

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 248**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/US2013/071852**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14085381**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13802815 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2925366**

54 Título: **Combinaciones farmacéuticas**

30 Prioridad:

29.11.2012 US 201261731174 P

30.11.2012 US 201261731555 P

23.01.2013 US 201361755520 P

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

24.05.2018

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

PORTER, DALE;

EMERY, CAROLINE;

TAN, LUJIAN y

YERRAMILLI-RAO, PADMAJA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 669 248 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinaciones farmacéuticas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende (a) un compuesto inhibidor de proteína quinasa C (PKC) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) uno, o al menos un, compuesto inhibidor de proteína quinasa activada por mitógeno (MEK), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable; y a los usos de dicha combinación en el tratamiento o prevención de enfermedades proliferativas, tales como cáncer. La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende (a) un compuesto inhibidor de proteína quinasa C (PKC) 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor de proteína quinasa activada por mitógeno (MEK) que es (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable; los usos de dicha combinación en el tratamiento o prevención de enfermedades proliferativas, tales como cáncer.

20 Antecedentes de la invención

El melanoma maligno uveal es un neoplasma maligno que surge en partes pigmentadas del ojo, específicamente en el iris, cuerpo ciliar o coroides. La terapia del melanoma maligno uveal incluye terapia local con enucleación o braquiterapia. Aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollan enfermedad metastásica, típicamente en el hígado y con frecuencia en pulmones y huesos, y la incidencia de nuevas metástasis continua creciendo con el tiempo, lo que sugiere que la enfermedad es de proliferación baja. El resultado en pacientes con enfermedad metastásica es pobre. No se ha demostrado ninguna terapia para esta enfermedad hasta la fecha.

Las mutaciones que afectan a cualquiera de los dos genes que codifican las subunidades alfa de proteína G de complejos de proteína G heterotriméricos (GNAQ y GNA11) se descubrieron en una amplia mayoría de tumores (Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al, Nature (2009); 457:599-601 y Van Raamsdonk CD, Griewank KG, et al (2010), N Eng J Med; 363:2191-9). Las mutaciones identificadas son típicas de mutaciones de activación que afectan a otras proteínas G. Molecular Cancer Therapeutics, 11: 1905-1914 (2012) describe el efecto terapéutico del inhibidor AEB071 de proteína quinasa C en melanoma ocular que alberga mutaciones GNAQ. A pesar de las numerosas opciones de tratamiento para pacientes con cáncer, siguen siendo necesarios agentes terapéuticos eficaces y seguros y una nueva combinación de terapias que se puedan administrar para el tratamiento de cáncer a largo plazo de manera eficaz.

Los presentes inventores han descubierto ahora que la inhibición de la cascada de generación de señales aguas abajo de estas proteínas G puede resultar útil para el tratamiento de una enfermedad proliferativa tal como cáncer, por ejemplo un tumor con una mutación Gα (GNA11/GNAQ), y en particular, melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal GNAQ o GNA11. Ahora se ha descubierto que una combinación de un compuesto inhibidor de proteína quinasa C (PKC) y un compuesto inhibidor de MEK resulta eficaz para el retardo del avance o tratamiento de una enfermedad proliferativa, especialmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal GNAQ o GNA11.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la combinación de una cantidad eficaz de un inhibidor de proteína quinasa C (PKC), 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo, un acetato del mismo, con una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor de MEK, (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico da como resultado una mejora inesperada del tratamiento de enfermedades proliferativas, en particular cáncer, y más particularmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal GNAQ o GNA11.

Cuando se administra de forma simultánea, secuencial o por separado, el compuesto inhibidor de proteína quinasa C (PKC) y el compuesto inhibidor de MEK interactúan de manera sinérgica para inhibir de manera intensa la proliferación celular y resultan eficaces, de manera sorprendente, en modelos de melanoma maligno uveal. Esta reacción sinérgica inesperada permite la reducción de la dosis necesaria para cada compuesto, lo cual conduce a la reducción de los efectos secundarios y a la mejora de la eficacia clínica a largo plazo de los compuestos en el tratamiento.

60 Sumario de la invención

La invención proporciona combinaciones farmacéuticas que pueden resultar útiles para la inhibición de la proliferación celular de un tumor con mutación Gα (GNA11/GNAQ) y para el tratamiento de enfermedades proliferativas, en particular cáncer, y más particularmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal GNAQ o GNA11. La presente invención proporciona combinaciones

farmacéuticas que comprenden: (a) un inhibidor de proteína quinasa C (PKC) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) al menos un inhibidor de proteína quinasa activado por mitógeno (MEK) y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención también proporciona combinaciones farmacéuticas que consisten en: (a) un inhibidor de proteína quinasa C (PKC) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de proteína quinasa activado por mitógeno (MEK) y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En las combinaciones anteriores, el compuesto inhibidor de PKC es

10 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En las combinaciones anteriores, el inhibidor de MEK es

15 (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico,
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

20 De acuerdo con la presente invención, los miembros de la combinación son (a) un compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 La presente invención se refiere además a una preparación combinada o una composición farmacéutica que comprende un (a) compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK que es (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención se refiere a una preparación combinada que comprende: (i) una o más formas de dosificación unitaria de miembro de combinación (a), y (ii) una o más formas de dosificación unitaria de miembro de combinación (b).

35 La presente invención pertenece de forma particular a una combinación farmacéutica que comprende (a) un compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK que es (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesita.

45 La presente divulgación proporciona además un envase comercial que comprende como agentes terapéuticos una combinación que comprende (a) un compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK que es (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con instrucciones para administración simultánea, por separado o secuencial del mismo para su uso en el retardo del avance o tratamiento de una enfermedad proliferativa.

50 Las combinaciones anteriores también se proporcionan para la administración simultánea, por separado o secuencial, en particular para el tratamiento o la prevención de una enfermedad proliferativa. La enfermedad proliferativa es cáncer, y más particularmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico, melanoma maligno uveal mutante GNAQ o GNA11 y cáncer, y más particularmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal metastásico con mutación GNAQ o GNA11.

55 Breve descripción de las figuras

60 La FIGURA 1 muestra el efecto de 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) y (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) sobre la proliferación de melanoma maligno uveal *in vitro*. Se midió la proliferación de estirpes celulares de melanoma maligno uveal durante el transcurso de 6 días por medio de tecnología xCELLigence en presencia de DMSO 0,5 μ M, AEB071 0,5 μ M, COMPUESTO B 0,5 μ M o AEB071 0,5 μ M + COMPUESTO B 0,5 μ M. En las estirpes celulares 92.1 y OMM1 que poseen mutaciones GNAQ y GNA11, respectivamente, AEB071 retardó la proliferación celular, viéndose este efecto exacerbado cuando se encontraba en combinación con el COMPUESTO B. Debido a que el COMPUESTO B como agente individual mostró el efecto más modesto sobre la proliferación de estirpes celulares 92.1 y OMM1 de melanoma maligno

uveal, la combinación de los dos agentes resulto capaz de suprimir de manera completa y sorprendente la proliferación de ambas estirpes celulares.

La FIGURA 2 muestra una vista cerrada en el patrón de sinergia entre AEB071 y el COMPUESTO B en la estirpe celular de melanoma maligno uveal 92.1, y muestra el efecto sinérgico entre los dos agentes. Se muestra la matriz de dosis entre los dos agentes; el efecto sobre la proliferación celular con respecto a las células no tratadas se muestra en el panel lateral superior, la inhibición en exceso en el panel central y la inhibición de proliferación con respecto a la normalización en el día cero en el panel inferior. Tanto el COMPUESTO B de agente individual como AEB071 fueron activos en 92.1, pero de manera importante, la combinación de los dos agentes dio como resultado más que magnitudes de respuesta aditivas a dosis bajas, lo que indica que la combinación de agentes juntos resulta más eficaz en la inhibición de la proliferación de la estirpe celular 92.1 de melanoma maligno uveal *in vitro* que con cualquier agente individual solo.

FIGURA 3: Se evalúa el efecto bioquímico de estos agentes siguiendo el tratamiento con AEB071 0,5 μ M, COMPUESTO B 0,5 μ M o 0,5 μ M de cada agente junto con las estirpes celulares 92.1 y OMM-1 de melanoma maligno uveal. Se atenuó el nivel de pMARCKS. La adición del COMPUESTO B A AEB071 no tuvo efecto alguno sobre la expresión de pMARCKS. El tratamiento de las mismas células con el COMPUESTO B condujo a una reducción de los niveles de pERK1/2, como pudo observarse a las 2 horas; a las 24 horas, comienza a volver la expresión de pERK1/2. Además, el tratamiento del COMPUESTO B de agente individual condujo a la inducción de la expresión de pMEK1/2 con el tiempo en ambas estirpes celulares; esto se observó claramente tras 48 horas de tratamiento. Sorprendentemente, únicamente la combinación de AEB071 y COMPUESTO B mostró eliminación retardada de pERK1/2 y pMEK1/2. De manera significativa, AEB071 evitó claramente la inducción de pMEK provocada por el tratamiento del agente individual COMPUESTO B. De este modo, la combinación de AEB071 y COMPUESTO B condujo a una inhibición retardada de fosfoproteína de pMEK, pERK y pMARCKS.

La FIGURA 4 muestra la actividad *in vivo* de AEB071 y COMPUESTO B en el modelo de xenoinjerto en ratón atímico de melanoma maligno uveal humano 92.1. Se administró AEB071 a una dosificación de 91 mg/kg tres veces al día (TID) durante 21 días. Se determinó la eficacia a partir de la inhibición de proliferación tumoral en el día 17, el último día con todos los ratones del estudio. Se calculó la actividad en tumor/control (T/C), el cambio en porcentaje del volumen tumoral medio desde el día 1 hasta el día 17 en ratones tratados con fármaco (Δ T) frente a ratones tratados con vehículo, o como T/T0, porcentaje de reducción en el grupo de volumen tumoral medio desde el día 1. Como se muestra en la Figura 4 el tratamiento de monoterapia AEB071 dio como resultado un T/C de 3 % ($p < 0,01$) y la adición de COMPUESTO B dosificado dos veces al día a 3,5 mg/kg al régimen AEB071 dio como resultado un T-T0 de -22 % ($p < 0,001$ actividad media, pero no fue significativo en comparación con AEB071 solo). El COMPUESTO B no tuvo actividad por sí mismo en este modelo *in vivo* con T/C de un 84 %. El tratamiento con AEB071 y COMPUESTO B, de este modo, resulta eficaz en el modelo de melanoma maligno uveal *in vivo* 92.1.

La FIGURA 5 muestra la proliferación tumoral *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de ratón atímico con melanoma maligno uveal 92.1 seguido durante > 70 días. Se dosificó a los ratones durante 21 días, el tratamiento se interrumpió y se controló la excrecencia tumoral. Dos semanas después del período de dosificación, los tumores evolucionaron en el punto de control en los grupos de tratamiento de monoterapia AEB071, mientras que los tumores evolucionaron a una tasa más lenta en el grupo de combinación. No se calculó el retardo de la proliferación tumoral debido a que dos o más tumores por grupo se volvieron estáticos tras el período de proliferación inicial, pero la tendencia de la tasa de excrecencia tumoral indicó que con la combinación AEB071 más COMPUESTO B los tumores proliferaron más lentamente que con el agente individual AEB071. Los tumores tratados con el agente individual COMPUESTO B no se controlaron debido a la falta de eficacia. Los datos indicaron que la combinación de AEB071 con COMPUESTO B tuvo una magnitud y duración de respuesta mayor en comparación con cualquier agente individual en el modelo 92.1 *in vivo* de melanoma maligno uveal.

La FIGURA 6 muestra la actividad *in vivo* de AEB071 administrado a 90,95, 45,58 y 22,74 mg/kg, (equivalente a 80, 40 y 20 mg/kg de base libre) con una dosificación de tres veces al día (TID) durante 21 días en combinación con el COMPUESTO B a 3,5 mg/kg con un régimen de dosificación de dos veces al día en el modelo de xenoinjerto en ratón atímico de melanoma maligno uveal humano 92.1. Se determinó la eficacia a partir de la inhibición de proliferación tumoral en el día 22. Se calculó la actividad en tumor/control (T/C), el cambio en porcentaje del volumen tumoral medio desde el día 1 hasta el día 22 en ratones tratados con fármaco (Δ T) frente a ratones tratados con vehículo, o como T/T0, porcentaje de reducción en el grupo de volumen tumoral medio desde el día 1. Como se muestra en la Figura 6, la monoterapia AEB071 a 90,95 mg/kg dio como resultado T/C de un 18 % ($p < 0,05$). La monoterapia AEB071 con 45,5 y 22,7 mg/kg dio como resultado T/C de un 52 % y un 92 % respectivamente, e inhibición media no significativa. La adición del COMPUESTO B dosificado dos veces al día a 3,5 mg/kg con dosis de AEB071 de 90,95 y 45,58 mg/kg dio como resultado un T-T0 de -52 % y -12 % respectivamente ($p < 0,001$). El COMPUESTO B no tuvo actividad por sí mismo en este modelo *in vivo* con T/C de un 56 %. La combinación a dosis elevada dio como resultado cuatro regresiones parciales. El tratamiento a dosis múltiples de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B resulta eficaz en el modelo de melanoma maligno uveal *in vivo* 92.1. La eficacia de la combinación aumenta de forma dependiente de la dosis, con un

umento de la dosis de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B que da como resultado una mayor magnitud de respuesta.

Descripción detallada de la invención

5 En el presente documento se describen diversas realizaciones enumeradas de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

10 La presente invención proporciona combinaciones farmacéuticas que comprenden: (a) un inhibidor de proteína quinasa C (PKC) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) al menos un inhibidor de proteína quinasa activado por mitógeno (MEK) definido en las reivindicaciones y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La presente invención se refiere a combinaciones farmacéuticas para administración simultánea, por separado o secuencial, en particular para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa.

Los términos generales usados en el presente documento se definen con los siguientes significados, a menos que se indique específicamente lo contrario:

20 Los términos "comprender" e "incluir" se usan en el presente documento en sus sentidos de extremo abierto y no limitante, a menos que se indique lo contrario.

25 Se ha de interpretar que los términos "un", "uno/una", "el/la" y los términos similares usados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente en el contexto. Cuando se usa la forma plural para compuestos, sales y similares, se acepta que ésta también indica un único compuesto, sal o similar.

30 El término "combinación" o la expresión "combinación farmacéutica" se definen en el presente documento para hacer referencia a cualquiera combinación fija en una forma unitaria de dosificación, una combinación no fija o un conjunto de partes para administración combinada en la que se puede administrar un compuesto inhibidor de PKC, un COMPUESTO A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el compuesto inhibidor MEK, COMPUESTO B o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, de manera simultánea, independiente al mismo tiempo o por separado, en intervalos de tiempo que permiten que los miembros de la combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, un efecto sinérgico. La expresión "combinación fija" significa que los principios activos, por ejemplo el COMPUESTO A y un miembro de combinación, por ejemplo, el COMPUESTO B, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una sola composición o dosificación. La expresión "combinación no fija" significa que los principios activos, por ejemplo el COMPUESTO A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un miembro de la combinación, por ejemplo el COMPUESTO B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran ambos a un paciente como entidades por separado bien de forma simultánea, concurrente o secuencial, sin límites de tiempo específicos, donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos o más compuestos en el organismo del paciente. Estos últimos también se aplican a las terapias de mezcla, por ejemplo, la administración de tres o más principios activos.

45 La expresión "inhibidor de proteína quinasa C" se define en la presente memoria para hacer referencia a un compuesto que se dirige, disminuye o inhibe la proteína quinasa C. El término PKC generalmente hace referencia a la familia completa de isoformas: isoformas convencionales; alfa, beta ($\beta 1$ y $\beta 2$) y gamma, isoformas novedosas; delta, épsilon, eta, y theta, e isoformas atípicas; zeta, y tau/lambda.

50 Los inhibidores de PKC apropiados incluye derivados de maleimida, tales como los compuestos descritos en la patente de Estados Unidos Nos. 5.545.636; 5.668.152; 5.672.681; 5.698.578; 5.710.145; 6.645.970; 7.220.774; 7.235.555; la publicación de Estados Unidos N.º 2008/0318975; las patentes europeas Nos. 0776895 B1; 0817627 B1; 1449529 B1; 1337527 B1; y las publicaciones PCT Nos. WO03/082859; y WO07/006533.

55 Los compuestos específicos de inhibidor de PKC incluyen

60 sotraustaurina (también conocido como AEB071 y descrito en la patente de Estados Unidos N.º. 6.645.970), 3-(1*H*-Indol-3-il)-4-[2-(piperazin-1-il)quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona descrita en el Ejemplo 70 de la Publicación PCT N.º. WO 2002/038561 o la patente de Estados Unidos N.º. 6.645.970), 3-[2-cloro-7-[(dimetilamino)metil]-1-naftalenil]-4-[7-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-1*H*-indol-3-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona ((N.º. CAS. 919992-85-1, descrito en la publicación PCT N.º WO07/006533 y la publicación de Estados Unidos N.º. 2008/0318975), 3-[3-(4,7-diaza-espiro[2,5]oct-7-il)-isoquinolin-1-il]-4-(7-metil-1*H*-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona (descrito en el Ejemplo 69 de la patente de Estados Unidos N.º. 7.235.555);

ruboxistaurina ((9S)-9-[(dimetilamino)metil]-6,7,10,11-tetrahydro-9H,18H-5,21:12,17-dimetenodibenzo-
[e,k]pirrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazaciclohexadecin-18,20(19H)-diona (también conocido como LY-333531 y
descrito en la patente de Estados Unidos N°. 5.698.578)) y la sal de mesilato de ruboxistaurina (descrita en la
patente de Estados Unidos N°. 5.710.145 y la patente europea N°. 0776895 B1);
5 y 12-(2-cianoetil)-6,7,12,13-tetrahydro-13-metil-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pirrolo(3,4-c)-carbazol (CAS No. 136194-
77-9, disponible en Calbiochem® y descrito en la patente de Estados Unidos N°. 5.489.608).

Se pueden seleccionar inhibidores de PKC que consisten en AD 198, aprinocarseno, balanol, briostatina 1,
balfostina, cedefingol, CGP 53353, cloruro de queleritrina, cicloplatam, delcasertib, enzastaurina, EP 70905, GF
10 109203X, gnidimacrina, GO 6976, GO 7716, GO 7775, GO 7852, HO 0303, mebutato de ingenol, ISI 641, JTV 519,
KAI 1678, LY 290181, LY 317644, midostaurina, NA 0345, NPC 15437, NSC 639365, NSC 639366, NSC 646958, p
XSC, RD 65071, RO 317549, RO 318220, RO 318425, RO 318830, RO 320432, Safingol, SPC 104065,
estaurosporina, teprenona, succinato de tocoferol, UCN 01 y UCN 1028C. En algunas realizaciones, el inhibidor de
PKC es midostaurina, enzastaurina o estaurosporina. En algunas realizaciones, el inhibidor de PKC es 3-(1H-Indol-
15 3-il)-4-[2-(piperazin-1-il)quinazolin-4-il]-1H-pirrol-2,5-diona descrito en el Ejemplo 70 de la PCT N°. Publicación WO
2002/038561 o la patente de Estados Unidos N°. 6.645.970),

La expresión "un inhibidor de MEK" se define en la presente memoria para hacer referencia a un compuesto que se
dirige, disminuye o inhibe la actividad de quinasa de MAP quinasa, MEK. Una diana de un inhibidor de MEK incluye,
20 pero sin limitarse a, ERK. Una diana indirecta de un inhibidor de MEK incluye, pero sin limitarse a, ciclina D1.

La expresión "composición farmacéutica" se define en la presente memoria para hacer referencia a una mezcla o
disolución que contiene al menos un agente terapéutico para administración a un sujeto, por ejemplo, un mamífero o
un ser humano, con el fin de prevenir o tratar una enfermedad o afección particular que afecta al mamífero o ser
25 humano.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se define en el presente documento para hacer referencia a aquellos
compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación, que son, dentro del alcance del juicio médico
aceptado, apropiados para contacto con los tejidos de un sujeto, por ejemplo, un mamífero o un ser humano, sin
30 toxicidad excesiva, respuesta alérgica con irritación y otro problema o complicación acorde con una relación de
riesgo/beneficio razonable.

El término "co-administración" o la expresión "administración combinada", tal y como se usa en el presente
documento, se define para que englobe la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un paciente
individual, y se pretende que incluyan los regímenes de tratamiento en los que los agentes no necesariamente se
35 administran por la misma ruta de administración o al mismo tiempo.

El término "tratar" o "tratamiento", tal y como se usa en la presente memoria, comprende el tratamiento de
atenuación, reducción o alivio de al menos un síntoma en un sujeto o efecto de retardo del avance de una
40 enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o la
erradicación completa de un trastorno, tal como cáncer. En el sentido de la presente invención, el término "tratar"
también indica detener, retardar la aparición (es decir, el período de manifestación clínica de una enfermedad) y/o
reducir el riesgo de desarrollo o empeoramiento de la enfermedad. El término "proteger" se usa en el presente
documento para hacer referencia al retardo o tratamiento, o ambos, tal y como resulte apropiado, desarrollo o
45 continuación o agravamiento de una enfermedad en un sujeto, por ejemplo, un mamífero o un ser humano.

El término "prevenir", o "prevención" tal y como se usa en el presente documento comprende la prevención de al
menos un síntoma asociado o provocado por el estado, enfermedad o trastorno objeto de tratamiento.

La expresión "activo conjunta y terapéuticamente" o "efecto terapéutico conjunto", tal y como se usa en el presente
documento, significa que los agentes terapéuticos se pueden proporcionar por separado (de forma cronológicamente
escalonada, especialmente de forma específica secuencial) en dichos intervalos de tiempo que prefieren, en el
animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, objeto de tratamiento, mostrar aún una interacción
50 (preferentemente sinérgica) (efecto terapéutico conjunto). Siempre que este sea el caso, se pueden determinar,
entre otros, por medio de los siguientes niveles sanguíneos, que muestran que ambos componentes están presentes
55 en la sangre del ser humano objeto de tratamiento al menos durante determinados intervalos de tiempo.

La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad clínicamente eficaz" de una combinación de agentes
terapéuticos es una cantidad suficiente para proporcionar una mejora apreciable con respecto a la línea base, de
60 signos apreciables clínicamente y síntomas del trastorno tratado con la combinación.

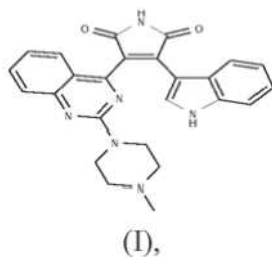
La expresión "efecto sinérgico", tal y como se usa en el presente documento, hace referencia a la acción de dos
agentes terapéuticos tales como, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I), *por ejemplo*, Compuesto A y un
compuesto inhibidor de MEK de la presente invención, *por ejemplo*, Compuesto B, que produce un efecto, por
ejemplo, ralentización del avance sintomático de una enfermedad proliferativa, en particular cáncer, o sus síntomas,
65 que es mayor que la adición simple de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. Se puede calcular un

5 efecto sinérgico, por ejemplo, usando métodos apropiados tales como ecuación Sigmoide-Emax (Holford, N. H. G. y Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación de efecto-medio (Chou, T. C. y Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación referida anteriormente se puede aplicar a los datos experimentales para generar el gráfico correspondiente para contribuir a la evaluación de los efectos de la combinación de fármacos. Los correspondientes gráficos asociados a las ecuaciones referidas anteriormente son la curva de concentración-efecto, curva de isoblograma y la curva de índice de combinación, respectivamente.

10 El término "sujeto" o "paciente" tal y como se usa en el presente documento incluye animales, que sean capaces de padecer o experimentar cáncer o cualquier trastorno que implique, directa o indirectamente, cáncer. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que experimenta riesgo de padecer, o potencialmente capaz de padecer cáncer.

15 El término "aproximadamente" tiene el significado de dentro de un 10 %, más preferentemente un 5 %, de un valor o intervalo concreto.

20 Las combinaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen el compuesto de PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (en lo sucesivo denominado ("COMPUESTO A") como inhibidor de proteína quinasa C. El COMPUESTO A es un compuesto inhibidor de proteína quinasa C (PKC) de Fórmula I

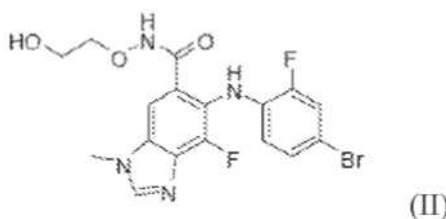


25 El COMPUESTO A se describe en el documento WO02/38561 y en la patente de Estados Unidos N°. 6.645.970, La síntesis del COMPUESTO A y su sal de acetato se describen en el Ejemplo 56 del documento WO W02/38561.

30 Cuando se hace referencia al COMPUESTO A, se comprende que el término "sal" o "sales" es una sal del COMPUESTO A que puede estar presente sola o en forma de mezcla con el compuesto libre de Fórmula (I) y son preferentemente sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferentemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir del compuesto de Fórmula (I) con un átomo de nitrógeno básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Los ácidos inorgánicos apropiados son, por ejemplo, ácidos de halógeno, tal como ácido clorhídrico, tales como ácido clorhídrico. Los ácidos orgánicos apropiados incluyen, por ejemplo, ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido acético, ácido fumárico o ácido metanosulfónico. Con fines de aislamiento y purificación, también es posible usar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, únicamente se emplean sales farmacéuticamente aceptables o compuestos libres (cuando sean aplicables en forma de preparaciones farmacéuticas) y éstas, por tanto, resultan preferidas. A la vista de la estrecha relación entre los compuestos novedosos en forma libre y aquellos en forma de sus sales, incluyendo aquellas sales que se pueden usar como intermedios, por ejemplo en la purificación o identificación de compuestos novedosos, se comprende que cualquiera referencia a los compuestos libres anteriores y siguientes también incluye las correspondientes sales, según resulte apropiado y oportuno. Las sales del COMPUESTO A son preferentemente sales farmacéuticamente aceptables; las sales farmacéuticamente aceptables que forman contra-iones apropiados se conocen en el campo. La sal más preferida del COMPUESTO A es sal de acetato.

45 Las combinaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen el compuesto inhibidor de MEK (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 El compuesto inhibidor de MEK (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) es un compuesto de fórmula (II)

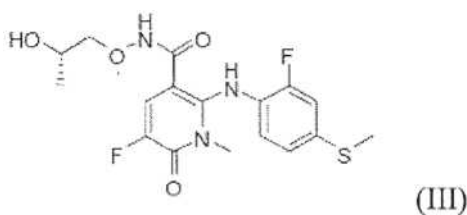


El compuesto inhibidor de MEK (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) se describe en la Solicitud PCT N° WO 03/077914, y se han descrito métodos para su preparación, por ejemplo, en el Ejemplo 18 del mismo.

Excepto cuando se divulga en el presente documento, los compuestos usados en la presente invención pueden poseer uno o más centros asimétricos y se pueden producir como estereoisómeros individuales o (*R*)- o (*S*) o en forma de mezclas de los mismos, como se describe en la Solicitud PCT N°. WO03/077914. Excepto donde se indique lo contrario, se pretende que la descripción o nomenclatura de un compuesto particular en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluya ambos enantiómeros individuales, mezclas de diastereómeros, racémicas o de otro tipo, de los mismos. Por consiguiente, la presente invención también incluye todos los citados isómeros, incluyendo mezclas diastereoméricas y enantiómeros resueltos de los compuestos de la presente invención. Las mezclas diastereoméricas se pueden separar en sus diastereoisómeros individuales sobre la base de sus diferencias químicas por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, por cromatografía o cristalización fraccionada. Los enantiómeros pueden separarse convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica mediante la reacción con un compuesto ópticamente activo adecuado (por ejemplo, alcohol), separando los diastereoisómeros y convirtiendo (por ejemplo, mediante hidrólisis) los diastereoisómeros individuales en los correspondientes enantiómeros puros. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de los estereoisómeros se conocen bien en la técnica (véase discusión en el Capítulo 4 de "Advanced organic Chemistry", 4ª edición, J. March. John Wiley and Sons, New York, 1992).

Los inhibidores de MEK adicionales que se pueden usar en la combinación de la presente divulgación incluyen (*S*)-5-fluoro-2-(2-fluoro-4-(metiltio)fenilamino)-*N*-(2-hidroxi-propoxi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropiridin-3-carboxamida (COMPUESTO C), PD0325901 (Pfizer)(Véase Publicación PCT N.º WO02/06213), PD-184352 (Pfizer), RDEA119 (Ardea Biosciences), GSK1120212 (GlaxoSmithKline)(Véase Publicación PCT N.º WO05/121142), XL518 (Exelexis), AS-701255 (Merck Serono), AS-701173 (Merck Serono), AS703026 (Merck Serono), RDEA436 (Ardea Biosciences), E6201 (Eisai) (Véase Goto *et al*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 3331(2): 485-495 (2009)), RO4987655 (Hoffmann-La Roche), JTP-74057, RG7167 y/o RG7420.

El compuesto inhibidor de MEK (*S*)-5-fluoro-2-(2-fluoro-4-(metiltio)fenilamino)-*N*-(2-hidroxi-propoxi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropiridin-3-carboxamida (COMPUESTO C) es un compuesto de fórmula (III)



El compuesto inhibidor de MEK (*S*)-5-fluoro-2-(2-fluoro-4-(metiltio)fenilamino)-*N*-(2-hidroxi-propoxi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropiridin-3-carboxamida (COMPUESTO C) se describe en el Ejemplo 25-BB de la Solicitud PCT N°. WO2007/044084, y se han descrito los métodos para su preparación en el presente documento.

El compuesto inhibidor de MEK usado en la combinación de la presente invención es (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto inhibidor de MEK útil en la combinación de la presente divulgación es también PD0325901 *N*-[2(*R*),3-dihidroxi-propoxi]-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzamida (Véase la Publicación PCT N°. WO02/06213).

Por lo que respecto a los inhibidores de MEK, el término "sal" o "sales", a menos que se indique lo contrario, incluye sales de grupos ácidos y básicos que pueden estar presentes en los compuestos de la presente invención. Los compuestos de la presente invención que son de naturaleza básica son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos que se pueden usar para preparar las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los compuestos básicos de la presente invención son las que forman sales de adición de ácidos no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacéuticamente aceptables, tales como las sales de acetato, benzoato, bromuro, cloruro, citrato, fumarato, bromhidrato, clorhidrato, yoduro,

lactato, maleato, mandelato, nitrato, oxalato, salicilato, succinato, y tartrato. Dado que un compuesto individual de la presente invención puede incluir más de un resto ácido o básico, los compuestos de la presente invención pueden incluir mono, di o tri-sales de un compuesto individual.

5 En el caso de un resto ácido en un compuesto de la presente invención, se puede formar una sal por medio de tratamiento de un compuesto de la presente invención con un compuesto básico, en particular una base inorgánica. Las sales inorgánicas preferidas son las que se forman con metales alcalinos o alcalino térreos tales como litio, sodio, potasio, bario y calcio. Las sales de base orgánica preferidas incluyen, por ejemplo, amonio, dibencilamonio, bencilamonio, 2-hidroxiethylamonio, bis(2-hidroxiethyl)amonio, feniletilbencilamina, dibencil-etilendiamina y sales
10 similares. Otras sales de restos ácidos pueden incluir, por ejemplo, las formadas con procaína, quinina y N-metilglucosamina, más sales formadas con aminoácidos básicos tales como glicina, ornitina, histidina, fenilglicina, lisina y arginina. Una sal especialmente preferida es una sal de sodio o potasio de un compuesto de la presente invención.

15 Con respecto a los restos básicos, se forma una sal por medio de tratamiento de un compuesto de la presente invención con un compuesto ácido, en particular un ácido inorgánico. Las sales inorgánicas preferidas de este tipo pueden incluir, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico o similares. Las sales orgánicas preferidas de este tipo, pueden incluir, por ejemplo, sales formadas con ácido acético, succínico, cítrico, maleico, fumárico, D-glutámico, glicólico, benzoico, cinámico y ácidos orgánicos similares. Una sal especialmente
20 preferida de este tipo es una sal de clorhidrato o sulfato del COMPUESTO B de la presente invención.

Sales farmacéuticamente aceptables del COMPUESTO B apropiadas para la presente invención incluyen las sales divulgadas en la Solicitud PCT N°. WO 03/077914 y Solicitud PCT N°. WO2007/044084.

25 A menos que se especifique lo contrario, o se indique claramente lo contrario en el texto, la referencia a agentes terapéuticos útiles en la combinación farmacéutica de la presente invención incluye tanto la base libre de los compuestos, como todas las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos.

30 La estructura de los compuestos identificaos por los nos. de código, genéricos o nombres comerciales se puede adoptar a partir de la edición actual del compendio convencional "El índice Merck" o a partir de bases de datos, por ejemplo, las patentes internacionales (Publicaciones Mundiales IMS).

Los compuestos usados como agentes terapéuticos en las combinaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados, de forma respectiva. También se encuentra dentro del alcance de la presente invención la combinación de dos agentes terapéuticos por separado como se ha explicado anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de la presente invención podría incluir tres agentes terapéuticos o más.

40 Una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto inhibidor de PKC o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y (b) al menos un compuesto inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, como se define en las reivindicaciones y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, se denominan en lo sucesivo COMBINACIÓN DE LA INVENCION. Esta expresión también adopta el significado de una combinación farmacéutica que consiste en (a) el compuesto inhibidor de PKC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) el compuesto inhibidor de MEK, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
45 opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de PKC y el compuesto inhibidor de MEK son los únicos agentes terapéuticos.

De acuerdo con la presente invención, los miembros de la combinación son (a) un compuesto inhibidor PKC 3-(1H-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1H-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 En una realización, la presente invención se refiere a una preparación combinada que comprende: (i) una o más formas de dosificación unitaria de miembro de combinación (a), y (ii) una o más formas de dosificación unitaria de miembro de combinación (b).

La presente invención pertenece de forma particular a una COMBINACIÓN DE LA INVENCION útil para el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesita. En la presente realización de
60 la presente invención, la COMBINACIÓN DE LA INVENCION se usa para el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa que comprende administrar a un sujeto una terapia de combinación, que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de PKC, 3-(1H-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1H-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de MEK, (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzoimidazol-5-carboxílico, o una
65 sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Preferentemente, el compuesto inhibidor de MEK se administra en

dosificaciones terapéuticamente eficaces que, cuando se combinan, proporcionan un efecto beneficioso. La administración puede ser simultánea o secuencial.

5 La enfermedad proliferativa tratada o evitada por medio de la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN es principalmente un tumor y/o cáncer. Los ejemplos de enfermedades proliferativas incluyen melanoma, en particular melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico, melanoma maligno uveal mutante GNAQ o GNA11 y cáncer, y más particularmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal metastásico con mutación GNAQ o GNA11.

10 En una realización de la presente invención, la enfermedad proliferativa es un tumor sólido. La expresión "tumor sólido" especialmente significa un melanoma, en particular melanoma maligno uveal, por ejemplo melanoma maligno uveal metastásico. Además, dependiendo del tipo de tumor y de la combinación particular usada, se puede obtener una disminución del volumen tumoral. Las combinaciones divulgadas en el presente documento también resultan apropiadas para evitar la dispersión metastásica de tumores y la proliferación o desarrollo de micro-metástasis. Las combinaciones divulgadas en la presente memoria son particularmente apropiadas para el tratamiento de los
15 pacientes con prognosis pobre, especialmente pacientes con prognosis pobre tales como los que tienen melanoma maligno uveal metastásico.

20 En una realización adicional, la enfermedad proliferativa es melanoma, en particular melanoma maligno uveal, por ejemplo melanoma maligno uveal metastásico.

En una realización adicional, la enfermedad proliferativa es melanoma maligno uveal, por ejemplo melanoma maligno uveal metastásico.

25 Se comprende que la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN se puede usar únicamente para el tratamiento de una enfermedad proliferativa de acuerdo con la presente invención.

30 Se ha descubierto que la terapia de combinación que comprende la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN tiene como resultado una mejora inesperada del tratamiento o prevención de enfermedades proliferativas en comparación con la monoterapia. Cuando se administra de forma simultánea, secuencial o por separado, el compuesto inhibidor PKC 3-(1H-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1H-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) y el compuesto inhibidor MEK (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzoimidazol-5-carboxílico, (COMPUESTO B) interaccionan de forma sinérgica para inhibir la proliferación celular.

35 La naturaleza de las enfermedades proliferativas es multifactorial. En determinadas circunstancias, se pueden combinar fármacos con diferentes mecanismos. Sin embargo, cuando se considera cualquiera combinación de agentes terapéuticos que tienen diferente modo de acción, no necesariamente conduce a combinaciones con efectos ventajosos.

40 La administración de una combinación farmacéutica de la invención puede tener como resultado no solo un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, por ejemplo, con respecto al alivio, retardo del avance o inhibición de los síntomas, sino también efectos beneficiosos sorprendentes, por ejemplo, menos efectos secundarios, calidad de vida mejorada o menor morbilidad, en comparación con una monoterapia que aplica solo uno de los agentes farmacéuticamente terapéuticos usados en la combinación de la invención.

45 Una ventaja adicional es que se pueden usar menores dosis de los agentes terapéuticos de la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN, por ejemplo, las dosis con frecuencia no solo son más pequeñas, sino que también se aplican de manera menos frecuente, o se pueden usar con el fin de disminuir la incidencia de efectos secundarios observados con uno de los miembros de la combinación por separado. Esto está de acuerdo con la demanda y requisitos de los
50 pacientes objeto de tratamiento.

55 Por medio de modelos de ensayo establecidos, se puede demostrar que una COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN tiene como resultado efectos beneficiosos descritos anteriormente en el presente documento. La persona experta en la técnica se encuentra completamente capacitada para seleccionar un modelo de ensayo relevante para comprobar dichos efectos beneficiosos. La actividad farmacológica de la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN puede, por ejemplo, demostrarse en un estudio clínico o en un procedimiento de ensayo como se describe esencialmente a continuación.

60 Los estudios clínicos apropiados son en particular, por ejemplo, estudios de escalado de dosis sin anonimato en pacientes con enfermedades proliferativas. Dichos estudios demuestran en particular la sinergia de los agentes terapéuticos de la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN. Los efectos beneficiosos sobre las enfermedades proliferativas se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios que se conocen por parte de la persona experta en la técnica. Dichos estudios pueden ser, en particular, apropiados para comparar los efectos de una monoterapia que usa cualquier agente terapéutico y una COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN.

65

En una realización, la dosis del COMPUESTO A inhibidor de PKC se escala hasta alcanzar la Dosificación Máxima Tolerada, y el compuesto inhibidor de MEK de la presente invención se administra con una dosis fija. Como alternativa, se puede administrar el COMPUESTO A de inhibidor PKC en una dosis fija y se puede escalar la dosis de al menos el inhibidor de MEK de la presente invención. Cada paciente puede recibir dosis del COMPUESTO A de inhibidor de PKC y/o un inhibidor de MEK de la presente invención de forma diaria o intermitente. Se puede determinar la eficacia del tratamiento en dichos estudios, *por ejemplo*, tras 12, 18 o 24 semanas por medio de la evaluación de las puntuaciones de los síntomas, por ejemplo, cada 6 semanas.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de MEK es el COMPUESTO B o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización preferida, el inhibidor de MEK es el COMPUESTO B.

La determinación de la interacción sinérgica entre uno o más componentes, el intervalo óptimo para el efecto y los intervalos de dosis absoluta de cada componente para llevar a cabo, se pueden medir de forma definitiva mediante la administración de los componentes con diferentes intervalos de relación de peso/peso y dosis a los pacientes que precisan el tratamiento.

En una realización preferida de la presente invención, la COMBINACIÓN DE LA INVENCION comprende un compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor MEK (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, por ejemplo melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal GNAQ o GNA11, preferentemente melanoma maligno uveal que alberga mutaciones ya sea GNAQ o GNA11.

En un aspecto, la presente invención proporciona una combinación sinérgica para administración a humanos que comprende (a) un compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK de la presente invención, COMPUESTO B o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en un intervalo de combinación (peso/peso) que corresponde a los intervalos observado en un modelo de tumor, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos más adelante, usado para identificar una interacción sinérgica.

De acuerdo con aspecto adicional, la presente invención proporciona una combinación sinérgica para administración a seres humanos comprende (a) un compuesto inhibidor PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un compuesto inhibidor MEK de la presente invención, COMPUESTO B o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en el que el intervalo de dosificación de cada componente corresponde a los intervalos sinérgicos observados en un modelo tumoral apropiado, por ejemplo, los modelos tumorales descritos en los Ejemplos siguientes, principalmente usado para identificar una interacción sinérgica.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que sea terapéutica y conjuntamente eficaz frente a una enfermedad proliferativa que comprende la COMBINACIÓN DE LA INVENCION. En esta composición, los miembros de combinación (a) y (b) se pueden administrar en una formulación individual o forma de dosificación unitaria, se pueden administrar de forma concurrente o por separado, o se pueden administrar de forma secuencial por medio de cualquiera ruta apropiada. La forma de dosificación unitaria puede ser también una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas para administración por separado de ambos miembros de la combinación, o para la administración de una combinación fija, *i.e.* una composición galénica individual que comprende la COMBINACIÓN DE LA INVENCION, se pueden preparar de manera conocida *per se* y son aquellas apropiadas para administración entérica, tal como administración oral o rectal y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo seres humanos, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una combinación farmacológicamente activa de un miembro solo, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, especialmente apropiados para aplicación entérica o parenteral.

La composición farmacéutica novedosa puede contener, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 99,9 %, preferentemente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 60 %, de otro(s) agente(s) terapéutico(s).

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la terapia de combinación para administración entérica o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos revestidos con azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, o ampollas. Si no se indica lo contrario, se preparan de manera conocida *per se*, por ejemplo, por medio de diversos procesos convencionales de mezcla, trituración, compresión directa, granulación, revestimiento con azúcar, disolución, liofilización, o técnicas de fabricación fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Se aprecia que el contenido unitario de un miembro de la combinación presente en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita, por sí mismo, constituir una cantidad eficaz, ya que

se puede alcanzar la cantidad eficaz necesaria por medio de la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

5 Una forma de dosificación unitaria que contiene la combinación de agentes o agentes individuales de la combinación de agentes puede estar en forma de micro-comprimidos encerrados dentro de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina. Para ello, se puede usar una cápsula de gelatina tal y como se emplea en las formulaciones farmacéuticas, tales como una cápsula de gelatina dura conocida como CAPSUGEL, disponible en Pfizer.

10 Las formas de dosificación unitarias de la presente invención pueden comprender de forma opcional vehículos convencionales adicionales o excipientes usados para sustancias farmacéuticas. Ejemplos de vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, emolientes, sustancias de deslizamiento, colorantes, aromatizantes y conservantes. El experto en la técnica puede seleccionar uno o más de los vehículos anteriormente mencionados con respecto a las propiedades particulares deseadas de la forma de dosificación por
15 experimentación rutinaria y sin peligro indebido. La cantidad de dichos vehículos usada puede variar dentro del intervalos convencionales en la técnica. Las siguientes referencias divulgan técnicas y excipientes usados para formular las formas de dosificación orales. Véase *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4ª edición, Rowe et al., Eds., American Pharmaceuticals Association (2003); y *Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2003).

20 Estos vehículos convencionales adicionales y opcionales se pueden incorporar en la forma de dosificación oral mediante la incorporación de uno o más vehículos en la mezcla inicial antes o durante la granulación o mediante combinación de uno o más vehículos convencionales con gránulos que comprenden la combinación de agentes o agentes individuales de la combinación de agentes en la forma de dosificación oral. En la última realización, se puede homogeneizar la mezcla combinada de forma adicional, por ejemplo, a través de un mezclador en V, y
25 posteriormente se puede comprimir o moldear para dar lugar a un comprimido, por ejemplo un comprimido monolítico, se puede encapsular por medio de una cápsula, o se puede rellenar en un sobrecito.

Los ejemplos de desintegrantes farmacéuticamente aceptables incluyen, almidones; arcillas; celulosas; alginatos; gomas; polímeros reticulados, por ejemplo, polivinil pirrolidona reticulada o crospovidona, por ejemplo, POLYPLASDONE XL de International Specialty Products (Wayne, NJ); carboximetilcelulosa de sodio reticulada o croscaramelosa de sodio, por ejemplo, AC-DI-SOL de FMC; y carboximetilcelulosa de calcio reticulada; polisacáridos de soja; y goma guar. El desintegrante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 10 % en peso de la composición. En una realización, el desintegrante está presente en una
30 cantidad de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 % en peso de la composición.

Los ejemplos de aglutinantes farmacéuticamente aceptables incluyen almidones; celulosas y sus derivados, por ejemplo, celulosa microcristalina, por ejemplo, AVICEL PH de FMC (Philadelphia, PA), hidroxipropil celulosa, hidroxietil celulosa e hidroxipropilmetil celulosa METHOCEL de Dow Chemical Corp. (Midland, MI); sacarosa; dextrosa; jarabe de maíz; polisacáridos; y gelatina. El aglutinante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 50 %, por ejemplo, 2-20 % en peso de la composición.

Los ejemplos de lubricantes farmacéuticamente aceptables y sustancias de deslizamiento farmacéuticamente aceptables incluyen sílice coloidal, trisilicato de magnesio, almidones, talco, fosfato de calcio tribásico, estearato de magnesio, estearato de aluminio, estearato de calcio, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, polietilén glicol, celulosa en forma de polvo y celulosa microcristalina. El lubricante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 10 % en peso de la composición. En una realización, el lubricante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1,5 % en peso de la composición. La sustancia de deslizamiento puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % en peso.

Los ejemplos de cargas farmacéuticamente aceptables y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen azúcar de repostería, azúcar comprimible, azúcar apto para compresión, dextrina, dextrosa, lactosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, sorbitol, sacarosa y talco. La carga y/o diluyente, por ejemplo, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 80 % en peso de la composición.

55 En una realización, la presente invención pertenece también a una COMBINACIÓN DE LA INVENCION para su uso en la preparación de una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesita.

60 De acuerdo con la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz de cada miembro de la combinación de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION puede administrarse de forma simultánea o secuencial, y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como combinación fija. Por ejemplo, el método de tratamiento de una enfermedad proliferativa de acuerdo con la invención puede comprender (i) administración de un primer agente (a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) administración de un agente (b) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades terapéuticamente eficaces en conjunto, preferentemente en cantidades sinérgicamente eficaces, por ejemplo, en
65

dosificaciones diarias o intermitentes que corresponden a las cantidades descritas en el presente documento. Los miembros individuales de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el transcurso de la terapia o de forma concurrente en formas de combinación individuales o divididas. Además, el término "administrar" también engloba el uso de un pro-fármaco de un miembro de combinación que se convierte *in vivo* en el miembro de combinación como tal. Por tanto, la presente invención se comprende como que engloba todos los regímenes citados de tratamiento simultáneo o alternativo y el término "administrar" debe interpretarse de manera consecuyente.

La dosificación eficaz de cada uno de los miembros de combinación empleados en la COMBINACIÓN DE LA INVENCION puede variar dependiendo del compuesto particular o la composición farmacéutica empleada, el modo de administración, la afección a tratar y la gravedad de la afección a tratar. De este modo, el régimen de dosificación de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION está seleccionado de acuerdo con una diversidad de factores que incluye la ruta de administración y la función renal y hepática del paciente. Un médico o facultativo con experiencia habitual en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerido para aliviar, contrarrestar o detener la evolución de la afección.

Las relaciones óptimas, dosificaciones individuales y combinadas, y las concentraciones de los miembros de combinación (a) y (b) de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION que dan lugar a eficacia sin toxicidad se basan en los parámetros cinéticos de disponibilidad del agente terapéutico para los sitios diana, y puede determinarse usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

La dosificación eficaz de cada uno de los miembros de combinación puede precisar una administración más frecuente de un(unos) compuesto(s), en comparación con otro(s) compuesto(s) de la combinación. Por lo tanto, para permitir la dosificación apropiada, los productos farmacéuticos envasados pueden contener una o más formas de dosificación que contienen la combinación de compuestos, y una o más formas de dosificación que contienen una de las combinaciones de los compuestos, pero no el(los) otro(s) compuesto(s) de la combinación.

Cuando los miembros de la combinación, que se emplean en la COMBINACIÓN DE LA INVENCION, se aplican en forma tal y como se comercializan como fármacos individuales, su dosificación y modo de administración pueden ser de acuerdo con la información proporcionada en el inserto del envase del fármaco comercializado respectivo, si no se menciona de otro modo.

El COMPUESTO A de inhibidor de PKC se puede administrar en dosis individuales o divididas, diarias, a un sujeto apropiado, en una dosificación eficaz dentro del intervalo de aproximadamente 0,05 a 50 mg por kg de peso corporal al día, preferentemente de aproximadamente 0,1-25 mg/kg/día, más preferentemente de aproximadamente 0,5-10 mg/kg/día, en dosis individuales o divididas. Para un ser humano de 70 kg, sería una cantidad de un intervalo de dosificación preferida de aproximadamente 35-700 mg al día.

El COMPUESTO B de inhibidor de MEK se puede administrar en dosis individuales o divididas, diarias, a un sujeto apropiado, en una dosificación eficaz dentro del intervalo de aproximadamente 0,001 a 100 mg por kg de peso corporal al día, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis individuales o divididas. Para un ser humano de 70 kg, sería una cantidad de un intervalo de dosificación preferida de aproximadamente 0,05 a 7 g/día, preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día.

La dosificación óptima de cada miembro de combinación para el tratamiento de una enfermedad proliferativa se puede determinar empíricamente para cada individuo que usa los métodos conocidos y dependerá de una diversidad de factores, que incluyen, aunque sin limitación, el grado de evolución de la enfermedad; la edad, peso corporal, estado general de salud, el género y la dieta del individuo; el tiempo y la ruta de administración; y otros medicamentos que pueda estar tomando el individuo. Las dosificaciones óptimas se pueden establecer usando un ensayo y procedimientos rutinarios que se conocen bien en la técnica.

La cantidad de cada miembro de combinación que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del individuo tratado y del modo de administración particular. En algunas realizaciones, las formas de dosificación unitarias que contienen la combinación de agentes, tal y como se describe en el presente documento, contienen cantidades de cada agente de la combinación que se administran típicamente cuando los agentes se administran solos.

La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo del compuesto usado y la afección particular a tratar o prevenir. En general, se prefiere el uso de la dosificación mínima que es suficiente para proporcionar la terapia eficaz. Los pacientes generalmente se controlan en cuanto a la eficacia terapéutica usando ensayos apropiados para la afección que se trata o previene, que resultará familiar para los expertos comunes en la técnica.

La presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad proliferativa que comprende administrar a dicho sujeto un COMBINACIÓN DE LA INVENCION en una cantidad, que se eficaz de manera conjunta y terapéutica frente a una enfermedad proliferativa. En particular, la enfermedad proliferativa a tratar con la COMBINACIÓN DE LA INVENCION está seleccionada entre melanoma, melanoma maligno uveal,

melanoma maligno uveal metastásico, melanoma maligno uveal con mutación GNAQ o GNA11 y melanoma maligno uveal metastásico con mutación GNAQ o GNA11.

Además, el tratamiento puede comprender cirugía o radioterapia.

La presente invención además se refiere a la COMBINACIÓN DE LA INVENCION para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, particularmente cáncer, tal como melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico, melanoma maligno uveal mutante GNAQ o GNA11 y cáncer, y más particularmente melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico y melanoma maligno uveal metastásico con mutación GNAQ o GNA 11.

La presente invención además proporciona un envase comercial que comprende como agentes terapéuticos la COMBINACIÓN DE LA INVENCION, junto con instrucciones para administración simultánea, la administración por separado o secuencial del mismo para su uso en el retardo del avance o tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesita.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención descrita con anterioridad; Los efectos beneficiosos de la combinación farmacéutica de la presente invención también se pueden determinar por medio de otros modelos de ensayo conocidos por parte de la persona experta en la técnica pertinente.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Estirpes celulares y cultivo celular

Se sometieron a cultivo estirpes celulares de melanoma maligno uveal 92.1 y OMM-1 en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (American Type Culture Collection (ATCC #30-2001)) complementado con 10 % de suero bovino fetal y se incubó a 37 °C/5 % de dióxido de carbono. La estirpe celular 92.1 posee una mutación GNAQ y la estirpe celular OMM1 alberga una mutación en GNA11.

Preparación de compuesto para experimentación *in vitro*

Se prepararon reservas de compuesto 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona, en lo sucesivo AEB071 y de (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico, en lo sucesivo COMPUESTO B, en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 10 mM.

Medición de proliferación por medio de xCELLigence

Se controló de forma continua la proliferación de células uveales con el analizador de células xCELLigence en tiempo real. Se incubaron placas-E (Roche #05 232 368 001) con células añadidas a una concentración final de 3000 células por cada 100 µl por pocillo. Se midió la impedancia cada 2 horas y durante 24 horas. Después de 24 horas, se añadieron DMSO, COMPUESTO B, AEB071 o ambos compuestos a los pocillos a una concentración final de 1 µM por compuesto hasta un volumen total de 120 µl. Se midió la impedancia cada 2 horas y durante 7 horas. Se normalizaron los datos al día 0 antes de la adición del compuesto.

Se muestra el efecto de 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona (COMPUESTO A) y (2-hidroxietoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico (COMPUESTO B) sobre la proliferación de melanoma maligno uveal *in vitro* (Figura 1). Se midió la proliferación de estirpes celulares de melanoma maligno uveal durante el trascurso de 6 días por medio de tecnología xCELLigence en presencia de DMSO 0,5 µM, AEB071 0,5 µM, COMPUESTO B 0,5 µM o AEB071 0,5 µM + COMPUESTO B 0,5 µM. En las estirpes celulares 92.1 y OMM1 que poseen mutaciones GNAQ y GNA11, respectivamente, AEB071 retardó la proliferación celular; este efecto se exacerbó cuando estuvo en combinación con el COMPUESTO B. El COMPUESTO B como agente individual presentó un efecto modesto sobre la proliferación en estirpes celulares de melanoma maligno uveal tanto 92.1 como OMM1; resultó bastante impactante que la combinación de los dos agentes fuese capaz de suprimir por completo la proliferación de ambas estirpes celulares.

EJEMPLO 2

Estirpes celulares y cultivo celular

Como en el caso del Ejemplo 1

Preparación de compuesto para experimentación *in vitro*

Como en el caso del Ejemplo 1.

Proliferación celular en combinación con matriz de dosis

5 Se sembraron células a una densidad de 3000 células por cada 100 μ l de medio por pocillo en placas de 96 pocillos (Costa #3904) y se incubó durante la noche antes de la adición del compuesto. Se preparó una reserva de compuesto en el medio de cultivo apropiado y se añadió manualmente a las placas por medio de una pipeta electrónica de multi-canal en tres réplicas. Se trataron las células con el compuesto solo o con una combinación de AEB071 y COMPUESTO B diluido 1:2 para una dilución de diez puntos que varió de 0,039 μ M a 10 μ M. Se evaluó la viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto y después de 144 horas de tratamiento, por medio de cuantificación de los niveles celulares de ATP a través de Cell Titer Glo (Promega #G7571) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se leyeron las placas sobre un lector de placas de luminiscencia (Victor X4, Perkin Elmer). Se calculó la inhibición fraccionaria de la proliferación usando XLIft y se normalizó con respecto a los pocillos que no contenían compuesto. Para la inhibición de la proliferación, se sustrajeron los valores 0 antes del cálculo de la inhibición. Se analizaron los datos por medio de un soporte lógico Chalice (<http://chalice.zalocus.com/documentation/analyzer/index.jsp>) para calcular la inhibición de proliferación, la inhibición y el exceso de HSA.

20 RESULTADOS

El efecto anti-proliferativo de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B se debe a la sinergia entre los dos agentes, como queda demostrado en la Figura 2. La Figura 2 proporciona una vista estrecha de los patrones de sinergia entre los dos agentes en la estirpe celular 92.1. Se muestra la matriz de dosis entre los dos agentes; el efecto sobre la proliferación celular con respecto a las células no tratadas se muestra en el panel superior, la inhibición en exceso (HSA) en el panel central y la inhibición de proliferación con respecto a la normalización en el día cero en el panel inferior. Los métodos de cálculo para la inhibición de la proliferación, la inhibición y el exceso de HSA se conocen en la técnica.

30 Ambos agentes individuales COMPUESTO B y AEB071 fueron activos en la estirpe celular 92.1, pero de manera importante la combinación de los dos agentes dio como resultado más que magnitudes de respuesta aditivas a dosis bajas. Por ejemplo, 0,16 μ M de agente individual COMPUESTO B dio lugar a un 57 % de inhibición de la proliferación, y el agente individual AEB071 a 0,16 μ M dio un 19 % de inhibición de la proliferación, pero la combinación de los dos agentes a estas dosis dio como resultado la inhibición de la proliferación de un 82 % (Figura 2, panel superior). Esta combinación de dosis representó una inhibición de exceso de 25 como se aprecia en el panel medio de la Figura 2. Los valores de inhibición e inhibición en exceso para todas las combinaciones de dosis se pueden apreciar en la Figura 2. La tasa de proliferación de células durante el ensayo de 3 días se tuvo en cuenta para el cálculo del porcentaje de inhibición de proliferación mostrado en la Figura 2, panel inferior. 100 % indicó estasis, que significa que las células no tuvieron proliferación ni se murieron durante el transcurso del ensayo, valores por encima de 100 indican muerte, 200 muerte celular completa, y valores por debajo de 100 indican proliferación a partir del comienzo del ensayo hasta el punto final del día 3.

EJEMPLO 3: Perfil bioquímico por medio de ensayo de inmunotransferencia de proteínas tras tratamiento con fármaco de estirpes celulares de melanoma maligno uveal 92.1 y OMM1.

45 Se incubaron células de melanoma maligno uveal con AEB071 0,5 μ M, COMPUESTO B 0,5 μ M, ambos compuestos o DMSO solo. Se sometieron a lisis las células trascurridas 2, 4, 8, 24 o 48 horas de tratamiento en tampón de extracción de proteína de mamífero M-PER que contenía un comprimido de mezcla de inhibidor de fosfatasa PhosStopo (Roche Diagnostics #04 906 837 001) y comprimido de mezcla de inhibidor de proteasa completo (Roche Diagnostics # 11 836 145 001). Se prepararon proteínas en un gel Bis-Tris NuPAGE SDS al 4-12 % (Invitrogen #WG1403Bx10) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia en seco (Invitrogen iBLOT). Se detectaron proteínas con diluciones 1:1000 de anti-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies # 4377), anti-pMARCKS (Cell Signaling Technologies #2741), anti-pMEK1/2 (Cell Signaling Technologies # 9121) y anti-Beta Actina (Ambion# AM4202). Se detectó beta actina usando un anticuerpo secundario apropiado y un sistema de detección de colorante por infra-rojo (Odyssey IRDye, LI-COR) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se detectaron el resto de proteínas usando un anticuerpo secundario anti-conejo-HRP y se desarrolló con Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Thermo Scientific # 34076) en un sistema de formación de imágenes Syngene.

60 RESULTADOS

Se evaluó el efecto bioquímico de estos agentes tras el tratamiento con AEB071 0,5 μ M, COMPUESTO B 0,5 μ M o 0,5 μ M de cada agente junto con las estirpes celulares 92.1 y OMM-1 de melanoma maligno uveal. Se atenuó el nivel de pMARCKS (Figura 3). La adición del COMPUESTO B A AEB071 no tuvo efecto alguno sobre la expresión de pMARCKS. El tratamiento de las mismas células con el COMPUESTO B condujo a una reducción de los niveles de pERK1/2, como pudo observarse a las 2 horas, a las 24 horas comienza a volver la expresión de pERK1/2. Además, el tratamiento del COMPUESTO B de agente individual condujo a la inducción de la expresión de pMEK1/2

con el tiempo en ambas estirpes celulares; esto se observó claramente tras 48 horas de tratamiento. Sorprendentemente, únicamente la combinación de AEB071 y COMPUESTO B mostró eliminación retardada de pERK1/2, pMEK1/2. De manera significativa, AEB071 evitó claramente la inducción de pMEK provocada por el tratamiento del agente individual COMPUESTO B. La combinación de AEB071 y COMPUESTO B eliminó los componentes de mecanismo en gran magnitud y duración en comparación con cualquier agente individual.

Se usó el modelo de xenoinjerto en ratón atímico con melanoma maligno uveal humano 92.1 que posee una mutación *GNAQ* para evaluar la actividad *in vivo* de AEB071, COMPUESTO B y una combinación de AEB071 y COMPUESTO B como se muestra en los Ejemplos 4, 5 y 6. Como puede verse a partir de los resultados obtenidos, la sinergia *in vitro* observada entre el COMPUESTO B y AEB071 se tradujo en eficacia *in vivo*. Como se muestra en la Figura 4 el tratamiento de monoterapia AEB071 dio como resultado un T/C de 3 % ($p < 0,01$) y la adición de COMPUESTO B dosificado dos veces al día a 3,5 mg/kg al régimen AEB071 dio como resultado un T-T0 de -22 % ($p < 0,001$ actividad media, pero no fue significativo en comparación con AEB071 solo). El COMPUESTO B no tuvo actividad por sí mismo con T/C de un 84 %. La combinación de los dos compuestos evitó intensamente la proliferación tumoral en el modelo 92.1 de melanoma maligno uveal *in vivo*. Además, el tratamiento a dosis múltiples de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B resultó eficaz en el modelo 92.1 *in vivo* de melanoma maligno uveal, como se muestra en la Figura 6. La eficacia de la combinación aumentó de forma dependiente de la dosis, con un aumento de la dosis de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B que da como resultado una mayor magnitud de respuesta.

EJEMPLO 4: Evaluación de la actividad *in vivo* en el modelo de xenoinjerto en ratón atímico de melanoma maligno uveal humano 92.1.

Preparación de compuesto para experimentación *in vivo*

Se añadió polvo de NVP-AEB071 (también denominado AEB071) (sal de acetato, 87,96 % base libre) a polietilenglicol 400 al 20 % (PEG400): 4,5 % HCl 0,1 M: 75,5 % de dextrosa al 5 % en agua (D5W), designado como Vehículo 1 y se agitó para obtener una disolución roja transparente. Se formuló NVP-COMPUESTO B (también denominado COMPUESTO B) como suspensión homogénea en carboximetil celulosa al 1 %: 0,5 % de Tween® 80 en agua desionizada. Se preparó una suspensión nueva una vez por semana para cada compuesto y se almacenó a 4 °C.

Ratones

Los ratones atímicos hembra (CrI:NU (Ncr)-Foxnlnu, Charles River) fueron de 9 semanas, y tenían un intervalo de peso corporal (BW) de 20,6-26,9 g, en el D1 del estudio. Se alimentó a los animales a demanda con agua (ósmosis inversa, 1 ppm Cl) y NIH 31 Modificado y Irradiated Lab Diet® que consistió en 18,0 % de proteína bruta, 5,0 % de grasa bruta y 5,0 % de fibra bruta. Se albergó a los ratones sobre Lechos para Animales de Laboratorio Enrich-o'cobs™ en micro-aisladores estáticos en un ciclo de 12 horas de luz a 20-22 °C (68-72 °F) y 40-60 % de humedad. DRS-NC cumple específicamente con las recomendaciones de Guide for Care and Use of Laboratory Animals con respecto a los procedimientos de restricción, cultivo, cirugía, alimentación y regulación de líquidos, y cuidados veterinarios. El programa animal en DRS-NC está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) Internacional, que garantiza el cumplimiento con normas aceptadas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Implantación de Tumores y Medición

Se cultivaron células de melanoma maligno uveal 92.1 durante la proliferación exponencial, y se resuspendieron en PBS frío (disolución salina de tampón de fosfato) con 50 % de Matrigel™ (BD Biosciences). Se inoculó cada ratón por vía subcutánea en la pata derecha con 5×10^6 células (0,2 ml de suspensión celular). Se calibraron los tumores en dos dimensiones para controlar el crecimiento a medida que su volumen medio alcanzó el intervalo deseado de 100-150 mm³. Se calculó el tamaño tumoral, en mm³, a partir de:

$$\text{Volumen Tumoral} = (w^2 \times l)/2$$

en la que w = anchura y l = longitud, en mm, del tumor. Se pudo estimar el peso tumoral asumiendo que 1 mg fue equivalente a 1 mm³ de volumen tumoral. Doce días después de la implantación de las células tumorales, en el Día 1 (D1) del estudio, se clasificaron los animales con volúmenes tumorales individuales de 108-256 mm³ en seis grupos ($n = 10/\text{grupo}$) con volúmenes medios tumorales por grupo de 153-159 mm³.

Se administró AEB071 a 91 mg/kg con dosificación de tres veces al día (TID) durante 21 días. Se determinó la eficacia a partir de la inhibición de proliferación tumoral en el día 17, el último día con todos los ratones del estudio. Se calculó la actividad en tumor/control (T/C), el cambio en porcentaje del volumen tumoral medio desde el día 1 hasta el día 17 en ratones tratados con fármaco (ΔT) frente a ratones tratados con vehículo, o como T/T0, porcentaje de reducción en el grupo de volumen tumoral medio desde el día 1. Como se muestra en la figura 4, el tratamiento AEB071 de monoterapia dio como resultado un T/C de un 3 % ($p < 0,01$). La adición de COMPUESTO B dosificado

dos veces al día a 3,5 mg/kg al régimen AEB071 dio como resultado un T-T0 de un -22 % ($p < 0,001$ actividad media, pero no fue significativo en comparación con AEB071 solo). El COMPUESTO B no tuvo actividad por sí mismo con T/C de un 84 %.

5 EJEMPLO 5

Preparación de compuesto para experimentación *in vivo*

Como en el caso del Ejemplo 4

10

Ratones

Como en el caso del Ejemplo 4

15 Implantación de Tumores y Medición

Como en el caso del Ejemplo 4

20 EJEMPLO 6

Preparación de compuesto para experimentación *in vivo*

Como en el caso del Ejemplo 4

25 Ratones

Como en el caso del Ejemplo 4

Implantación de Tumores y Medición

30

Como en el caso del Ejemplo 4

La monoterapia de AEB071 produjo la estasis tumoral media casi completa durante el período de dosificación al tiempo que la combinación provocó la reducción media tumoral más modesta. Dos semanas después del período de dosificación, los tumores evolucionaron en el punto de control en los grupos de tratamiento de monoterapia AEB071, mientras que los tumores evolucionaron más lentamente en el grupo de combinación (Figura 5).

35

La Figura 5 muestra la proliferación tumoral *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de ratón atímico con melanoma maligno uveal 92.1 seguido durante > 70 días. Se dosificó a los ratones durante 21 días, el tratamiento se interrumpió y se controló la excrecencia tumoral. Dos semanas después del período de dosificación, los tumores evolucionaron en el punto de control en los grupos de tratamiento de monoterapia AEB071, mientras que los tumores evolucionaron a una tasa más lenta en el grupo de combinación. No se calculó el retardo de la proliferación tumoral debido a que dos o más tumores por grupo se volvieron estáticos tras el período de proliferación inicial, pero la tendencia de la tasa de excrecencia tumoral indicó que con la combinación AEB071 más COMPUESTO B los tumores proliferaron más lentamente que con el agente individual AEB071. Los tumores tratados con el agente individual COMPUESTO B no se controlaron debido a la falta de eficacia. Estos datos indicaron que la combinación de AEB071 con COMPUESTO B tuvo una magnitud de respuesta mayor en comparación con cualquier agente individual en el modelo 92.1 *in vivo* de melanoma maligno uveal.

40

45

La Figura 6 muestra que el tratamiento a dosis múltiples de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B resultó eficaz en un estudio *in vivo* que usó el modelo 92.1 de melanoma maligno uveal. La eficacia de la combinación aumentó de forma dependiente de la dosis, con un aumento de la dosis de AEB071 en combinación con el COMPUESTO B que da como resultado una mayor magnitud de respuesta. Se administró AEB071 a 90,95, 45,58 y 22,74 mg/kg, (equivalente a 80, 40 y 20 mg/kg de base libre) con una dosificación de tres veces al día (TID) durante 21 días en combinación con el COMPUESTO B a 3,5 mg/kg con una dosificación de dos veces al día en el modelo de xenoinjerto en ratón atímico de melanoma maligno uveal humano 92.1. Se determinó la eficacia a partir de la inhibición de proliferación tumoral en el día 22. Se calculó la actividad en tumor/control (T/C), el cambio en porcentaje del volumen tumoral medio desde el día 1 hasta el día 22 en ratones tratados con fármaco (ΔT) frente a ratones tratados con vehículo, o como T/T0, porcentaje de reducción en el grupo de volumen tumoral medio desde el día 1. Como se muestra en la Figura 6, la monoterapia AEB071 a 90,95 mg/kg dio como resultado T/C de un 18 % ($p < 0,05$). La monoterapia con 45,5 y 22,7 mg/kg dio como resultado T/C de un 52 % y un 92 % respectivamente, e inhibición media no significativa. La adición del COMPUESTO B dosificado diariamente en 3. /kg con dosis de AEB071 de 90,95 y 45,58 mg/kg dio como resultado un T-T0 de -52 % y -12 % respectivamente ($p < 0,001$). El COMPUESTO B no tuvo actividad por sí mismo en este modelo *in vivo* con T/C de un 56 %. La combinación a dosis elevada dio como resultado cuatro regresiones parciales.

50

55

60

65

Conclusión

Se proporciona evidencia experimental de que la inhibición combinada de PKC y MEK es sinérgica y eficaz en melanoma maligno uveal. Esta combinación resulta beneficiosa en el establecimiento de mutaciones de activación GNAQ o GNA11, ya que las mutaciones de activación en cualquier gen conducen a dependencia de la formación de señales de PKC. La combinación de estos agentes es antiproliferativa *in vitro* y eficaz *in vivo*. La inhibición PKC en estirpes celulares de melanoma maligno uveal atenúa pMARCKS, pero tiene un efecto más modesto en los niveles de pERK1/2. La inhibición de MEK de agente individual es capaz de bloquear pERK1/2, no obstante los niveles de pMEK1/2 se inducen con el tiempo con el inhibidor de MEK que conduce a la reactivación de pERK1/2. Únicamente la combinación de inhibición de MEK y PKC es capaz de lograr una fosforilación atenuada y retardada de MARCKS, ERK1/2 y MEK1/2.

EJEMPLO 7

Este es un estudio de multi-centro, multinacional, sin anonimato de la combinación de AEB071 y el COMPUESTO B. Los pacientes son pacientes con diagnóstico de melanoma maligno uveal metastásico. Existen dos partes en el estudio. La Fase Ib es un estudio de escalado de dosis y la Fase II es una evaluación de grupo-paralelo de dos ramas aleatorizado, del MTD/RP2D {MTD (dosis máxima tolerada)/RP2D (fase de dos dosis recomendada)} obtenido a partir de la Fase Ib. El estudio está diseñado sin anonimato ya que todos los pacientes reciben la misma dosis que otros pacientes implicados en la misma cohorte de dosis en la parte de la Fase Ib del estudio, y reciben bien MTD/RP2D para la combinación de AEB071 y COMPUESTO B BID (dos veces al día) o 45 mg de COMPUESTO B BID (dos veces al día) únicamente en el estudio de Fase II.

Los tratamientos de investigación objeto de evaluación en la Fase Ib y la Fase II consisten en AEB071 y COMPUESTO B o COMPUESTO B como agente individual en la Fase II. Se administran los tratamientos de investigación en forma de dosis fija-plana, y no por medio de peso corporal o área superficial corporal.

Todos los pacientes reciben el tratamiento diariamente en un programa de 28 días (un ciclo), sin interrupción entre ciclos. Cada paciente puede continuar en tratamiento hasta que no se obtenga beneficio alguno o experimente episodios adversos significativos, que precisen la retirada, interrupción a criterio del investigador, o retirada del consentimiento.

La Fase Ib es un estudio de escalado de dosis diseñado para determinar MTD (dosis máxima tolerada) y RP2D (fase recomendada de dos dosis) de la terapia de combinación.

Se administran AEB071 y el COMPUESTO B a todos los pacientes en el estudio de Fase Ib, y se evalúa la dosis de combinación por motivos de seguridad aumentando la dosis de AEB071 en combinación con una dosis de 30 mg del COMPUESTO B.

El objetivo de la parte de Fase II del presente estudio es evaluar la respuesta frente a la enfermedad por medio del uso de mediciones objetivas del tamaño tumoral, y para caracterizar de forma adicional la seguridad y la tolerancia. Para contribuir en la presente evaluación, los pacientes se someten a aleatorización central en modo 1:1 para recibir bien MTD/RP2D para la combinación de AEB071 y COMPUESTO B BID o 45 mg de COMPUESTO B BID (dos veces al día) de forma única.

Se administran tanto AEB071 y COMPUESTO B por vía oral BID (dos veces al día) en las dosis especificadas en la Tabla siguiente, en base diaria, durante cada ciclo de 28 días.

Tabla: Programa de tratamiento y Dosis

Tratamiento de Estudio	Forma farmacéutica y ruta de administración	Dosis (dosis diaria total) mg		Frecuencia y/o Régimen
		Fase I	Fase II	
AEB071	Comprimido para uso oral	400 (800)	RP2D (2xRP2D)	Diario (ciclos de 28 días)
COMPUESTO B	Comprimido para uso oral	30 (60)	45 (90)	Diario (ciclos de 28 días)

Se administran fármacos mientras las evaluaciones tumorales se encuentran en revisión por parte de la plantilla. Si se encontró que el paciente había progresado, el tratamiento se interrumpió de forma inmediata.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende o consiste en:
- 5 (a) un compuesto inhibidor de proteína quinasa C (PKC) que es 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
 (b) un compuesto inhibidor de proteína quinasa activado por mitógeno (MEK) que es (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo
- 10 para administración simultánea, separada o secuencial.
2. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para administración simultánea del compuesto de inhibidor de PKC y el compuesto de inhibidor de MEK.
4. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el compuesto inhibidor de PKC y el compuesto inhibidor de MEK se administran como formas de dosificación por separado.
- 20 5. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para administración secuencial del compuesto de inhibidor de PKC y el compuesto de inhibidor de MEK.
- 25 6. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la combinación farmacéutica se formula para administración oral.
7. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la combinación farmacéutica se formula en forma de comprimido o comprimidos.
- 30 8. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el cáncer es melanoma maligno uveal, melanoma maligno uveal metastásico, melanoma maligno uveal con mutación GNAQ y melanoma maligno uveal con mutación GNA11.
- 35 9. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el cáncer es melanoma maligno uveal con mutación GNAQ.
10. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el cáncer es melanoma maligno uveal con mutación GNA11.
- 40 11. Una combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que (a) el compuesto inhibidor de PKC y (b) el compuesto inhibidor de MEK se proporcionan en cantidades sinérgicamente eficaces para el tratamiento de cáncer.
- 45 12. Una preparación combinada que comprende (a) una o más formas de dosificación unitarias del compuesto inhibidor de PKC 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-quinazolin-4-il]-1*H*-pirrol-2,5-diona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) una o más formas de dosificación unitarias del compuesto inhibidor de MEK (2-hidroxi-etoxi)-amida de ácido 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 50 13. Una composición farmacéutica que comprende una combinación como se define en la reivindicación 1 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el inhibidor de PKC y el inhibidor de MEK se proporcionan en cantidades sinérgicamente eficaces para el tratamiento de cáncer.

Figura 1

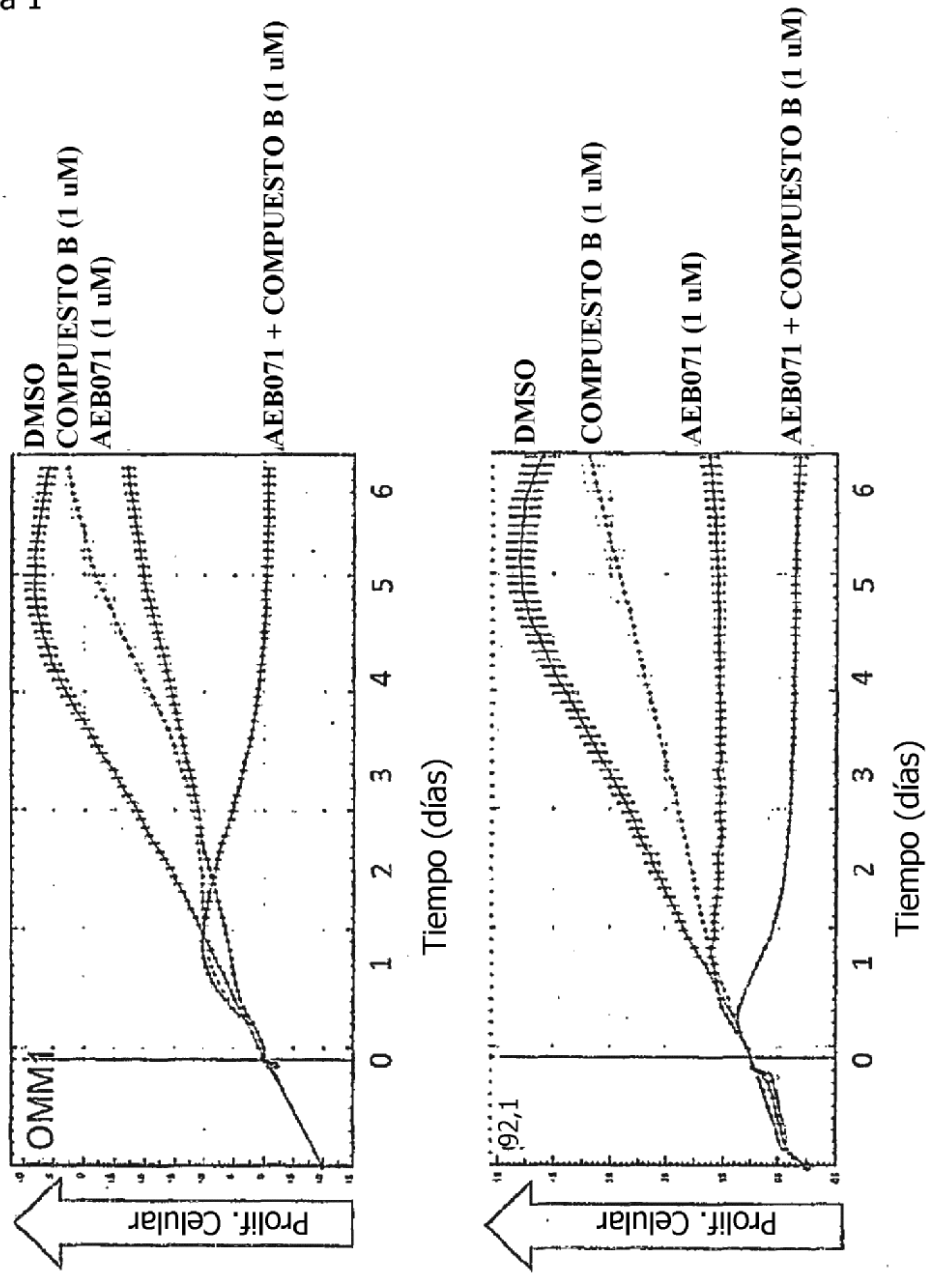


Figura 2A

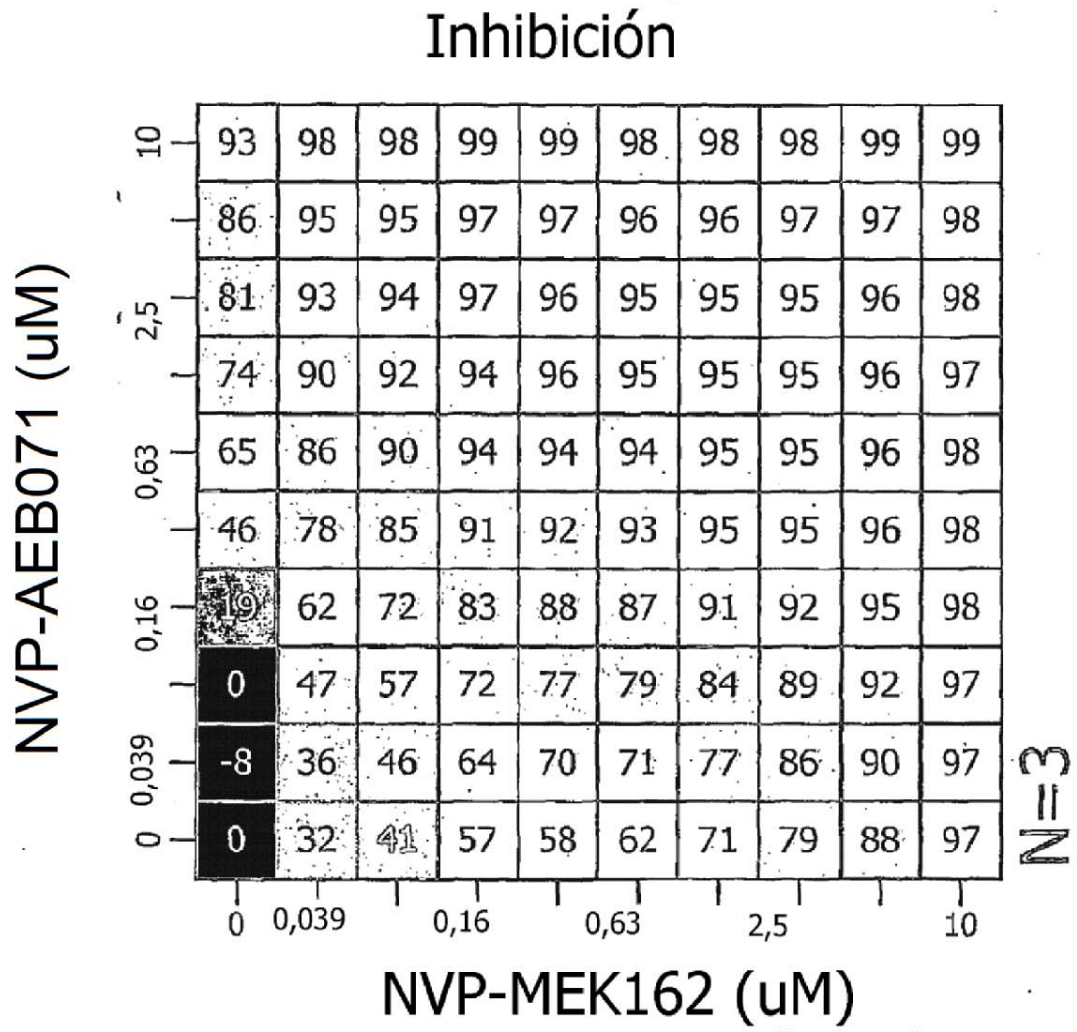


Figura 2B

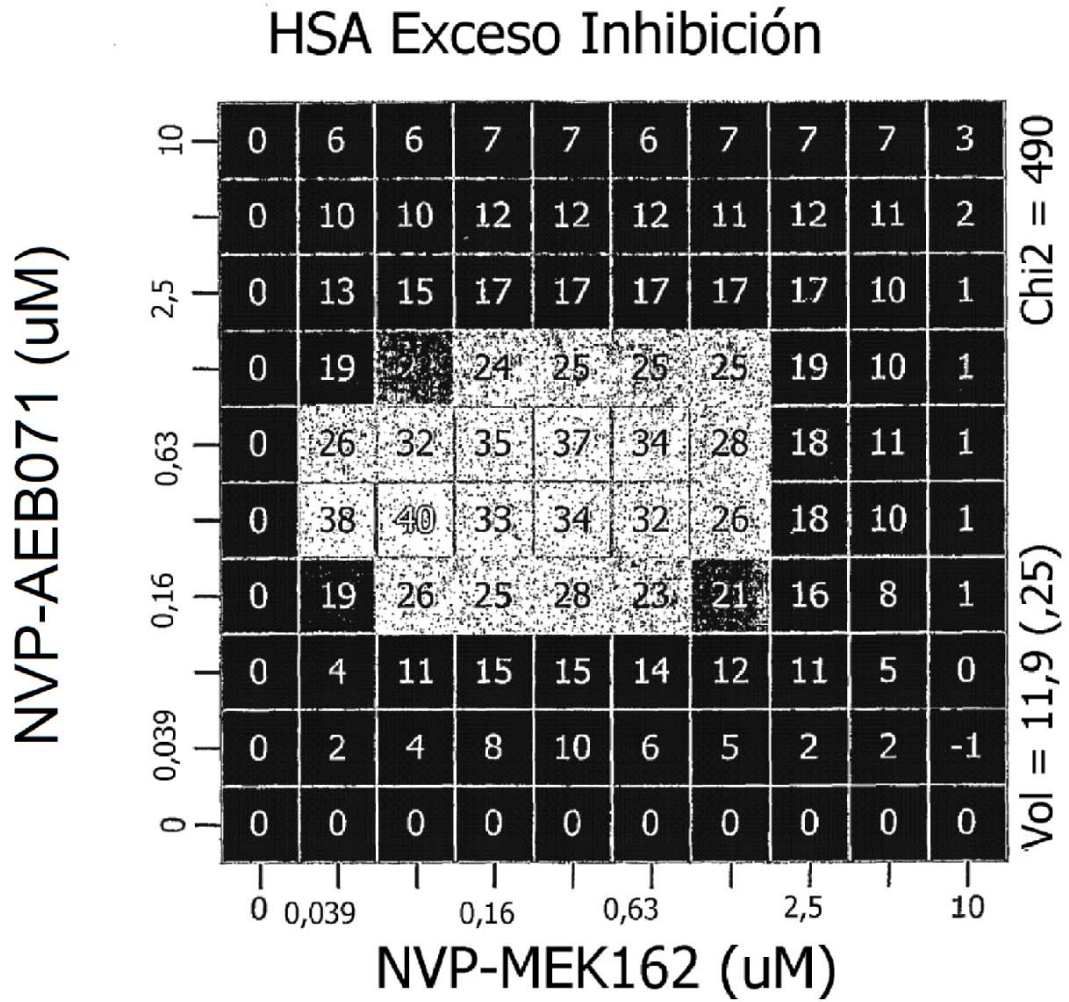


Figura 2C

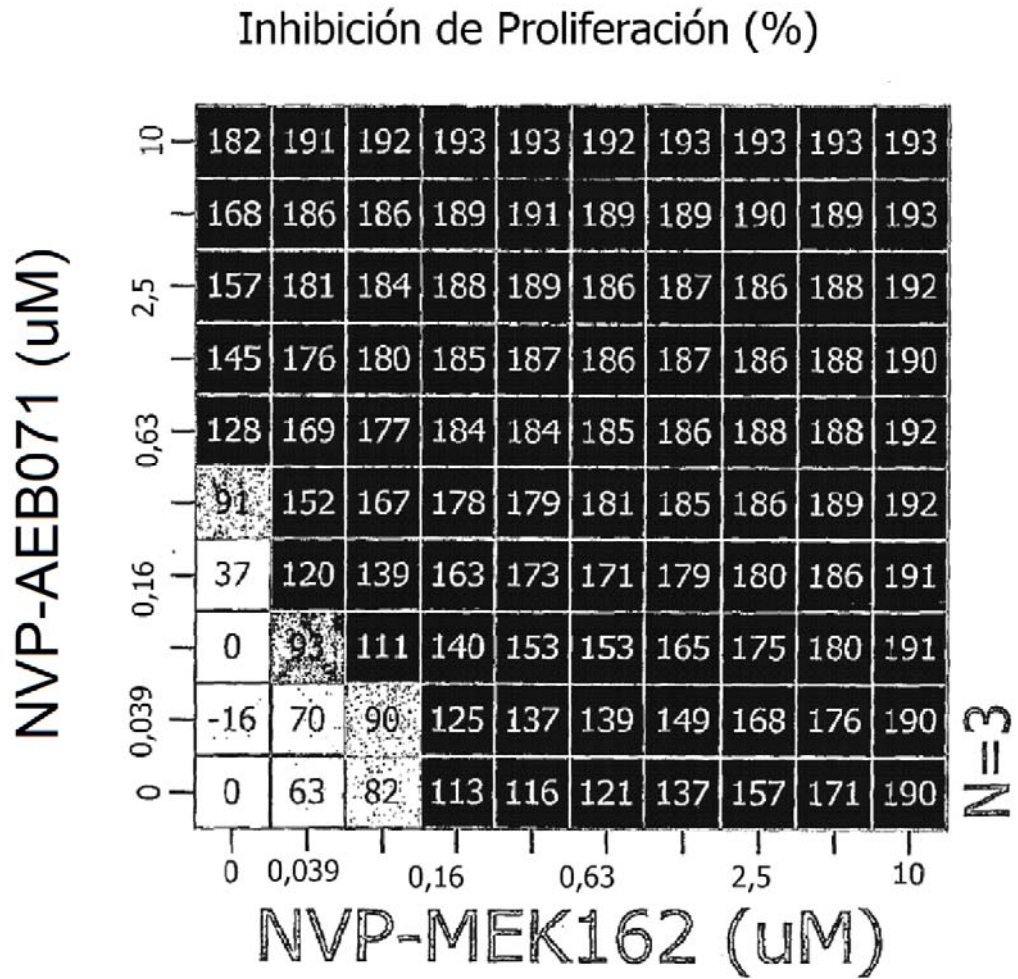


Figura 3

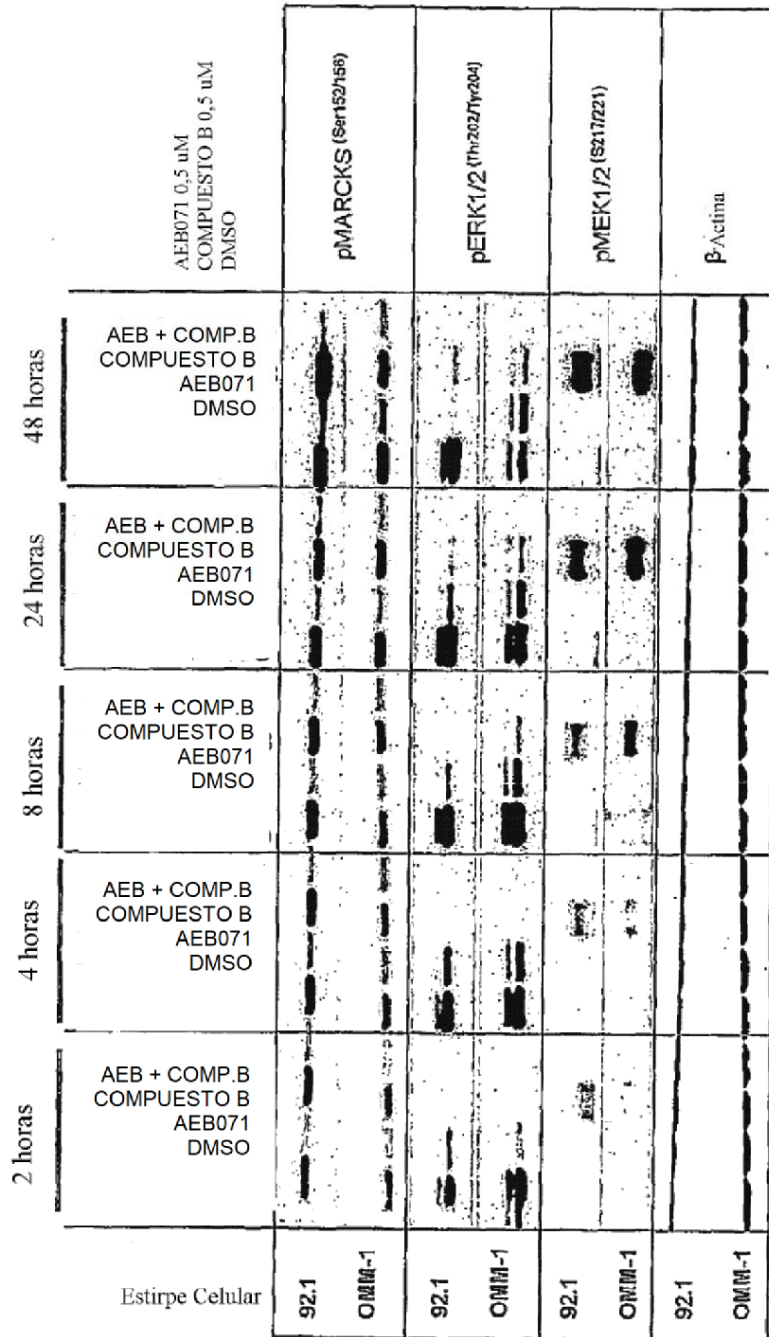


Figura 4

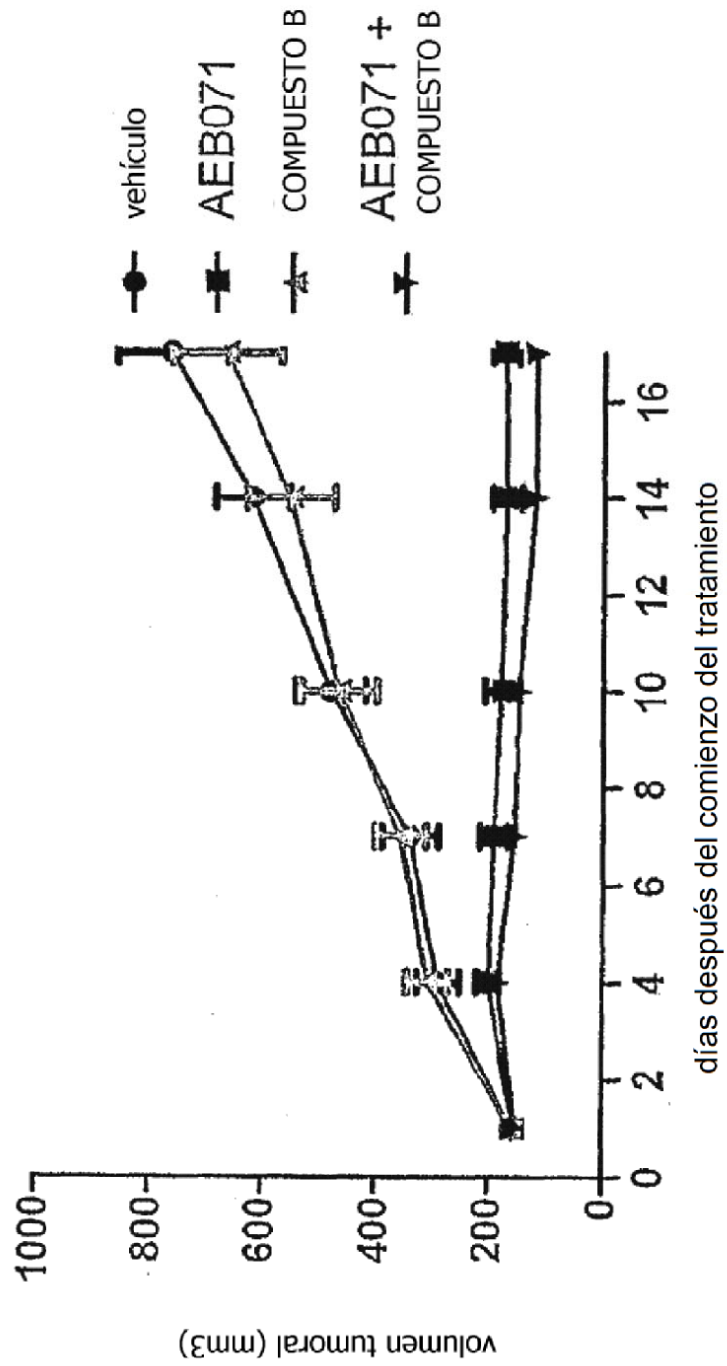


Figura 5

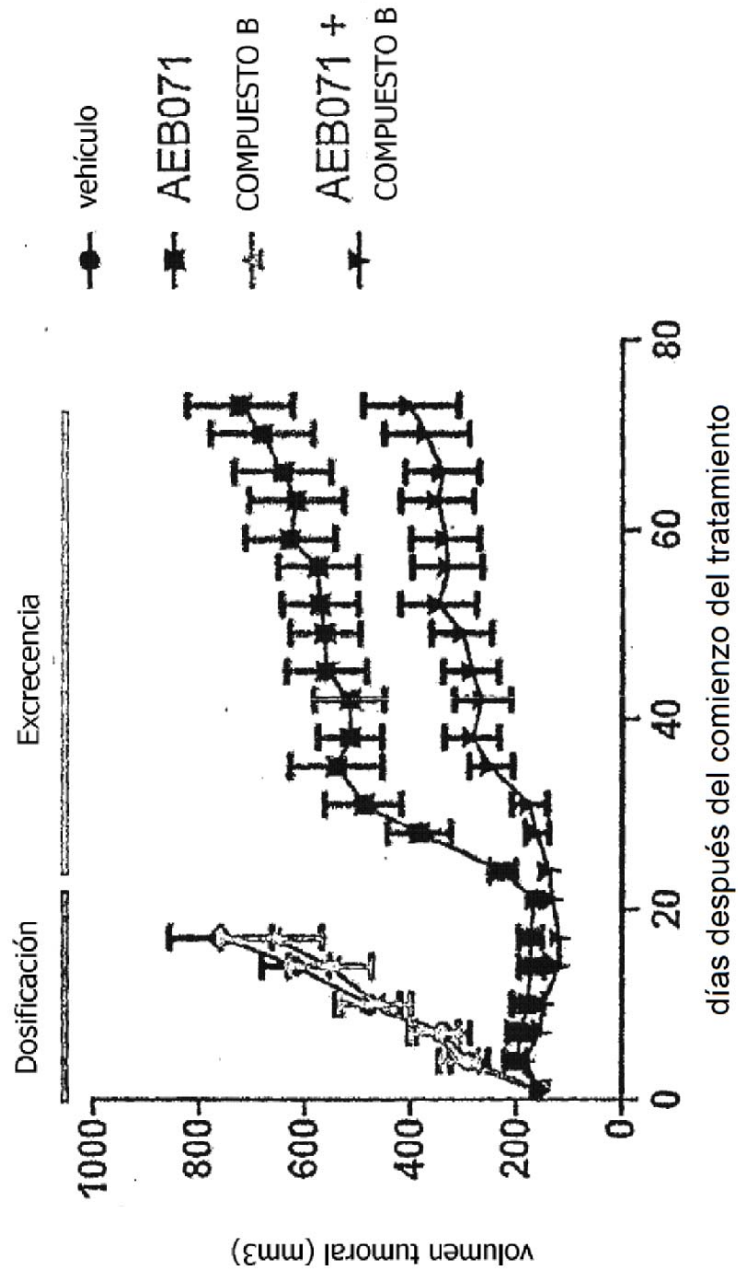


Figura 6

