplo, el nivel de expresión de interferón de un sujeto o grupo de control, donde un nivel de expresión de interferón en el paciente por arriba del valor estándar indica que el paciente responde al tratamiento. Para el tratamiento de combinación triple con un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino, el nivel de expresión de interferón del sujeto o grupo de control puede derivar de un sujeto o un grupo de sujetos que se trataron con solo dos de estos compuestos, por ejemplo, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino, solo uno de estos compuestos o, preferentemente, el sujeto o grupo de sujetos no se trató. De manera similar, para el tratamiento con dos compuestos, por ejemplo, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino, el sujeto o grupo de sujetos de control se trató con solo uno de los dos compuestos o, preferentemente, no se trató. En algunas realizaciones, el método comprende un tercer paso, donde los resultados de la comparación dan por resultado la adaptación del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento se puede detener o se puede adaptar la dosificación de los fármacos. El nivel de expresión del biomarcador se puede medir por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el nivel de expresión se puede determinar a nivel de proteína o ARNm. En algunos casos, el nivel de expresión de ARN se determina por secuenciación de ARN.

También se va a entender que la terminología usada en la presente es para el propósito de describir realizaciones

particulares solamente, y no se propone que limite el alcance de la presente invención, que se define solamente por las reivindicaciones anexas. Las técnicas que son esenciales de acuerdo con la invención se describen en detalle en la especificación. Otras técnicas que no se describen con detalle corresponden a métodos estándar conocidos que se conocen bien por una persona experta en la técnica, o las técnicas se describen con más detalle en referencias citadas, solicitudes de patente o literatura estándar. Siempre que no se den otros indicios en la solicitud, se usan solo como ejemplos, no se consideran esenciales de acuerdo con la invención, pero se pueden reemplazar por otras herramientas y materiales biológicos adecuados.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ejemplos adecuados más adelante. Dentro de los ejemplos, se usan reactivos estándar y amortiguadores que están libres de actividades contaminantes (siempre que sea práctico). Los ejemplos se van a interpretar particularmente de modo que no se limiten a las combinaciones de características explícitamente demostradas, sino que las características ejemplificadas se pueden combinar de nuevo sin restricciones siempre que se resuelva el problema técnico de la invención. De manera similar, las características de cualquier reivindicación se pueden combinar con las características de una o más reivindicaciones. La presente invención que se ha descrito en resumen y con detalle, se ilustra y no se limita por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se probaron de forma independiente dos inhibidores de ATR, ATRi 1 (compuesto 1) y ATRi 2 (compuesto 2), en combinación con diferentes agentes quimioterapéuticos, incluidos los agentes que contienen platino, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino, para analizar el efecto combinatorio sobre la inhibición de crecimiento celular. Los inhibidores de ATR ATRi 1 y ATRi 2 se usaron a 0,02 μ M y 0,4 μ M, respectivamente y los agentes que contienen platino se usaron en concentraciones crecientes: Carboplatino: 100 μ M, 25 μ M, 6,25 μ M, 1,56 μ M, 391 nM; Cisplatino: 10 mM, 2,5 mM, 625 nM, 156 nM, 39 nM; Oxaliplatino: 25 μ M, 6,25 μ M, 1,56 μ M, 391 nM, 98 nM. Se trataron 35 líneas de células cancerosas diferentes con estas combinaciones.

Condiciones experimentales/programa de tratamiento: Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pozos bajo condiciones estándar. Las células se dejaron reposar durante 48 horas antes del tratamiento. El tratamiento se realizó durante 120 horas y se detuvo por adición de ácido tricloroacético seguido de tinción con sulforrodamina B. Las combinaciones incluyeron la adición simultánea de ambos pares de agentes.

El efecto combinatorio de los compuestos se determinó al medir su inhibición del crecimiento celular en comparación con la inhibición observada para monoterapias de estos compuestos usando las mismas concentraciones que se usaron para las combinaciones. El efecto de combinación se ha calculado como el exceso sobre la combinación lineal de los efectos de monoterapia usando el modelo de independencia BLISS ($E1+2 = E1 + E2 - E1 E2$). El exceso de BLISS promedio se calcula como el exceso promedio sobre la combinación lineal de los efectos de monoterapia en todas las concentraciones de inhibidor. Los valores de exceso de BLISS positivos por arriba de 0,1 describen un efecto sinérgico, y los valores de exceso de BLISS por debajo de -0,1 describen un efecto antagónico. Las medidas de exceso de BLISS de la combinación de dos inhibidores de ATR y diferentes agentes quimioterapéuticos, incluidos los agentes que contienen platino mencionados, para 35 líneas de células se muestran en la figura 3.

Como se observa en la figura 3, los dos inhibidores de ATR muestran inhibición sinérgica del crecimiento celular cuando se combinan con los agentes que contienen platino, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino.

Se observó un efecto terapéutico particularmente fuerte en los siguientes entornos:

Agente que contiene platino	4TRi	Líneas de células	Origen	Exceso de BLISS
Carboplatino	ATRi 1	A549	pulmón	0,121196631
Carboplatino	ATRi 1	A673	músculo	0,477068952
Carboplatino	ATRi 1	BXPC3	páncreas	0,146420188
Carboplatino	ATRi 1	CALU6	pulmón	0,163731081
Carboplatino	ATRi 1	COLO205	colon	0,147193806
Carboplatino	ATRi 1	DU145	próstata	0,373382961
Carboplatino	ATRi 1	HL-60	hematológico	0,288214316
Carboplatino	ATRi 1	LOVO	colon	0,108299031
Carboplatino	ATRi 1	MCF7	mama	0,134628294
Carboplatino	ATRi 1	MDAMB231	mama	0,356878196
Carboplatino	ATRi 1	MDAMB435	piel	0,35185886
Carboplatino	ATRi 1	MHHES1	hueso	0,126437348

ES 3 009 674 T3

Carboplatino	ATRi 1	MIAPACA2	páncreas	0,308854247
Carboplatino	ATRi 1	MV4-11	hematológico	0,148229027
Carboplatino	ATRi 1	NCIH460	pulmón	0,188252583
Carboplatino	ATRi 1	PANC1	páncreas	0,234922833
Carboplatino	ATRi 1	PBMC	hematológico	0,10145506
Carboplatino	ATRi 1	RDES	hueso	0,322748341
Carboplatino	ATRi 1	SAOS2	hueso	0,135893442
Carboplatino	ATRi 1	SW620	colon	0,17400545
Carboplatino	ATRi 1	U2OS	hueso	0,450328304
Carboplatino	ATRi 1	WSU-NHL	hematológico	0,248508988
Carboplatino	ATRi 2	A204	músculo	0,249590261
Carboplatino	ATRi 2	A375	piel	0,17940193
Carboplatino	ATRi 2	A549	pulmón	0,175413086
Carboplatino	ATRi 2	A673	músculo	0,50494045
Carboplatino	ATRi 2	ASPC1	páncreas	0,226636349
Carboplatino	ATRi 2	BXPC3	páncreas	0,283986217
Carboplatino	ATRi 2	CALU6	pulmón	0,223137608
Carboplatino	ATRi 2	COLO205	colon	0,252726587
Carboplatino	ATRi 2	DU145	próstata	0,492974
Carboplatino	ATRi 2	GRANTA-519	hematológico	0,151399735
Carboplatino	ATRi 2	HCT116	colon	0,118098944
Carboplatino	ATRi 2	HL-60	hematológico	0,322629825
Carboplatino	ATRi 2	HT29	colon	0,312381037
Carboplatino	ATRi 2	IGROV1	ovario	0,217706292
Carboplatino	ATRi 2	LOVO	colon	0,301650615
Carboplatino	ATRi 2	MCF7	mama	0,130566415
Carboplatino	ATRi 2	MDAMB231	mama	0,401300128
Carboplatino	ATRi 2	MDAMB435	piel	0,333422413
Carboplatino	ATRi 2	MIAPACA2	páncreas	0,363426483
Carboplatino	ATRi 2	MV4-11	hematológico	0,219553367
Carboplatino	ATRi 2	NCIH460	pulmón	0,197141594
Carboplatino	ATRi 2	PANC1	páncreas	0,236938398
Carboplatino	ATRi 2	PBMC	hematológico	0,21450182
Carboplatino	ATRi 2	RDES	hueso	0,386208527
Carboplatino	ATRi 2	SAOS2	hueso	0,216863472
Carboplatino	ATRi 2	SW620	colon	0,168742165
Carboplatino	ATRi 2	U2OS	hueso	0,687381648
Carboplatino	ATRi2	U87MG	cerebro	0,234321881
Carboplatino	ATRi 2	WSU-NHL	hematológico	0,355193663
Cisplatino	ATRi 1	A204	músculo	0,19694654
Cisplatino	ATRi 1	A375	piel	0,124244252
Cisplatino	ATRi 1	A549	pulmón	0,153418836
Cisplatino	ATRi 1	A673	músculo	0,500829877
Cisplatino	ATRi 1	BXPC3	páncreas	0,114832942
Cisplatino	ATRi 1	CALU6	pulmón	0,19281478
Cisplatino	ATRi 1	COLO205	colon	0,247980039
Cisplatino	ATRi 1	DU145	próstata	0,489546417
Cisplatino	ATRi 1	GRANTA-519	hematológico	0,106528853
Cisplatino	ATRi 1	HL-60	hematológico	0,359186244
Cisplatino	ATRi 1	IGROV1	ovario	0,128205257
Cisplatino	ATRi 1	LOVO	colon	0,133119727
Cisplatino	ATRi 1	MCF7	mama	0,214646867
Cisplatino	ATRi 1	MDAMB231	mama	0,356521065
Cisplatino	ATRi 1	MDAMB435	piel	0,3829918
Cisplatino	ATRi 1	MHHES1	hueso	0,192779097
Cisplatino	ATRi 1	MIAPACA2	páncreas	0,413789124
Cisplatino	ATRi 1	MV4-11	hematológico	0,231201135
Cisplatino	ATRi 1	NCIH460	pulmón	0,282144394

ES 3 009 674 T3

Cisplatino	ATRi 1	PANC1	páncreas	0,197466011
Cisplatino	ATRi 1	PBMC	hematológico	0,170744463
Cisplatino	ATRi 1	RDES	hueso	0,382471067
Cisplatino	ATRi 1	SAOS2	hueso	0,178936662
Cisplatino	ATRi 1	SW620	colon	0,222950882
Cisplatino	ATRi 1	U2OS	hueso	0,502848671
Cisplatino	ATRi 1	U87MG	cerebro	0,146487922
Cisplatino	ATRi 1	WSU-NHL	hematológico	0,176223278
Cisplatino	ATRi 2	A204	músculo	0,338160004
Cisplatino	ATRi 2	A375	piel	0,266859254
Cisplatino	ATRi 2	A549	pulmón	0,243195538
Cisplatino	ATRi 2	A673	músculo	0,529955464
Cisplatino	ATRi 2	ASPC1	páncreas	0,217564753
Cisplatino	ATRi 2	BXPC3	páncreas	0,264428379
Cisplatino	ATRi 2	CALU6	pulmón	0,206811222
Cisplatino	ATRi 2	COLO205	colon	0,289788048
Cisplatino	ATRi 2	DU145	próstata	0,567171683
Cisplatino	ATRi 2	GRANTA-519	hematológico	0,237785072
Cisplatino	ATRi 2	HCT116	colon	0,129577463
Cisplatino	ATRi 2	HL-60	hematológico	0,332324212
Cisplatino	ATRi 2	HT29	colon	0,375966052
Cisplatino	ATRi 2	IGROV1	ovario	0,265210007
Cisplatino	ATRi 2	IMR90	pulmón	0,150381193
Cisplatino	ATRi 2	LOVO	colon	0,363859362
Cisplatino	ATRi 2	MCF7	mama	0,229404094
Cisplatino	ATRi 2	MDAMB231	mama	0,335689756
Cisplatino	ATRi 2	MDAMB435	piel	0,305382726
Cisplatino	ATRi 2	MDAMB436	mama	0,105941911
Cisplatino	ATRi 2	MHHES1	hueso	0,142251524
Cisplatino	ATRi 2	MIAPACA2	páncreas	0,408497284
Cisplatino	ATRi 2	MV4-11	hematológico	0,300599435
Cisplatino	ATRi 2	NCIH460	pulmón	0,292234633
Cisplatino	ATRi 2	PANC1	páncreas	0,263966822
Cisplatino	ATRi 2	PBMC	hematológico	0,300277861
Cisplatino	ATRi 2	RAMOS	hematológico	0,117544179
Cisplatino	ATRi 2	RDES	hueso	0,416759146
Cisplatino	ATRi 2	SAOS2	hueso	0,257010529
Cisplatino	ATRi 2	SW620	colon	0,20073269
Cisplatino	ATRi 2	U2OS	hueso	0,710054514
Cisplatino	ATRi 2	U87MG	cerebro	0,287615857
Cisplatino	ATRi 2	WSU-NHL	hematológico	0,305392445
Oxaliplatino	ATRi 1	A673	músculo	0,398164808
Oxaliplatino	ATRi 1	COLO205	colon	0,168087736
Oxaliplatino	ATRi 1	DU 145	próstata	0,439897865
Oxaliplatino	ATRi 1	HL-60	hematológico	0,278503965
Oxaliplatino	ATRi 1	HT1080	tejido conjuntivo	0,171160855
Oxaliplatino	ATRi 1	MDAMB231	mama	0,188547957
Oxaliplatino	ATRi 1	MDAMB435	piel	0,212591265
Oxaliplatino	ATRi 1	MIAPACA2	páncreas	0,212851831
Oxaliplatino	ATRi 1	MV4-11	hematológico	0,1369089
Oxaliplatino	ATRi 1	RDES	hueso	0,332767017
Oxaliplatino	ATRi 1	U2OS	hueso	0,165598744
Oxaliplatino	ATRi 1	WSU-NHL	hematológico	0,18190226
Oxaliplatino	ATRi 2	A204	músculo	0,117462267
Oxaliplatino	ATRi 2	A375	piel	0,18963669
Oxaliplatino	ATRi 2	A549	pulmón	0,140667935
Oxaliplatino	ATRi 2	A673	músculo	0,462537651
Oxaliplatino	ATRi 2	ASPC1	páncreas	0,120760827

Oxaliplatino	ATRi 2	BXPC3	páncreas	0,217521464
Oxaliplatino	ATRi 2	COLO205	colon	0,262943622
Oxaliplatino	ATRi 2	DU145	próstata	0,561849335
Oxaliplatino	ATRi 2	GRANTA-519	hematológico	0,193546237
Oxaliplatino	ATRi 2	HCT116	colon	0,106439
Oxaliplatino	ATRi 2	HL-60	hematológico	0,272291113
Oxaliplatino	ATRi 2	HT29	colon	0,277891345
Oxaliplatino	ATRi 2	IGROV1	ovario	0,210629861
Oxaliplatino	ATRi 2	LOVO	colon	0,256302125
Oxaliplatino	ATRi 2	MCF7	mama	0,225685532
Oxaliplatino	ATRi 2	MDAMB231	mama	0,178692882
Oxaliplatino	ATRi 2	MDAMB435	piel	0,203776377
Oxaliplatino	ATRi 2	MHHES1	hueso	0,151955699
Oxaliplatino	ATRi 2	MIAPACA2	páncreas	0,118755662
Oxaliplatino	ATRi 2	MV4-11	hematológico	0,127773664
Oxaliplatino	ATRi 2	NCIH460	pulmón	0,159921419
Oxaliplatino	ATRi 2	PANC1	páncreas	0,100739372
Oxaliplatino	ATRi 2	PBMC	hematológico	0,23765779
Oxaliplatino	ATRi 2	RDES	hueso	0,351486564
Oxaliplatino	ATRi 2	SAOS2	hueso	0,116150755
Oxaliplatino	ATRi 2	SW620	colon	0,103447461
Oxaliplatino	ATRi 2	U2OS	hueso	0,580457627
Oxaliplatino	ATRi 2	U87MG	cerebro	0,153359354
Oxaliplatino	ATRi 2	WSU-NHL	hematológico	0,163869039

Ejemplo 2: Prueba *in vivo* de la eficacia antitumoral de un tratamiento de combinación triple en un modelo de tumor MC38 subcutáneo murino

- 5 El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de un tratamiento de combinación triple que comprende avelumab, un agente que contiene platino (cisplatino o carboplatino) y ATRi 1 (compuesto 1) en el modelo singénico de cáncer colorrectal MC38 subcutáneo en ratones C57BL/6.

Cultivo de células

- 10 Las células tumorales MC38 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo en monocapa en DMEM + glutamina 2 mM complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron de manera rutinaria dos veces por semana por tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se cosecharon y se contaron para la inoculación de tumor.

Inoculación de tumor y agrupación de animales

- 20 Cada ratón se inoculó de manera subcutánea en el flanco superior derecho con células MC38 (3×10^5) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo de tumor. Los tratamientos se iniciaron el día 7 después de la inoculación del tumor cuando el tamaño de tumor promedio alcanzó aproximadamente 80 mm³. Los animales se asignaron en grupos utilizando un software de aleatorización basado en Excel que realiza una aleatorización estratificada con base en sus volúmenes tumorales. Cada grupo consistió en 10 ratones portadores de tumores. Los compuestos probados se administraron a los ratones de acuerdo con el régimen predeterminado que se muestra en el diseño experimental de la tabla 2 y tabla 6, respectivamente.

Compuestos probados (Tabla 1)

Compuestos probados	Solvente
Avelumab	PBS
Control de isotipo	PBS
Cisplatino	Salina al 0,9 %
Carboplatino	Salina al 0,9 %
ATRi 1	0,5 % Methocel K4M Premium/0,25 % Tween 20 (solvente también referido como Vehículo)

Mediciones de tumor y criterios de valoración

- 30 El criterio de valoración principal fue ver si el crecimiento tumoral se puede retrasar o los ratones se pueden curar.

El tamaño tumoral se midió dos veces a la semana en dos dimensiones usando un calibrador, y el volumen se expresó en mm³ usando la fórmula: $V = 0,5 \times a \times b^2$ donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. El tamaño de tumor se usó entonces para el cálculo de los valores de T/C. El valor de T/C (en por ciento) es una indicación de efectividad antitumoral; T y C son los volúmenes medios de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día dado. El TGI se calculó para cada grupo usando la fórmula: $TGI (\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$; Ti es el volumen tumoral promedio de un grupo de tratamiento en un día dado, T0 es el volumen tumoral promedio del grupo de tratamiento en el día del inicio del tratamiento, Vi es el volumen tumoral promedio del grupo de control de vehículo en el mismo día con Ti y V0 es el volumen tumoral promedio del grupo de vehículo en el día del inicio del tratamiento. Los animales se sometieron a eutanasia cuando alcanzaron una carga tumoral de 3.000 mm³ según las regulaciones de IACUC y el tiempo para alcanzar este punto final se usó para el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la diferencia en el volumen tumoral entre los grupos se realizó en los datos obtenidos en el mejor punto de tiempo terapéutico en el día 17 después del inicio del tratamiento). Se realizó un ANOVA unidireccional, y cuando se obtuvo una estadística F significativa (una relación de varianza de tratamiento a la varianza de error), las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de Games-Howell. Todos los datos se analizaron usando SPSS 17.0. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

El análisis estadístico de la diferencia en la tasa de supervivencia entre los grupos se realizó en los datos de supervivencia hasta el día 66 después del inicio del tratamiento. Se realizó la prueba de Kaplan-Meier, todos los datos se analizaron usando GraphPad Prism 6.0., las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Experimento 2A: Triple combinación de avelumab, cisplatino y ATRi 1 en el modelo MC38

La eficacia antitumoral de la combinación triple, avelumab, cisplatino y ATRi 1 se probó de acuerdo con los métodos anteriores y con el diseño experimental descrito en la tabla 2.

Diseño experimental (tabla 2):

Grupo	N ^a	Tratamiento	Dosis	Vía de dosificación	Programa
1	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
2	10	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
3	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Cisplatino	3,5 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
4	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
5	10	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Cisplatino	3,5 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
6	10	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
7	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Cisplatino	3,5 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
8	10	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Días 3, 6, 9
		Cisplatino	3,5 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7

Nota:

a. N: número de animales por grupo

Como medida indirecta de toxicidad, se monitoreó el cambio de peso corporal, los resultados de lo cual se muestran en la figura 4.

Las curvas de crecimiento tumoral de los diferentes ratones se muestran en la figura 5 y la inhibición del crecimiento tumoral en el día 17 se muestra en la siguiente tabla 3.

Análisis de inhibición de crecimiento tumoral (Tabla 3)

Grupo de tratamiento	Tamaño de tumor (mm ³) ^a en el día 17	T/C (%)	TGI (%)	valor p ANOVA unidireccional
1	1725 ± 367	-	-	-
2	1038 ± 250	60,2	41,8	0,773
3	1088 ± 221	63,1	38,7	0,803
4	1534 ± 267	88,9	11,6	1,000
5	380 ± 124	22,0	81,8	0,077
6	1062 ± 274	61,6	40,3	0,823
7	539 ± 123	31,2	72,1	0,139
8	79 ± 46	4,6	100,1	0,026

Nota:
a. Media ± SEM.

El tamaño tumoral medio de los animales tratados con vehículo alcanzó 1.725 mm³ en el día 17 después del inicio del tratamiento. El tratamiento con 400 ug de avelumab como agente individual, 3,5 mg/kg de cisplatino como agente individual y 60 mg/kg de ATRi 1 como agente individual tuvo actividad antitumoral menor; los tamaños de tumor medios fueron 1.038 mm³, 1.088 mm³ y 1.534 mm³, respectivamente, en el día 17 (valor de T/C = 60,2 %, 63,1 % y 88,9 %; TGI = 41,8 %, 38,7 % y 11,6 %, respectivamente, p= 0,773, 0,803 y 1.000 en comparación con el grupo de vehículo).

El tratamiento de combinación dual con 400 ug de avelumab y 3,5 mg/kg de cisplatino mostró una actividad antitumoral pronunciada con un tamaño tumoral medio de 380 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 22,0 %, TGI = 81,8 %, p=0,077 en comparación con el grupo de vehículo). El tratamiento de combinación dual con 400 ug de avelumab y 60 mg/kg de ATRi 1 mostró actividad antitumoral menor con un tamaño tumoral medio de 1.062 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 61,6 %, TGI = 40,3 %, p= 0,823 en comparación con el grupo de vehículo). El tratamiento de combinación dual con 3,5 mg/kg de cisplatino y 60 mg/kg de ATRi 1 mostró una actividad antitumoral pronunciada con un tamaño tumoral medio de 539 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 31,2 %, TGI = 72,1 %, p= 0,139 en comparación con el grupo de vehículo). El tratamiento de combinación triple con 400 ug de avelumab, 3,5 mg/kg de cisplatino y 60 mg/kg de ATRi 1 mostró la actividad antitumoral más alta con un tamaño tumoral medio de 79 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 4,6 %, TGI = 100,1 %, p= 0,026 en comparación con el grupo de vehículo).

Los datos de supervivencia se reflejan en la figura 6 y las siguientes tablas 4 y 5.

Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para el tratamiento de combinación triple en el modelo singénico de cáncer colorrectal MC38 subcutáneo murino calculado con base en los datos de supervivencia hasta el día 66 (Tabla 4)

Grupo de tratamiento	Supervivencia mediana, días	Valor p para prueba de rango logarítmico ^a	Ratones libres de tumor el día 66
1	21,5	-	0/10
2	26	0,0753	0/10
3	28	0,1220	0/10
4	24	0,9640	0/10
5	38,5	0,0002	2/10
6	29,5	0,0272	0/10
7	29,5	0,0010	0/10
8	No alcanzada	<0,0001	7/10

Nota:

a. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico (en comparación con el grupo de vehículo).

Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para el tratamiento de combinación triple versus cada tratamiento de combinación doble con base en los datos de supervivencia hasta el día 66 (Tabla 5)

Grupo de tratamiento	Supervivencia mediana, días	Valor p para prueba de rango logarítmico ^a
5	38,5	0,0150
6	29,5	<0,0001
7	29,5	0,0002
8	No alcanzada	-

a. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico (en comparación con el grupo de tratamiento de combinación triple).

En comparación con el grupo tratado con vehículo, los tratamientos de combinación dual (avelumab + cisplatino;

avelumab + ATRi 1; cisplatino + ATRi 1) y el tratamiento de combinación triple (avelumab + cisplatino + ATRi 1) prolongaron significativamente la tasa de supervivencia de los animales en este estudio ($p = 0,0002$, $0,0272$, $0,0010$, $<0,0001$, respectivamente, en comparación con el grupo de vehículo). En comparación con cada grupo de tratamiento de combinación dual (avelumab + cisplatino; avelumab + ATRi 1; cisplatino + ATRi 1), el tratamiento de combinación triple (avelumab + cisplatino + ATRi 1) prolongó significativamente la tasa de supervivencia de los animales ($p = 0,0150$, $<0,0001$, $0,0002$, respectivamente, en comparación con el grupo de tratamiento de combinación triple).

En resumen, el tratamiento de combinación de Avelumab, cisplatino, ATRi 1 mostró una alta actividad antitumoral en el modelo singénico de cáncer colorrectal MC38.

Experimento 2B: Triple combinación de avelumab, carboplatino y ATRi 1

La eficacia antitumoral de la combinación triple, avelumab, carboplatino y ATRi 1 se probó de acuerdo con los métodos anteriores y con el diseño experimental descrito en la tabla 6.

Diseño experimental (Tabla 6):

Grupo	N ^a	Tratamiento	Dosis	Vía de dosificación	Programa
1	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
2	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
3	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
4	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
5	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
6	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
7	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p. o.</i>	Días 0, 7
8	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i. p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p. o.</i>	Días 0, 7

Nota:

a. N: número de animales por grupo.

Como medida indirecta de toxicidad, se monitoreó el cambio de peso corporal, los resultados de lo cual se muestran en la figura 7.

Las curvas de crecimiento tumoral de los diferentes ratones se muestran en la figura 8 y la inhibición del crecimiento tumoral en el día 17 se muestra en la siguiente tabla 7.

Análisis de inhibición de crecimiento tumoral (Tabla 7)

Grupo de tratamiento	Tamaño de tumor (mm ³) ^a en el día 17	T/C (%)	TGI% (%)	valor <i>p</i> ANOVA unidireccional
1	1409 ± 334	-	-	-
2	774 ± 153	54,9	47,8	0,674
3	671 ± 160	47,6	55,5	0,521
4	1824 ± 245	129,5	-31,2	0,968
5	284 ± 55	20,2	84,7	0,098
6	769 ± 244	54,6	48,2	0,774
7	149 ± 53	10,6	94,8	0,056
8	115 ± 77	8,2	97,4	0,049

Nota:

a. Media ± SEM.

El tamaño tumoral medio de los animales tratados con vehículo alcanzó 1.409 mm³ en el día 17 después del inicio del tratamiento. El tratamiento con 400 ug de avelumab como agente individual, 60 mg/kg de carboplatino como agente individual y 60 mg/kg de ATRi 1 como agente individual tuvo actividad antitumoral menor; los tamaños de tumor medios fueron 774 mm³, 671 mm³ y 1.824 mm³, respectivamente, en el día 17 (valor de T/C = 54,9 %, 47,6 % y 129,5 %; TGI = 47,8 %, 55,5 % y -31,2 %, respectivamente, p= 0,674, 0,521 y 0,968 en comparación con el grupo de vehículo).

El tratamiento de combinación dual con 400 ug de avelumab y 60 mg/kg de carboplatino mostró una actividad antitumoral pronunciada con un tamaño tumoral medio de 284 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 20,2 %, TGI = 84,7%, p=0,098 en comparación con el grupo de vehículo). El tratamiento de combinación dual con 400 ug de avelumab y 60 mg/kg de ATRi 1 mostró actividad antitumoral menor con un tamaño tumoral medio de 769 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 54,6 %, TGI = 48,2 %, p= 0,774 en comparación con el grupo de vehículo). El tratamiento de combinación dual con 60 mg/kg de carboplatino y 60 mg/kg de ATRi 1 mostró una actividad antitumoral pronunciada con un tamaño tumoral medio de 149 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 10,6 %, TGI = 94,8 %, p= 0,056 en comparación con el grupo de vehículo). El tratamiento de combinación triple con 400 ug de avelumab, 60 mg/kg de carboplatino y 60 mg/kg de ATRi 1 mostró la actividad antitumoral más alta con un tamaño tumoral medio de 115 mm³ en el día 17 (valor de T/C = 8,2 %, TGI = 97,4 %, p= 0,049 en comparación con el grupo de vehículo).

Los datos de supervivencia se reflejan en la figura 9 y las siguientes tablas 8 y 9.

Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para el tratamiento de combinación triple en el modelo singénico de cáncer colorrectal MC38 subcutáneo murino calculado con base en los datos de supervivencia hasta el día 66 (Tabla 8)

Grupo de tratamiento	Supervivencia mediana, días	Valor p para prueba de rango logarítmico ^a	Ratones libres de tumor el día 66
1	22,5		0/10
2	31	0,0196	0/10
3	28	0,0450	0/10
4	21	0,1425	0/10
5	36,5	0,0001	0/10
6	29,5	0,0586	1/10
7	41,5	<0,0001	1/10
8	No alcanzada	<0,0001	7/10

Nota:

a. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico (en comparación con el grupo de vehículo).

Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para el tratamiento de combinación triple versus cada tratamiento de combinación doble con base en los datos de supervivencia hasta el día 66 (Tabla 9)

Grupo de tratamiento	Supervivencia mediana, días	Valor p para prueba de rango logarítmico ^a
5	36,5	0,0008
6	29,5	0,0013
7	41,5	0,0054
8	No alcanzada	-

a. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico (en comparación con el grupo de tratamiento de combinación triple).

En comparación con el grupo tratado con vehículo, los tratamientos de combinación dual (avelumab + carboplatino; avelumab + ATRi 1; carboplatino + ATRi 1) y el tratamiento de combinación triple (avelumab + carboplatino + ATRi 1) prolongaron significativamente la tasa de supervivencia de los animales en este estudio (p= 0,0001, 0,0001, <0,0001, respectivamente, en comparación con el grupo de vehículo). En comparación con cada grupo de tratamiento de combinación dual (avelumab + carboplatino; avelumab + ATRi 1; carboplatino + ATRi 1), el tratamiento de combinación triple (avelumab + carboplatino + ATRi 1) prolongó significativamente la tasa de supervivencia de los animales (p= 0,0008, 0,0013, 0,0054, respectivamente, en comparación con el grupo de tratamiento de combinación triple).

En resumen, el tratamiento de combinación de Avelumab, carboplatino, ATRi 1 mostró una alta actividad antitumoral en el modelo singénico de cáncer colorrectal MC38.

Ejemplo 3: Estudio de re-exposición en el modelo MC38

El objetivo del estudio de re-exposición fue probar si los animales supervivientes del estudio de eficacia del ejemplo

2 habían adquirido inmunidad protectora contra el mismo tumor.

Ejemplo 3A: Triple combinación de avelumab, cisplatino y ATRi 1

- 5 En este estudio, los animales sobrevivientes del grupo 5 (avelumab, 400 ug + cisplatino, 3,5 mg/kg + vehículo) y el grupo 8 (avelumab, 400 ug + cisplatino, 3,5 mg/kg + ATRi 1, 60 mg/kg) se volvieron a exponer con 3×10^5 células MC38 en el día 67 después de la primera inoculación de MC38 (tabla 10). Las células se inyectaron en el flanco izquierdo de los animales.

10 Diseño experimental (Tabla 10)

Grupo de tratamiento de acuerdo con el ejemplo 2A	n ^a	Líneas de células	Número de células/ratón	Volumen de inyección
Ratones sin tratamiento previo	10	MC38	3×10^5	100 μ l
5	2		3×10^5	100 μ l
8	7		3×10^5	100 μ l

Nota:

a. N: número de animales por grupo.

El crecimiento tumoral se monitoreó durante 3 semanas después de la implantación y los volúmenes tumorales se muestran en la siguiente tabla 11:

15 Datos de crecimiento tumoral (Tabla 11)

Días	Volumen tumoral (mm ³) ^a		
	Ratones no tratados	Grupo de tratamiento 5	Grupo de tratamiento 8
0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
7	182 $\pm$ 14	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
11	346 $\pm$ 49	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
14	740 $\pm$ 113	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
18	1337 $\pm$ 167	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
21	2162 $\pm$ 336	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Nota:

a. Media $\pm$ SEM

El tamaño tumoral medio de los ratones sin tratamiento previo de control alcanzó 2.162 mm³ en el día 21 después de la implantación tumoral. No se encontró crecimiento tumoral en los respondedores completos del grupo 5 y grupo 8 después de la re-exposición a MC38 durante todo el estudio.

- 20 En resumen, los animales supervivientes parecen haber adquirido inmunidad protectora contra el mismo tumor.

Ejemplo 3B: Triple combinación de avelumab, carboplatino y ATRi 1

- 25 En este estudio, los animales sobrevivientes del grupo 6 (avelumab, 400 ug + solución salina al 0,9 % + ATRi 1, 60 mg/kg), grupo 7 (control de isotipo, 400 ug + carboplatino, 60 mg/kg + ATRi 1, 60 mg/kg) y grupo 8 (avelumab, 400 ug + carboplatino, 60 mg/kg + ATRi 1, 60 mg/kg) se volvieron a exponer con 3×10^5 células MC38 en el día 67 después de la primera inoculación de MC38 (tabla 12). Las células se inyectaron en el flanco izquierdo de los animales.

30 Diseño experimental (Tabla 12)

Grupo de tratamiento de acuerdo con el ejemplo 28	n ^a	Líneas de células	Número de células/ratón	Volumen de inyección
Ratones sin tratamiento previo	10	MC38	3×10^5	100 μ l
6	1		3×10^5	100 μ l
7	1		3×10^5	100 μ l
8	7		3×10^5	100 μ l

Nota:

a. N: número de animales por grupo.

El crecimiento tumoral se monitoreó durante 3 semanas después de la implantación y los volúmenes tumorales se muestran en la siguiente tabla 13:

35 Datos de crecimiento tumoral (Tabla 13)

Días -	Volumen tumoral (mm ³) ^a			
	Ratones no tratados	Grupo de tratamiento 6	Grupo de tratamiento 7	Grupo de tratamiento 8
0	0 $\pm$ 0	0	0	0 $\pm$ 0

7	182 ± 14	0	0	0 ± 0
11	346 ± 49	0	0	0 ± 0
14	740 ± 113	0	0	0 ± 0
18	1337 ± 167	0	0	0 ± 0
21	2162 ± 336	0	0	0 ± 0

Nota:

a. Media ± SEM

El tamaño tumoral medio de los ratones sin tratamiento previo de control alcanzó 2.162 mm³ en el día 21 después de la implantación tumoral. No se encontró crecimiento tumoral en los respondedores completos de los grupos 6, 7 y 8 después de la re-exposición a MC38 durante todo el estudio.

En resumen, los animales supervivientes parecen haber adquirido inmunidad protectora contra el mismo tumor.

Ejemplo 4: Prueba *in vivo* de la eficacia antitumoral de un tratamiento de combinación triple en un modelo de tumor MB49 subcutáneo murino

El objetivo de este estudio fue investigar la eficacia terapéutica de carboplatino, ATRi 1 (compuesto 1) y el anticuerpo anti-PD-L1 avelumab en el modelo de tumor singénico MB49.

Inoculación de tumor y agrupación de animales

Se inyectaron ratones hembra C57BU6 a las 8-9 semanas de edad de manera subcutánea en el flanco derecho con 0,5x10⁶ de células tumorales MB49 viables en 0,1 ml de PBS. Los animales se aleatorizaron y la terapia se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen de alrededor de 100 mm³ (día 0 de tratamiento). Cada grupo consistió en 10 ratones portadores de tumores. Los compuestos probados se administraron a los ratones de acuerdo con el régimen predeterminado que se muestra en el diseño experimental de la tabla 14:

Diseño experimental (Tabla 14):

Grupo	N ^a	Tratamiento	Dosis	Vía de dosificación	Programa
1	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
2	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
3	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
4	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
5	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
6	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
7	10	Control de isotipo	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7
8	10	Avelumab	400 µg	<i>i. v.</i>	Días 3, 6, 9
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Días 0, 7
		ATRi 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Días 0, 7

Los anticuerpos y carboplatino se disolvieron en solución salina al 0,9 % y ATRi 1 en Methocel K4M Premium al 0,5 %/Tween 20 al 0,25 % (también referido como Vehículo).

Mediciones de tumor y criterios de valoración

El tamaño tumoral se midió dos veces a la semana y el volumen tumoral se determinó usando la fórmula, ancho x longitud x altura x 0,5236. El tamaño de tumor se usó entonces para el cálculo de los valores de T/C.

El peso corporal también se midió dos veces a la semana. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen tumoral

alcanzó 2000 mm³.

Análisis estadístico

- 5 Se usó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, ANOVA bidireccional, prueba t no emparejada y prueba de rango logarítmico del paquete de software GraphPad Prism (Prism 5 para Windows, versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

10 Resultados

Como medida indirecta de toxicidad, se monitoreó el cambio de peso corporal, los resultados de lo cual se muestran en la figura 10.

- 15 Las curvas de crecimiento tumoral de los diferentes ratones se muestran en la figura 11 y la inhibición del crecimiento tumoral en el día 18 se muestra en la siguiente tabla 15.

Análisis de inhibición de crecimiento tumoral (Tabla 15)

Grupo de tratamiento	Tamaño de tumor (mm ³) ^a en el día 18	TGI% (%)	valor <i>p</i> ANOVA unidireccional
1	2264 ± 256	-	-
2	1378 ± 175	39,1	0,0264
3	1814 ± 212	19,9	0,5195
4	2087 ± 333	7,8	0,99
5	1108 ± 239	51,1	0,0018
6	1385 ± 259	38,8	0,0279
7	1588 ± 276	29,9	0,1405
8	556 ± 79	75,5	0,0001

Nota:

a. Media ± SEM.

- 20 Los datos de supervivencia se reflejan en la figura 12 y las siguientes tablas 16 y 17.

Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para el tratamiento de combinación triple en el modelo MB49 subcutáneo murino calculado con base en los datos de supervivencia (Tabla 16)

Grupo de tratamiento	Supervivencia mediana, días	Valor <i>p</i> para prueba de rango logarítmico ^a
1	21	-
2	22,5	0,0146
3	21	0,107
4	21	0,2537
5	24	0,002
6	25,5	0,0034
7	24	0,0279
8	31	<0,0001

Nota:

a. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico (en comparación con el grupo de vehículo).

25

Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para el tratamiento de combinación triple versus cada tratamiento de combinación doble con base en los datos de supervivencia (Tabla 17)

Grupo de tratamiento	Supervivencia mediana, días	Valor <i>p</i> para prueba de rango logarítmico ^a
5	24	0,0151
6	25,5	0,0081
7	24	0,001
8	31	-

a. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo con la prueba de rango logarítmico (en comparación con el grupo de tratamiento de combinación triple).

- 30 En este estudio, la monoterapia con carboplatino o monoterapia con ATRi 1 no mostraron ningún efecto de inhibición del crecimiento tumoral significativo en comparación con el grupo de control (con base en los cálculos de TGI en el día 18 después del inicio del tratamiento, tabla 15; y con base en el análisis de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, tabla 16).

La combinación de carboplatino + ATRi 1 mostró un efecto moderado sobre el crecimiento tumoral en el día 18 después del inicio del tratamiento (TGI=29,9 % versus el grupo de control, $p=0,1405$, tabla 15), dando por resultado un incremento significativo en la mediana de supervivencia (24 versus 21 días para el grupo de control, $p=0,0279$, tabla 16).

Avelumab como monoterapia mostró un efecto moderado de inhibición de crecimiento tumoral (TGI=39,1 % versus el grupo de control, $p=0,0264$) que dio por resultado un incremento en la supervivencia mediana en comparación con el grupo de control (22,5 versus 21 días, $p=0,0146$). La combinación de avelumab con carboplatino o ATRi 1 también mostró un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral (día 18 TGI=51,1 % y 38,8 % versus el grupo de control, $p=0,0018$ y $p=0,0279$, respectivamente, tabla 15) y una supervivencia mediana prolongada en comparación con el grupo de control (24 y 25,5 versus 21 días, tabla 16).

La combinación triple de Carboplatino/ATRi 1/Avelumab mostró un potente efecto antitumoral en este estudio y fue significativamente mejor en comparación con cualquiera de los dobles (Carboplatino/ATRi 1, Carboplatino/Avelumab o ATRi 1/Avelumab) usando cálculos de TGI para el día 18 (TGI de 75,5 % versus 29,9 %, 51,1 % y 38,8 % correspondientemente) y por el análisis de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (supervivencia mediana de 31 días versus 24, 24 y 25,5 días correspondientemente, valores P para comparación de triplete vs dobles que se muestra en la tabla 17).

En resumen, los datos de inhibición de crecimiento tumoral con la combinación triple de carboplatino, ATRi 1 y Avelumab demostraron un beneficio superior sobre los tratamientos de combinación doblete.

Ejemplo 5: Perfiles de expresión génica *in vitro* e *in vivo*

El objetivo de este estudio fue identificar conjuntos de genes que difieren entre los grupos de tratamiento y grupos de control.

Preparación de muestras *in vitro*

Las células de cáncer murino MC38 se trataron con vehículo, ATRi (110 nM), carboplatino (10 μ M) o ATRi (110 nM) + carboplatino (10 μ M) durante 24 h, 48 h o 72 horas. Al final de cada tratamiento, punto de tiempo, la mayoría de las células tumorales eran viables como se determina por Cell Titer-Glo (Promega, Cat No. G7573). La extracción de ARN se realizó usando un kit Qiagen (Qiagen, Cat No. 74104).

Preparación de muestras *in vivo*

Cultivo de células

Las células tumorales MC38 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo en monocapa en DMEM + glutamina 2 mM complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron de manera rutinaria dos veces por semana por tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se cosecharon y se contaron para la inoculación de tumor.

Inoculación de tumor y agrupación de animales

Cada ratón se inoculó de manera subcutánea en el flanco superior derecho con células MC38 (3×10^5) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo de tumor. Los animales se asignaron en grupos usando un software de aleatorización basado en Excel que realiza una aleatorización estratificada con base en sus volúmenes tumorales cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó aproximadamente 150 mm³ (día 0). Cada grupo consistió en 5 ratones portadores de tumores. Los compuestos probados se administraron a los ratones de acuerdo con el régimen predeterminado que se muestra en el diseño experimental de la tabla 19.

Compuestos probados (Tabla 18)

Compuestos probados	Solvente
Avelumab	PBS
Control de isotipo	PBS
Carboplatino	Salina al 0,9 %
ATRi 1	0,5 % Methocel K4M Premium/0,25 % Tween 20 (solvente también referido como Vehículo)

Diseño experimental (Tabla 19):

Grupo	Animales por grupo	Tratamiento	Dosis	Vía de dosificación	Programa
1	5	Control de isotipo	400 µg	<i>i.v.</i>	Día 0
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Día 1
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Día 1
2	5	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Día 0
		Salina al 0,9 %	-	<i>i.p.</i>	Día 1
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Día 1
3	5	Control de isotipo	400 µg	<i>i.v.</i>	Día 0
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Día 1
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Día 1
4	5	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Día 0
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Día 1
		Vehículo	-	<i>p.o.</i>	Día 1
5	5	Avelumab	400 µg	<i>i.v.</i>	Día 0
		Carboplatino	60 mg/kg	<i>i.p.</i>	Día 1
		ATRI 1	60 mg/kg	<i>p.o.</i>	Día 1

En el día 3 después de la aleatorización, los animales se sacrificaron y las muestras tumorales se recolectaron en amortiguador RNALater. La extracción de ARN se realizó usando un kit Qiagen (Qiagen, Cat No. 74104).

5 Generación de RNAseq y análisis de expresión génica

Se realizó RNA-Seq de las muestras de ARN *in vitro* e *in vivo* anteriores. Cada muestra tuvo 30-50 millones de lecturas utilizables que se alinearon con el genoma. Los perfiles de expresión se normalizaron y transformaron con el método limma-voom. Los conjuntos de genes mSigDB y las firmas inmunitarias se utilizaron para comprender las diferencias en los distintivos tumorales, vías canónicas y diferencias de contenido de células inmunitarias.

Resultados

15 *In vitro*, se encontró que el tratamiento con ATRI + carboplatino mejoró de manera robusta las vías de interferón (IFN) gamma e IFN alfa/beta en comparación con el agente o vehículo individual (figura 13a, b). Este efecto fue máximo a 48 horas.

20 Estas vías se examinaron el día 3 y día 6 *in vivo*, en ratones con tumor tratados con mono, doble o triple terapia de avelumab, carboplatino y ATRI. De manera similar, se observó que el tratamiento de combinación triple de ATRI + carboplatino + avelumab mejoró fuertemente las vías de IFN gamma e IFN alfa/beta en comparación con el vehículo, el tratamiento con agente individual o doblete (figura 14a, b).

25 En conclusión, dos estudios *in vitro* e *in vivo* independientes demostraron que el efecto de tratamiento de un agente que contiene platino sobre los niveles de ARNm del gen relacionado con IFN-γ en células cancerosas se mejora en gran medida y aún más cuando se combina con un agente farmacológico ATRI. Además, se observó que los niveles de ARNm del gen relacionado con IFN-γ incrementaron aún más cuando los dos fármacos, agente que contiene platino + ATRI, se combinaron con el mAb anti-PDL1 Avelumab. La activación de la señalización de IFN se ha correlacionado positivamente con el resultado clínico y la respuesta positiva a las terapias con PDx. En este contexto, la regulación positiva robusta de IFN por ATRI + agente que contiene platino + Avelumab en comparación con el agente que contiene platino + Avelumab respalda fuertemente el potencial del beneficio de combinación de tripletes versus al doblete observado en el modelo de tumor MC38.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino para su uso en un método para tratar un cáncer,

donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1,

donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, y donde el inhibidor de ATR se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidoil)ciclopropil]pirimidin-2-il}-1H-pirrol-2-il]piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

2. Los compuestos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y una cadena ligera, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

3. Los compuestos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab, el inhibidor de ATR es 3-[3-(4-metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el agente que contiene platino es carboplatino.

4. Los compuestos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cabeza y cuello, colon, urotelio, próstata, esófago, vejiga, estómago, sistema neuroendocrino, mesénquima, mama, ovario, peritoneo primario, trompas de Falopio, páncreas y subtipos histológicos de los mismos.

5. Los compuestos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el cáncer es un cáncer recurrente resistente a PARPi seleccionado de cáncer de ovario, cáncer peritoneal primario y cáncer de trompas de Falopio.

6. Los compuestos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el antagonista de PD-1 es avelumab y se administra Q3W con una dosis de aproximadamente 1600 mg, el agente que contiene platino es carboplatino y se administra Q3W a una dosis con un AUC objetivo de aproximadamente 5 mg/ml·min y el inhibidor de ATR es 3-[3-(4-metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina y se administra Q3W a una dosis de aproximadamente 90 mg/m².

7. Los compuestos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el método de tratamiento comprende una fase principal, opcionalmente seguida de una fase de mantenimiento después de la finalización de la fase principal.

8. Los compuestos para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el antagonista de PD-1, el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino se administran durante la fase principal, en tanto que durante la fase de mantenimiento se administran el antagonista de PD-1 pero no el inhibidor de ATR y el agente que contiene platino.

9. Una combinación que comprende un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino,

donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1,

donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, y donde el inhibidor de ATR se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidoil)ciclopropil]pirimidin-2-il}-1H-pirrol-2-il]piridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10. Un kit que comprende un antagonista de PD-1, un inhibidor de ATR y un agente que contiene platino,

donde el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1,

donde el agente que contiene platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, y donde el inhibidor de ATR se selecciona del grupo que consiste en 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-

- 5 [4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-[4-(oxetan-3-il)piperazin-1-carbonil]piperidin-1-il}piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 2-amino-6-fluoro-N- [5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, 4-{4-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-6-[1-(S-metilsulfonimidoil)ciclopropil]pirimidin-2-il}-1H-pirrol[2,3-b]piridina,
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

DIBUJOS

Figura 1A

SEQ ID NO: 7 (Secuencia de cadena pesada de avelumab)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF
YADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PFSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 1B

SEQ ID NO: 8 (Secuencia de cadena pesada de avelumab que carece de K C-terminal)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF
YADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PFSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Figura 2

SEQ ID NO: 9 (Secuencia de cadena ligera de avelumab)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPT
VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYA
ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Figura 3A

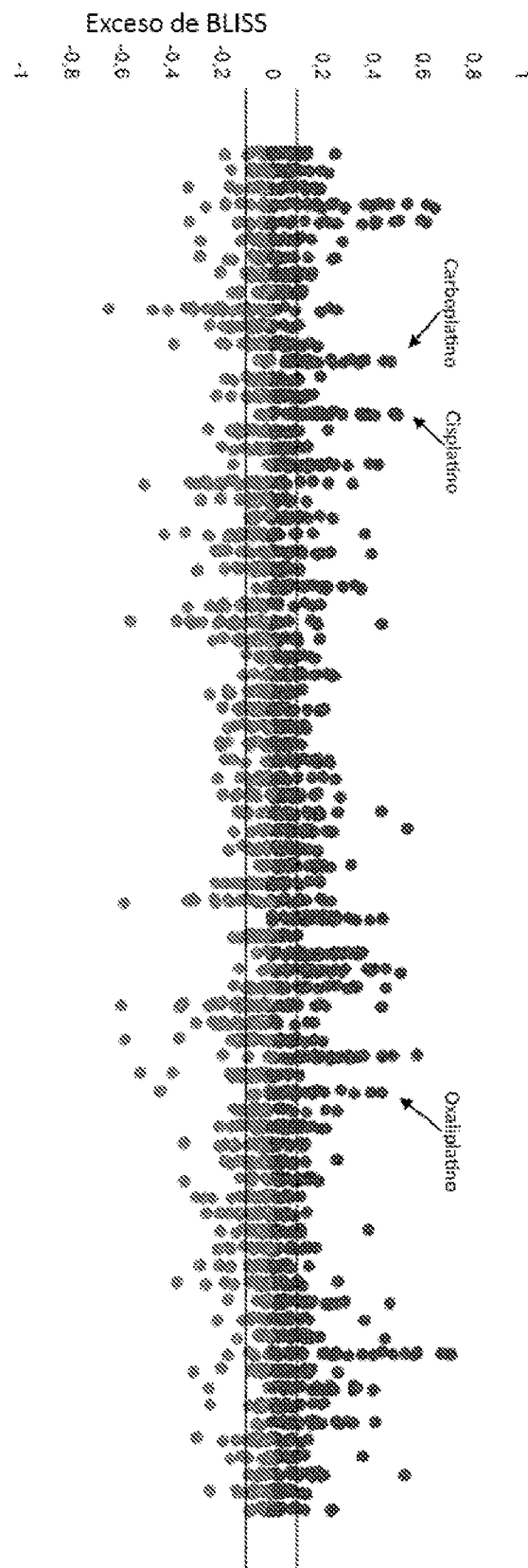


Figura 3B

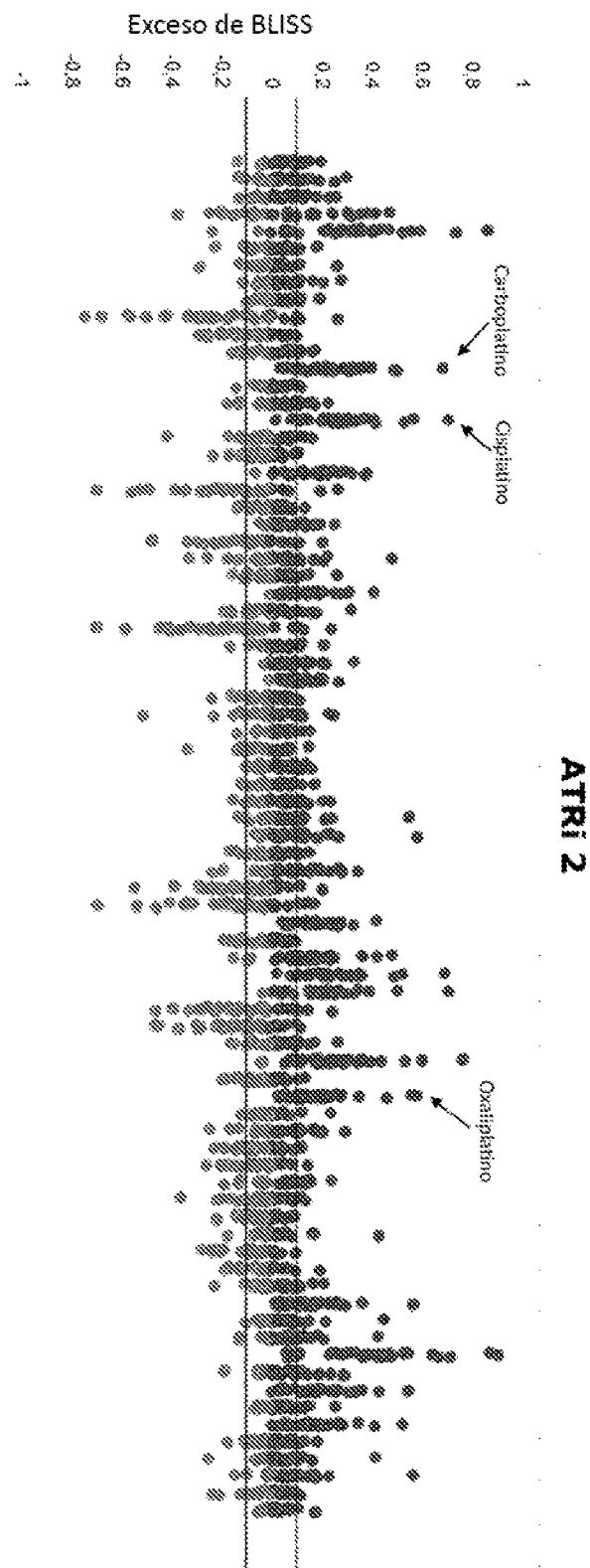


Figura 4

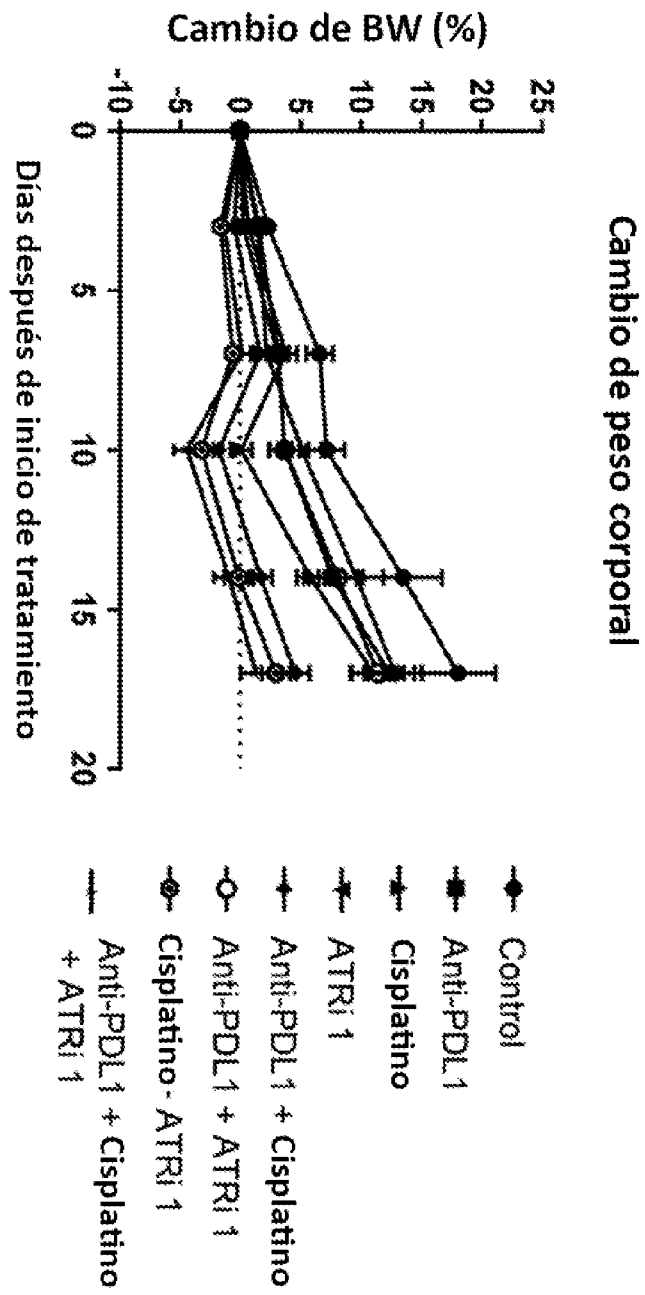


Figura 5

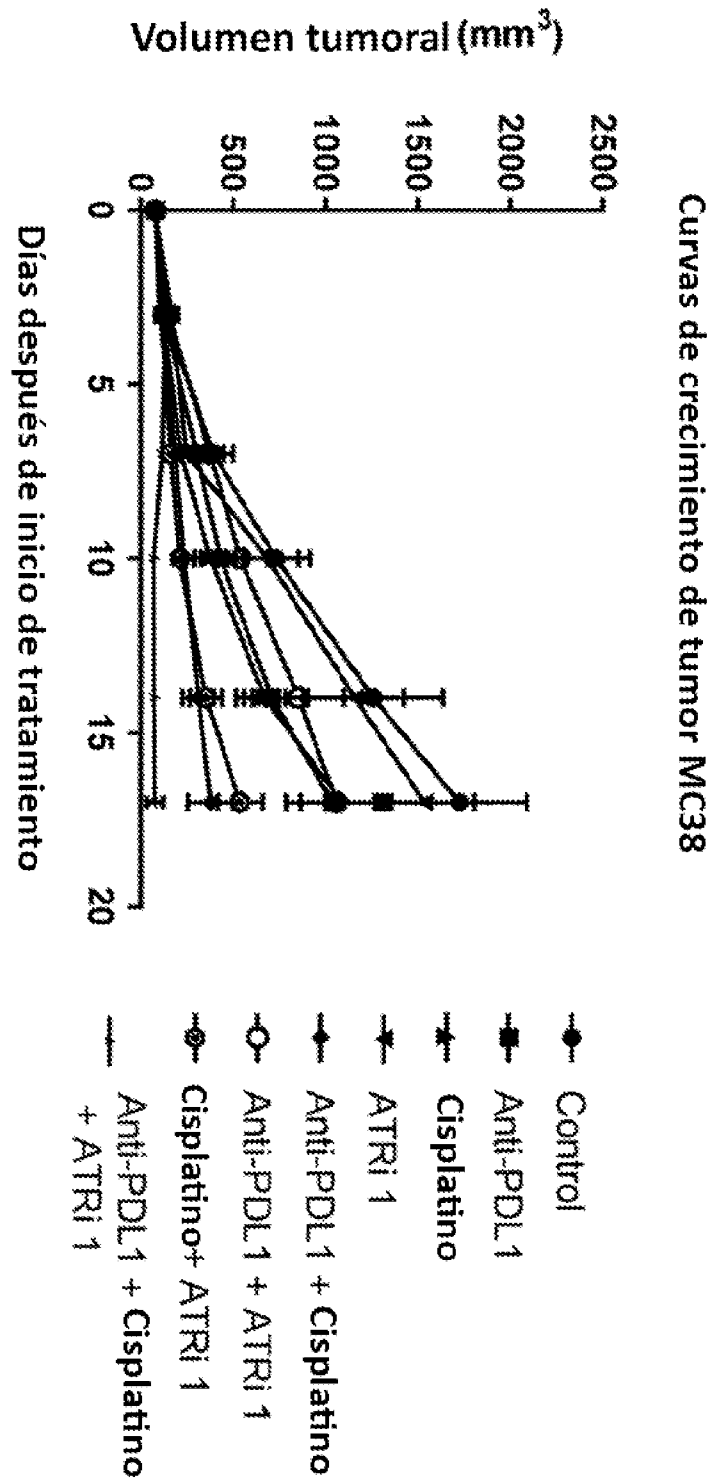


Figura 6

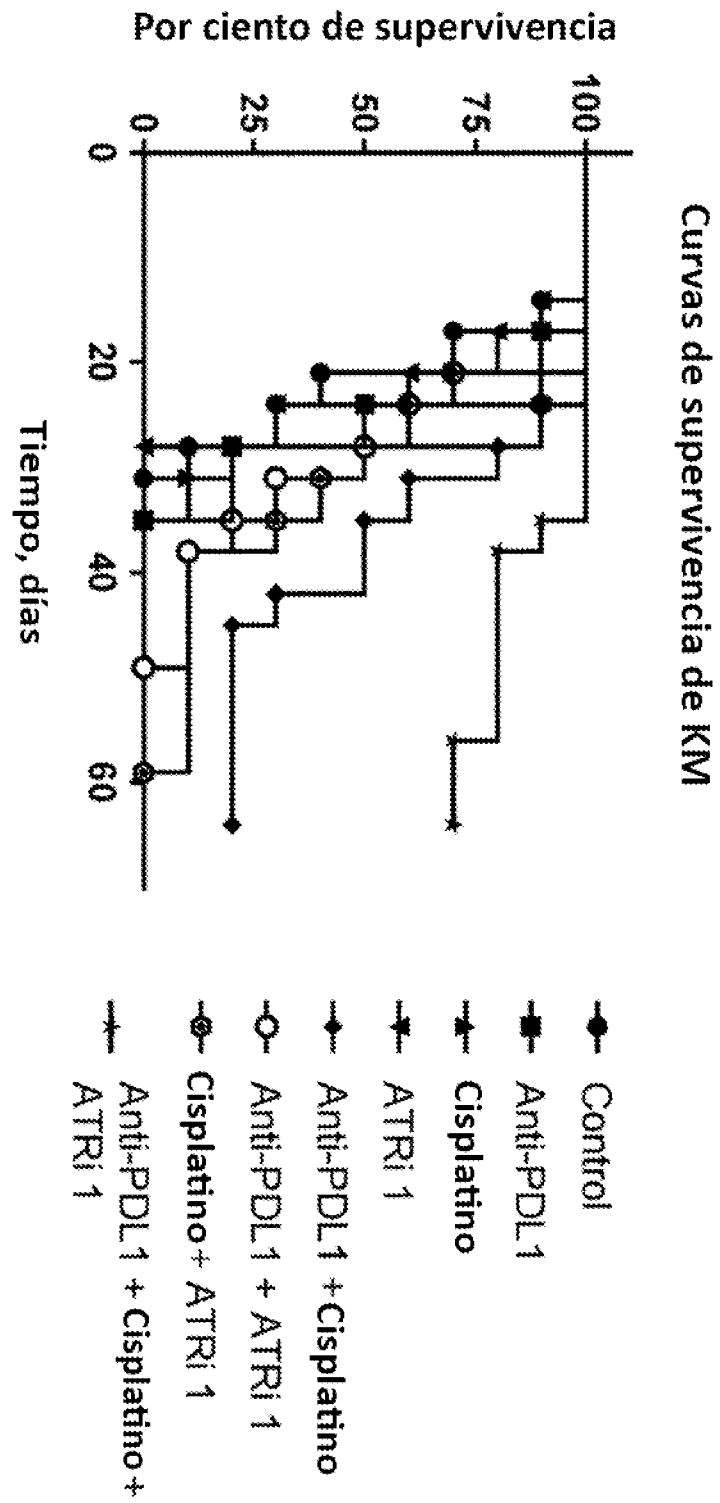


Figura 7

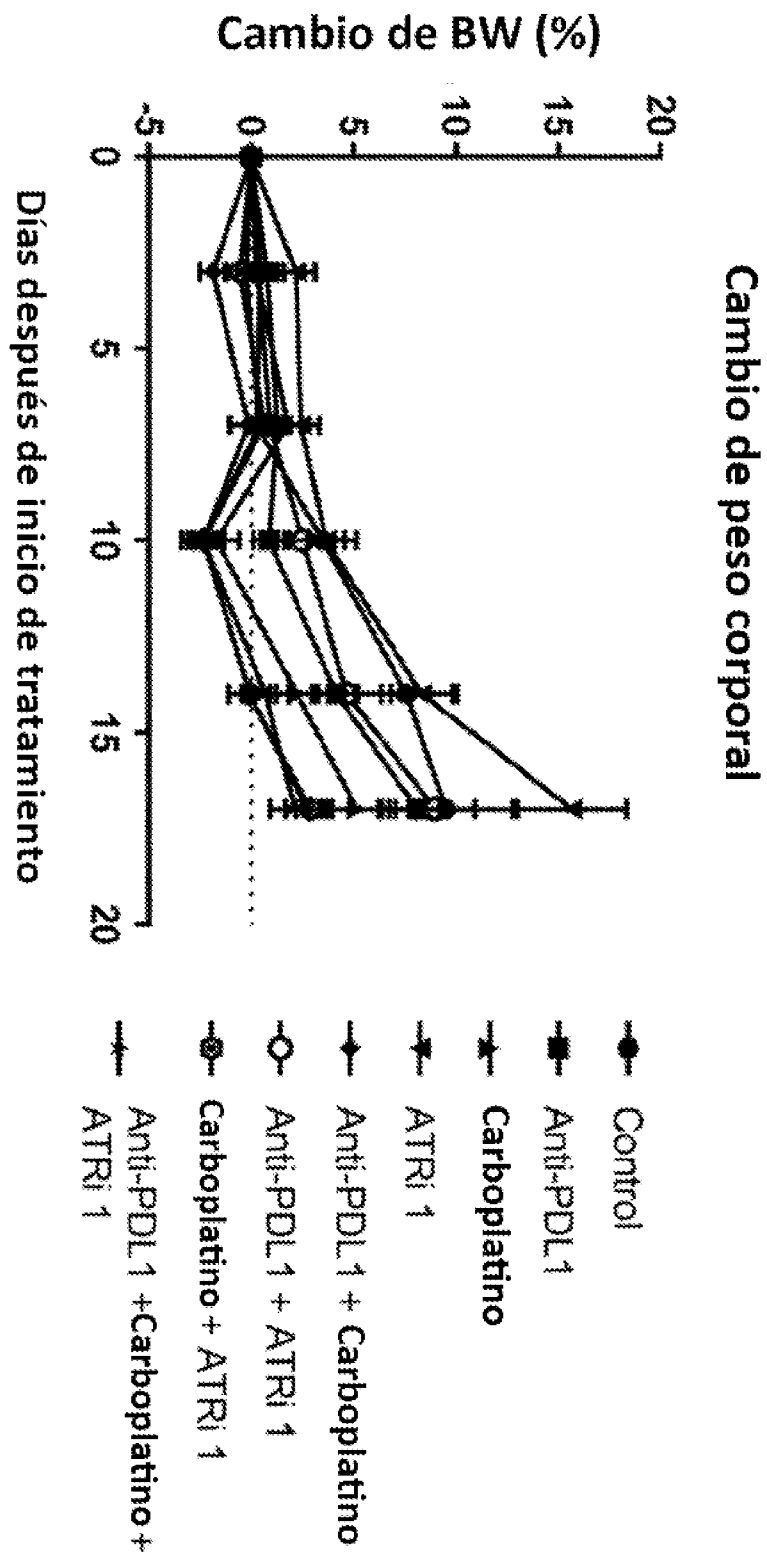


Figura 8

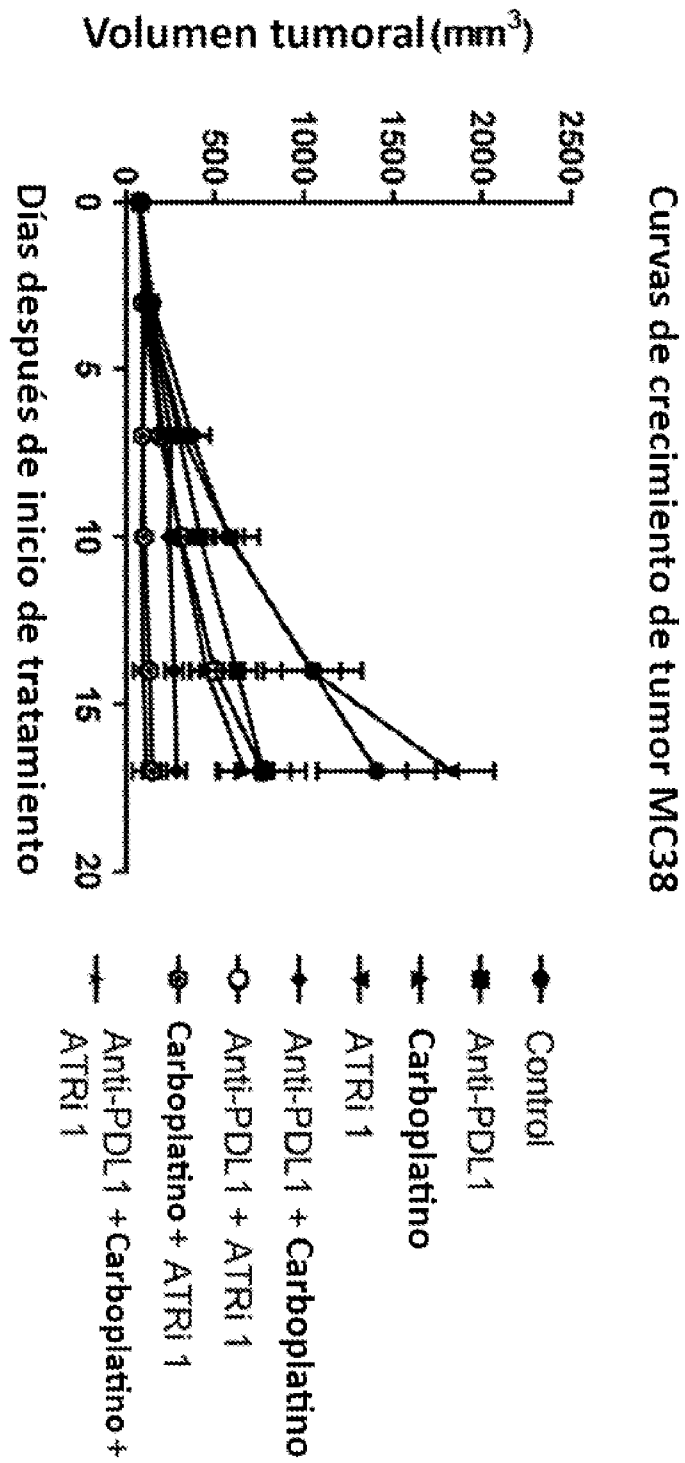


Figura 9

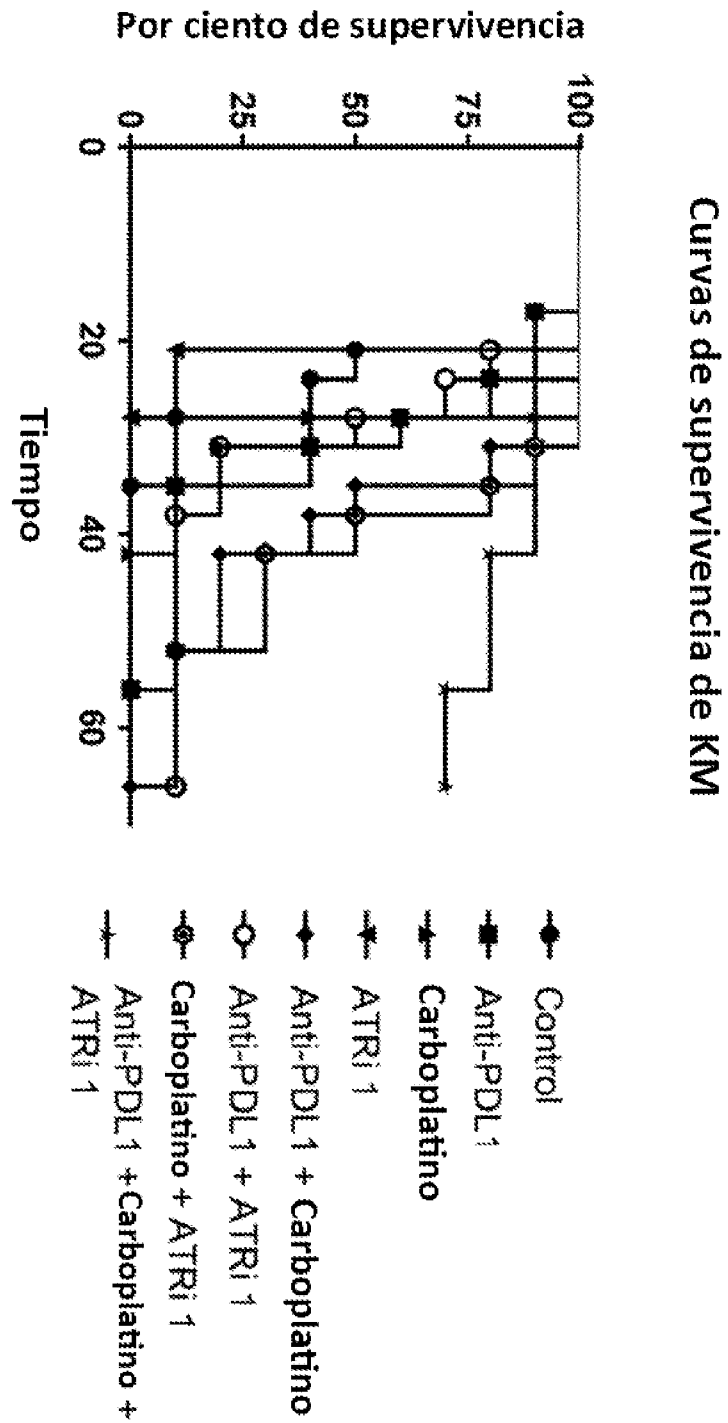


Figura 10

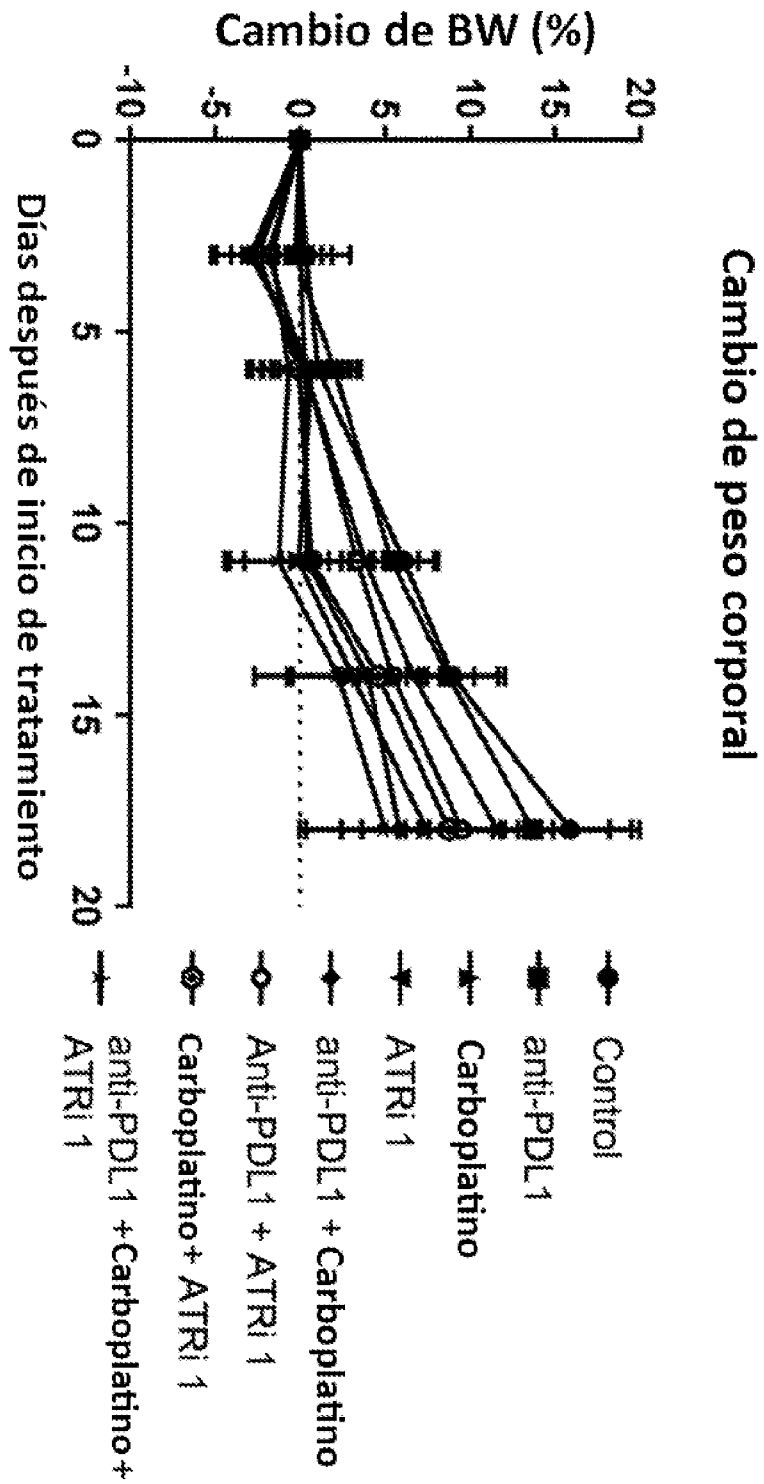


Figura 11

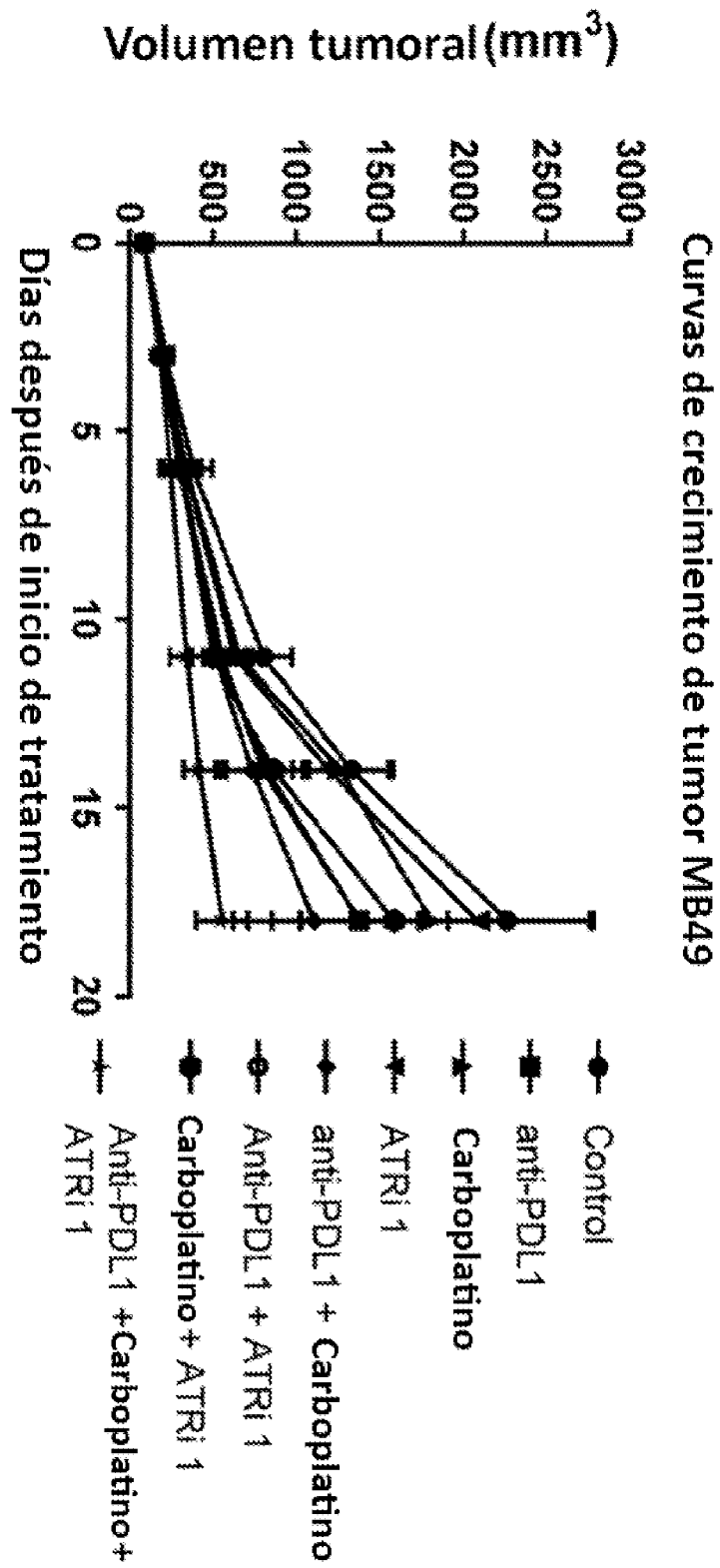


Figura 12

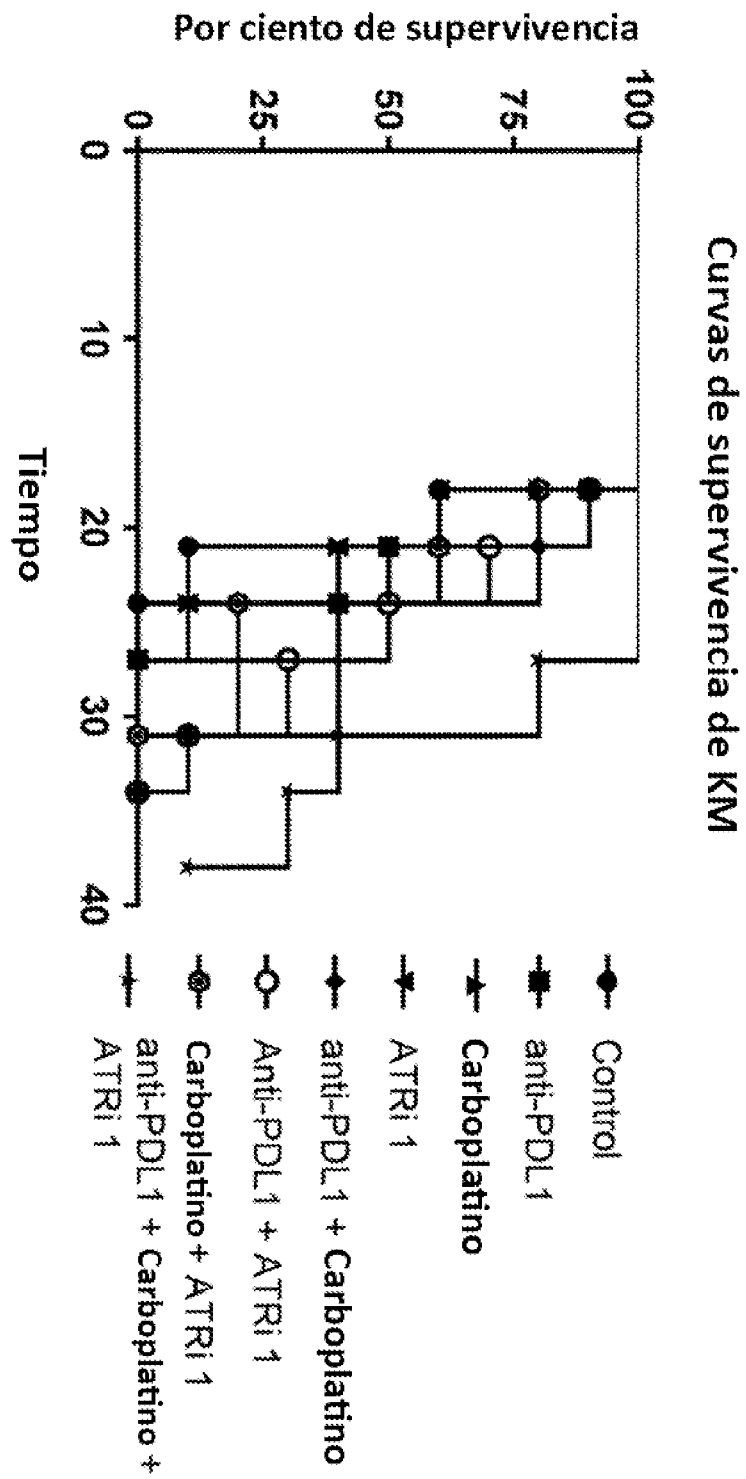


Figura 13A

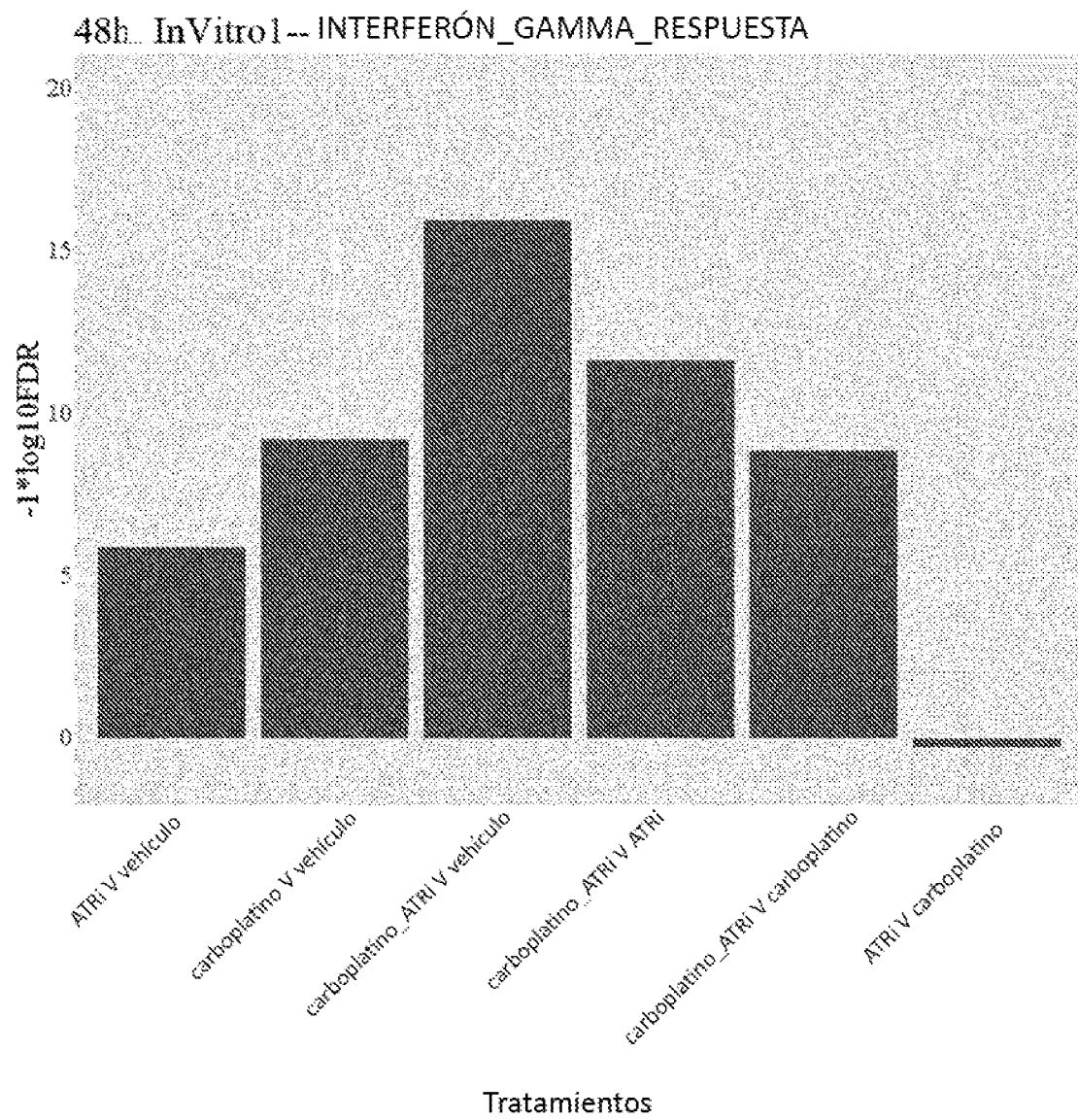


Figura 13B

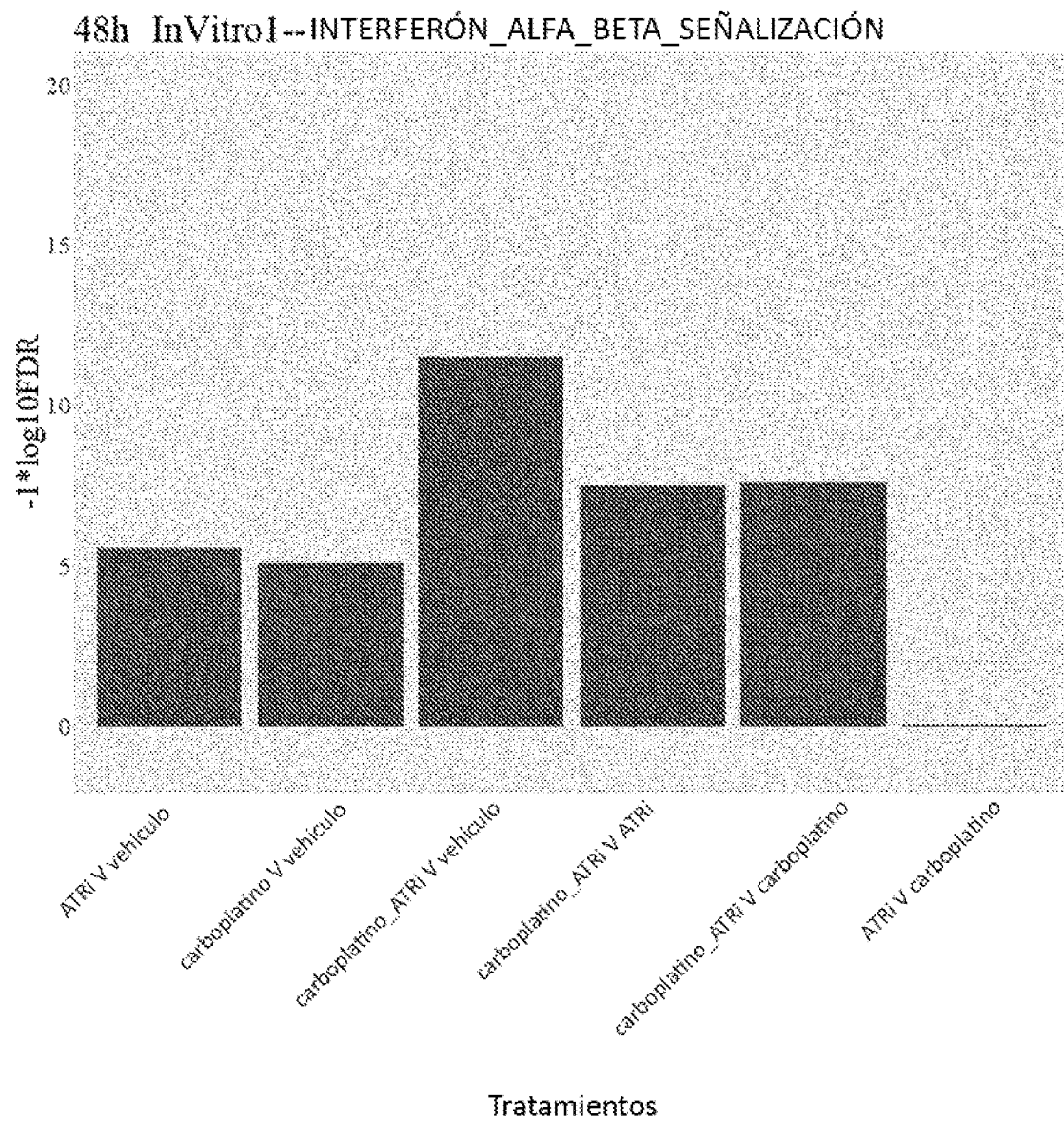


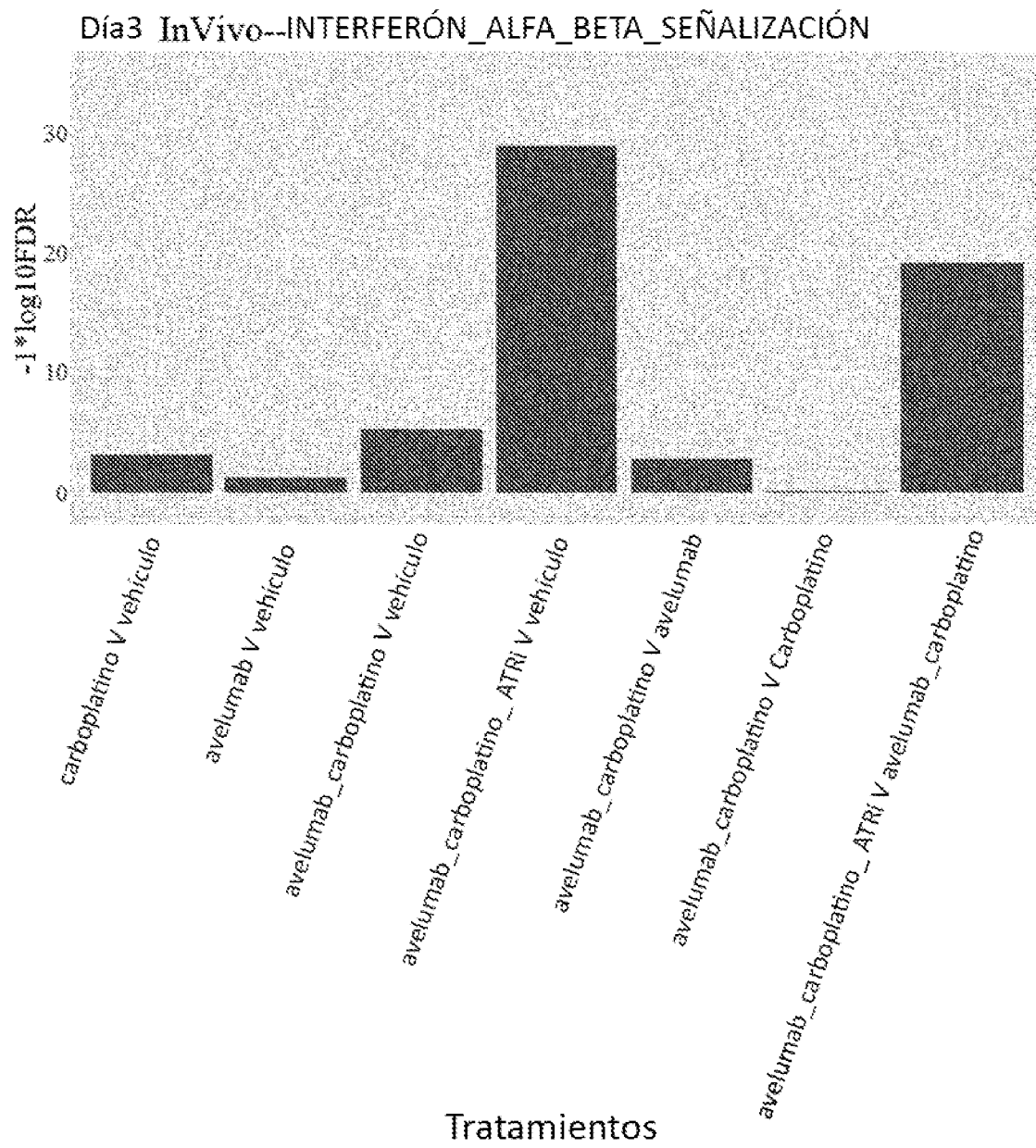
Figura 14A

Figura 14B

Día3 InVivo-- INTERFERÓN_GAMMA_RESPUESTA

