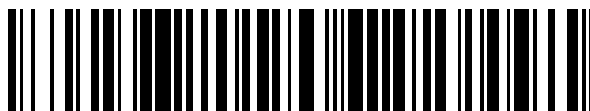


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 625**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4155 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010 E 10819435 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2480084**

54 Título: **Combinación farmacéutica**

30 Prioridad:

23.09.2009 US 245019 P

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

27.01.2015

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
Corporation Service Company, 2711 Centreville
Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US**

72 Inventor/es:

**DUMBLE, MELISSA;
GILMER, TONA;
KUMAR, RAKESH;
LEBOWITZ, PETER F.;
MORRIS, SHANNON RENAE y
LAQUERRE, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 625 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 farmacéutica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero. En particular, la invención se refiere a una combinación nueva que comprende el inhibidor de MEK: N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y el inhibidor de Akt: N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, las composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas, y tales combinaciones para el uso en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

15 El tratamiento eficaz de los trastornos hiperproliferativos, que incluyen el cáncer, es un objetivo constante en el campo de la oncología. En general, el cáncer es el resultado de la desregulación de los procesos normales que controlan la división celular, la diferenciación y la muerte celular apoptótica. La apoptosis (muerte celular programada) desempeña un papel esencial en el desarrollo embrionario y en la patogénesis de diversas enfermedades, tales como las enfermedades neuronales degenerativas, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Una de las rutas estudiadas con más frecuencia, que implica la regulación mediante quinasas de la apoptosis, es la señalización celular desde los receptores de factores de crecimiento de la superficie celular hacia el núcleo (Crews y Erikson, *Cell*, 74:215-17, 1993).

20 Los receptores con actividad de tirosina quinasa (RTKs) activados por factores de crecimiento extracelulares incorporan proteínas intracelulares a la membrana celular, por lo que se activan componentes de transducción de señales claves que habitualmente están hiper-activados en el cáncer. Estos incluyen la fosfoinositol 3-quinasa (denominada PI3K más adelante en la presente memoria) y la proteína de unión a trifosfato de guanosina (GTP) RAS.

25 La familia de proteínas PI3K consiste en 15 miembros que comparten homología de secuencias, en particular en sus dominios de quinasa; sin embargo, tienen diferentes especificidades por el sustrato y modos de regulación (Vivanco & Sawyers. *Nat. Rev. Cancer*, 2002.2:489-501). Las PI3-quinasas de clase I fosforilan lípidos que contienen inositol, conocidos como fosfatidilinositoles (PtdIns) en la posición 3. El sustrato principal de los miembros de la familia de clase I, PtdIns-4, 5-P2 (PIP2) se convierten en PtdIns-3, 4, 5-P3 (PIP3) mediante estas quinasas. PIP3 es un segundo mensajero crucial que incorpora proteínas que contienen dominios de homología de pleckstrina a la membrana celular en la que se activan. De estas proteínas la más estudiada es AKT, que estimula la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular. La señalización por AKT se puede regular mediante la activación de PI3K. Los tres miembros de la familia de genes de AKT, AKT1, AKT2 y AKT3, codifican proteínas quinasas específicas de serina/treonina, que, tras la activación, se mueven al citoplasma y al núcleo, en los que fosforilan numerosos sustratos, que incluyen mTOR (TORC1).

35 La ruta de PI3K-AKT está entre las rutas activadas más habitualmente en el cáncer humano. La función y la importancia de esta ruta en la tumorigénesis y la progresión tumoral está bien establecida (Samuels y Ericson. *Curr. Opin Oncology*, 2006. 18: 77-82). Así, la desregulación de la señalización por PI3K/AKT en los tumores contribuye a un fenotipo celular que muestra numerosas marcas características de las neoplasias malignas, que incluyen un potencial reproductivo ilimitado y la evitación de la apoptosis (Hanahan y Weinberg, *Cell*. 2000. 100:57-70). Numerosas alteraciones genéticas somáticas y de la línea germinal pueden activar estas rutas. La activación somática de la ruta de señalización por PI3K/AKT se da de manera muy habitual activando mutaciones en PI3KCA (que codifica la subunidad de quinasa p110 α catalítica) o por medio de mutaciones que suponen la pérdida de la función, deleciones o silenciamiento mediante metilación del promotor del gen supresor de tumores PTEN (un regulador negativo de PI3K) (Vivanco y Sawyers. *Nat. Rev. Cancer*. 2002. 2:489-501). Con menos frecuencia, también se ha identificado una mutación activadora de AKT1 que conduce a la incorporación a la membrana independiente de PI3K en el cáncer de mama, ovárico y colorrectal (Carpten *et al.* *Nature*. 2007. 448:439-44).

50 Se sabe que la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP)/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) quinasa (denominada MEK más adelante en la presente memoria) está implicada en la regulación de numerosos procesos celulares. La familia Raf (B-Raf, C-Raf, etc.) activa a la familia MEK (MEK-1, MEK-2, etc.), y la familia MEK activa a la familia ERK (ERK-1 y ERK-2). En líneas generales, la actividad de señalización de la ruta de RAF/MEK/ERK controla la traducción del mRNA. Esto incluye los genes relacionados con el ciclo celular. Por lo tanto, la hiperactivación de esta ruta puede conducir a una proliferación celular descontrolada. La desregulación de la ruta de RAF/MEK/ERK mediante la hiperactivación de ERK se observa en aproximadamente un 30% de todas las neoplasias malignas humanas (Allen, LF, *et al.* *Semin. Oncol.* 2003. 30(5 Supl. 16):105-16). RAS, que puede señalizar a través de PI3K/AKT y RAF/MEK/ERK, tiene una proteína oncogénica mutada en el 15% de todos los cánceres (Davies, H. *et al.* *Nature*. 2002. 417:949-54). Además, las mutaciones de BRAF activantes se han identificado con una frecuencia elevada en tipos específicos de tumores (p.ej., melanomas) (Davies, H. *et al.* *Nature*.

2002. 417:949-54). Aunque las mutaciones activantes en el propio MEK no parecen darse con frecuencia en el cáncer humano, se cree que MEK es un objetivo farmacológico importante para tratar el cáncer humano debido a su papel fundamental en la ruta de ERK. Además, la actividad inhibitoria de MEK induce de manera eficaz la inhibición de la actividad de ERK1/2 y la inhibición de la proliferación celular (The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, N° 4, págs. 2686-2692, 2001), y se espera que el compuesto muestre efectos sobre las enfermedades provocadas por una proliferación celular indeseable, tal como la tumorigénesis y/o el cáncer.

Estas observaciones demuestran que la ruta de PI3K/Akt desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia celular o la apoptosis en la tumorigénesis y/o el cáncer.

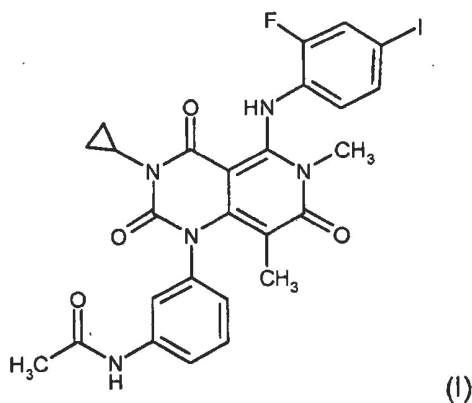
Estas observaciones demuestran que la ruta de RAF/MEK/ERK desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia celular o la apoptosis en la tumorigénesis y/o el cáncer.

Sería útil proporcionar una terapia nueva que proporcione un tratamiento más eficaz y/o mejorado de un individuo que padece los efectos del cáncer,

Sumario de la invención

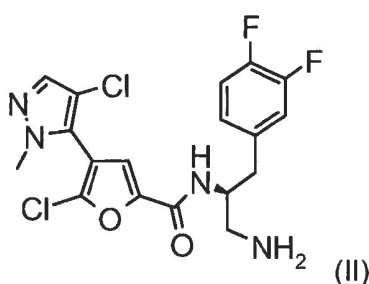
Una realización de esta invención proporciona una composición que comprende una combinación de:

(i) un compuesto de Estructura (I):



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) un compuesto de Estructura (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización de esta invención proporciona una combinación para el uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de N-(3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil)acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de manera adecuada el solvato de sulfóxido de dimetilo, de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Una realización de esta invención proporciona una combinación para el uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de N-(3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil)acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de manera adecuada el solvato de sulfóxido de dimetilo, de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

en la que la combinación se administra dentro de un periodo especificado, y

en la que la combinación se administra durante una duración de tiempo.

5 Una realización de esta invención proporciona una combinación para el uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano que lo necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de manera adecuada el solvato de sulfóxido de dimetilo, de la misma, y N-{(1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil}-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

en la que los compuestos de la combinación se administran de manera secuencial.

10 **Breve descripción de los dibujos**

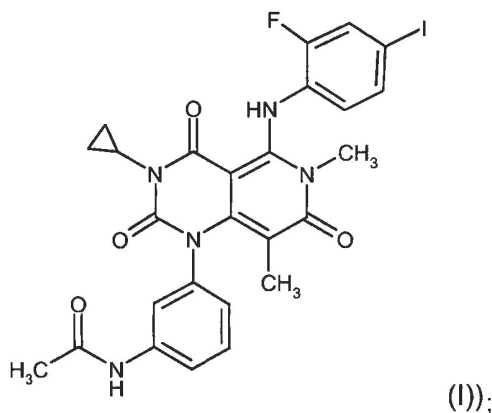
Figura - 1 La Figura 1 representa las curvas de inhibición del crecimiento celular-respuesta a dosis para MDA-MB-175-VII, BT474-J4 y JIMT-1.

Figura - 2 La Figura 2 representa el efecto de las combinaciones de los Compuestos A y B y la monoterapia contra xenoinjertos de tumores mutantes para KRAS que crecen en ratones SCID.

15 **Descripción detallada de la invención**

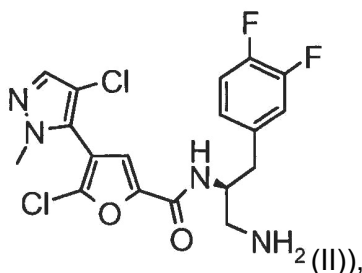
La presente invención se refiere a combinaciones que exhiben actividad antiproliferativa. De manera adecuada, la invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento del cáncer que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de manera adecuada el solvato de sulfóxido de dimetilo, de la misma, (más adelante en la presente memoria Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de manera adecuada el solvato de sulfóxido de dimetilo, de la misma,

cuyo compuesto se representa mediante la Estructura I:



25 y N-{(1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil}-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, (más adelante en la presente memoria Compuesto B o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

cuyo compuesto se representa mediante la Estructura II:



para el uso en el tratamiento del cáncer.

30 El Compuesto A se describe y se reivindica, junto con las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo,

como útil como inhibidor de la actividad de MEK, en particular en el tratamiento del cáncer, en la solicitud internacional N° PCT/JP2005/011082, que tiene como fecha de presentación internacional el 10 de junio de 2005; el número de publicación internacional WO 2005/121142 y una fecha de publicación internacional del 22 de diciembre de 2005, cuya descripción completa se incorpora en la presente memoria como referencia, el Compuesto A es el compuesto del Ejemplo 4-1. El Compuesto A se puede preparar como se describió en la solicitud internacional N° PCT/JP2005/011082. El Compuesto A se puede preparar como se describió en la publicación de patente de Estados Unidos N° US 2006/0014768, publicada el 10 de enero de 2006, cuya descripción completa se incorpora en la presente memoria como referencia.

De manera adecuada, el Compuesto A está en forma de un solvato de sulfóxido de dimetilo. De manera adecuada, el Compuesto A está en forma de una sal de sodio. De manera adecuada, el Compuesto A está en forma de un solvato seleccionado de: hidrato, ácido acético, etanol, nitrometano, clorobenceno, 1-pentanol, alcohol isopropílico, etilén glicol y 3-metil-1-butanol. Un experto en la técnica puede preparar estos solvatos y formas salinas a partir de la descripción de la solicitud internacional N° PCT/JP2005/011082 o la publicación de patente de Estados Unidos N° US 2006/0014768.

El Compuesto B se describe y se reivindica, junto con las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, como útil como inhibidor de la actividad de AKT, en particular en el tratamiento del cáncer, en la solicitud internacional N° PCT/US2008/053269, que tiene como fecha de presentación internacional el 7 de febrero de 2008; el número de publicación internacional WO 2008/098104 y una fecha de publicación internacional del 14 de agosto de 2008, cuya descripción completa se incorpora en la presente memoria como referencia, el Compuesto B es el compuesto del ejemplo 224. El Compuesto B se puede preparar como se describió en la solicitud internacional N° PCT/US2008/053269.

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las combinaciones de la invención son ventajosas respecto de los compuestos componentes individuales, ya que las combinaciones proporcionarán una o más de las siguientes propiedades mejoradas en comparación con la administración individual de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto componente: i) un efecto antineoplásico mayor que el agente individual más activo, ii) actividad antineoplásica sinérgica o muy sinérgica, iii) un protocolo de dosificación que proporciona una actividad antineoplásica incrementada con un perfil reducido de efectos secundarios, iv) una reducción del perfil de efectos tóxicos, v) un incremento de la ventana terapéutica, o vi) un incremento de la biodisponibilidad de uno o ambos compuestos componentes.

Los compuestos de la invención pueden contener uno o más átomos quirales, o pueden existir de otra manera en forma de dos enantiómeros. Por lo tanto, los compuestos de esta invención incluyen mezclas de enantiómeros, así como enantiómeros purificados o mezclas enriquecidas enantioméricamente. También, se entiende que todos los tautómeros y las mezclas de tautómeros se incluyen dentro del alcance del Compuesto A, y las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, y del Compuesto B, y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los compuestos de la invención pueden formar un solvato, que se entiende que es un complejo de estequiometría variable formado por un soluto (en esta invención, el Compuesto A o una sal del mismo y/o el Compuesto B o una sal del mismo) y un disolvente. Tales disolventes, para los fines de la invención, no pueden interferir con la actividad biológica del soluto. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen agua, metanol, sulfóxido de dimetilo, etanol y ácido acético. De manera adecuada, el disolvente usado es un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de disolventes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, sulfóxido de dimetilo, etanol y ácido acético. De manera adecuada, el disolvente usado es agua.

Los expertos en la técnica preparan fácilmente las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención.

Al referirse a un protocolo de dosificación, el término "día", "al día", y similares, se refiere a un momento en un día del calendario que comienza a medianoche y finaliza la medianoche siguiente.

El término "tratar", y los derivados del mismo, tal como se usa en la presente memoria, significa una terapia terapéutica. Con respecto a una afección particular, tratar significa: (1) mejorar o prevenir la afección de una o más de las manifestaciones biológicas de la afección, (2) interferir con (a) uno o más puntos de la cascada biológica que conduce a o que es responsable de la afección o (b) una o más de las manifestaciones biológicas de la afección, (3) mitigar uno o más de los síntomas, efectos o efectos secundarios asociados a la afección o al tratamiento de la misma, o (4) ralentizar la progresión de la afección o una o más de las manifestaciones biológicas de la afección. Así, también se contempla la terapia profiláctica. El técnico experto apreciará que "prevención" no es un término absoluto. En medicina, se entiende que "prevención" se refiere a la administración profiláctica de un fármaco para disminuir sustancialmente la probabilidad o gravedad de una afección o manifestación biológica de la misma, o para retrasar el inicio de dicha afección o manifestación biológica de la misma. La terapia profiláctica es adecuada, por ejemplo, cuando se considera que un sujeto corre un riesgo elevado de desarrollar cáncer, tal como cuando un sujeto tiene una historia familiar importante de cáncer o cuando un sujeto se ha expuesto a un carcinógeno.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad eficaz" significa la cantidad de un fármaco o agente

5 farmacéutico que generará la respuesta biológica o médica de un tejido, aparato, animal o humano que busca, por ejemplo, un investigador o médico. Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido tal cantidad, da como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención, o mejora de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución de la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. La expresión también incluye en su alcance las cantidades eficaces para aumentar la función fisiológica normal.

10 El término "combinación", y los derivados del mismo, tal como se usa en la presente memoria, significa una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y del Compuesto B o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en la administración simultánea o cualquier manera de administración secuencial por separado. Preferiblemente, si la administración no es simultánea, los compuestos se administran en una estrecha proximidad temporal entre sí. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma farmacéutica, p.ej. un compuesto se puede administrar de manera tópica y el otro compuesto se puede administrar de manera oral. De manera adecuada, ambos compuestos se administran de manera oral.

15 La expresión "equipo de combinación", tal como se usa en la presente memoria, significa la composición o composiciones farmacéuticas que se usan para administrar el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la invención. Cuando ambos compuestos se administran de manera simultánea, el equipo de combinación puede contener el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una única composición farmacéutica, tal como un comprimido, o en composiciones farmacéuticas diferentes. Cuando los compuestos no se administran de manera simultánea, el equipo de combinación contendrá el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en composiciones farmacéuticas diferentes. El equipo de combinación puede comprender el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en composiciones farmacéuticas diferentes en un único envase o en composiciones farmacéuticas diferentes en envases diferentes.

En un aspecto, se proporciona un equipo de combinación que comprende los componentes:

el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

30 el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención, el equipo de combinación comprende los siguientes componentes:

el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

35 el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en el que los componentes se proporcionan en una forma que es adecuada para la administración secuencial, por separado y/o simultánea.

En una realización, el equipo de combinación comprende:

40 un primer envase que comprende el Compuesto A, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

un segundo recipiente que comprende el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un medio recipiente que contiene dicho primer y segundo recipientes.

45 El "equipo de combinación" también puede estar provisto de instrucciones, tales como instrucciones de dosificación y administración. Tales instrucciones de dosificación y administración pueden ser del tipo que se proporciona a un doctor, por ejemplo una etiqueta de un producto farmacológico, o pueden ser del tipo que proporciona un doctor, tales como instrucciones para un paciente.

50 A menos que se defina de otra manera, en todos los protocolos de dosificación descritos en la presente memoria, el régimen de los compuestos administrados no tiene que comenzar con el inicio del tratamiento y terminar con el fin del tratamiento, solamente es necesario que el número de días consecutivos en los que se administran ambos compuestos y el número opcional de días consecutivos en los que se administra solamente uno de los compuestos componentes, o el protocolo de dosificación indicado, que incluye la cantidad de compuesto administrado, se den en cierto momento durante el curso de tratamiento.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "Compuesto A²" significa ---Compuesto A, o una sal o solvato

farmacéuticamente aceptable del mismo---

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "Compuesto B²" significa ---Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo---

5 La expresión "dosis de carga", tal como se usa en la presente memoria, se entenderá que significa una dosis individual o régimen de duración corta del Compuesto A o del Compuesto B que tiene una dosis mayor que la dosis de mantenimiento administrada al sujeto para incrementar rápidamente el nivel de concentración en sangre del fármaco. De manera adecuada, un régimen de duración corta para el uso en la presente memoria será de: 1 a 14 días; de manera adecuada de 1 a 7 días; de manera adecuada de 1 a 3 días; de manera adecuada durante tres días; de manera adecuada durante dos días; de manera adecuada durante un día. En ciertas realizaciones, la "dosis de carga" puede incrementar la concentración en sangre del fármaco hasta un nivel terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la "dosis de carga" puede incrementar la concentración en sangre del fármaco hasta un nivel terapéuticamente eficaz junto con una dosis de mantenimiento del fármaco. La "dosis de carga" se puede administrar una vez al día, o más de una vez al día (p.ej., hasta 4 veces al día). De manera adecuada, la "dosis de carga" se administrará una vez al día. De manera adecuada, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; de manera adecuada de 2 a 10 veces; de manera adecuada de 2 a 5 veces; de manera adecuada 2 veces; de manera adecuada 3 veces; de manera adecuada 4 veces; de manera adecuada 5 veces. De manera adecuada, la dosis de carga se administrará durante 1 a 7 días; de manera adecuada de 1 a 5 días; de manera adecuada de 1 a 3 días; de manera adecuada durante 1 día; de manera adecuada durante 2 días; de manera adecuada durante 3 días, seguido de un protocolo de dosificación de mantenimiento.

20 La expresión "dosis de mantenimiento", tal como se usa en la presente memoria, se entenderá que significa una dosis que se administra en serie (por ejemplo, al menos dos veces), y que pretende elevar lentamente los niveles de concentración en sangre del compuesto hasta un nivel terapéuticamente eficaz, o mantener tal nivel terapéuticamente eficaz. La dosis de mantenimiento se administra en general una vez al día, y la dosis diaria de la dosis de mantenimiento es menor que la dosis diaria total de la dosis de carga.

25 De manera adecuada, las combinaciones de esta invención se administran dentro de un "periodo especificado".

La expresión "periodo especificado", y los derivados de la misma, tal como se usa en la presente memoria, significa el intervalo de tiempo entre la administración de uno del Compuesto A² y del Compuesto B² y el otro del Compuesto A² y del Compuesto B². A menos que se defina de otra manera, el periodo especificado puede incluir la administración simultánea. Cuando ambos compuestos de la invención se administran una vez al día, el periodo especificado se refiere al momento de la administración del Compuesto A² y del Compuesto B² durante un único día. Cuando uno o ambos compuestos de la invención se administran más de una vez al día, el periodo especificado se calcula basándose en la primera administración de cada compuesto en un día específico. No se considera ninguna de las administraciones de un compuesto de la invención que son posteriores a la primera durante un día específico cuando se calcula el periodo específico.

35 De manera adecuada, si los compuestos se administran dentro de un "periodo especificado" y no se administran de manera simultánea, ambos se administran dentro de alrededor de 24 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 24 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 12 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 12 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 11 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 11 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 10 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 10 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 9 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 9 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 8 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 8 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 7 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 7 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 6 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 6 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 5 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 5 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 4 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 4 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 3 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 3 horas; de manera adecuada se administrarán dentro de alrededor de 2 horas entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 2 horas; de manera adecuada ambos se administrarán dentro de alrededor de 1 hora entre sí - en este caso, el periodo especificado será de alrededor de 1 hora; Tal como se usa en la presente memoria, la administración del Compuesto A² y del Compuesto B² con una separación de menos de alrededor de 45 minutos se considera una administración simultánea.

De manera adecuada, cuando la combinación de la invención se administra durante un "periodo especificado", los compuestos se co-administrarán durante una "duración de tiempo".

La expresión "duración de tiempo", y los derivados de la misma, tal como se usa en la presente memoria, significa que ambos compuestos de la invención se administran dentro de un "periodo especificado" durante un número

administración continua.

5 De manera adecuada, durante el curso de tratamiento, el Compuesto A² y el Compuesto B² se administrarán dentro de un periodo especificado de 2 días a lo largo de un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días se administrará el Compuesto B² solo. De manera adecuada, este protocolo de 7 días se repite durante 2 ciclos o durante 14 días; de manera adecuada, durante 4 ciclos o 28 días; de manera adecuada, durante una administración continua.

10 De manera adecuada, durante el curso de tratamiento, el Compuesto A² y el Compuesto B² se administrarán dentro de un periodo especificado de 1 día durante un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días se administrará el Compuesto A² solo. De manera adecuada, este protocolo de 7 días se repite durante 2 ciclos o durante 14 días; de manera adecuada, durante 4 ciclos o 28 días; de manera adecuada, durante una administración continua.

15 De manera adecuada, durante el curso de tratamiento, el Compuesto A² y el Compuesto B² se administrarán dentro de un periodo especificado de 1 día durante un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días se administrará el Compuesto B² solo. De manera adecuada, este protocolo de 7 días se repite durante 2 ciclos o durante 14 días; de manera adecuada, durante 4 ciclos o 28 días; de manera adecuada, durante una administración continua.

20 De manera adecuada, durante el curso de tratamiento, el Compuesto A² y el Compuesto B² se administrarán dentro de un periodo especificado de 1 a 5 días a lo largo de un periodo de 14 días, y durante los otros días del periodo de 14 días se administrará el Compuesto A² solo. De manera adecuada, este protocolo de 14 días se repite durante 2 ciclos o durante 28 días; de manera adecuada, durante una administración continua.

De manera adecuada, durante el curso de tratamiento, el Compuesto A² y el Compuesto B² se administrarán dentro de un periodo especificado de 1 a 5 días a lo largo de un periodo de 14 días, y durante los otros días del periodo de 14 días se administrará el Compuesto B² solo. De manera adecuada, este protocolo de 14 días se repite durante 2 ciclos o durante 28 días; de manera adecuada, durante una administración continua.

25 De manera adecuada, si los compuestos no se administran durante un "periodo especificado", se administran de manera secuencial. La expresión "administración secuencial", y los derivados de la misma, tal como se usa en la presente memoria, significa que uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra una vez al día durante dos o más días consecutivos, y el otro del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra posteriormente una vez al día durante dos o más días consecutivos. Además, en la presente memoria se contempla un descanso farmacológico utilizado entre la administración secuencial de uno del Compuesto A² y del Compuesto B² y el otro del Compuesto A² y del Compuesto B². Tal como se usa en la presente memoria, un descanso farmacológico es un periodo de días tras la administración secuencial de uno del Compuesto A² y del Compuesto B² y antes de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B², en el que no se administra ni el Compuesto A² ni el Compuesto B². De manera adecuada, el descanso farmacológico será un periodo de días seleccionado de: 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días y 14 días.

40 De manera adecuada, si los compuestos no se administran durante un "periodo especificado", se administran de manera secuencial. La expresión "administración secuencial", y los derivados de la misma, tal como se usa en la presente memoria, significa que uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante uno o más días consecutivos, y el otro del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra posteriormente durante uno o más días consecutivos.

Con respecto a la administración secuencial:

45 De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 2 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B² durante 2 a 30 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 2 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B² durante 2 a 21 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 2 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico de 1 a 14 días, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B² durante 2 a 14 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 3 a 7 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico de 3 a 10 días, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B² durante 3 a 7 días consecutivos.

55 De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B² durante 1 a 30 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 1 a 21 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico opcional, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto B² durante 1 a 21 días consecutivos. De manera adecuada, uno del Compuesto A² y del Compuesto B² se administra durante 1 a 14 días consecutivos, seguido de un descanso farmacológico de 1 a 14 días, seguido de la administración del otro del Compuesto A² y del Compuesto

Se entiende que una administración en un "periodo especificado" y una administración "secuencial" pueden ir seguidas por una dosificación repetida o pueden ir seguidas por un protocolo de dosificación alternada, y el protocolo de dosificación repetida o de dosificación alternada puede ir precedido por un descanso farmacológico.

5 De manera adecuada, la cantidad del Compuesto A² administrada como parte de la combinación según la presente invención será una cantidad seleccionada de alrededor de 0,125 mg a alrededor de 10 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 0,25 mg a alrededor de 9 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 0,25 mg a alrededor de 8 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 8 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 7 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 1 mg a alrededor de 7 mg; de manera adecuada, la cantidad será de alrededor de 5 mg. Por lo tanto, la cantidad del Compuesto A administrada como parte de la combinación según la presente invención será una cantidad seleccionada de alrededor de 0,125 mg a alrededor de 10 mg. Por ejemplo, la cantidad del Compuesto A² administrada como parte de la combinación según la presente invención puede ser 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 3,5 mg, 4 mg, 4,5 mg, 5 mg, 5,5 mg, 6 mg, 6,5 mg, 7 mg, 7,5 mg, 8 mg, 8,5 mg, 9 mg, 9,5 mg, 10 mg. De manera adecuada, la cantidad seleccionada del Compuesto A² se administra dos veces al día. De manera adecuada, la cantidad seleccionada del Compuesto A² se administra una vez al día. De manera adecuada, la administración del Compuesto A² comenzará como una dosis de carga. De manera adecuada, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; de manera adecuada de 2 a 10 veces; de manera adecuada de 2 a 5 veces; de manera adecuada 2 veces; de manera adecuada 3 veces; de manera adecuada 4 veces; de manera adecuada 5 veces. De manera adecuada, la dosis de carga se administrará de 1 a 7 días; de manera adecuada de 1 a 5 días; de manera adecuada de 1 a 3 días; de manera adecuada durante 1 día; de manera adecuada durante 2 días; de manera adecuada durante 3 días, seguido de un protocolo de dosificación de mantenimiento.

De manera adecuada, la cantidad del Compuesto B² administrada como parte de la combinación según la presente invención será una cantidad seleccionada de alrededor de 5 mg a alrededor de 500 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 25 mg a alrededor de 400 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 30 mg a alrededor de 375 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 35 mg a alrededor de 350 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 40 mg a alrededor de 300 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 45 mg a alrededor de 275 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 50 mg a alrededor de 250 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 55 mg a alrededor de 225 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 60 mg a alrededor de 200 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 65 mg a alrededor de 175 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 70 mg a alrededor de 150 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 75 mg a alrededor de 150 mg; de manera adecuada, la cantidad será de alrededor de 100 mg. Por lo tanto, la cantidad del Compuesto B² administrada como parte de la combinación según la presente invención será una cantidad seleccionada de alrededor de 5 mg a alrededor de 500 mg. Por ejemplo, la cantidad del Compuesto B² administrada como parte de la combinación según la presente invención puede ser 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg, 140 mg, 145 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 425 mg, 450 mg, 475 mg o 500 mg. De manera adecuada, la cantidad seleccionada del Compuesto B² se administra dos veces al día. De manera adecuada, la cantidad seleccionada del Compuesto B² se administra una vez al día. De manera adecuada, la administración del Compuesto B² comenzará como una dosis de carga. De manera adecuada, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; de manera adecuada de 2 a 10 veces; de manera adecuada de 2 a 5 veces; de manera adecuada 2 veces; de manera adecuada 3 veces; de manera adecuada 4 veces; de manera adecuada 5 veces. De manera adecuada, la dosis de carga se administrará de 1 a 7 días; de manera adecuada de 1 a 5 días; de manera adecuada de 1 a 3 días; de manera adecuada durante 1 día; de manera adecuada durante 2 días; de manera adecuada durante 3 días, seguido de un protocolo de dosificación de mantenimiento.

50 De manera adecuada, la cantidad del Compuesto B² administrada como parte de la combinación según la presente invención será una cantidad seleccionada de alrededor de 75 mg a alrededor de 1.000 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 100 mg a alrededor de 900 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 150 mg a alrededor de 850 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 200 mg a alrededor de 800 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 250 mg a alrededor de 750 mg; de manera adecuada, la cantidad se seleccionará de alrededor de 300 mg a alrededor de 6000 mg; de manera adecuada, la cantidad será de alrededor de 450 mg. Por lo tanto, la cantidad del Compuesto B² administrada como parte de la combinación según la presente invención será una cantidad seleccionada de alrededor de 75 mg a alrededor de 1.000 mg. Por ejemplo, la cantidad del Compuesto B² administrada como parte de la combinación según la presente invención puede ser 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 425 mg, 450 mg, 475 mg, 500 mg, 525 mg, 550 mg, 575 mg, 600 mg, 625 mg, 650 mg, 675 mg, 700 mg, 725 mg, 750 mg, 775 mg, 800 mg, 825 mg, 850 mg, 875 mg, 900 mg, 925 mg, 950 mg, 975 mg o 1.000 mg.

Tal como se usa en la presente memoria, todas las cantidades especificadas para el Compuesto A² y el Compuesto B² se indican como la cantidad administrada de compuesto libre o sin formar la sal y sin solvatar, por dosis.

La combinación de la presente invención se puede emplear además con otros compuestos terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

5 Aunque es posible que, para el uso en la terapia, se puedan administrar cantidades terapéuticamente eficaces de las combinaciones de la presente invención en forma del producto químico bruto, es preferible presentar las combinaciones en forma de una composición o composiciones farmacéuticas. Por lo tanto, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas, que incluyen el Compuesto A² y/o el Compuesto B², y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las combinaciones de la presente invención son como se describieron anteriormente. El/los vehículo(s) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación, capaces incorporarse a una formulación farmacéutica, y no perjudicial(es) para su receptor. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona además un proceso para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye mezclar el Compuesto A² y/o el Compuesto B² con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se indicó anteriormente, tales elementos de la combinación farmacéutica utilizados se pueden presentar en composiciones farmacéuticas diferentes o se pueden formular juntos en una formulación farmacéutica.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de ingrediente activo por dosis unitaria. Como conocen los expertos en la técnica, la cantidad de ingrediente activo por dosis dependerá de la afección a tratar, la vía de administración y la edad, el peso y el estado del paciente. Las formulaciones farmacéuticas unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis o sub-dosis diaria, o una fracción adecuada de la misma, de un ingrediente activo. Además, tales formulaciones farmacéuticas se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica.

El Compuesto A² y el Compuesto B² se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada. Las vías adecuadas incluyen la oral, rectal, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), vaginal, y parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal, y epidural). Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con el estado del receptor de la combinación y el cáncer a tratar. También se apreciará que cada uno de los agentes administrados se puede administrar mediante las mismas o diferentes vías, y que el Compuesto A² y el Compuesto B² se pueden mezclar en una composición/formulación farmacéutica. De manera adecuada, el Compuesto A² y el Compuesto B² se administran en composiciones farmacéuticas orales diferentes.

30 Los compuestos o combinaciones de la presente invención se incorporan en formas farmacéuticas adecuadas tales como cápsulas, comprimidos, o preparaciones inyectables. Se emplean vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato cálcico dihidrato, yeso, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato magnésico y ácido esteárico. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, solución salina y agua. De forma similar, el vehículo puede incluir un material de liberación prolongada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera. La cantidad de vehículo sólido varía ampliamente pero, preferiblemente, será de alrededor de 25 mg a alrededor de 1 g por unidad de dosis. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará de manera adecuada en forma de un jarabe, elixir, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril tal como una ampolla, o una suspensión líquida acuosa o no acuosa.

40 Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente farmacológico activo se puede combinar con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable atóxico oral, tal como etanol, glicerol, agua. Se preparan polvos triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico triturado de forma similar, tal como un carbohidrato comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. También puede haber presentes agentes aromatizantes, conservantes, dispersantes y colorantes.

45 Se debería entender que además de los ingredientes mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellos que son adecuados para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Tal como se indica, se administran cantidades terapéuticamente eficaces de las combinaciones de la invención (Compuesto A² en combinación con el Compuesto B²) a un ser humano. En general, la cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes administrados de la presente invención dependerá de varios factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto, la afección precisa que requiere tratamiento, la gravedad de la afección, la naturaleza de la formulación, y la vía de administración. En última instancia, la cantidad terapéuticamente eficaz será a criterio del médico que aplica el tratamiento.

55 Se ensayan la eficacia, las propiedades ventajosas y sinérgicas de las combinaciones de la presente invención según los procedimientos conocidos.

De manera adecuada, se ensayan la eficacia, las propiedades ventajosas y sinérgicas de las combinaciones de la invención en general según los ensayos de proliferación celular de combinación siguientes. Las células se colocan en placas de 384 pocillos a 500 células/pocillo en medios de cultivo adecuados para cada tipo de célula,

complementados con un 10% de FBS y un 1% de penicilina/estreptomicina, y se incuban durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂. Las células se tratan en forma de cuadrícula con la dilución del Compuesto A² (20 diluciones, que incluyen la ausencia de compuesto, de diluciones a un medio partiendo de 1-20 µM dependiendo del compuesto) de izquierda a derecha en una placa de 384 pocillos y también se tratan con el Compuesto B² (20 diluciones, que incluyen la ausencia de compuesto, de diluciones a un medio partiendo de 1-20 µM dependiendo del compuesto) de arriba a abajo en una placa de 384 pocillos, y se incuban como antes durante 72 horas adicionales. En ciertos casos, los compuestos se añaden de manera escalonada, y el tiempo de incubación se puede prolongar hasta 7 días. El crecimiento celular se mide mediante el uso del reactivo CellTiter-Glo® según el protocolo del fabricante, y las señales se leen en un lector PerkinElmer EnVision™ ajustado para el modo de luminiscencia con una lectura de 0,5 segundos. Los datos se analizan como se describe más adelante.

Los resultados se expresan como un porcentaje del valor a t=0 y se representan frente a la concentración de compuesto(s). El valor a t=0 se normaliza al 100% y representa el número de células presentes en el momento de la adición de compuesto. Se determina la respuesta celular para cada compuesto y/o combinación de compuestos mediante el uso de un ajuste de curvas de 4 ó 6 parámetros de la viabilidad celular frente a la concentración mediante el uso del complemento IDBS XLfit para el programa informático Microsoft Excel y mediante la determinación de la concentración necesaria para una inhibición del 50% del crecimiento celular (gCI₅₀). Se realiza la corrección del fondo restando los valores de los pocillos que no contienen células. Para cada combinación de fármacos, se calcula un índice de combinación (IC), exceso respecto del agente individual más elevado (EOHSA) y exceso respecto del valor de Bliss (EOBliss) según los métodos conocidos, tal como se describió en Chou y Talalay (1984) *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 37 a 55; y Berenbaum, MC (1981) *Adv. Cancer Research*, 35, 269-335.

Inhibición del crecimiento celular in vitro mediante el Compuesto A, Compuesto B y su combinación en líneas celulares tumorales

Métodos:

Análisis de líneas celulares de cáncer de mama

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas tumorales de mama humana, BT-474, HCC1419, HCC1937, HCC1954, HCC202, KPL-1, MDA-MB-157, MDA-MB-175-VII, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SK-BR-3, SUM225PE, UACC893, y ZR-75-1; línea tumoral de pulmón, CALU-3; y línea de melanoma, CHL-1, fueron de la ATCC. La línea tumoral de mama humana JIMT-1 fue de la Colección Europea de Cultivos Celulares (R.U.). Las líneas tumorales de mama humana SUM149PT, SUM190PT y SUM52PE fueron de Asterand. Estas líneas se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal (FBS). Se cultivó una línea de tumor de cabeza y cuello, LICR LON HN5 (HN5), un obsequio del Instituto de Investigación del Cáncer, Surrey, R.U., en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía un 5% de FBS; la línea celular de tumor de mama KPL-4 fue proporcionada amablemente por el Dr Junichi Kurebayashi (Kawasaki Medical School, Okayama, Japón) y se cultivó en DMEM que contenía un 5% de FBS. JIMT-1 es una línea derivada de un paciente clínicamente resistente a trastuzumab (Herceptin®). BT-474-J4 es un clon celular individual derivado de una mezcla de células BT-474 que se seleccionaron para crecer en lapatinib a una concentración de 3 µM.

Ensayo de inhibición del crecimiento celular y análisis de los datos de la combinación.

Todas las células se cultivaron durante un mínimo de 72 horas antes de colocarlas en placas. Las células se ensayaron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (NUNC 136102) de medio RPMI que contenía un 10% de FBS para todas las células a 2.000 células por pocillo, excepto KPL-4 y HN5 que se colocaron en las placas con DMEM que contenía un 5% de FBS a 500 células por pocillo. Aproximadamente 24 horas tras la colocación en las placas, las células se expusieron a diez diluciones en serie a un medio o un tercio del compuesto o la combinación de los dos agentes a una proporción molar constante de 1:1 de Compuesto A respecto de Compuesto B en medios RPMI que contenía un 10% de FBS o DMEM que contenía un 5% de FBS. Las células se incubaron en presencia de los compuestos durante 3 días. Se determinaron los niveles de ATP añadiendo CellTiter Glo® (Promega) según el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadió CellTiter Glo® a cada placa, se incubó durante 20 minutos y después se leyó la señal luminiscente en el lector de placas SpectraMax L con un tiempo de integración de 0,5 seg.

La inhibición del crecimiento celular se estimó tras el tratamiento con el compuesto o la combinación de compuestos durante tres días y la comparación de la señal respecto de las células tratadas con vehículo (DMSO). El crecimiento celular se calculó respecto de los pocillos de control tratados con vehículo (DMSO). La concentración de compuesto que inhibió un 50% del crecimiento celular del control (CI₅₀) se interpoló mediante el uso de una regresión no lineal con la ecuación $y=(A+(B-A)/(1+(C/x)^D))$, en la que A es la respuesta mínima (y_{min}), B es la respuesta máxima (y_{max}), C es el punto de inflexión de la curva (CE₅₀) y D es el coeficiente de Hill.

Se estudiaron los efectos de la combinación sobre la potencia mediante el uso del índice de combinación (IC), que se calculó con los valores de CI₅₀ retro-interpolados y la ecuación no exclusiva mutuamente obtenida por Chou y Talalay (1): $IC = Da/CI_{50}(a) + Db/CI_{50}(b) + (Da \times Db)/(CI_{50}(a) \times CI_{50}(b))$

en la que $CI_{50}(a)$ es la CI_{50} del Compuesto A; $CI_{50}(b)$ es la CI_{50} para el Compuesto B; Da es la concentración del Compuesto A en combinación con el Compuesto B que inhibió un 50 % del crecimiento celular; y Db es la concentración del Compuesto B en combinación con el Compuesto A que inhibió un 50% del crecimiento celular. En general, un valor de $IC < 0,9$, entre 0,9 y 1,1, o $> 1,1$ indica sinergia, aditividad y antagonismo, respectivamente. En general, cuanto menor sea el número IC , mayor es la intensidad de la sinergia.

Los efectos de la combinación sobre la escala de respuestas se cuantificaron mediante el exceso respecto del agente individual más elevado (EOHSA) basándose en el concepto de mezcla no lineal como describieron con detalle Peterson y Novick (2007) y Peterson (2010) [(2;3) [Peterson y Novick, 2007; Peterson, 2010]. Los valores de EOHSA se definen como los incrementos en la mejora (aquí, en diferencia de 'puntos de porcentaje' (ppts)) producidos por la combinación respecto del mejor agente individual a su nivel de dosis del componente para la combinación. Para los tratamientos con agente individual y de combinación, las células se expusieron a los compuestos a una proporción de dosis fija, y las curvas de respuesta a dosis se ajustaron a los datos experimentales y se analizaron mediante el uso de modelos de regresión. A los niveles de dosis totales especificados de CI_{50} a lo largo de la curva de respuesta a dosis, se determinó la combinación de dosis (que correspondía a CI_{50}) para sacar conclusiones estadísticas sobre EOHSA. De manera más específica, para un experimento de fármacos de combinación que implicaba un fármaco 1 a la dosis $d1$ y un fármaco 2 a la dosis $d2$, (es decir, dosis total igual a $d1+d2$), se dice que tiene un EOHSA positivo si la respuesta media para la combinación es mejor que la respuesta media para el fármaco 1 a la dosis $d1$ o para el fármaco 2 a la dosis $d2$.

Los resultados del análisis de las líneas celulares de cáncer de mama se informan en la Tabla 1 y la Figura 1 más adelante.

Estudio de Proliferación de Líneas Celulares de Colon, Pulmón y Páncreas

En un estudio diferente, se llevaron a cabo ensayos con fármacos de combinación con los Compuestos A y B mediante el uso de un panel de líneas celulares de cáncer de colon humano ($n = 26$), cáncer de pulmón ($n = 15$) y cáncer pancreático ($n = 6$). Las líneas celulares se obtuvieron de proveedores comerciales (ATCC y DSMZ). Las líneas celulares se cultivaron en RPMI-1640 complementado con glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y 10% de suero bovino fetal (excepto para Capan-1 y HuP-T4, que se cultivaron con un 20% de suero bovino fetal) y se mantuvieron a 37 °C y un 5% de CO_2 en un incubador húmedo. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 384 pocillos con densidades de siembra óptimas para cada línea celular.

Los compuestos de ensayo se prepararon en forma de reservas 10 mM en un 100% de DMSO. Se hicieron diluciones adicionales de los compuestos en DMSO. El Compuesto A se diluyó horizontalmente en una placa de microtitulación de 96 pocillos diferente en las filas D-G mediante el uso de una serie de diluciones a un tercio para 10 puntos de dilución. El Compuesto B se diluyó horizontalmente de manera similar en una placa de microtitulación de 96 pocillos en las filas B-E mediante el uso de una serie de diluciones a un tercio para 10 puntos de dilución.

Los dos compuestos se combinaron mediante el uso de volúmenes iguales de cada placa de fármaco en los medios de cultivo celular. Esto dio como resultado una dilución 1:50 de los fármacos. Tanto el Compuesto A como el Compuesto B se titularon individualmente en las filas B y C (para el Compuesto B) y en las filas F y G (para el Compuesto A) de la placa de fármacos mezclados.

Se llevó a cabo una dilución 1:10 de los fármacos en los medios de cultivo celular antes de la adición a las células. La adición de fármacos a las células dio como resultado una dilución 1:2 adicional de los fármacos hasta una dilución total de 1:1000.

El intervalo de concentración final para los compuestos de ensayo fue 250 a 0,013 nM para el Compuesto A y 1000 a 0,5 nM para el Compuesto B. El control positivo consistió en medio de cultivo con DMSO a un 0,1% y células. El control negativo consistió en medio de cultivo con DMSO a un 0,1%. Las líneas celulares se incubaron a 37 °C, 5% de CO_2 en aire húmedo durante 72 horas. La proliferación celular se midió mediante el uso del reactivo CellTiter Glo (Promega) según el protocolo del fabricante. Las placas se tratan con la disolución CellTiter Glo y se analizan las URL (unidades relativas de luz) mediante el uso de un lector de placas Molecular Devices SpectraMax M5.

Análisis de Datos

Se usaron tres medidas independientes para analizar los efectos combinatorios sobre la inhibición del crecimiento del Compuesto B y del Compuesto A.

Se usaron los valores de intensidad en porcentaje en el modelo 205 de XLfit (IDBS, Inc.) en Microsoft Excel para calcular los valores de gCI_{50} mediante el uso de un ajuste logístico de 4 parámetros. El punto medio de la ventana de crecimiento (el gCI_{50}) se halla en la mitad entre el número de células en el momento de la adición de compuesto ($T=0$) y el crecimiento de las células de control tratadas con DMSO a las 72 hrs. El valor de la intensidad del fondo de la curva de respuesta (Y_{min}) se divide por el número de células en el tiempo cero (T_0) para generar una medida para la muerte celular (Y_{min}/T_0). Un valor por debajo de 1 para Y_{min}/T_0 indica una potencia más intensa en la inducción de la muerte celular con el tratamiento en comparación con los valores más elevados.

1. Exceso respecto del agente individual más elevado (EOHSA) - Se calculó como se describió anteriormente (Borisy et al, 2003; FDA 21 CFR 300.50)

2. Sinergia de Bliss - Un segundo criterio usado a menudo para determinar la sinergia de una combinación es determinar la inhibición en exceso respecto de la independencia de Bliss o "aditividad" (Bliss y Mexico, 1939). El modelo supone una respuesta combinada de los dos compuestos independientemente mediante el uso de lo siguiente:

$$E_a + E_b - (E_a * E_b)$$

En la que E_a es el efecto (o inhibición en porcentaje) del Compuesto A y E_b es el efecto del Compuesto B. El efecto resultante de la combinación de los dos compuestos se compara con su aditividad predicha por Bliss, y se genera un índice de sinergia para cada dosis a lo largo de la curva de respuesta.

3. Índice de combinación (IC) - Un tercer criterio usado tradicionalmente para determinar la sinergia es el índice de combinación (IC) de Chou y Talalay (1984). La siguiente ecuación es un modelo usado para los compuestos que se comportan con diferentes mecanismos de acción (fórmula no exclusiva mutuamente). Esto se calculó como se describió anteriormente.

Para las medidas de EOHSA y de sinergia de Bliss, se genera un índice para cada dosis a lo largo de la curva de respuesta. Estos índices reflejan el porcentaje respecto del agente más elevado (EOHSA) o el porcentaje mayor que la aditividad de Bliss, dependiendo de la medida que se esté interpretando. Se estudian los índices a lo largo de toda la curva de dosis, y las combinaciones que muestran índices elevados (>10) en el intervalo de concentraciones terapéuticas para ambos duplicados se consideran sinérgicas. Cuanto mayor sea el índice, mayor es el efecto de la combinación para los dos compuestos. Para el índice de combinación, cuanto menor sea el IC, más sinergia se observa con la combinación.

Para las líneas celulares que nunca alcanzaron una concentración inhibitoria del 25% para uno de los compuestos de la combinación, no se puede calcular un valor de IC y no se enumera ningún valor para el IC en las Tablas 4, 7 y 10.

Se analizó un subgrupo de las líneas celulares por duplicado (colon: n = 4; pulmón: n = 13; páncreas: n = 3). Para todos los análisis posteriores, se calculó la media de los datos para estas líneas celulares.

Datos de Mutación de las Líneas Celulares

Se cotejaron los datos de mutaciones para el estado de los genes relacionados con el cáncer seleccionado. La fuente de datos son los datos de cribado de mutaciones de líneas celulares de cáncer publicados como parte de la base de datos del catálogo de mutaciones somáticas en el cáncer (COSMIC) (Bamford S. *et al.* Br. J. Cancer. 2004. 91:355-58). Para asegurar que la identidad de las líneas celulares usadas en el ensayo de proliferación coincidió con la de la base de datos COSMIC, se llevó a cabo una comparación de genotipos entre las líneas celulares del cribado de sensibilidad y las de COSMIC. De manera específica, esto supuso:

1. Calcular los genotipos para cada línea celular mediante el uso del 'Chip SNP' 500K de Affymetrix (Affymetrix, Inc., Sunnyvale, CA) y el algoritmo RLMM (Rabbee y Speed, Bioinformatics, 2006. 22: 7-12).

2. Identificar las coincidencias de genotipos de cada línea celular con las precalculadas para cada línea celular que tiene perfiles de mutación en COSMIC.

3. Asignar el estado de mutaciones para cada línea celular basándose en las coincidencias de genotipos.

Resultados:

Panel de Células de Cáncer de Mama, Melanoma, Cabeza y Cuello, y Pulmón

Se determinó el efecto de la inhibición del crecimiento celular mediante un Compuesto A inhibidor de la proteína activada por mitógenos/ERK-quinasa (MEK), un Compuesto B inhibidor de AKT, y su combinación en un panel de líneas celulares de tumores humanos. Las CI_{50} s medias (de al menos dos experimentos independientes) y los efectos de la combinación a las CI_{50} s se resumen en la Tabla 1. Las curvas de respuesta a dosis representativas para las líneas celulares MDA-MB-175-VII, BT-474-J4 y JIMT-1 se proporcionan en la Figura 1. Un subgrupo de líneas celulares de cáncer de mama, que incluyen las líneas con amplificación génica de HER2 (HER2+) KPL-4, UACC893, SUM190PT, HCC1954 y MDA-MB-453 con la mutación PIK3CA_H1047R, MDA-MB-361 con la mutación PIK3CA_E545K, y SUM225PE con PIK3CA de tipo natural; y las líneas que no son HER2+ ZR-75-1, SUM52PE y MDA-MB-175-VII fueron sensibles al Compuesto B como agente individual con una $CI_{50} < 1 \mu M$. Por otra parte, las líneas de tumor de mama MDA-MB-175-VII y SUM149PT; la línea de cabeza y cuello, HN5; la línea de pulmón Calu3; y la línea de melanoma, CHL-1, fueron sensibles al Compuesto A como agente individual ($CI_{50} < 1 \mu M$). Sin embargo, todas las líneas celulares enumeradas en la Tabla 1 fueron más sensibles a la combinación de Compuesto A y Compuesto B, tal como se indica mediante sus valores de CI_{50} reducidos, que oscilaron de 0,01 a 0,76 μM . La combinación de Compuesto A y Compuesto B mostró una inhibición del crecimiento celular mayor que la del agente

individual más activo solo, tal como se demostró mediante los valores de EOHA de 8-39 ppt en todas las líneas (Tabla 1), y sinérgica con un valor del índice de combinación (IC) de 0,34 en MDA-MB-175-VII, una línea sensible al Compuesto A o al Compuesto B (Figura 1-A). BT-474-J4, un derivado de la línea original BT-474 que muestra un nivel incrementado de resistencia a lapatinib, exhibió una sensibilidad incrementada al Compuesto B como agente individual ($CI_{50} = 0,271 \mu M$) en comparación con las células originales BT-474 ($CI_{50} > 1 \mu M$). La combinación de Compuesto A y Compuesto B mostró un beneficio en la inhibición incrementada del crecimiento celular en BT-474-J4 con un valor de EOHA de 25 ppt (Figura 1-B). JIMT-1, una línea celular derivada de un paciente que progresó con trastuzumab, no fue sensible al Compuesto A o al Compuesto B como agentes individuales. El combinar el Compuesto A y el Compuesto B fue beneficioso en las células JIMT-1, con un valor de EOHA de 27 ppt (Figura 1-C).

Panel de Líneas Celulares de Colon, Pulmón y Páncreas

Se determinó el efecto de inhibición del crecimiento celular mediante un Compuesto A inhibidor de la proteína activada por mitógenos/ERK-quinasa (MEK), un Compuesto B inhibidor de AKT, y su combinación en un panel de líneas celulares de colon humano (n = 26), pulmón (n = 15), y páncreas (n = 6). Se presenta un resumen de estos resultados en las Tablas 2 y 3. En los cánceres de colon, el 77% (20/26) mostró sinergia mediante al menos una medida. Además, todas las líneas celulares de cáncer de colon (26/26) mostraron un incremento de la muerte celular (medida mediante el cambio de Y_{min} respecto del agente individual más elevado); mientras 7/26 (27%) mostraron un incremento > 20%. Las líneas de pulmón tuvieron tasas elevadas de sinergia, en las que 11/15 (73%) mostraron sinergia mediante al menos una medida. Un total de 7/15 (47%) líneas celulares mostraron un incremento de muerte celular > 20%. Las líneas celulares pancreáticas también mostraron tasas elevadas de inhibición sinérgica del crecimiento, en las que 4/6 (67%) mostraron sinergia mediante al menos una única medida. De forma similar, 4/6 (67%) demostraron un incremento de la muerte celular > 20% respecto del agente individual más elevado.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento celular mediante el Compuesto A, Compuesto B y su combinación en líneas celulares tumorales humanas.

Tipo de Tumor	Línea Celular	Gene Amp+	Estado de PIK3CA y PTEN	Valores de CI_{50} en micromolar (media +/- DE)				Efecto de Combinación EOHA (ppt)
				Agente Individual		Combinación en Proporción Equimolar		
				Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B	
Mama	KPL-4	HER2+	PIK3CA H1047R	>1	0,017 +/- 0,003	0,010 +/- 0,003	0,010 +/- 0,003	13 +/- 9
	UACC893	HER2+	PIK3CA H1047R	>1	0,070 +/- 0,066	0,014 +/- 0,011	0,014 +/- 0,011	34 +/- 6
	SUM19OPT	HER2+	PIK3CA H1047R	>1	0,112 +/- 0,005	0,013 +/- 0,003	0,013 +/- 0,003	17 +/- 6
	HCC1954	HER2+	PIK3CA H1047R	>1	0,412 +/- 0,180	0,042 +/- 0,023	0,042 +/- 0,023	22 +/- 12
	MDA-MB-453	HER2+	PIK3CA H1047R	>1	0,366 +/- 0,013	0,106 +/- 0,022	0,106 +/- 0,022	29 +/- 1
	MDA-MB-361	HER2+	PIK3CA E545K	>1	0,169 +/- 0,055	0,106 +/- 0,025	0,106 +/- 0,025	15 +/- 4
	BT-474-J4	HER2+	PIK3CA K111N	>1	0,217 +/- 0,198	0,036 +/- 0,018	0,036 +/- 0,018	25 +/- 9
	SUM225PE	HER2+	TN	>1	0,529 +/- 0,422	0,178 +/- 0,154	0,178 +/- 0,154	20 +/- 0
	HCC1419	HER2+	TN	>1	>1	0,280 +/- 0,209	0,280 +/- 0,209	23 +/- 8
	BT-474	HER2+	PIK3CA K111N	>1	>1	0,659 +/- 0,597	0,659 +/- 0,597	13 +/- 4
	HCC202	HER2+	PIK3CA E545K	>1	>1	0,187 +/- 0,102	0,187 +/- 0,102	33 +/- 8
	JimT-1	HER2+	PIK3CA C420R	>1	>1	0,255 +/- 0,099	0,255 +/- 0,099	27 +/- 8
	SK-BR-3	HER2+	TN	>1	>1	0,759 +/- 0,266	0,759 +/- 0,266	12 +/- 3
	ZR-75-1		PTEN L108R	>1	0,042 +/- 0,005	0,032 +/- 0,001	0,032 +/- 0,001	8 +/- 2
	SUM52PE	FGFR2+	TN	>1	0,230 +/- 0,109	0,036 +/- 0,040	0,036 +/- 0,040	19 +/- 23
	MDA-MB-175-VII		TN	0,063 +/- 0,002	0,137 +/- 0,001	0,014 +/- 0,001	0,014 +/- 0,001	23 +/- 2
	SUM149PT		PTEN bajo	0,279 +/- 0,358	>1	0,024 +/- 0,006	0,024 +/- 0,006	22 +/- 2
	KPL-1		PIK3CA E545K	>1	>1	0,178 +/- 0,012	0,178 +/- 0,012	39 +/- 2
	HCC1937		PTEN bajo	>1	>1	0,373 +/- 0,101	0,373 +/- 0,101	25 +/- 1
	MDA-MB-157		TN	>1	>1	0,757 +/- 0,147	0,757 +/- 0,147	21 +/- 8
Cabeza y cuello	HN5	EGFR+	TN	0,301 +/- 0,137	>1	0,059 +/- 0,008	0,059 +/- 0,008	25 +/- 8
Pulmón	Calu-3	HER2+	TN	0,085 +/- 0,012	>1	0,044 +/- 0,009	0,044 +/- 0,009	11 +/- 6
Melanoma	CHL-1		TN	0,417 +/- 0,164	>1	0,068 +/- 0,013	0,068 +/- 0,013	16 +/- 6

HER2+: gen HER2 amplificado; EGFR+: gen EGFR amplificado, FGFR2+: gen FGFR2 amplificado.

Las curvas de inhibición del crecimiento celular-respuesta a dosis para MDA-MB-175-VII, BT474-J4 y JIMT-1 se representan en la Figura 1 más adelante.

Lista de Referencias

- 5 (1) Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.
- (2) Peterson JJ, Novick SJ. Nonlinear blending: a useful general concept for the assessment of combination drug synergy. *J Recept Signal Transduct Res* 2007;27(2-3):125-46.
- (3) Peterson J. A Review of Synergy Concepts of Nonlinear Blending and Dose-Reduction Profiles. *Frontiers of Bioscience S2*, 483-503. 2010.
- 10 Tabla 2. Panel de líneas celulares pancreáticas (n=6), de colon (n=26) y pulmón (n=15) y estado de las mutaciones usadas para los estudios de combinación.

Línea Celular	Órgano	Diagnóstico/Histología	KRAS	NRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN
NCI-H747	Colon	Adenocarcinoma	p.G13D	TN	TN	TN	TN
LS1034	Colon	Adenocarcinoma	p.A146T	TN	TN	TN	TN
SW948	Colon	Adenocarcinoma	p.Q61L	TN	TN	p.E542K	TN
LS174T	Colon	Adenocarcinoma	p.G12D	TN	TN	p.H1047R	TN
SW116	Colon	Adenocarcinoma	p.G12A	TN	TN	TN	TN
T84	Colon	Carcinoma	p.G13D	TN	TN	p.E542K	TN
Colo 201	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	p.V600E	TN	TN
SW403	Colon	Carcinoma	p.G12V	TN	TN	TN	TN
DLD-1	Colon	Carcinoma	p.G13D	TN	TN	p.E545K	TN
Colo205	Colon	Adenocarcinoma	p.G12V	TN	p.V600E	TN	TN
Colo 320HSR	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	TN	TN
SW620	Colon	Adenocarcinoma	p.G12V	TN	TN	TN	TN
NCI-H508	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	p.E545K	TN
Colo-320DM	Colon	Adenocarcinoma	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.
SW837	Colon	Adenocarcinoma	p.G12C	TN	TN	TN	TN
KM12	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	TN	p.G129*,p.K267fs*9
WiDr	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	p.V600E	p.P449T	TN
HCT-8	Colon	adenocarcinoma colorrectal ileocecal	p.G13D	TN	TN	p.E545K	TN
RKO	Colon	Carcinoma	TN	TN	p.V600E	p.H1047R	TN
HT-29	Colon	Carcinoma	TN	TN	p.V600E	p.P449T	TN
SW480	Colon	Adenocarcinoma	p.G12V	TN	TN	TN	TN
HCT-15	Colon	Adenocarcinoma	p.G13D	TN	TN	p.E545K	TN
HCT116	Colon	Carcinoma	p.G13D	TN	TN	p.H1047R	TN
SW48	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	TN	TN
SW1417	Colon	Adenocarcinoma	TN	TN	p.V600E	TN	TN
HCC2998	Colon	Carcinoma	p.A146T	TN	TN	TN	TN
Calu-6	Pulmón	Adenocarcinoma	p.Q61K	TN	TN	TN	TN
SK-MES-1	Pulmón	Carcinoma de células escamosas	TN	TN	TN	TN	TN
A549	Pulmón	Epitelial-escamoso basal alveolar	p.G12S	TN	TN	TN	TN
NCI-H2170	Pulmón	Carcinoma de células escamosas	TN	TN	TN	TN	TN
NCI-H2228	Pulmón	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	TN	TN
NCI-H23	Pulmón	Adenocarcinoma	TN	TN	p.V600E	p.P449T	TN
NCI-H1792	Pulmón	Adenocarcinoma	p.G12C	TN	TN	TN	TN
NCI-H358	Pulmón	Broncoalveolar	p.G12C	TN	TN	TN	TN
NCI-H2122	Pulmón	Adenocarcinoma	p.G12C	TN	TN	TN	TN
NCI-H520	Pulmón	Carcinoma de células escamosas	TN	TN	TN	TN	TN
NCI-HI299	Pulmón	Cáncer de pulmón no microcítico	TN	p.Q61K	TN	TN	TN
NCI-HI563	Pulmón	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	TN	TN
NCI-H460	Pulmón	Carcinoma microcítico	p.Q61H	TN	TN	p.E545K	TN

NCI-H2030	Pulmón	Adenocarcinoma	p.G12C	TN	TN	TN	TN
SW900	Pulmón	Carcinoma	p.G12V	TN	TN	TN	TN
BxPC-3	Páncreas	Adenocarcinoma	TN	TN	TN	TN	TN
SW1990	Páncreas	Adenocarcinoma	p.G12D	TN	TN	TN	TN
YAPC	Páncreas	Carcinoma	p.G12V	TN	TN	TN	TN
MlaPaCa	Páncreas	Carcinoma	p.G12C	TN	TN	TN	TN
HPAFII	Páncreas	Carcinoma	p.G12D	TN	TN	TN	TN
ASPC1	Páncreas	Carcinoma	p.G12D	TN	TN	TN	TN

Clave de la Tabla 2

Línea Celular = Nombre de la línea celular

Órgano = Órgano del que procedieron las células

5 Diagnóstico/Histología = Diagnóstico anatomopatológico del tejido

KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/PTEN = Estado de mutaciones; TN = Tipo Natural; No disp. = Datos no disponibles

Tabla 3. Inhibición del crecimiento celular mediante el Compuesto A, el Compuesto B y su combinación en líneas celulares humanas de colon, pulmón y páncreas. Los valores de GIC50 se presentan en nM.

Líneas Celulares		Compuesto A		Compuesto B		Combinación		Diferencial respecto del agente individual más elevado		Medida de la sinergia		
Línea Celular	Tipo de Tumor	gCl ₅₀ (nM)	Y _{mir} /T ₀	gCl ₅₀ (nM)	Y _{mir} /T ₀	gCl ₅₀ (nM)	Y _{mir} /T ₀	Y _{min} (%)	gCl ₅₀ (nM)	EOHSA	BLISS	Índice de Comb.
Colo201	Colon	4,0	-8,96	>1000,00	80,18	106,78	-19,02	-10,06	106,78	Aditivo	Sinergia	
Colo205	Colon	0,77	-1,30	>1000,00	14,87	25,81	-7,30	-6,01	25,81	Moderado	Moderado	
Colo320DM	Colon	>250,00	81,01	>1000,00	9,81	>1000,00	7,71	-2,10	>1000,0	Sin Sinergia	Moderado	
Colo320HS R	Colon	>250,00	78,4	>1000,00	26,6	>1000,00	23,0	-4,9	>1000,0	Moderado	Sinergia	
DLD1	Colon	342,3	39,7	>1000,00	29,0	310,8	9,1	-19,9	310,8	Sinergia	Moderado	
HCC2998	Colon	16,7	2,13	292,3	-4,90	17,55	-11,08	-6,17	17,55	Sinergia	Sinergia	Sinergia
HCT116	Colon	23,2	19,40	>1000,00	25,31	137,65	0,51	-18,89	137,65	Sinergia	Sinergia	
HCT15	Colon	>250,00	57,0	>1000,00	30,4	781,1	9,6	-20,8	781,1	Moderado	Moderado	
HCT8	Colon	13,30	16,70	758,1	20,44	112,72	-1,09	-17,80	112,72	Sinergia	Sinergia	Sinergia
HT29	Colon	3,6	11,99	780,5	11,64	65,01	-3,14	-14,78	65,01	Moderado	Sinergia	Sinergia
KM12	Colon	28,7	19,1	927,6	13,9	154,4	1,3	-12,7	154,4	Sinergia	Sinergia	Sinergia
LS1034	Colon	36,99	2,87	>1000,00	-0,67	328,82	-14,71	-14,05	328,82	Sinergia	Sinergia	
LS174T	Colon	81,4	18,28	>1000,00	19,70	599,62	0,17	-18,10	599,62	Sinergia	Sinergia	
NCIH508	Colon	22,64	15,22	68,2	11,12	16,23	5,72	-5,40	16,23	Sinergia	Sinergia	Sinergia
NCIH747	Colon	5,35	5,55	>1000,00	23,79	52,90	-10,08	-15,63	52,90	Moderado	Sinergia	
RKO	Colon	77,8	24,44	>1000,00	17,13	106,33	-5,73	-22,86	106,33	Sinergia	Sinergia	
SW1116	Colon	14,61	2,28	>1000,00	37,32	164,38	-22,08	-24,36	164,38	Moderado	Moderado	
SW1417	Colon	2,86	16,19	>1000,00	3,63	31,62	-14,56	-18,19	31,62	Moderado	Moderado	
SW403	Colon	4,6	3,02	74,3	8,82	25,95	-12,74	-15,76	25,95	Sinergia	Aditivo	Sinergia
SW48	Colon	8,16	13,02	428,4	-11,68	16,92	-14,72	-3,04	16,92	Sinergia	Moderado	Sinergia
SW480	Colon	325,65	29,37	>1000,00	11,87	105,87	-10,73	-22,60	105,87	Sinergia	Moderado	
SW620	Colon	15,2	15,46	>1000,00	76,65	261,31	4,76	-10,71	261,31	Moderado	Moderado	
SW837	Colon	153,4	25,58	>1000,00	63,88	658,09	-3,94	-29,52	558,09	Sinergia	Sinergia	
SW948	Colon	185,2	27,87	609,3	20,46	267,82	-11,48	-31,94	267,82	Sinergia	Sinergia	Sinergia
WiDr	Colon	1,85	3,94	700,4	5,24	28,50	-6,92	-10,86	28,50	Sinergia	Moderado	Sinergia
T84	Colon	138,64	12,44	427,4	-5,58	105,11	-27,17	-21,59	105,11	Sinergia	Moderado	Sinergia
A549	Pulmón	12,9	15,9	>1000,00	32,7	147,7	-5,4	-21,3	147,7	Sinergia	Moderado	
Calu6	Pulmón	53,1	15,0	>1000,00	56,3	868,0	-4,4	-19,4	868,0	Moderado	Aditivo	
NCIH1299	Pulmón	24,0	45,9	>1000,00	58,1	295,1	20,2	-25,7	295,1	Sinergia	Moderado	

ES 2 527 625 T3

NCIH1563	Pulmón	>250,00	26,6	65,0	27,6	91,2	-22,1	-48,6	91,2	Sinergia	Moderado	
NCIH1792	Pulmón	42,0	2,8	>1000,00	26,0	234,1	-14,4	-17,2	234,1	Sinergia	Moderado	
NCIH2030	Pulmón	>250,00	55,8	>1000,00	40,7	440,0	3,3	-17,2	440,0	Sinergia	Moderado	
NCIH2122	Pulmón	30,0	-11,8	>1000,00	11,4	266,5	-15,5	-3,7	266,5	Sinergia	Sinergia	
NCIH2170	Pulmón	>250,00	59,5	>1000,00	18,2	512,2	-0,2	-18,3	512,2	Sinergia	Sinergia	
NCIH2228	Pulmón	>250,00	39,7	>1000,00	37,1	357,5	-6,6	-43,7	357,5	Sinergia	Sinergia	
NCIH23	Pulmón	>250,00	36,3	>1000,00	41,5	540,9	-1,9	-38,1	540,9	Sinergia	Sinergia	
NCIH358	Pulmón	17,3	10,7	>1000,00	37,2	83,8	-10,7	-21,4	83,8	Moderado	Aditivo	
NCIH460	Pulmón	63,0	39,1	664,2	20,8	151,1	3,2	-17,6	151,1	Sinergia	Moderado	Moderado
NCIH520	Pulmón	>250,00	70,2	568,4	15,0	450,7	2,6	-12,4	450,7	Aditivo	Moderado	
SKMES1	Pulmón	80,4	19,5	>1000,00	49,6	604,5	-20,1	-39,6	604,5	Sinergia	Sinergia	
SW900	Pulmón	15,0	-5,9	>1000,00	47,3	149,1	-24,3	-18,4	149,1	Moderado	Moderado	
ASPC1	Páncreas	19,7	13,6	>1000,00	42,9	44,3	-8,2	-21,8	44,3	Aditivo	Aditivo	
BxPC3	Páncreas	>250,00	20,89	>1000,00	71,87	360,17	-25,90	-46,78	360,17	Sinergia	Sinergia	
HPAFII	Páncreas	15,9	-0,8	>1000,00	31,2	95,4	-14,5	-13,7	95,4	Sinergia	Sinergia	
MlaPaCa	Páncreas	23,5	25,0	>1000,00	0,7	430,9	10,1	9,4	430,9	Moderado	Moderado	
SW1990	Páncreas	94,0	17,1	>1000,00	36,8	412,4	-8,4	-25,6	412,4	Sinergia	Moderado	
YAPC	Páncreas	>250,00	59,4	>1000,00	55,2	641,3	17,9	-37,4	641,3	Sinergia	Moderado	

Clave de la Tabla 3:

Línea Celular = Línea celular derivada de tumor

gCl₅₀ = Concentración de compuesto necesaria para provocar un 50% de inhibición del crecimiento

5 Y_{min} (%) = Porcentaje del crecimiento celular mínimo en presencia del Compuesto B (respecto del control de DMSO) medido mediante su % a T=0 (número de células en el momento de la adición del Compuesto B). Un número negativo indica una pérdida neta de células respecto a las que hay a T=0.

Y_{min} / T₀ = Y_{min} dividido por el número de células a tiempo cero

EOHSA = Exceso respecto de la determinación del agente individual más elevado

10 BLISS = Determinación de la sinergia de Bliss

Índice de Comb. = Puntuación del índice de combinación

Efecto del Compuesto B (inhibidor de AKT) en combinación con el Compuesto A (inhibidor de MEK) sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumor pancreático humano (HPAC y Capan2) en ratones SCID

Método:

15 Se implantaron de manera subcutánea células tumorales HPAC o Capan2 (carcinoma pancreático humano que alberga el gen KRAS mutante) a ratones SCID hembra. Cuando el volumen tumoral alcanzó ~150 mm³, los ratones se aleatorizaron por bloques en diferentes grupos de tratamiento (n=8 ratones/grupo). Los ratones recibieron el inhibidor de AKT, el Compuesto B, a 10 ó 30 mg/kg, una vez al día (CD). El inhibidor de MEK, el Compuesto A, se administró a 0,1, 0,3 y 1,0 mg/kg, una vez al día (CD) solo o a 0,1 y 0,3 mg/kg una vez al día en combinación con el

20 inhibidor de AKT. Los ratones se pesaron y se midieron los tumores mediante un calibre dos veces a la semana. El tratamiento continuó hasta que el volumen tumoral alcanzó >1000 mm³. Los volúmenes tumorales se calcularon mediante el uso de la fórmula: volumen tumoral = (Longitud x Anchura²)/2. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se calculó cada día de medida de los tumores mediante el uso de la fórmula: 100x[1-(crecimiento medio de los tumores tratados con compuesto / crecimiento medio de los tumores de control tratados con vehículo)]. Los datos

25 se representan como la media ± EEM para el volumen tumoral para cada grupo.

Resultados:

El tratamiento de los ratones que albergaban tumores HPAC con el Compuesto B mostró una inhibición mínima (11-15%) en el grupo de 10 mg/kg y una inhibición moderada (31-40%) en el grupo de 30 mg/kg en dos estudios independientes. La monoterapia con el Compuesto A mostró una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de los tumores HPAC del ~40, 60 y 90% a 0,1, 0,3 y 1 mg/kg, respectivamente. En el modelo de xenoinjerto de Capan2, el Compuesto B mostró una inhibición del crecimiento similar (27-30%) a ambas dosis de 10 y 30 mg/kg, mientras la administración del Compuesto A a 0,1, 0,3 y 1,0 mg/kg dio como resultado una inhibición del crecimiento del 70, 87 y 104%, respectivamente. El tratamiento combinado con el inhibidor de AKT (Compuesto B) y el inhibidor

30

de MEK (Compuesto A) dio como resultado una actividad anti-tumoral incrementada en comparación con el agente solo a las dosis respectivas para ambos xenoinjertos de tumores HPAC y Capan2 (datos resumidos en la Tabla 4 y la Figura 2).

5 Tabla 4: Inhibición del crecimiento de xenoinjertos de tumores HPAC y Capan2 en ratones tratados con el Compuesto B y el Compuesto A

Grupo	Régimen	% de Inhibición del Crecimiento Tumoral		
		HPAC-D01	HPAC-D02	Capan2-D01
	Duración del Tratamiento	75	74	56
nº 1	Vehículo/Control	--	--	
nº 2	Compuesto A 0,1 mg/kg v.o., CD	38%	41%	74%
nº 3	Compuesto A 0,3 mg/kg v.o., CD	60%	65%	90%
nº 4	Compuesto A 1 mg/kg v.o., CD	91%	89%	104%
nº 5	Compuesto B 10 mg/kg v.o., CD	11%	15%	22%
nº 6	Compuesto B 30 mg/kg v.o., CD	40%	31%	26%
nº 7	Compuesto A 0,1 mg/kg + Compuesto B 10 mg/kg v.o., CD	76%	65%	84%
nº 8	Compuesto A 0,1 mg/kg + Compuesto B 30 mg/kg v.o., CD	75%	67%	75%
nº 9	Compuesto A 0,3 mg/kg + Compuesto B 10 mg/kg v.o., CD	80%	72%	99%
nº 10	Compuesto A 0,3 mg/kg + Compuesto B 30 mg/kg v.o., CD	93%	93%	108%

Debido a que las combinaciones de la presente invención son activas en los ensayos anteriores, exhiben una utilidad terapéutica ventajosa en el tratamiento del cáncer.

10 De manera adecuada, la presente invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento o la reducción de la gravedad de un cáncer seleccionado de: cerebral (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, de mama, cáncer de mama inflamatorio, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, ependimoma, meduloblastoma, de colon, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón, de hígado, melanoma, ovárico, pancreático, de próstata, sarcoma, osteosarcoma, tumor de células gigantes de hueso, tiroideo,

15 leucemia linfoblástica de células T, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia neutrofílica crónica, leucemia linfoblástica aguda de células T, plasmocitoma, leucemia inmunoblástica de células grandes, leucemia de células del manto, mieloma múltiple, leucemia megacarioblástica, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, eritroleucemia,

20 linfoma maligno, linfoma de hodgkin, linfoma no hodgkin, linfoma de células T linfoblásticas, linfoma de Burkitt, linfoma folicular,

neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, cáncer vulvar, cáncer de cuello de útero, cáncer endometrial, cáncer renal, mesotelioma, cáncer esofágico, cáncer de las glándulas salivales, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo, cáncer oral, cáncer de la boca, GIST (tumor estromático gastrointestinal) y cáncer testicular.

25 De manera adecuada, la presente invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento o la reducción de la gravedad de un cáncer seleccionado de: cerebral (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, enfermedad de Cowden, enfermedad de Lhermitte-Duclos, de mama, de colon, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón, de hígado, melanoma, ovárico, pancreático, de próstata, sarcoma y tiroideo.

30 De manera adecuada, la presente invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento o la reducción de la gravedad de un cáncer seleccionado de cáncer ovárico, de mama, pancreático y de próstata.

De manera adecuada, la presente invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento o la

reducción de la gravedad de síndromes precancerosos en un mamífero, que incluye un ser humano, en el que el síndrome precanceroso se selecciona de: neoplasia intraepitelial de cuello de útero, gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), síndrome mielodisplásico, anemia aplásica, lesiones de cuello de útero, nevus de la piel (pre-melanoma), neoplasia intraepitelial (intraductal) prostática (PIN), carcinoma ductal in situ (DCIS), pólipos del colon y hepatitis o cirrosis grave.

De manera adecuada, la presente invención se refiere a una combinación para el uso en el tratamiento o la reducción de la gravedad de un cáncer que es de tipo natural o mutante para Ras/Raf, y de tipo natural o mutante para PI3K/Pten. Esto incluye los pacientes de tipo natural para Ras/Raf y PI3K/PTEN, los mutantes para Ras/Raf y PI3K/PTEN, los mutantes para Ras/Raf y de tipo natural para PI3K/PTEN, y de tipo natural para Ras/Raf y mutantes para PI3K/PTEN.

La expresión "de tipo natural", tal como se entiende en la técnica, se refiere a una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que se da en una población nativa sin modificación genética. Tal como se entiende también en la técnica, un "mutante" incluye una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que tiene al menos una modificación en un aminoácido o ácido nucleico en comparación con el aminoácido o ácido nucleico correspondiente hallado en un polipéptido o polinucleótido de tipo natural, respectivamente. En el término mutante se incluye el polimorfismo de nucleótido simple (SNP), en el que existe una diferencia en un único par de bases en la secuencia de una cadena de ácido nucleico en comparación con la cadena de ácido nucleico hallada de manera más prevalente (de tipo natural).

Los cánceres que son de tipo natural o mutantes para Ras/Raf y de tipo natural o mutantes para PI3K/Pten se identifican mediante métodos conocidos.

Por ejemplo, las células tumorales de tipo natural o mutantes para Ras/Raf o PI3K/PTEN se pueden identificar mediante técnicas de amplificación y secuenciación del ADN, técnicas de detección de ADN y ARN, que incluyen, pero sin limitación, transferencia de Northern y de Southern, respectivamente, y/o diversas tecnologías de biochips y de matrices. Los polipéptidos de tipo natural y mutantes se pueden detectar mediante una diversidad de técnicas que incluyen, pero sin limitación, técnicas de inmunodiagnóstico tales como ELISA, transferencia de Western o inmunocitoquímica.

Esta invención proporciona una combinación que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Esta invención también proporciona una combinación que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para el uso en la terapia.

Esta invención también proporciona una combinación que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para el uso en el tratamiento del cáncer.

Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Esta invención también proporciona un equipo de combinación que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Esta invención también proporciona el uso de una combinación que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la fabricación de un medicamento.

Esta invención también proporciona el uso de una combinación que comprende N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la

fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

Detalles Experimentales

Ejemplo 1 - Composición de Cápsulas

- 5 Se produce una forma farmacéutica oral para administrar una combinación de la presente invención rellenando una cápsula de gelatina dura estándar de dos piezas con los ingredientes en las proporciones mostradas en la Tabla I, a continuación.

Tabla I

Ingredientes	Cantidades
N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo (el solvato de sulfóxido de dimetilo del Compuesto A)	5 mg
N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida (Compuesto B)	60 mg
Manitol	250 mg
Talco	125 mg
Estearato de Magnesio	8 mg

Ejemplo 2 - Composición de Cápsulas

- 10 Se produce una forma farmacéutica oral para administrar uno de los compuestos de la presente invención rellenando una cápsula de gelatina dura estándar de dos piezas con los ingredientes en las proporciones mostradas en la Tabla II, a continuación.

Tabla II

Ingredientes	Cantidades
N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo (el solvato de sulfóxido de dimetilo del Compuesto A)	5 mg
Manitol	55 mg
Talco	16 mg
Estearato de Magnesio	4 mg

Ejemplo 3 - Composición de Cápsulas

- 15 Se produce una forma farmacéutica oral para administrar uno de los compuestos de la presente invención rellenando una cápsula de gelatina dura estándar de dos piezas con los ingredientes en las proporciones mostradas en la Tabla III, a continuación.

Tabla III

Ingredientes	Cantidades
N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida (Compuesto B)	60 mg
Manitol	250 mg
Talco	125 mg
Estearato de Magnesio	8 mg

Ejemplo 4 - Composición de Comprimidos

- 20 La sacarosa, la celulosa microcristalina y los compuestos de la combinación inventada, tal como se muestran en la Tabla IV siguiente, se mezclan y se granulan en las proporciones mostradas con una disolución del 10% de gelatina. Los gránulos húmedos se criban, se secan, se mezclan con el almidón, talco y ácido esteárico, después se criban y se comprimen en un comprimido.

Tabla IV

Ingredientes	Cantidades
N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo (el solvato de sulfóxido de dimetilo del Compuesto A)	5 mg
N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida (Compuesto B)	60 mg
Celulosa microcristalina	300 mg
sacarosa	10 mg
almidón	40 mg
talco	20 mg
ácido esteárico	5 mg

Ejemplo 5 - Composición de Comprimidos

5 La sacarosa, la celulosa microcristalina y uno de los compuestos de la combinación inventada, tal como se muestran en la Tabla V siguiente, se mezclan y se granulan en las proporciones mostradas con una disolución del 10% de gelatina. Los gránulos húmedos se criban, se secan, se mezclan con el almidón, talco y ácido esteárico, después se criban y se comprimen en un comprimido.

Tabla V

Ingredientes	Cantidades
N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo (el solvato de sulfóxido de dimetilo del Compuesto A)	5 mg
Celulosa microcristalina	30 mg
sacarosa	4 mg
almidón	2 mg
talco	1 mg
ácido esteárico	0,5 mg

Ejemplo 6 - Composición de Comprimidos

10 La sacarosa, la celulosa microcristalina y uno de los compuestos de la combinación inventada, tal como se muestran en la Tabla VI siguiente, se mezclan y se granulan en las proporciones mostradas con una disolución del 10% de gelatina. Los gránulos húmedos se criban, se secan, se mezclan con el almidón, talco y ácido esteárico, después se criban y se comprimen en un comprimido.

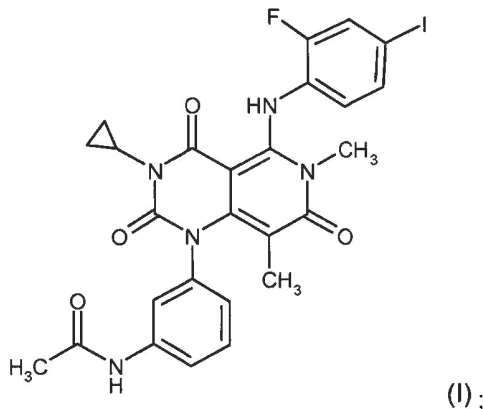
Tabla VI

Ingredientes	Cantidades
N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida (Compuesto B)	60 mg
Celulosa microcristalina	300 mg
sacarosa	40 mg
almidón	20 mg
talco	10 mg
ácido esteárico	5 mg

REIVINDICACIONES

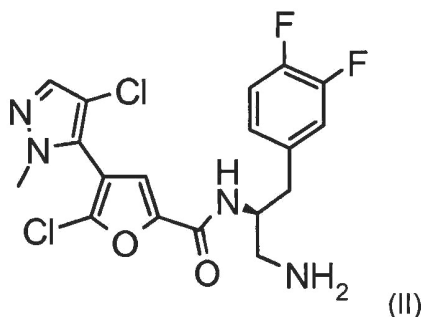
1. Una combinación que comprende:

(i) un compuesto de Estructura (I):



5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) un compuesto de Estructura (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. Una combinación según la reivindicación 1, en la que el compuesto de Estructura (I) está en forma de un solvato de sulfóxido de dimetilo.

3. Un equipo de combinación que comprende una combinación según la reivindicación 1 ó 2 junto con un vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 4. El uso de una combinación según la reivindicación 1 ó 2 o de un equipo de combinación según la reivindicación 3 en la fabricación de un medicamento o medicamentos para el tratamiento del cáncer o de síndromes precancerosos.

5. Una combinación o equipo de combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento del cáncer o de síndromes precancerosos.

20 6. Una combinación o equipo de combinación para el uso en el tratamiento del cáncer o síndromes precancerosos según la reivindicación 5, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, solvato de sulfóxido de dimetilo, y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

en la que la combinación se administra dentro de un periodo especificado, y

en la que la combinación se administra durante una duración de tiempo.

25 7. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 6, en la que la cantidad de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo se selecciona de 0,25 mg a 9 mg, y esa cantidad se administra una vez al día, y la cantidad de N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se selecciona de 10 mg a 300 mg, y esa

cantidad se administra una vez al día.

8. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 6, en la que N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se administran dentro de 12 horas entre sí durante 1 a 3 días consecutivos, seguido de la administración de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo durante 3 a 7 días consecutivos, opcionalmente seguido de uno o más ciclos de dosificación repetida.
9. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 8, en la que N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran dentro de 12 horas entre sí durante 2 días consecutivos seguido de la administración de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo durante 4 a 6 días consecutivos, opcionalmente seguido de uno o más ciclos de dosificación repetida.
10. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 6, en la que N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran dentro de 12 horas entre sí durante 2 días a lo largo de un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días: se administra solo N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo, opcionalmente seguido de uno o más ciclos de dosificación repetida; o se administra solo N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, opcionalmente seguido de uno o más ciclos de dosificación repetida.
11. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 6, en la que se administra N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma durante al menos 7 días consecutivos.
12. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 6, en la que se administra N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo y N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma dentro de 12 horas entre sí durante 5 días a lo largo de un periodo de 14 días, y durante los otros días del periodo de 14 días: se administra solo N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo, opcionalmente seguido de uno o más ciclos de dosificación repetida; o se administra solo N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, opcionalmente seguido de uno o más ciclos de dosificación repetida.
13. Una combinación o equipo de combinación para el uso según la reivindicación 6 ó 7, en la que el compuesto N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida - sulfóxido de dimetilo se administra primero en una dosis de carga durante 1 a 3 días seguido de la administración de dosis de mantenimiento del compuesto; y/o el compuesto N-((1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etil)-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra primero en una dosis de carga durante 1 a 3 días seguido de la administración de dosis de mantenimiento del compuesto.
14. El uso según la reivindicación 4, o una combinación o equipo de combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en el que el cáncer es de tipo natural o mutante para Ras/Raf y de tipo natural o mutante para PI3K/PTEN.
15. El uso según la reivindicación 4, o una combinación o equipo de combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en el que el cáncer se selecciona de cáncer ovárico, de mama, pancreático y de próstata.

Figura 1

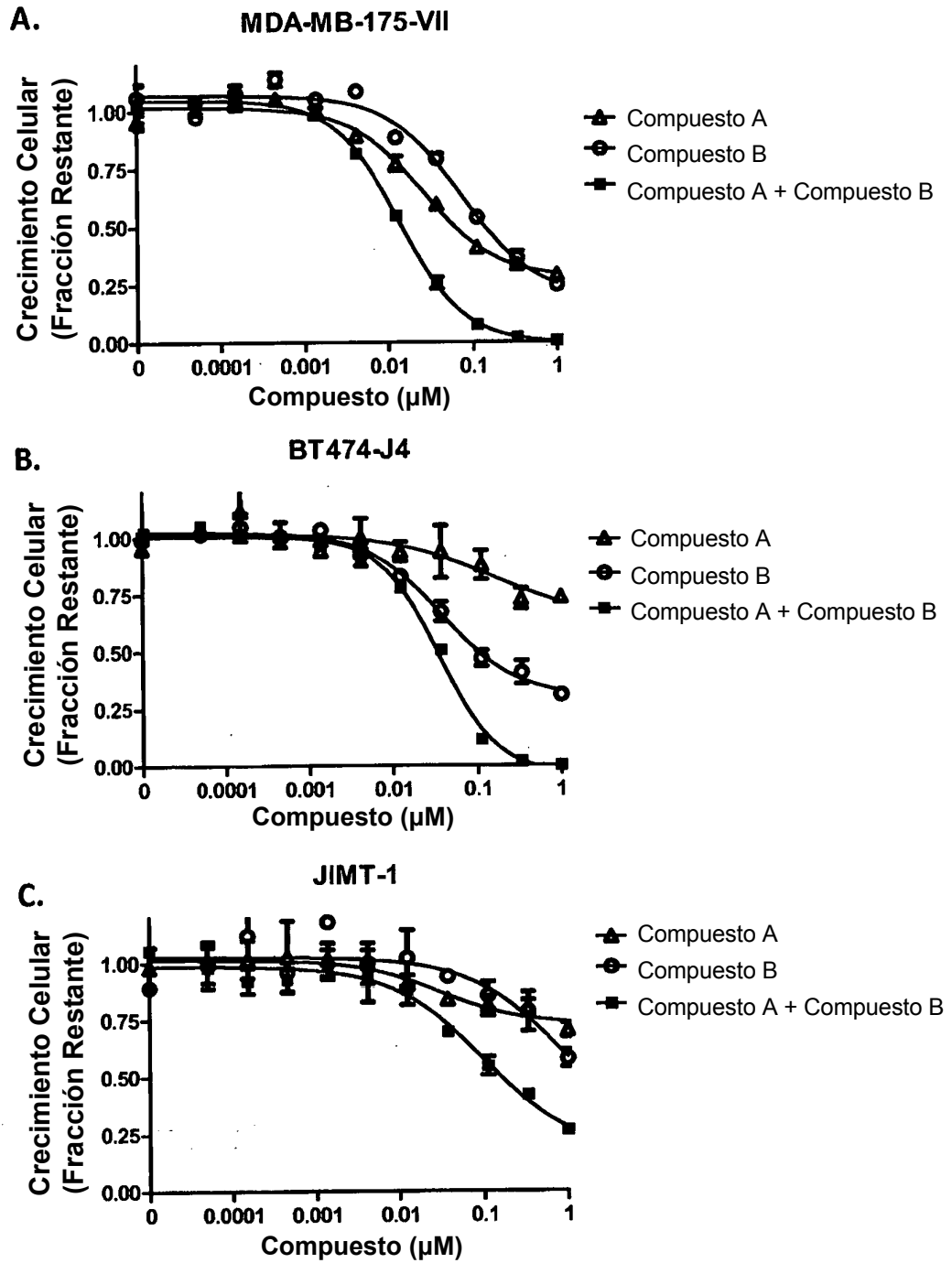


Figura 2

