

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 929**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4025 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2014** **PCT/IB2014/063022**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15004636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2014** **E 14822283 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 3019166**

54 Título: **Una combinación farmacéutica para el tratamiento del melanoma**

30 Prioridad:

12.07.2013 US 201361845749 P

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

03.12.2019

73 Titular/es:

PIRAMAL ENTERPRISES LIMITED (100.0%)
Piramal Tower, Ganpatrao Kadam Marg,
Lower Parel, Mumbai 400 013, IN

72 Inventor/es:

AGARWAL, VEENA;
PERIYASAMY, GIRIDHARAN;
RATHOS, MAGGIE;
SRIVASTAVA, ANKITA y
SRINIVASA, SREESHA

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP

ES 2 733 929 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

Una combinación farmacéutica para el tratamiento del melanoma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de la CDK (quinasa dependiente de la ciclina) representado por un compuesto de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF (serina/treonina proteína quinasa B-raf) o un inhibidor de MEK (proteína quinasa activada por mitógenos), para su uso en el tratamiento del melanoma. La invención también se refiere a un método de tratamiento del melanoma en el que se usa la combinación farmacéutica.

Antecedentes de la invención

El melanoma es el tipo más grave de cáncer de piel. El melanoma, de hecho, es un tumor maligno que se origina en las células denominadas melanocitos, que son células productoras de pigmento. Se produce con mayor frecuencia en la piel, pero también puede desarrollarse en el ojo o en el revestimiento de la nariz, de la boca o de los genitales. Posteriormente, el melanoma puede propagarse a los órganos internos. Cuando el melanoma se produce en la piel, se conoce como melanoma cutáneo. Cuando el melanoma se produce en el ojo, se denomina melanoma ocular o intraocular. La incidencia del melanoma está aumentando en todo el mundo, se informa que el melanoma maligno es responsable del 80 % de las muertes por cáncer de piel (*N. Engl. J. Med.*, 2010, 363, 8, 711-723).

Cuando el melanoma se disemina, se suelen encontrar células cancerosas en los ganglios linfáticos. Cuando el cáncer llega a los ganglios linfáticos, es una indicación de que las células cancerosas pueden haberse diseminado a otras partes del cuerpo, tales como el hígado, los pulmones o el cerebro, dando lugar al melanoma metastásico. De hecho, las metástasis del melanoma son muy agresivas y el tiempo de supervivencia para los pacientes con melanoma metastásico es de una media de solo 3 a 15 meses. Desafortunadamente, no existe un tratamiento eficaz para el melanoma metastásico. El diagnóstico precoz y la extirpación quirúrgica inmediata son las opciones posibles para los pacientes para una posible cura. El régimen terapéutico para el melanoma metastásico inicialmente se componía de fármacos tales como la interleucina-2, la dacarbazina, la temozolomida, la fotemustina y el carboplatino, pero cada uno está asociado con una tasa de respuesta deficiente y una supervivencia global deficiente. Por ejemplo, se encontró que la dacarbazina estaba asociada con una tasa de respuesta del 7-12 % y una supervivencia global media de 5-8 meses tras iniciarse el tratamiento (*N. Engl. J. Med.*, 2011, 364, 26, 2507-2516).

En un estudio de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) en un gran panel de cánceres comunes, se encontró que el 40-60 % de los melanomas son portadores de una mutación activadora en el gen que codifica la serina/treonina proteína quinasa B-raf (BRAF). Entre las mutaciones de BRAF observadas en el melanoma, más del 90 % están en el codón 600, y entre estas, más del 90 % son una mutación de un solo nucleótido que da lugar a la sustitución de la valina por ácido glutámico (BRAV600E). La segunda mutación más común es BRAV600K, que sustituye la valina por lisina, que representa el 5-6 % de los melanomas, seguida de BRAV600R (que sustituye la valina por arginina) y BRAV600D (que sustituye la valina por ácido aspártico) (*Journal of Translational Medicine*, 2012, 10, 85, 1-9).

Se ha encontrado que los inhibidores de BRAF son eficaces en la contracción tumoral en la mayoría de los pacientes con melanoma mutante BRAF a bajas concentraciones nanomolares. Los factores limitantes en la eficacia son la resistencia al fármaco y la supervivencia sin progresión, que se limita a 5-7 meses. Algunos ejemplos de inhibidores potentes de BRAV600 incluyen BAY43-9006 (sorafenib, Bayer), vemurafenib (PLX4032, Plexxikon; RG7204, RO5185426, Hofmann-LaRoche), GDC-0879 (GlaxoSmithKline), dabrafenib (GSK2118436, GlaxoSmithKline), PLX4720 (Hofmann-LaRoche), BMS-908662 (XL281, Bristol-Myers Squibb), LGX818 (Novartis), PLX3603 (RO5212054, Hofmann-LaRoche), ARQ-736 (ArQule), DP-4978 (Deciphera) y RAF265 (Novartis).

El vemurafenib es un potente inhibidor de BRAF mutante; En particular, del mutante BRAV600E. El vemurafenib indujo la regresión tumoral completa o parcial en el 81 % de los pacientes que tenían melanoma con la mutación BRAV600E. Se observaron respuestas en todos los sitios de la enfermedad, incluyendo el hueso, el hígado y el intestino delgado. Sin embargo, después de una respuesta precoz fiable hacia el vemurafenib, se encontró que los tumores sensibles desarrollaron resistencia al tratamiento. En algunos pacientes con mutaciones BRAV600E, los tumores mostraron resistencia sin evidencia de una respuesta precoz (*N. Engl. J. Med.*, 2010, 363, 9, 809-819). El dabrafenib es un inhibidor potente y selectivo de RAF quinasa de las enzimas BRAF y CRAF humanas de tipo silvestre, así como de formas mutantes BRAV600E, BRAV600K y BRAV600D.

Las MEK1 y MEK2 son quinasas de especificidad doble que catalizan la fosforilación de la tirosina y treonina en proteínas diana; Las quinasas de especificidad doble se incluyen dentro de la familia de las serina/treonina proteína quinasas. La fosforilación de proteínas es la clase más extendida de modificación posterior a la traducción usada en la transducción de señales (*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 417, 5-10). MEK1 y

MEK2 se expresan proteínas no receptoras hidrófilas que se expresan de forma ubicua, que participan en la cascada de transducción de señales RAS-RAF-MEK-ERK, que a veces se denomina cascada de proteínas quinasa activada por mitógenos (MAPK). La activación de Raf mediada por Ras genera la activación de MEK1 y MEK2 (MAP/ERK quinasa 1 y 2), que, a su vez, fosforilan ERK1 y ERK2 (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2) en tirosina-185 y treonina-183. ERK1 y ERK2 activadas se translocan y acumulan en el núcleo, en el que pueden fosforilar una variedad de sustratos, incluyendo los factores de transcripción que controlan el crecimiento y la supervivencia celulares. Una regulación controlada de estas cascadas participa en la proliferación y diferenciación celulares, mientras que una activación no regulada de estas quinasas puede producir oncogénesis. La desregulación de la vía RAS/RAF/MEK ha sido detectada en más del 30 % de los tumores humanos, sin embargo, las mutaciones en los genes MEK1 y MEK2 son raras, por lo que la hiperactivación de MEK1/2 generalmente se debe a mutaciones de ganancia de función en RAS y/o BRAF. Dada la importancia de la vía Ras/Raf/MEK/ERK en el desarrollo de los cánceres humanos, los componentes quinasa de las cascadas de transducción de señales son dianas potencialmente importantes para la modulación de la progresión de la enfermedad en el cáncer y otras enfermedades proliferativas.

Algunos ejemplos de inhibidores potentes de MEK incluyen trametinib (Mekinist™), selumetinib (AstraZeneca), binimetinib (Array Biopharma), PD-0325901 (Pfizer), cobimetinib (Exelixis), refametinib (Valeant Pharmaceutical Int.), pimasertib (Santhera Pharmaceuticals), TAK-733 (Takeda) y WX-554 (UCB Pharma S A).

Trametinib es un potente inhibidor selectivo de MEK1 y MEK2. Se demuestra actividad clínica significativa del trametinib en pacientes con melanoma maligno metastásico con una mutación BRAFV600E o BRAFV600K no previamente tratada con un inhibidor de BRAF en comparación con la quimioterapia (bien dacarbazina o paclitaxel).

Por consiguiente, es evidente a partir del análisis anterior que el melanoma metastásico y el melanoma mutante BRAF resistente, sigue siendo difícil de tratar con las terapias existentes; y por lo tanto, existe una necesidad continua de nuevos tratamientos eficaces para estas afecciones, tanto para prevenir su progresión como para tratar las afecciones.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de CDK (quinasa dependiente de la ciclina) representado por un compuesto de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF (serina/treonina proteína quinasa B-raf) o un inhibidor de MEK (proteína quinasa activada por mitógenos), para su uso en el tratamiento del melanoma.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite; una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK representado por un compuesto de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado de un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y al menos un agente antineoplásico seleccionado de un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de CDK representado por el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado de un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK; para el tratamiento del melanoma.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de CDK representado por un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del melanoma.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit farmacéutico que comprende un inhibidor de CDK seleccionado a partir de los compuestos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y al menos un agente antineoplásico seleccionado de un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK.

Otros aspectos y el alcance adicional de la aplicabilidad de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 representa el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación, sobre el ciclo celular y la apoptosis en células de melanoma G361 después de 5 días usando citometría de flujo.
- La Figura 2 representa el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación, sobre la fase inicial de la apoptosis en células de melanoma G361 tratadas durante 24 h usando el método de tinción con anexina.
- 10 La Figura 3 representa el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación, sobre el ciclo celular y la apoptosis en células de melanoma SK-MEL3 después de 5 días usando citometría de flujo.
- La Figura 4 representa el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375.
- 15 La Figura 5 representa el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular G361.
- La Figura 6 representa el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular MDAMB435S.
- 20 Las Figuras 7a y 7b representan la curva de respuesta a la dosis del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos (48 h) en la estirpe celular A375 parental y A375R resistente.
- 25 Las Figuras 8a y 8b representan el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375 resistente.
- Las Figuras 9a y 9b representan el efecto del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375R resistente.
- 30 Las Figuras 10a y 10b representan el efecto del compuesto A (voruciclib) y el trametinib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375 resistente.
- Las Figuras 11a y 11b representan el efecto del compuesto A (voruciclib) y el trametinib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375R resistente.
- 35 Las Figuras 12a y 12b representan el efecto del compuesto A (voruciclib) y dabrafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375 resistente.
- 40 Las Figuras 13a y 13b representan el efecto del compuesto A (voruciclib) y dabrafenib solos y en combinación (48 h), en la estirpe celular A375R resistente.

Descripción detallada de la invención

- 45 Los términos y las expresiones generales usados en el presente documento anteriormente y de aquí en adelante tienen preferentemente los siguientes significados dentro del contexto de la presente divulgación, a menos que se indique de otro modo. Por consiguiente, a continuación, se proporcionan en el presente documento las definiciones de los términos generales usados en el contexto de la presente invención:
- 50 Las formas en singular "un", "uno", "una", y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto estipule claramente otra cosa.
- El uso de "/s" como parte de un término, incluye una referencia al término individualmente o en una pluralidad, por ejemplo, el término agente/s puede indicar un solo agente o más agentes.
- 55 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos uno/a" se refiere a uno/a o más. Por ejemplo, la expresión "al menos un agente antineoplásico" significa que la combinación comprende un solo agente antineoplásico o más agentes antineoplásicos.
- Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y del sustituyente, así como representa un estable compuesto, que no se transforma fácilmente, tal como un reordenamiento, una ciclación, una eliminación, etc.
- 60 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo, el diluyente, los excipientes y/o la sal debe ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el destinatario de la misma. "Farmacéuticamente aceptable" también significa que las composiciones o formas farmacéuticas están dentro del alcance del buen juicio médico, siendo adecuadas para su uso en animales
- 65

o seres humanos sin producir una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en el presente documento, el término "combinación" o la expresión "combinación farmacéutica" significa la administración combinada de los agentes antineoplásicos, en el contexto de la presente invención; un inhibidor de CDK (un compuesto de fórmula I) y al menos un agente antineoplásico seleccionado de un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK; agentes antineoplásicos que se pueden administrar independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo que permitan especialmente que los componentes de la combinación muestren un efecto sinérgico.

Las quinasas dependientes de la ciclina (CDK) son una familia de enzimas que se activan en fases específicas del ciclo celular. Las CDK consisten en una subunidad catalítica (la quinasa o CDK dependiente de la ciclina real) y una subunidad reguladora (ciclina). Hay al menos nueve CDK (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, etc.) y al menos 15 tipos diferentes de ciclinas (ciclina A, B1, B2, D1, D2, D3, E, H etc.). Cada etapa del ciclo celular está regulada por dichos complejos de CDK: transición G1/S (CDK2/ciclina A, CDK4/ciclina D1-D3, CDK6/ciclina D3), fase S (CDK2/ciclina A), fase G2 30 (CDK1/ciclina A), fase de transición G2/M (CDK1/ciclina B).

Como se usa en el presente documento, La expresión "inhibidor de CDK" se refiere a un agente que es capaz de inhibir una o más quinasas dependientes de ciclina (CDK). La expresión aberrante y la sobreexpresión de estas quinasas se evidencian en muchas afecciones patológicas tales como el cáncer. En el contexto de la presente invención, el inhibidor de CDK contenido en la combinación farmacéutica de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los compuestos de la presente invención inhiben CDK1/ciclina B, CDK2/ciclina E, CDK4/ciclina D, CDK4/ciclina D1 y/o CDK9/ciclina T1 con especificidad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de BRAF" se refiere a un agente que es capaz de inhibir la actividad de la quinasa BRAF o la quinasa BRAF mutada (una o más formas mutadas de la serina/treonina proteína quinasa B-RAF (BRAF)). El noventa por ciento de las mutaciones de BRAF informadas dan lugar a una sustitución de valina por ácido glutámico en el aminoácido 600 (la mutación V600E). Por consiguiente, la expresión "inhibidores de BRAF" abarca dentro de su alcance un compuesto que es capaz de inhibir BRAF o su forma mutada; o un compuesto que es capaz de inhibir la forma mutada V600 de BRAF; o un compuesto que es capaz de inhibir la forma mutada V600E de BRAF en melanoma tanto no refractario como refractario.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de MEK" se refiere a un agente que es capaz de interactuar con una proteína quinasa activada por mitógenos (MEK) e inhibir su actividad enzimática. La inhibición de la actividad enzimática de MEK, a su vez, reduce la capacidad de MEK para fosforilar un sustrato peptídico o proteico. MEK1 y MEK2 son proteínas quinasas que participan en la cascada de transducción de señales de RAS-RAF-MEK-ERK. Esta cascada participa en la regulación de una gran variedad de procesos que incluyen la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la migración celular, la diferenciación, el metabolismo y la proliferación. Por consiguiente, la expresión "inhibidores de MEK" abarca dentro de su alcance un compuesto que es capaz de inhibir a MEK.

Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" o la expresión "efecto sinérgico" o "sinergismo", como se usa en el presente documento, se refiere al efecto terapéutico de la combinación de los compuestos (un inhibidor de BRAF y un inhibidor de CDK, es decir, el compuesto de fórmula I), que es mayor que el efecto aditivo de los compuestos usados en la combinación farmacéutica. Ventajosamente, dicha sinergia entre los principios activos (los compuestos terapéuticamente activos) cuando se combinan, permite el uso de dosis más pequeñas de uno o ambos principios activos, proporciona mayor eficacia a las mismas dosis y/o previene o retrasa la acumulación de resistencia a múltiples fármacos. El método de índice de combinación (IC) de Chou y Talalay se puede usar para determinar el efecto de sinergia, aditivo o antagonista de los compuestos usados en combinación. Cuando el valor de IC es inferior a 1, hay sinergia entre los compuestos usados en la combinación; cuando el valor de IC es igual a 1, hay un efecto aditivo entre los compuestos usados en la combinación y cuando el valor del IC es superior a 1, hay un efecto antagónico. El efecto sinérgico se puede lograr mediante la formulación conjunta de los compuestos contenidos en la combinación farmacéutica o la composición de la presente invención y la administración de dichos compuestos simultáneamente a través de una forma farmacéutica o como formulaciones separadas administradas simultánea o secuencialmente.

Como se usa en el presente documento, "melanoma" se refiere a una afección caracterizada por el crecimiento de un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. La mayoría de los melanocitos aparecen en la piel, pero también se encuentran en las meninges, en el tracto digestivo, en los ganglios linfáticos y en los ojos. Cuando el melanoma se presenta en la piel, se conoce como melanoma cutáneo. El melanoma también puede producirse en los ojos y se denomina melanoma ocular o intraocular. El melanoma raramente se produce en las meninges, en el tracto digestivo, los ganglios linfáticos u otras zonas en las que se encuentran los melanocitos.

Las expresiones "melanoma mutante" o "melanoma maligno", usadas indistintamente, se refieren a una neoplasia melanocítica que comprende células de melanoma que tienen un defecto (también conocido como "mutación"). El melanoma maligno, por lo general, se desarrolla desde o cerca de un nevo, que consiste en una masa de células

con una notable tendencia a la metástasis. Del 40 al 60 % de los melanomas son portadores de una mutación activadora en el gen que codifica la serina/treonina proteína quinasa B-raf (BRAF). Entre las mutaciones de BRAF observadas en el melanoma, más del 90 % están en el codón 600, y entre estas, más del 90 % son una mutación de un solo nucleótido que da lugar a la sustitución de la valina por ácido glutámico (BRAV600E). La segunda mutación más común es BRAV600K, que sustituye la valina por lisina, que representa el 5-6 % de los melanomas, seguida de BRAV600R y BRAV600D. (*Journal of Translational Medicine*, 2012, 10, 85, 1-9).

La expresión "melanoma metastásico" se refiere a un melanoma que se ha diseminado a través del sistema linfático y/o los vasos sanguíneos a otros sitios del cuerpo, incluyendo el tejido subcutáneo que se encuentra debajo de la piel, los nódulos linfáticos y otros órganos tales como los pulmones, el hígado, los huesos o el cerebro. El melanoma en estadio III se caracteriza por el nivel de metástasis de los ganglios linfáticos. No hay evidencia de metástasis a distancia. El melanoma en estadio IV se caracteriza por la localización de metástasis a distancia y el nivel de lactato deshidrogenasa sérica (LDH). Esta etapa también se denomina melanoma metastásico.

A menos que se indique otra cosa, el término "melanoma" también puede incluir melanoma recurrente o resistente. El término "recurrente" o "resistente" se refiere al brote repetido de melanoma, o a una progresión del melanoma de forma independiente de si la enfermedad fue curada antes de dicho brote o dicha progresión.

Por consiguiente, el tratamiento del melanoma para el que se proporciona la combinación farmacéutica (como se describe en el presente documento), se refiere al tratamiento del melanoma mutante BRAF no refractario, metastático o refractario (resistente), en particular, melanoma mutante BRAV600, y más particularmente melanoma mutante BRAV600E.

La expresión "no sensible/refractario" como se usa en referencia al melanoma, se usa en el presente documento para referirse a los sujetos o pacientes con melanoma que han sido tratados con las terapias disponibles para el cáncer, tales como la quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia; para el tratamiento del melanoma; no siendo la terapia clínicamente adecuada para tratar a los pacientes, de modo que estos pacientes necesitan una terapia de eficacia adicional, es decir, permanecen insensibles a la terapia. La expresión también puede describir sujetos o pacientes que respondan a la terapia, pero padeciendo efectos secundarios, recaídas, desarrollando resistencia o no experimentando ningún alivio de uno o más síntomas de melanoma. En diversas realizaciones, "no sensible/refractario" significa que al menos algunas partes significativas de las células cancerosas no son eliminadas ni su división celular detenida. La determinación de si las células cancerosas "no responden/son refractarias" puede realizarse *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para evaluar la eficacia del tratamiento en las células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "refractario/a" en dicho contexto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ciclo de tratamiento" se refiere a un período de tiempo durante el que se lleva a cabo una secuencia de administración recurrente de un inhibidor de CDK, es decir, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos uno agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK.

El término "apoptosis" se refiere al proceso natural de muerte celular programada. Es un proceso de autodestrucción, en el que la célula usa maquinaria celular especializada para destruirse. Las células se desintegran en partículas unidas a la membrana que luego se eliminan por fagocitosis. La apoptosis es un mecanismo que permite a los metazoos controlar el número de células y eliminar las células que amenazan la supervivencia del animal.

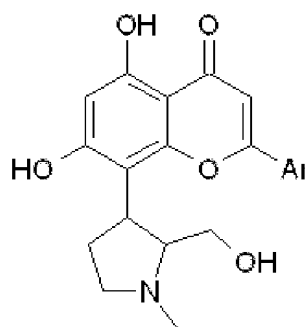
El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferentemente, a un mamífero, muy preferentemente a un ser humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimentación, más particularmente un ser humano que padece melanoma. El término "sujeto" puede usarse indistintamente con la expresión "paciente". En el contexto de la presente invención, la expresión "un sujeto que lo necesite" significa un sujeto que necesita tratamiento para un melanoma mutante o maligno. Como alternativa, la expresión "un sujeto que lo necesite" significa un sujeto (paciente) diagnosticado de melanoma mutante o maligno.

El término "mamífero", como se usa en el presente documento, pretende abarcar a los seres humanos, así como a los mamíferos no humanos. Los mamíferos no humanos incluyen, pero sin limitación, animales domésticos, tales como vacas, cerdos, caballos, perros, gatos, conejos, ratas y ratones, y animales no domésticos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un inhibidor de CDK, es decir, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado de entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, que, cuando se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento, es suficiente para proporcionar beneficio terapéutico, que debe incluir: (i) prevenir o retrasar uno o más síntomas de melanoma; (ii) mejorar o eliminar uno o más síntomas de melanoma; o (iii) tratar el melanoma.

El término "tratar" o "tratamiento" o "tratado" con referencia al melanoma en un sujeto, Preferentemente, un mamífero, más preferentemente, un ser humano incluyen: (i) la inhibición del melanoma, es decir, detener el desarrollo del melanoma; (ii) la reducción de la regresión del melanoma; (iii) la inhibición de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (iv) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (v) la mejoría del melanoma, es decir, reducir la gravedad de los síntomas asociados con el melanoma; y (vi) el alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con el melanoma.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de CDK seleccionado de un compuesto de fórmula I;



Fórmula I

en la que Ar es un grupo fenilo, que está sustituido con 2 sustituyentes diferentes seleccionados entre cloro y trifluorometilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos uno agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK; para su uso en el tratamiento del melanoma.

De acuerdo con otra realización, el inhibidor de CDK contenido en la combinación farmacéutica de la presente invención se selecciona de un compuesto de fórmula I; en el que Ar es un grupo fenilo sustituido por 2 grupos diferentes seleccionados entre cloro y trifluorometilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con otra realización adicional, el inhibidor de CDK contenido en la combinación farmacéutica de la presente invención se selecciona de un compuesto de fórmula I, en la que Ar es un grupo fenilo sustituido por cloro; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La fabricación de los compuestos de fórmula I o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y la fabricación de la composición farmacéutica que contiene los compuestos se desvela en la publicación de patente PCT n.º WO2004004632 (correspondiente a la patente de EE.UU. n.º 7.271.193) y la publicación de patente PCT n.º WO2007148158. Estas publicaciones de patente PCT desvelan que los compuestos representados por la fórmula I pueden usarse en el tratamiento de trastornos proliferativos. Como se indica en el presente documento anteriormente, los compuestos de fórmula I se pueden usar en forma de sus sales. La sal preferida de compuestos de fórmula I incluye acetatos, alginatos, ascorbatos, aspartatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, boratos, cinnamatos, citratos, etanosulfonatos, fumaratos, glucuronatos, glutamatos, glicolatos, clorhidratos, bromhidratos, hidrof fluoruros, cetoglutaratos, lactatos, maleatos, malonatos, mesilato, nitratos, oxalatos, palmoatos, percloratos, fosfatos, picratos, salicilatos, succinatos, sulfamato, sulfatos, tartratos, tosilato, sal del ácido trifluoroacético y otras sales de adición de ácido conocidas por los expertos en la materia.

En una realización, el inhibidor de CDK (el compuesto de fórmula 1) contenido en la combinación farmacéutica es (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona; o su sal farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el inhibidor de CDK (el compuesto de fórmula 1) contenido en la combinación farmacéutica es clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometil fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (denominado en el presente documento "compuesto A". El compuesto A también se conoce en el presente documento como "voruciclib").

En una realización, el inhibidor de BRAF contenido en la combinación farmacéutica es un inhibidor de la forma mutada V600 de BRAF.

En una realización, el inhibidor de BRAF contenido en la combinación farmacéutica es un inhibidor de la forma mutada V600E de BRAF.

En una realización, el inhibidor de BRAF contenido en la combinación farmacéutica se selecciona de BAY43-9006 (sorafenib, Bayer), vemurafenib (PLX4032, Plexxikon; RG7204, RO5185426, Hofmann-LaRoche), GDC-0879

(GlaxoSmithKline), dabrafenib (GSK2118436, GlaxoSmithKline), PLX4720 (Hofmann-LaRoche), BMS-908662 (XL281, Bristol-Myers Squibb), LGX818 (Novartis), PLX3603 (RO5212054, Hofmann-LaRoche), ARQ-736 (ArQule), DP-4978 (Deciphera) o RAF265 (Novartis).

5 En una realización, el inhibidor de BRAF contenido en la combinación farmacéutica es vemurafenib.

En una realización, el inhibidor de BRAF contenido en la combinación farmacéutica es dabrafenib.

10 En una realización, el inhibidor de MEK contenido en la combinación farmacéutica es un inhibidor de la forma mutada V600 de BRAF.

En una realización, el inhibidor de MEK contenido en la combinación farmacéutica es un inhibidor de la forma mutada V600E o V600K de BRAF.

15 En una realización, el inhibidor de MEK contenido en la combinación farmacéutica se selecciona entre selumetinib (AstraZeneca), binimetinib (Array Biopharma), PD-0325901 (Pfizer), trametinib (Mekinist™), cobimetinib (Exelixis), refametinib (Valeant), pimasertib (Santhera Pharmaceuticals), TAK-733 (Takeda) o WX-554 (UCB Pharma S A).

20 En una realización, el inhibidor de MEK contenido en la combinación farmacéutica es trametinib.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y al menos uno de dichos agentes antineoplásicos; se administran simultáneamente.

25

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y al menos uno de dichos agentes antineoplásicos; se administran secuencialmente.

30

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que dicho agente antineoplásico se administra antes de la administración del inhibidor de CDK.

35

40

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de CDK se administra antes de la administración de dicho agente antineoplásico.

45

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico se administran ambos una vez al día.

50

En otra realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de CDK se administra una vez al día, mientras que dicho agente antineoplásico se administra dos veces al día.

55

60

En otra realización más, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un

65

inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico se administran ambos dos veces al día.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite; una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre un compuesto de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado de un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK.

10 En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite; una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico se administran simultáneamente.

15 En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico se administran secuencialmente.

20 En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que dicho agente antineoplásico se administra antes de la administración de dicho inhibidor de CDK.

25 En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK se administra antes de la administración de dicho agente antineoplásico.

30 En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico se administran ambos una vez al día.

35 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK se administra una vez al día y dicho agente antineoplásico se administra dos veces al día.

40 En otra realización más, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico se administran ambos dos veces al día.

45 En una realización, el método de tratamiento del melanoma comprende administrar al sujeto que lo necesite; el inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK en el intervalo de dosis descrito en el presente documento.

50 En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de BRAF y dicho inhibidor de CDK se administran simultáneamente.

55 En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de BRAF y dicho inhibidor de CDK se administran secuencialmente.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de BRAF se administra antes de la administración de dicho inhibidor de CDK.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK se administra antes de la administración de dicho inhibidor de BRAF.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de BRAF se administran ambos una vez al día.

En otra realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK se administra una vez al día y dicho inhibidor de BRAF se administra dos veces al día.

En otra realización más, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de BRAF se administran ambos dos veces al día.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento del melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de BRAF.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de BRAF y dicho inhibidor de CDK se administran simultáneamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de BRAF y dicho inhibidor de CDK se administran secuencialmente.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de BRAF se administra antes de la administración de dicho inhibidor de CDK.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK se administra antes de la administración de dicho inhibidor de BRAF.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de BRAF se administran ambos una vez al día.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar

a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK se administra una vez al día, mientras que dicho inhibidor de BRAF se administra dos veces al día.

En otra realización más, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de BRAF se administran ambos dos veces al día.

En una realización, el método de tratamiento del melanoma comprende administrar al sujeto que lo necesite; el inhibidor de BRAF y el inhibidor de CDK seleccionados entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en el intervalo de dosis descrito en el presente documento.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de MEK y dicho inhibidor de CDK se administran simultáneamente.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que el inhibidor de MEK y el inhibidor de CDK se administran secuencialmente.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de MEK se administra antes de la administración de dicho inhibidor de CDK.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK se administra antes de la administración de dicho inhibidor de MEK.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de MEK se administran ambos una vez al día.

En otra realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK se administra una vez al día, mientras que dicho inhibidor de MEK se administra dos veces al día.

En otra realización más, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que la dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de MEK se administran ambos dos veces al día.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento del melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de MEK.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de MEK y dicho inhibidor de CDK se administran simultáneamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de MEK y dicho inhibidor de CDK se administran secuencialmente.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de MEK se administra antes de la administración de dicho inhibidor de CDK.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK se administra antes de la administración de dicho inhibidor de MEK.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de MEK se administran ambos una vez al día.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK se administra una vez al día, mientras que dicho inhibidor de MEK se administra dos veces al día.

En otra realización más, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK, en el que dicho inhibidor de CDK y dicho inhibidor de MEK se administran ambos dos veces al día.

En una realización, el método de tratamiento del melanoma comprende administrar al sujeto que lo necesite; el inhibidor de MEK y el inhibidor de CDK seleccionados entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en el intervalo de dosis descrito en el presente documento.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en el que dicha combinación farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar el melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK.

En una realización de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma no refractario.

En otra realización de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF no refractario.

En otra realización más de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF V600 no refractario.

En una realización adicional de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF V600E o BRAF V600K no refractario.

En una realización de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma refractario o recurrente.

En otra realización de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF resistente.

En otra realización más de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF V600 resistente.

5 En una realización adicional de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF V600E o BRAF V600K resistente.

En una realización de la presente invención, el melanoma que se está tratando es melanoma metastásico.

10 En otra realización de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAF metastásico.

En otra realización más de la presente invención, el melanoma que se está tratando es un melanoma mutante BRAFV600 metastásico.

15 En una realización adicional de la presente invención, el melanoma que se está tratando es melanoma mutante BRAFV600E o BRAFV600K metastásico.

20 De acuerdo con la presente invención, la administración de los inhibidores de CDK (el compuesto de fórmula I) y/o el agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal o intrarrectal.

25 En una realización, el inhibidor de CDK puede administrarse por vía oral para generar y mantener buenos niveles en sangre del mismo, mientras que el/los agente/s antineoplásicos seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK pueden administrarse por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o por infusión.

30 En otra realización, el inhibidor de CDK puede administrarse por vía parenteral por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o por infusión, mientras que el/los agente/s antineoplásicos seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK pueden administrarse por vía oral.

35 En una realización adicional, tanto el inhibidor de CDK como el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK pueden administrarse por vía oral para generar y mantener buenos niveles en sangre de los mismos.

40 En una realización adicional más, tanto el inhibidor de CDK de fórmula I como el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK pueden administrarse por vía parenteral por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o por infusión, para generar y mantener buenos niveles en sangre de los mismos.

45 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del melanoma, en la que dicha composición comprende un inhibidor de CDK seleccionado entre los compuestos de fórmula I o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Para la producción de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas de gelatina dura, los excipientes farmacéuticamente activos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, goma arábiga, magnesio o glucosa, etc. Para las cápsulas de gelatina blanda y los supositorios, los vehículos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, grasas, ceras, aceites naturales o endurecidos, etc. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones son, por ejemplo, soluciones de inyección, o para las emulsiones o los jarabes son, por ejemplo, agua, solución fisiológica de cloruro de sodio o alcoholes, por ejemplo, etanol, propanol o glicerol, soluciones de azúcar, tales como soluciones de glucosa o soluciones de manitol, o una mezcla de los diversos disolventes que se han mencionado.

55 El inhibidor de CDK (el compuesto de fórmula I) y el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK pueden formularse individualmente o en combinación en formas farmacéuticas usando técnicas farmacéuticas convencionales conocidas por un experto en la materia tal como mediante mezcla, granulación, disolución o liofilización.

60 En general, las composiciones destinadas a un uso farmacéutico pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, por ejemplo, "Remington - The Science and Practice of Pharmacy" (21ª edición) (2005), "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman (11ª edición) (2006) y "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems" de Ansel (9ª edición) y "Solid-State Chemistry of Drugs" (2ª edición) (1999).

65 Las composiciones descritas en el presente documento pueden estar en una forma adecuada para la administración oral, por ejemplo, formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos, cápsulas, pastillas o gránulos; formas

farmacéuticas líquidas tales como, emulsiones, soluciones, suspensiones; para inyección parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o infusión), por ejemplo, en forma de una solución, suspensión o emulsión estéril; para la administración tópica, por ejemplo, en forma de pomada, crema, gel o loción.

- 5 Las composiciones para las administraciones orales pueden estar en la forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, sellos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéutica agradable al paladar. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto impulsor osmóticamente activo también son adecuadas para la administración oral de los compuestos (el inhibidor de CDK y/o el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK) contenidos en la combinación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden incluir vehículos convencionales tales como manitol, lactosa, almidón, almidón de maíz, estearato de magnesio, talco, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Dichos vehículos son preferentemente de calidad farmacéutica.

20 Para las pomadas, cremas, el principio activo (inhibidor de CDK y/o agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK) se formula en una base de aceite en agua o de agua en aceite.

Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, generalmente se emplean soluciones estériles del principio activo (inhibidor de CDK y/o agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK), y el pH de las soluciones se debe ajustar y tamponar adecuadamente.

- 25 Además, el efecto de los compuestos, es decir, los inhibidores de CDK y/o el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK contenidos en la composición farmacéutica puede retrasarse o prolongarse a través de una formulación adecuada. Por ejemplo, se puede preparar un microgránulo lentamente soluble del compuesto e incorporarse en un comprimido o una cápsula. La técnica se puede mejorar mediante la fabricación de microgránulos de diferentes velocidades de disolución y el relleno de cápsulas con una mezcla de los microgránulos. Los comprimidos o las cápsulas se pueden recubrir con una película que resista la disolución durante un período de tiempo predecible. Incluso los preparados parenterales se pueden hacer de acción prolongada, disolviendo o suspendiendo el compuesto en vehículos oleosos o emulsionados que le permiten dispersarse solo lentamente en el suero.

- 35 Aunque las dosis eficaces del inhibidor de CDK seleccionado entre los compuestos de fórmula I y el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK) usados para la administración varían dependiendo de la gravedad de la enfermedad (melanoma), la gravedad de los síntomas, la edad, el sexo, el peso corporal y la diferencia de sensibilidad del paciente, el modo, el tiempo, el intervalo y la duración de la administración, la naturaleza y el tipo de formulación, etc. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos contenidos en la combinación farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administran en un marco de tiempo en el que ambos agentes aún están activos. Un experto en la materia sería capaz de determinar dicho marco de tiempo determinando la semivida de los agentes terapéuticos administrados. Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, los agentes antineoplásicos contenidos en la composición farmacéutica pueden administrarse de forma simultánea o secuencial. Los expertos en la materia reconocerán que son posibles varias variaciones dentro del alcance y espíritu de esta invención.

- La dosis de los agentes terapéuticos que se van a administrar debe seleccionarse, produciendo el efecto deseado. Una dosis adecuada del inhibidor de CDK puede ser de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg. La dosis del inhibidor de CDK que se va a administrar puede cubrir un amplio intervalo dependiendo de la gravedad del melanoma que se vaya a tratar. La dosis que se va a administrar diariamente puede seleccionarse para obtenerse el efecto deseado. Una dosis adecuada puede variar de aproximadamente 50 mg/día a 350 mg/día del inhibidor de CDK. Si se requiere, también se pueden administrar dosis diarias más altas o más bajas.

- 50 En una realización, el inhibidor de BRAF se puede administrar de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 2500 mg/día, y esta cantidad se puede administrar en una o varias dosis por día o por dosis o por ciclo de tratamiento.

- En una realización, el inhibidor de MEK se puede administrar de aproximadamente 0,01 mg/día a 2000 mg/día, y esta cantidad se puede administrar en una o varias dosis por día o por dosis o por ciclo de tratamiento.

- 60 En una realización, el inhibidor de CDK y el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK se administran ambos una vez al día. En otra realización, el inhibidor de CDK y el/los agente/s antineoplásico/s seleccionados entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK se administran dos veces al día. En una realización adicional, el inhibidor de CDK se administra una vez al día, mientras que el/los agente/s antineoplásico/s seleccionado/s entre un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK se administra/n dos veces al día. Sin embargo, la cantidad de cada agente terapéutico contenida en la combinación farmacéutica de

acuerdo con la presente invención, cuando se usa en combinación, normalmente será inferior a una cantidad que produciría un efecto terapéutico si se administra solo. Por conveniencia, la dosis diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día si se desea.

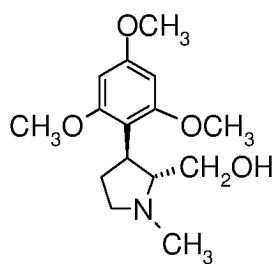
5 Las combinaciones proporcionadas por la presente invención se han evaluado en ciertos sistemas de ensayo y en varios programas administrativos diferentes *in vitro*. Los detalles experimentales son los que se proporcionan a continuación. Los datos presentados en el presente documento indican claramente que el inhibidor de BRAF o el inhibidor de MEK, cuando se combina con un inhibidor de CDK seleccionado entre los compuestos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, presentan un efecto sinérgico. Está claramente indicado que
10 los agentes terapéuticos, cuando se usan en combinación en el tratamiento del melanoma, aumentan la apoptosis o la citotoxicidad en las células proliferativas en comparación con cuando las células se tratan solo con el inhibidor de CDK (es decir, solo el compuesto de fórmula I o su sal farmacéuticamente aceptable) o solo el inhibidor de BRAF o solo el inhibidor de MEK.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un kit farmacéutico que comprende un inhibidor de CDK (el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK. El kit farmacéutico puede comprender un recipiente que contiene un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK como una formulación de dosis fija; o
20 el kit puede comprender dos o más recipientes separados para el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos uno agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK. El kit puede comprender además un prospecto, que incluye información sobre la indicación, el uso, la dosis, la vía de administración, las contraindicaciones, precauciones y advertencias. El recipiente adecuado que se puede usar incluye un bote, un vial, una ampolla, una jeringa o un blíster. El kit
25 farmacéutico puede comprender opcionalmente un recipiente adicional que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, agua para inyección, solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y solución de dextrosa.

Los inhibidores de CDK, es decir, los compuestos de fórmula I contenidos en la combinación farmacéutica de la
30 presente invención; pueden prepararse de acuerdo con los métodos desvelados en la publicación de patente PCT n.º WO2004004632 y publicación de patente PCT n.º WO2007148158.

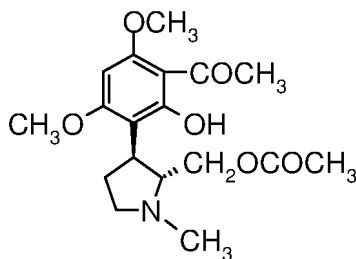
El proceso general para la preparación de compuestos de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, comprende las siguientes etapas:

35 (a) tratar el enantiómero (-)-*trans* puro resuelto enantioméricamente del compuesto intermedio de fórmula VIA,



VIA

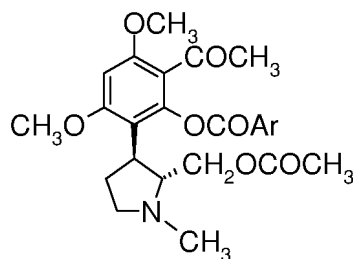
40 con anhídrido acético en presencia de un catalizador de ácido de Lewis, obteniéndose un compuesto acetilado resuelto de fórmula VIIA;



VIIA

45 (b) hacer reaccionar el compuesto acetilado resuelto de fórmula VIIA con un ácido de fórmula ArCOOH o un cloruro de ácido de fórmula ArCOCl o un anhídrido de ácido de fórmula (ArCO)₂O o un éster de fórmula

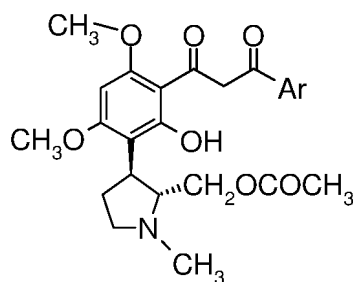
ArCOOCH₃, en la que Ar es como se define anteriormente en el presente documento en referencia al compuesto de fórmula I, en presencia de una base y un disolvente, obteniéndose un compuesto resuelto de fórmula VIIIA;



VIIIA

5

(c) tratar el compuesto resuelto de fórmula VIIIA con una base en un disolvente adecuado, obteniéndose el correspondiente compuesto de β-dicetona resuelto de fórmula IXA;



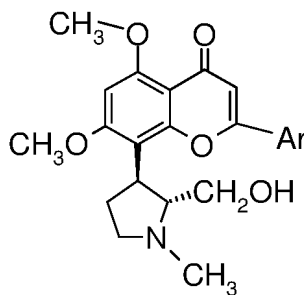
IXA

10

en la que Ar es como se ha definido anteriormente;

(d) tratar el compuesto de β-dicetona resuelto de fórmula IXA con un ácido tal como ácido clorhídrico, obteniéndose el correspondiente compuesto ciclado de fórmula XA;

15



XA

20

(e) someter el compuesto de fórmula XA a desalquilación calentándolo con un agente de desalquilación a una temperatura que varía entre 120 y 180 °C, obteniéndose el enantiómero (+)-*trans* del compuesto de fórmula I y, opcionalmente, convertir el compuesto en su sal farmacéuticamente aceptable.

El catalizador de ácido de Lewis utilizado en la etapa (a) anterior se puede seleccionar entre: BF₃, Et₂O, cloruro de cinc, cloruro de aluminio y cloruro de titanio.

25

La base utilizada en la etapa (b) del proceso puede seleccionarse entre trietilamina, piridina y una combinación de DCC-DMAP (combinación de *N,N'*-diciclohexil-carbodiimida y 4-dimetilaminopiridina).

30

Será evidente para los expertos en la materia que la reorganización del compuesto de fórmula VIIIA con el correspondiente compuesto de β-dicetona de fórmula IXA se conoce como una reorganización de *Baker-Venkataraman* (*J. Chem. Soc.*, 1933, 1381 y *Curr. Sci.*, 1933, 4, 214).

La base usada en la etapa (c) del proceso se puede seleccionar entre: hexametildisilazida de litio, hexametildisilazida de sodio, hexametildisilazida de potasio, hidruro sódico e hidruro potásico. Una base preferida es hexametildisilazida de litio.

El agente de desalquilación usado en la etapa (e) del proceso para la desalquilación del compuesto de fórmula IXA se puede seleccionar entre: clorhidrato de piridina, tribromuro de boro, eterato de trifluoruro de boro y tricloruro de aluminio. Un agente de desalquilación preferido es clorhidrato de piridina.

- 5 La preparación del compuesto de partida de fórmula VIA implica hacer reaccionar 1-metil-4-piperidona con una solución de 1,3,5-trimetoxibenceno en ácido acético glacial, para producir 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)-1,2,3,6-tetrahidropiridina, que se hace reaccionar con dietileterato de trifluoruro de boro, borohidruro de sodio y tetrahidrofurano, produciendo 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)piperidin-3-ol. La conversión de 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)piperidin-3-ol en el compuesto de fórmula VIA implica la conversión del grupo hidroxilo presente en el
- 10 anillo de piperidina del compuesto, 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)piperidin-3-ol en un grupo saliente tal como tosilo, mesilo, triflato o haluro mediante el tratamiento con un reactivo apropiado tal como cloruro de *p*-toluenosulfonilo, cloruro de metanosulfonilo, anhídrido triflico o pentacloruro de fósforo en presencia de nucleófilos de oxígeno tales como trietilamina, piridina, carbonato potásico o carbonato sódico, seguido de la contracción del anillo en presencia de nucleófilos de oxígeno tales como acetato de sodio o acetato de potasio en un disolvente alcohólico tal como
- 15 isopropanol, etanol o propanol.

El compuesto representativo, compuesto A (también denominado voruciclib) usado en los ensayos farmacológicos se refiere a clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-una y fue uno de los compuestos desvelados en la publicación PCT publicada n.º WO2007148158.

20

El efecto sinérgico de la combinación de acuerdo con la presente invención que comprende el inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK se explica ahora con más detalle con referencia a sus realizaciones preferidas. Se ha de señalar que estas se proporcionan solo como ejemplos y no pretenden limitar la invención.

25

Debe entenderse que la invención puede suponer diferentes variaciones alternativas y secuencias de etapas, salvo cuando se especifique expresamente otra cosa. Además, a diferencia de cualesquier otro ejemplo operativo, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan, por ejemplo, cantidades de ingredientes usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término

30 "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se han de obtener mediante la presente invención.

Los expertos en la materia reconocerán que son posibles varias variaciones dentro del alcance y espíritu de esta invención. La invención se describirá a continuación con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero por supuesto, bajo ningún concepto, deben interpretarse como limitantes de su alcance.

35

Ejemplos:

40 En el presente documento, se usan las siguientes abreviaturas o términos:

BF ₃	: Trifluoruro de boro
BF ₃ .Et ₂ O	: Dietileterato de trifluoruro de boro
CaCl ₂	: Cloruro de calcio
CHCl ₃	: Cloroformo
CDCl ₃	: Cloroformo deuterado
CO ₂	: Dióxido de carbono
DCC	: <i>N, N'</i> -diciclohexil-carbodiimida
DMAP	: 4-Dimetilaminopiridina
DMF	: <i>N, N</i> -dimetilformamida
DMSO	: Dimetilsulfóxido
Et ₂ O	: Dietiléter
EtOAc	: Acetato de etilo
g	: Gramo
h	: Hora
HCl	: Ácido clorhídrico
IPA	: Alcohol isopropílico
KBr	: Bromuro de potasio
kg	: Kilogramo
l	: litro
MeOH	: Metanol
min	: Minuto/s

mg	: Miligramo
ml	: Mililitro
μl	: Microlitro
mM	: Micromolar
mmol	: Milimolar
mol	: Mol
NaCl	: Cloruro de sodio
Na ₂ CO ₃	: Carbonato de sodio
NaHCO ₃	: Bicarbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	: Sulfato de sodio
n-BuLi	: n-Butil-litio
PEL	: Piramal Enterprises Limited
°C	: Grados centígrados
THF	: Tetrahidrofurano

Ejemplos

5 **Preparación del compuesto A (voruciclib) y del compuesto B (riviciclib), (compuesto B no englobado por la invención) los compuestos representativos de fórmula 1 se presentan en el presente documento como ejemplos de referencia:**

Ejemplo de referencia 1:

10 **(a) Preparación de (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-8-(2-hidroxi metil-1-metilpirrolidin-3-il)-5,7-dimetoxi-cromen-4-ona**

A una solución de n-BuLi (solución al 15 % en hexano, 2,2 ml, 5 mmol) en THF (10 ml), mantenida a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno, se añadió hexametildisilazano (1,08 ml, 5,1 mmol) gota a gota y se agitó durante 15 min. A esto, se añadió una solución de 2-(2-acetoximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-6-acetil-3,5-dimetoxifeniloéster de ácido (+)-trans-2-cloro-4-trifluorometilbenzoico (1,44 g, 2,5 mmol) en THF (10 ml) gota a gota, manteniendo la temperatura a 0 °C. Después de la adición, se dejó calentar la reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 h. Se acidificó la mezcla de reacción con HCl diluido y se basificó con bicarbonato sódico al 10 % a pH de 8 a 9. Se extrajo la capa acuosa con cloroformo (3 x 25 ml). Se lavó la capa orgánica con agua (25 ml) y salmuera (25 ml), y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Se concentró la capa orgánica a presión reducida y se secó al vacío, produciendo 3-{3-[3-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-3-oxo-propionil]-2-hidroxi-4,6-dimetoxi-fenil}-1-metil-pirrolidin-2-il-metiléster de ácido acético en forma de un aceite (1,3 g, 90,2 %). Se disolvió este éster en HCl concentrado (10 ml) y se agitó durante 3 h para efectuar la ciclación. Una vez finalizadas las 3 h, se basificó la mezcla de reacción con NaHCO₃ sólido a pH de 8 a 9. Se extrajo la capa acuosa con cloroformo (25 x 3 ml), y se lavó con agua (25 ml) y salmuera (25 ml). Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró a presión reducida y se secó al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con metanol al 3 % en cloroformo y amoníaco al 0,1 % como eluyente, produciendo el compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-8-(2-hidroximetil-1-metilpirrolidin-3-il)-5,7-dimetoxi-cromen-4-ona en forma de un sólido de color amarillo.

30 Rendimiento: 0,56 g (48,2 %); RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,95 (d, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,69 (d, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,46 (s, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,01 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 3,71 (dd, 1H), 3,41 (d, 1H), 3,26 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,10 (m, 2H); MS (ES⁺): m/z 497 (M+1).

35 **(b) Preparación de (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metilpirrolidin-3-il)-cromen-4-ona**

Se calentó una mezcla del compuesto como el obtenido en la parte (a) (0,25 g, 0,5 mmol), clorhidrato de piridina (0,25 g, 2,16 mmol) y una cantidad catalítica de quinolina a 180 °C durante un período de 2,5 h. Se diluyó la mezcla de reacción con metanol (25 ml) y se basificó con Na₂CO₃ sólido a pH 10. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó con metanol. Se concentró la capa orgánica y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando amoníaco al 0,1 % y metanol al 4,5 % en cloroformo como eluyente, produciendo el compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metilpirrolidin-3-il)-cromen-4-ona, en forma de un sólido de color amarillo.

45 Rendimiento: 0,15 g (63,7 %); RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,99 (m, 2H), 7,83 (d, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,41 (s, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 2,99 (s, 3H), 2,54 (m, 1H), 2,28 (m, 1H); MS (ES⁺): m/z 470 (M+1).

(c) Preparación de clorhidrato de (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi-metil-1-metilpirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (compuesto A o voruciclib)

Se suspendió el compuesto como el obtenido en (b) (0,1 g, 0,2 mmol) en metanol (2 ml) y se trató con HCl etéreo, y se evaporó el disolvente orgánico, produciendo el compuesto, clorhidrato de (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi metil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

Rendimiento: 0,1 g (92,8 %); RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8,02 (d, 2H), 7,83 (d, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,41 (s, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,68 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,39 (m, 1H), 2,99 (s, 3H), 2,54 (m, 1H), 2,31 (m, 1H).

Ejemplo de referencia 2:**(a) Preparación de (+)-trans-2-(2-clorofenil)-8-(2-hidroximetil-1-metil pirrolidin-3-il)-5,7-dimetoxi-cromen-4-ona**

Se añadió hidruro de sodio (50 %, 0,54 g, 11,25 mmol) en porciones a una solución de (-)-trans-1-(2-hidroxi-3-(2-hidroximetil-1-metil pirrolidin-3-il)-4,6-dimetoxifenil)-etanona (0,7 g, 2,2 mmol) en DMF seca (15 ml) a 0 °C, en una atmósfera de nitrógeno y con agitación. Después de 10 min, se añadió 2-clorobenzoato metílico (1,15 g, 6,75 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 h. Se añadió metanol lentamente por debajo de 20 °C. Se vertió la mezcla de reacción sobre hielo picado (300 g), se acidificó con HCl 1:1 (pH 2) y se extrajo usando EtOAc (2 x 100 ml). Se basificó la capa acuosa usando una solución saturada de Na_2CO_3 (pH 10) y se extrajo usando CHCl_3 (3 x 200 ml). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4 anhidro) y se concentró. Al residuo, se añadió HCl conc. (25 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo picado (300 g) y se basificó usando una solución acuosa saturada de Na_2CO_3 . La mezcla se extrajo usando CHCl_3 (3 x 200 ml). Se lavó el extracto orgánico con agua, se secó (Na_2SO_4 anhidro) y se concentró, obteniéndose el compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-5,7-dimetoxi-cromen-4-ona.

Rendimiento: 0,67 g (64 %); pf: 91-93 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +5,8^\circ$ (c = 0,7, metanol); IR (KBr): 3431, 1648, 1598, 1571 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7,70 (dd, 1H), 7,52 (m, 1H), 7,45 (m, 2H), 6,50 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 4,17 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,64 (dd, 1H), 3,40 (d, 1H), 3,15 (m, 1H), 2,74 (d, 1H), 2,52 (m, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,00 (m, 2H); MS (ES+): m/z 430 (M+1).

(b) Preparación de (+)-trans-2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi metil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona

Se añadió clorhidrato de piridina fundido (4,1 g, 35,6 mmol) al compuesto como el obtenido en la parte (a) (0,4 g, 0,9 mmol) y se calentó a 180 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió a 25 °C, se diluyó con MeOH (10 ml) y se basificó usando Na_2CO_3 a pH 10. La mezcla se filtró y la capa orgánica se concentró. El residuo se suspendió en agua (5 ml), se agitó durante 30 min, se filtró y se secó, obteniéndose el compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

Rendimiento: 0,25 g (70 %); IR (KBr): 3422, 3135, 1664, 1623, 1559 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7,56 (d, 1H), 7,36 (m, 3H), 6,36 (s, 1H), 6,20 (s, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,70 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 2,88 (m, 1H), 2,58 (s, 3H), 2,35 (m, 1H), 1,88 (m, 1H); MS (ES+): m/z 402 (M+1); Análisis: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClNO}_5$ C, 62,24 (62,71); H, 5,07 (4,97); N, 3,60 (3,48); Cl, 9,01 (8,83).

(c) Preparación de clorhidrato de (+)-trans-2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi metil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (compuesto B o riviciclib)

Se suspendió el compuesto como el obtenido en la parte (b) (0,2 g, 0,48 mmol) en IPA (5 ml) y se añadió HCl al 3,5 % (25 ml). Se calentó la suspensión, obteniéndose una solución transparente. La solución se enfrió, y se filtró el sólido, obteniéndose el compuesto, clorhidrato de (+)-trans-2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

Rendimiento: 0,21 g (97 %); pf: 188 - 192 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +21,3^\circ$ (c = 0.2, metanol); RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz): δ 7,80 (d, 1H), 7,60 (m, 3H), 6,53 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,89 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,38 (m, 1H), 2,90 (s, 3H), 2,45 (m, 1H), 2,35 (m, 1H); MS (ES+): m/z 402 (M+1) (base libre).

Datos biológicos:**Ensayos farmacológicos:****Ejemplo 1:**

I. Estudio *in vitro* que implica el uso de la combinación del compuesto A (inhibidor de CDK, también conocido como voruciclib) y vemurafenib (inhibidor de BRAFV600E) en estirpes celulares de melanoma mutadas con BRAFV600E

Objetivo:

Estudiar el efecto de la combinación del compuesto A (inhibidor de CDK, también denominado voruciclib) y vemurafenib (inhibidor de BRAFV600E) sobre el ciclo celular y la apoptosis en estirpes celulares de melanoma mutadas con BRAFV600E.

Materiales y métodos:**Estirpes celulares**

En este estudio, se usaron celulares de melanoma G361 y SK-MEL3 obtenidas de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), EE.UU. G361 es una estirpe celular sensible al vemurafenib, mientras que SK-MEL3 es una estirpe celular resistente al vemurafenib. Ambas estirpes celulares están mutadas con BRAFV600E.

A. Análisis de la distribución del ciclo celular usando citometría de flujo:

Se sembraron células de melanoma G361/SK-MEL3 en matraces de cultivo tisular de 25 mm³. Después de 24 h, las células G361 se trataron con: i) compuesto A (1 µM); ii) vemurafenib (1 µM); y iii) compuesto A (1 µM) y vemurafenib (1 µM) juntos durante 5 días.

En el caso de las células de melanoma SK-MEL3, las células se trataron con: i) compuesto A (1 µM); ii) vemurafenib (10 µM); y iii) compuesto A (1 µM) y vemurafenib (10 µM) juntos durante 5 días.

Las células de control se dejaron sin tratar durante 5 días. Las células desprendidas y adherentes se recogieron al final de los 5 días. Las células se lavaron dos veces con aproximadamente 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con centrifugación a 1000 rpm durante 10 min. Las células se volvieron a suspender en 500 µl de PBS y se fijaron en 500 µl de etanol al 70 % helado. Se incubaron las células fijas a temperatura ambiente durante 30 min, se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min. Al sedimento celular, se añadió 1 ml de etanol al 70 % enfriado y se almacenó a una temperatura inferior a 0 °C hasta su posterior análisis. Las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el fijador y se volvieron a suspender en 250 µl de PBS. A esto, se añadieron 12,5 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml en PBS) y 12,5 µl de ARNasa A (1 mg/ml). Tras una incubación a 37 °C durante 30 min, las células se analizaron usando citometría de flujo.

Se usó un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACS Calibur, EE.UU.) para estos estudios de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó el láser de ión argón fijado a 488 nm como fuente de excitación. Las células con contenido de ADN entre 2n y 4n se designaron como en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular, de acuerdo con lo definido por el nivel de fluorescencia roja. Las células que presentan menos de 2n de contenido de ADN se designaron como células sub-G1. Se expresó el número de células en cada compartimiento del ciclo celular como un porcentaje del número total de células presentes.

B. Tinción de anexina V-FITC (para la detección de la apoptosis temprana)

La anexina V-FITC es una sonda sensible para identificar células apoptóticas. Durante la apoptosis temprana, la fosfolípido fosfatidil serina (PS) de la membrana se transloca de la laminilla interna a la laminilla externa de la membrana plasmática, exponiendo así la PS al entorno celular externo. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente del calcio de 35-36 kDa que tiene una alta afinidad por la PS y que se une a las células con PS expuesta.

El yoduro de propidio es un colorante polar, que entra en las células a través de membranas con fugas y, por lo tanto, se usa junto con el isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la detección de la apoptosis tardía.

Se sembraron células de melanoma G361 en matraces de cultivo tisular de 25 mm³. Después de 24 h, las células se trataron con: i) compuesto A (1 µM); ii) vemurafenib (1 µM); y iii) compuesto A (1 µM) y vemurafenib (1 µM) juntos; durante 24 h. Las células de control se dejaron sin tratar durante 24 h. El medio que contenía células flotantes se recogió y se combinó con las células adherentes después de la recogida con tripsina en los diferentes puntos temporales. Las células se lavaron dos veces con PBS frío con centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Se volvió a suspender el sedimento celular en tampón de unión x1 (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM) a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se tiñeron 100 µl de la solución (1×10^5 células) con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente (25-30 °C) a oscuras y la muestra se analizó mediante citometría de flujo.

Resultados:

Los resultados de estos estudios se representan en las Fig. 1-3.

Conclusión:

La Figura 1 indica que las células G361 tratadas con vemurafenib muestran una detención significativa de G1 del 91,94 % frente a las células de control (72,36 %). Como se vio en la fase subG1, las células tratadas con el compuesto A y vemurafenib solo mostraron solo un 9,48 % y un 2,3 % de apoptosis respectivamente, mientras que las células tratadas con la combinación del compuesto A y vemurafenib mostraron un 53,67 % de células sometidas a apoptosis, lo que indica que la combinación es sinérgica.

En la Figura 2, el recuadro superior derecho indica las células G361 que se encuentran en apoptosis temprana. Posteriormente, estas células se someten a una apoptosis que conduce a la muerte celular. Las células tratadas con la combinación de compuesto A y vemurafenib mostraron un 27 % de células en apoptosis temprana (células teñidas con anexina) frente al 8 % y al 20 % para las células tratadas con solo el compuesto A y vemurafenib, respectivamente. Este dato indica que la combinación presenta sinergia.

En la Figura 3, las células SK-MEL3 tratadas solo con vemurafenib mostraron una detención de G1 significativa del 76,78 % frente a las células de control (67,38 %). La apoptosis se observa en el 29,75 % de las células tratadas con la combinación de compuesto A y vemurafenib, como se ve desde la fase subG1, mientras que las células tratadas con solo el compuesto A y vemurafenib mostraron solo un 19,63 % y 15,12 % de apoptosis respectivamente, lo que indica que la combinación es sinérgica.

Los resultados tal como se muestran en las Fig. 1-3 y como se han explicado anteriormente, establecen claramente que la combinación de compuesto A y vemurafenib es sinérgica en las estirpes celulares de melanoma mutado con BRAFV600E sensibles y resistentes a vemurafenib, e induce una mayor apoptosis cuando se usan en combinación en comparación con el compuesto A y vemurafenib cuando se usan solos.

II. Estudios de combinación doble *in vitro* de compuesto A con vemurafenib (inhibidor de BRAFV600E) en células de melanoma mutadas con BRAF humanas

Objetivo: El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de la combinación de compuesto A (inhibidor de CDK) y vemurafenib (inhibidor de BRAFV600E) en células de melanoma mutadas con BRAF.

A. Materiales

Compuestos de ensayo	: compuesto A (preparado en los laboratorios de PEL); vemurafenib (Nanjing Chemlin Chemical Industry Co.,Ltd, China)
Vehículo	: DMSO (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Alemania)
Preparación de las dosis	: se pesaron el compuesto A y vemurafenib, y se disolvieron en la cantidad necesaria de DMSO, dando una solución madre necesaria.
Sistema de ensayo	: el sistema de ensayo incluía las estirpes celulares G361, A375 y MDAMB-435S (mutadas con BRAFV600E), que se adquirieron en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), EE.UU.

B. Métodos

Los estudios de citotoxicidad usando el compuesto A y vemurafenib en diversas combinaciones, se llevaron a cabo usando el ensayo de deshidrogenasa de células vivas con CCK8.

i) Ensayo de deshidrogenasa de células vivas con el kit de recuento de células 8 (CCK8)

Las estirpes celulares de cáncer de melanoma mutadas con BRAFV600E humanas, G361, A375 y MDAMB-435S se sembraron a una densidad de 3.000 células/pocillo en 199 µl de medio RPMI 1640 en placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche para permitir que las células se adhirieran. Las células se trataron con los compuestos de ensayo respectivos. En total, había diez grupos;

- i) 1 µM de vemurafenib solo durante 48 h;
- ii) 0,3 µM / 0,1 µM de compuesto A solo durante 48 h;
- iii) 1 µM / 0,3 µM de compuesto A solo durante 48 h;
- iv) 3 µM / 1 µM de compuesto A solo durante 48 h;
- v) 10 µM / 3 µM de compuesto A solo durante 48 h;
- vi) combinación de 0,3 µM / 0,1 µM de compuesto A y 1 µM de vemurafenib durante 48 h;
- vii) combinación de 1 µM / 0,3 µM de compuesto A y 1 µM de vemurafenib durante 48 h;
- viii) combinación de 3 µM / 1 µM de compuesto A y 1 µM de vemurafenib durante 48 h;
- ix) combinación de 10 µM / 3 µM de compuesto A y 1 µM de vemurafenib durante 48 h;
- x) los pocillos de control se trataron con vehículo DMSO durante 48 h.

Las placas se incubaron en incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C±1 °C. Se usó vemurafenib a una

concentración de 1,0 μM para las 3 estirpes celulares diferentes, mientras que el compuesto A se usó a concentraciones de 0,3 μM , 1 μM , 3 μM y 10 μM en el caso de las células de melanoma A375 y a concentraciones de 0,1 μM , 0,3 μM , 1,0 μM , 3,0 μM en el caso de las células de melanoma G361 y MDA MB435S. Al final de los períodos de incubación, las placas se ensayaron usando el protocolo de ensayo de citotoxicidad de CCK8. La sinergia se determinó mediante el índice de combinación (IC) calculado usando el software Compusyn de Chou y Talalay (4). IC <1 es sinérgico, IC = 1 es aditivo e IC > 1 es antagónico.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student, considerándose significativo un valor de $p < 0,05$. Los datos se expresan como la media $\pm$ el error típico de la media (ETM). Se obtuvo el valor medio de al menos dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

ii) Protocolo de ensayo de citotoxicidad

Se sembraron células en crecimiento logarítmico en placas a una densidad de 3×10^3 células/pocillo y se dejaron recuperar durante 16-18 h. Las células se expusieron a una concentración variable de ambos compuestos, compuesto A y vemurafenib durante 48 h. Después de 48 h, se determinó la toxicidad celular mediante el reactivo CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc, Mariland y Japón). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se añadieron 5 μl /pocillo de reactivo CCK-8, y las placas se incubaron durante 2 h. Se determinó la toxicidad midiendo la absorbancia en el lector de microplacas de multifluorescencia de Tecan Sapphire a una longitud de onda de 450 nm corregida a 650 nm y normalizando con respecto a los controles. Todos los experimentos se realizaron dos veces por triplicado.

Programa de tratamiento para el compuesto A y vemurafenib:

Las Tablas 1 y 2 indican el programa de tratamiento del compuesto A y vemurafenib en células A375 y en células G361 y MDA-MB435S, respectivamente.

Tabla 1: Plan de tratamiento del compuesto A y vemurafenib en células A375

n.º de serie	Grupos de tratamiento para las células A375	Plan de tratamiento (en horas (h))
i	compuesto A (1 μM)	48 h
ii	compuesto A (0,3 μM)	48 h
iii	compuesto A (1,0 μM)	48 h
iv	compuesto A (3,0 μM)	48 h
v	compuesto A (10,0 μM)	48 h
vi	compuesto A (0,3 μM) y vemurafenib (1 μM)	48 h
vii	compuesto A (1,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	48 h
viii	compuesto A (3,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	48 h
ix	compuesto A (10,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	48 h
x	Control + Vehículo (DMSO)	48 h

Tabla 2: Plan de tratamiento del compuesto A y vemurafenib en células G361 y MDA-MB435S

n.º de serie	Grupos de tratamiento para las células G361 y MDA-MB435S	Plan de tratamiento (en horas (h))
i	vemurafenib (1 μM)	48 h
ii	compuesto A (0,1 μM)	48 h
iii	compuesto A (0,3 μM)	48 h
iv	compuesto A (1,0 μM)	48 h
v	compuesto A (3,0 μM)	48 h
vi	compuesto A (0,1 μM) y vemurafenib (1 μM)	48 h
vii	compuesto A (0,3 μM) y vemurafenib (1 μM)	48 h

(continuación)

n.º de serie	Grupos de tratamiento para las células G361 y MDA-MB435S	Plan de tratamiento (en horas (h))
viii	compuesto A (1,0 µM) y vemurafenib (1 µM)	48 h
ix	compuesto A (3,0 µM) y vemurafenib (1 µM)	48 h
x	Control + Vehículo (DMSO)	48 h

Resultados:

- 5 Los valores de CI_{50} de la citotoxicidad para el compuesto A y vemurafenib y sus combinaciones en diferentes estirpes celulares se presentan en la Tabla 3. Las Figuras 4-6 y las Tablas 4-6 representan el efecto de la combinación del compuesto A y vemurafenib en diversas estirpes celulares de melanoma.

Tabla 3: Determinación de la CI_{50} del compuesto A y vemurafenib en las estirpes celulares G361, A375 y MDAMB-435S (mutadas con BRAF^{V600E})

n.º de serie	Estirpe celular	Compuestos	CI_{50} en µM (± ETM)
1	A375	compuesto A	5,5 ± 0,67
		compuesto A	0,8 ± 0,07
2	G361	compuesto A	0,75 ± 0,056
		compuesto A	0,2 ± 0,032
3	MDAMB435S	compuesto A	0,85 ± 0,064
		compuesto A	0,7 ± 0,058

En las Fig. 4-6, el eje X muestra la concentración del compuesto A y vemurafenib solos y de los compuestos en combinación, el eje Y izquierdo muestra el % de citotoxicidad y el eje Y derecho muestra los valores del índice de combinación.

En la Fig. 4, las células tratadas con vemurafenib a 1 µM mostraron una inhibición del 23 %, mientras que las células tratadas con el compuesto A a 3 µM mostraron una inhibición de las células del 46 %. Sin embargo, cuando las células se trataron con vemurafenib en combinación con el compuesto A a esta concentración subóptima, se observó un efecto sinérgico del 83 % de inhibición de las células con un índice de combinación (IC) de 0,70. Los datos sinérgicos presentados representan la media de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Tabla 4: Valores medios del índice de combinación para la combinación del compuesto A y vemurafenib en células A375

Concentración en µM	Índice de combinación (IC del 95 %) en células A375
compuesto A (0,3 µM) y vemurafenib (1 µM)	0,66 (de 0,58 a 0,75)
compuesto A (1,0 µM) y vemurafenib (1 µM)	0,68 (de 0,60 a 0,77)
compuesto A (3,0 µM) y vemurafenib (1 µM)	0,70 (de 0,62 a 0,79)
compuesto A (10,0 µM) y vemurafenib (1 µM)	0,76 (de 0,68 a 0,85)
IC = Intervalos de Confianza	

En la Fig. 5, las células tratadas con vemurafenib a 1 µM mostraron una inhibición del 30 %, mientras que las células tratadas con el compuesto A a 0,3 µM mostraron una inhibición de las células de solo el 2 %. Sin embargo, cuando las células se trataron con vemurafenib en combinación con el compuesto A a esta concentración subóptima, se observó un notable efecto sinérgico del 52 % de inhibición de las células con un valor del índice de combinación de 0,77. Cuando las células se trataron con el compuesto A (3 µM) en combinación con vemurafenib (1 µM), mostró una inhibición de las células del 91 % con un índice de combinación de 0,9. Los datos sinérgicos presentados representan la media de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Tabla 5: Valores medios del índice de combinación para la combinación del compuesto A y vemurafenib en células G361

Concentración en μM	Índice de combinación (IC del 95 %) en células G361
compuesto A (0,1 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,79 (de 0,74 a 0,84)
compuesto A (0,3 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,77 (de 0,72 a 0,82)
compuesto A (1,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,87 (de 0,82 a 0,92)
compuesto A (3,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,97 (de 0,92 a 1,02)
IC = Intervalos de Confianza	

En la Fig. 6, las células tratadas con vemurafenib a 1 μM mostraron una inhibición de las células del 31 %, mientras que las células tratadas con el compuesto A a 1 μM mostraron una inhibición de las células del 32 %. Cuando las células se trataron con vemurafenib en combinación con el compuesto A a esta concentración subóptima, se observó un efecto sinérgico del 90 % de inhibición de las células con un índice de combinación de 0,74. Los datos sinérgicos presentados representan la media de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Tabla 6: Valores medios del índice de combinación para la combinación del compuesto A y vemurafenib en células MDA-MB-435S

Concentración en μM	Índice de combinación (IC del 95 %) en células MDA-MB435S
compuesto A (0,1 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,83 (de 0,78 a 0,88)
compuesto A (0,3 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,78 (de 0,72 a 0,83)
compuesto A (1,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,74 (de 0,68 a 0,79)
compuesto A (3,0 μM) y vemurafenib (1 μM)	0,90 (de 0,85 a 0,96)
IC = Intervalos de Confianza	

Conclusión:

La combinación de vemurafenib y el compuesto A mostró un notable efecto sinérgico en las células de melanoma mutadas con BRAF.

Bibliografía:

1. Smalley K. S., Lioni M., Palma M. D., Xiao M., Desai B., Egyhazi S., Hansson J., Wu H., King A. J., Van Belle P., Elder D. E., Flaherty K. T., Herlyn M., Nathanson K. L.; "Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas"; *Mol. Cancer Ther.*, 2008, 7, 2876-2883.
2. Smalley K. S. M. y Flaherty K. T.; "Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for Melanoma"; *British Journal of Cancer*, 2009, 100, 431-435.
3. Dhomen N., Marais R.; "BRAF signaling and targeted therapies in melanoma" *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2009, 23, 3, 529-45.
4. Ting-Chao Chou; "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies" *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58, 621-81.

Ejemplo 2:

A. Estudios de combinación *in vitro* del compuesto A (inhibidor de CDK, también conocido como voruciclib) con un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF (vemurafenib o dabrafenib) o un inhibidor de MEK (trametinib) en una estirpe celular de melanoma mutada con BRAFV600E (A375) y su derivado resistente a vemurafenib (A375R)

Objetivo:

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de la combinación de inhibidor de CDK (voruciclib) con un inhibidor de BRAF (vemurafenib o dabrafenib) o un inhibidor de MEK (trametinib) en células de melanoma mutadas con BRAF.

B. Materiales:

Compuestos de ensayo	: compuesto A (preparado en los laboratorios de PEL); vemurafenib (Selleckchem EE.UU., S1267); dabrafenib (Selleckchem EE.UU., S2807) y trametinib (Selleckchem EE.UU., S2673)
Vehículo	: DMSO (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Alemania)
Preparación de las dosis	: se pesaron los compuestos de ensayo, y se disolvieron en la cantidad necesaria de DMSO, dando una solución madre necesaria.
Sistema de ensayo	: El sistema de ensayo incluía las estirpes celulares A375 (mutadas con BRAFV600E), que se adquirieron en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), EE.UU. y la estirpe celular A375R (resistente a vemurafenib - desarrollada en los laboratorios de PEL).

5 C. Métodos:

Los estudios de citotoxicidad usando todos los compuestos de ensayo como agentes individuales y en combinaciones se llevaron a cabo usando el ensayo de deshidrogenasa de células vivas de CCK8.

10 Ensayo de deshidrogenasa de células vivas del kit de recuento de células 8 (CCK8):

Se sembraron células de melanoma mutadas con BRAFV600E en crecimiento logarítmico a una densidad de 1.500 células/pocillo en 30 µl de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en una placa de 384 pocillos (Corning, EE. UU.) usando la plataforma automatizada Tecan (sistema de manejo de líquidos FreedomEvo) e se incubaron durante aproximadamente 12-16 h para permitir que las células se adhirieran. Las células se trataron durante 48 h con diferentes dosis de compuesto A y agentes antineoplásicos (vemurafenib o dabrafenib o trametinib) como monoterapia (usados individualmente) y en combinaciones. Se llevaron a cabo estudios usando diferentes dosis para cada combinación (por ejemplo, combinación de compuesto A y vemurafenib). Las proporciones de tratamiento de los compuestos de ensayo cuando se usan individualmente y en combinación en células A375 y A375R se representan en las Tablas 7A-7C (es decir, combinación de compuesto A y vemurafenib; combinación de compuesto A y dabrafenib; y combinación de compuesto A y trametinib). Las siguientes dosis de compuesto A (µM): 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015; vemurafenib (µM) 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,9; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; dabrafenib (µM) 3; 1,5; 0,75; 0,37; 0,18; 0,09; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; trametinib (µM) 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,031; 0,015; 0,007; 0,003; 0,001, Ltd. Se mezclaron las dosis anteriores de agentes antineoplásicos (vemurafenib o dabrafenib o trametinib) en múltiples proporciones con el compuesto A como se muestra en las Tablas 7A-7C. Los controles usados eran solo células o células junto con el vehículo (DMSO).

Las placas se incubaron durante 48 h en una incubadora de CO₂ humidificada al 5 % a 37 °C±1 °C. Tras la incubación, las placas se ensayaron con el reactivo CCK8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc, Mariland y Japón). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se añadieron 3 µl de reactivo CCK-8 en cada pocillo de la placa de 384 pocillos y las placas se incubaron durante 2 h. Se determinó la toxicidad midiendo la absorbancia en el lector de microplacas de multifluorescencia de Tecan Sapphire a una longitud de onda de 450 nm normalizada con respecto a los controles. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

La potencia de la combinación se cuantificó usando el software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO, EE. UU.) que se basa en el método de Chou Talalay que calcula un índice de combinación (IC) con valores de IC inferiores a 1, lo que indica una sinergia.

Tabla 7A-7C: Proporciones de tratamiento de compuesto A y agentes antineoplásicos (vemurafenib o dabrafenib o trametinib) como monoterapia (usados individualmente) y en combinaciones en células A375 y A375R.

Las proporciones de tratamiento del compuesto A (indicado como A) y vemurafenib (indicado como V) solos o en combinaciones se representan en la tabla 7A.

Tabla 7A:

Concentraciones en µM											
A (0)	V (30)	V (15)	V (7,5)	V (3,75)	V (1,88)	V (0,94)	V (0,47)	V (0,23)	V (0,12)	V (0,059)	
A (1)	A (1) + V (30)	A (1) + V (15)	A (1) + V (7,5)	A (1) + V (3,75)	A (1) + V (1,88)	A (1) + V (0,94)	A (1) + V (0,47)	A (1) + V (0,23)	A (1) + V (0,12)	A (1) + V (0,059)	
A (0,5)	A (0,5) + V (30)	A (0,5) + V (15)	A (0,5) + V (7,5)	A (0,5) + V (3,75)	A (0,5) + V (1,88)	A (0,5) + V (0,94)	A (0,5) + V (0,47)	A (0,5) + V (0,23)	A (0,5) + V (0,12)	A (0,5) + V (0,059)	
A (0,25)	A (0,25) + V (30)	A (0,25) + V (15)	A (0,25) + V (7,5)	A (0,25) + V (3,75)	A (0,25) + V (1,88)	A (0,25) + V (0,94)	A (0,25) + V (0,47)	A (0,25) + V (0,23)	A (0,25) + V (0,12)	A (0,25) + V (0,059)	
A (0,125)	A (0,125) + V (30)	A (0,125) + V (15)	A (0,125) + V (7,5)	A (0,125) + V (3,75)	A (0,125) + V (1,88)	A (0,125) + V (0,94)	A (0,125) + V (0,47)	A (0,125) + V (0,23)	A (0,125) + V (0,12)	A (0,125) + V (0,059)	
A (0,0625)	A (0,0625) + V (30)	A (0,0625) + V (15)	A (0,0625) + V (7,5)	A (0,0625) + V (3,75)	A (0,0625) + V (1,88)	A (0,0625) + V (0,94)	A (0,0625) + V (0,47)	A (0,0625) + V (0,23)	A (0,0625) + V (0,12)	A (0,0625) + V (0,059)	
A (0,0312)	A (0,0312) + V (30)	A (0,0312) + V (15)	A (0,0312) + V (7,5)	A (0,0312) + V (3,75)	A (0,0312) + V (1,88)	A (0,0312) + V (0,94)	A (0,0312) + V (0,47)	A (0,0312) + V (0,23)	A (0,0312) + V (0,12)	A (0,0312) + V (0,059)	
A (0,0156)	A (0,0156) + V (30)	A (0,0156) + V (15)	A (0,0156) + V (7,5)	A (0,0156) + V (3,75)	A (0,0156) + V (1,88)	A (0,0156) + V (0,94)	A (0,0156) + V (0,47)	A (0,0156) + V (0,23)	A (0,0156) + V (0,12)	A (0,0156) + V (0,059)	

Las proporciones de tratamiento del compuesto A (indicado como A) y dabrafenib (indicado como D) solos o en combinaciones se representan en la tabla 7B.

Tabla 7B:

Concentraciones en µM											
A (0)	D (3)	D (1,5)	D (0,75)	D (0,38)	D (0,19)	D (0,094)	D (0,047)	D (0,023)	D (0,012)	D (0,006)	
A (1)	A (1) + D (3)	A (1) + D (1,5)	A (1) + D (0,75)	A (1) + D (0,38)	A (1) + D (0,19)	A (1) + D (0,094)	A (1) + D (0,047)	A (1) + D (0,023)	A (1) + D (0,012)	A (1) + D (0,006)	
A (0,5)	A (0,5) + D (3)	A (0,5) + D (1,5)	A (0,5) + D (0,75)	A (0,5) + D (0,38)	A (0,5) + D (0,19)	A (0,5) + D (0,094)	A (0,5) + D (0,047)	A (0,5) + D (0,023)	A (0,5) + D (0,012)	A (0,5) + D (0,006)	
A (0,25)	A (0,25) + D (3)	A (0,25) + D (1,5)	A (0,25) + D (0,75)	A (0,25) + D (0,38)	A (0,25) + D (0,19)	A (0,25) + D (0,094)	A (0,25) + D (0,047)	A (0,25) + D (0,023)	A (0,25) + D (0,012)	A (0,25) + D (0,006)	
A (0,125)	A (0,125) + D (3)	A (0,125) + D (1,5)	A (0,125) + D (0,75)	A (0,125) + D (0,38)	A (0,125) + D (0,19)	A (0,125) + D (0,094)	A (0,125) + D (0,047)	A (0,125) + D (0,023)	A (0,125) + D (0,012)	A (0,125) + D (0,006)	
A (0,0625)	A (0,0625) + D (3)	A (0,0625) + D (1,5)	A (0,0625) + D (0,75)	A (0,0625) + D (0,38)	A (0,0625) + D (0,19)	A (0,0625) + D (0,094)	A (0,0625) + D (0,047)	A (0,0625) + D (0,023)	A (0,0625) + D (0,012)	A (0,0625) + D (0,006)	
A (0,0312)	A (0,0312) + D (3)	A (0,0312) + D (1,5)	A (0,0312) + D (0,75)	A (0,0312) + D (0,38)	A (0,0312) + D (0,19)	A (0,0312) + D (0,094)	A (0,0312) + D (0,047)	A (0,0312) + D (0,023)	A (0,0312) + D (0,012)	A (0,0312) + D (0,006)	
A (0,0156)	A (0,0156) + D (3)	A (0,0156) + D (1,5)	A (0,0156) + D (0,75)	A (0,0156) + D (0,38)	A (0,0156) + D (0,19)	A (0,0156) + D (0,094)	A (0,0156) + D (0,047)	A (0,0156) + D (0,023)	A (0,0156) + D (0,012)	A (0,0156) + D (0,006)	

Las proporciones de tratamiento del compuesto A (indicado como A) y trametinib (indicado como T) solos o en combinaciones se representan en la tabla 7C.

Tabla 7C:

Concentraciones en µM											
A (0)	T (1)	T (0,5)	T (0,25)	T (0,13)	T (0,06)	T (0,031)	T (0,016)	T (0,008)	T (0,004)	T (0,002)	
A (1)	A (1) + T (1)	A (1) + T (0,5)	A (1) + T (0,25)	A (1) + T (0,13)	A (1) + T (0,06)	A (1) + T (0,031)	A (1) + T (0,016)	A (1) + T (0,008)	A (1) + T (0,004)	A (1) + T (0,002)	
A (0,5)	A (0,5) + T (1)	A (0,5) + T (0,5)	A (0,5) + T (0,25)	A (0,5) + T (0,13)	A (0,5) + T (0,06)	A (0,5) + T (0,031)	A (0,5) + T (0,016)	A (0,5) + T (0,008)	A (0,5) + T (0,004)	A (0,5) + T (0,002)	
A (0,25)	A (0,25) + T (1)	A (0,25) + T (0,5)	A (0,25) + T (0,25)	A (0,25) + T (0,13)	A (0,25) + T (0,06)	A (0,25) + T (0,031)	A (0,25) + T (0,016)	A (0,25) + T (0,008)	A (0,25) + T (0,004)	A (0,25) + T (0,002)	
A (0,125)	A (0,125) + T (1)	A (0,125) + T (0,5)	A (0,125) + T (0,25)	A (0,125) + T (0,13)	A (0,125) + T (0,06)	A (0,125) + T (0,031)	A (0,125) + T (0,016)	A (0,125) + T (0,008)	A (0,125) + T (0,004)	A (0,125) + T (0,002)	
A (0,0625)	A (0,0625) + T (1)	A (0,0625) + T (0,5)	A (0,0625) + T (0,25)	A (0,0625) + T (0,13)	A (0,0625) + T (0,06)	A (0,0625) + T (0,031)	A (0,0625) + T (0,016)	A (0,0625) + T (0,008)	A (0,0625) + T (0,004)	A (0,0625) + T (0,002)	
A (0,0312)	A (0,0312) + T (1)	A (0,0312) + T (0,5)	A (0,0312) + T (0,25)	A (0,0312) + T (0,13)	A (0,0312) + T (0,06)	A (0,0312) + T (0,031)	A (0,0312) + T (0,016)	A (0,0312) + T (0,008)	A (0,0312) + T (0,004)	A (0,0312) + T (0,002)	
A (0,0156)	A (0,0156) + T (1)	A (0,0156) + T (0,5)	A (0,0156) + T (0,25)	A (0,0156) + T (0,13)	A (0,0156) + T (0,06)	A (0,0156) + T (0,031)	A (0,0156) + T (0,016)	A (0,0156) + T (0,008)	A (0,0156) + T (0,004)	A (0,0156) + T (0,002)	

Resultados:

Los resultados de estos estudios se representan en las Fig. 7-13.

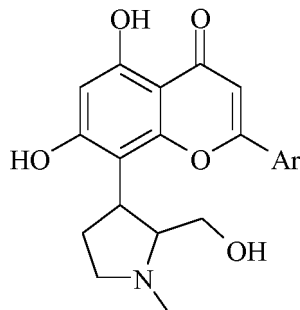
5 Conclusión:

1. A partir de las Fig. 7a y 7b, se puede concluir que la estirpe celular A375 es muy sensible al vemurafenib, mientras que A375R es resistente. Además, tanto A375 como A375R son igualmente sensibles al compuesto A (voruciclib).
2. A partir de las Fig. 8a y 8b, se puede concluir que la combinación del compuesto A (voruciclib) y vemurafenib muestra una fuerte sinergia ($IC < 0,5$) en la estirpe celular A375.
3. A partir de las Fig. 9a y 9b, se puede concluir que la combinación de compuesto A (voruciclib) y vemurafenib muestra una fuerte sinergia ($IC < 0,5$) en la estirpe celular A375R.
4. A partir de las Fig. 10a y 10b, se puede concluir que la combinación de compuesto A (voruciclib) y dabrafenib muestra una fuerte sinergia ($IC < 0,5$) en la estirpe celular A375.
5. A partir de las Fig. 11a y 11b, se puede concluir que la combinación de compuesto A (voruciclib) y dabrafenib muestra una fuerte sinergia ($IC < 0,5$) en la estirpe celular A375R.
6. A partir de las Fig. 12a y 12b, se puede concluir que la combinación del compuesto A (voruciclib) y trametinib muestra una fuerte sinergia ($IC < 0,5$) en la estirpe celular A375.
7. A partir de las Fig. 13a y 13b, se puede concluir que la combinación de compuesto A (voruciclib) y trametinib muestra una fuerte sinergia ($IC < 0,5$) en la estirpe celular A375R.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK (quinasa dependiente de la ciclina) seleccionado entre el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5



Fórmula I

10 en la que Ar es fenilo, que está sustituido con 2 sustituyentes diferentes seleccionados entre cloro y trifluorometilo; en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF (serina/treonina proteína quinasa B-raf) o un inhibidor de MEK (proteína quinasa activada por mitógenos), para su uso en el tratamiento del melanoma.

15 2. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de CDK es clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (compuesto A, también conocido como voruciclib).

20 3. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de BRAF o el inhibidor de MEK es un inhibidor de la forma mutada V600 de BRAF.

4. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el inhibidor de BRAF es un inhibidor de la forma mutada V600E de BRAF.

25 5. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de BRAF se selecciona entre sorafenib, vemurafenib, GDC-0879, dabrafenib, PLX4720, BMS-908662, LGX818, PLX3603, ARQ-736, DP-4978 o RAF265.

30 6. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el inhibidor de BRAF es vemurafenib.

7. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el inhibidor de BRAF es dabrafenib.

35 8. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el inhibidor de MEK es un inhibidor de la forma mutada V600E o V600K de BRAF.

40 9. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de MEK se selecciona entre selumetinib, binimetinib, PD-0325901, trametinib, cobimetinib, refametinib, pimasertib, TAK-733 o WX-554.

10. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el inhibidor de MEK es trametinib.

45 11. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el dicho inhibidor de CDK; y el dicho al menos un agente antineoplásico seleccionado entre un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK; se administran de forma simultánea o secuencial a un sujeto que lo necesita.

50 12. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el melanoma es melanoma no refractario, melanoma mutante BRAF no refractario, melanoma mutante BRAFV600 no refractario, melanoma mutante BRAFV600E o BRAFV600K no refractario.

55 13. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el melanoma es melanoma recurrente o refractario, melanoma mutante BRAF recurrente o refractario,

melanoma mutante BRAFV600 recurrente o refractario, melanoma mutante BRAFV600E recurrente o refractario, o melanoma mutante BRAFV600K.

- 5 14. El inhibidor de CDK y al menos un agente antineoplásico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el melanoma es melanoma metastásico, melanoma mutante BRAF metastásico, melanoma mutante BRAFV600 metastásico, melanoma mutante BRAFV600E metastásico o melanoma mutante BRAFV600K metastásico.

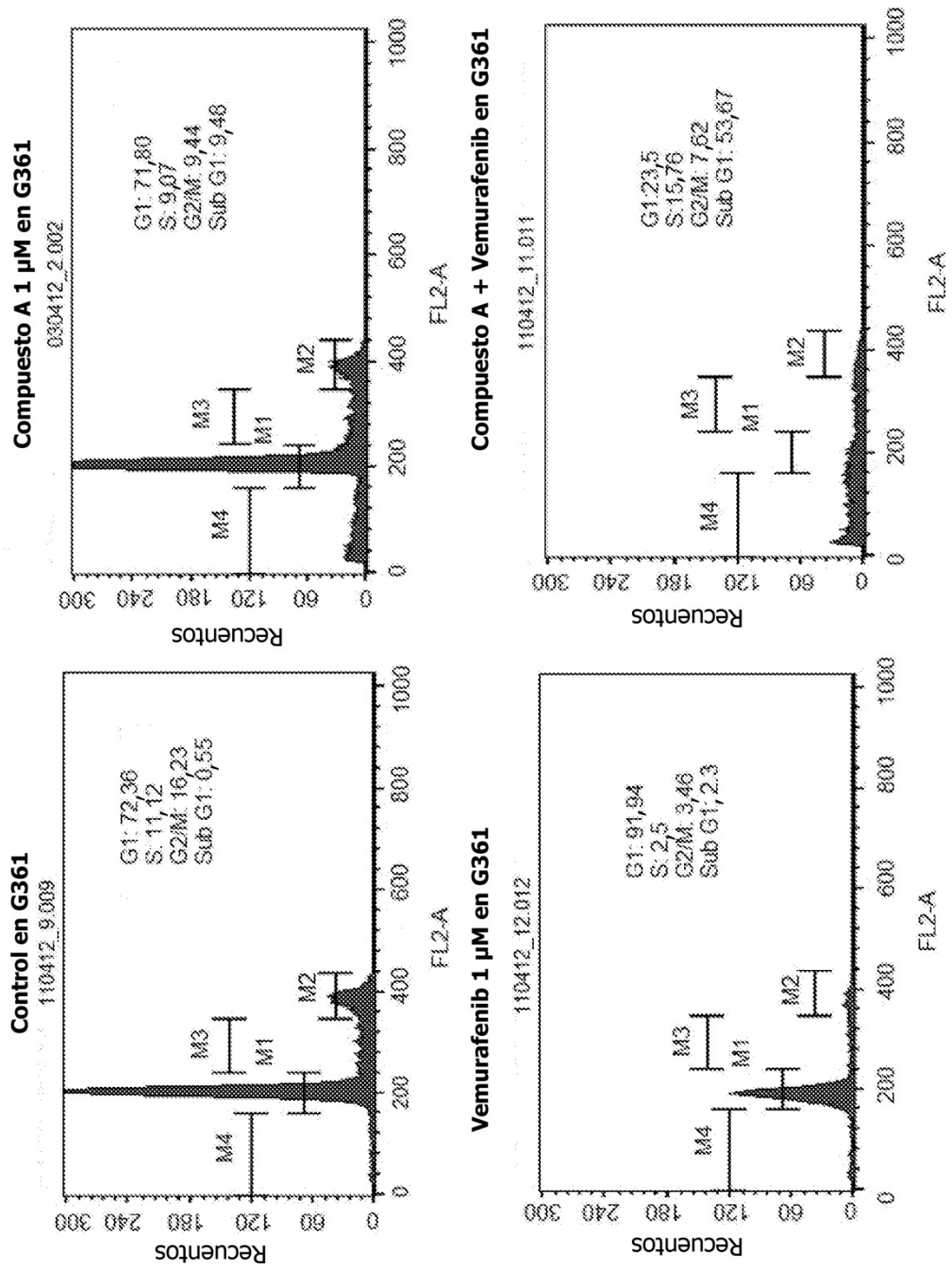


Figura 1

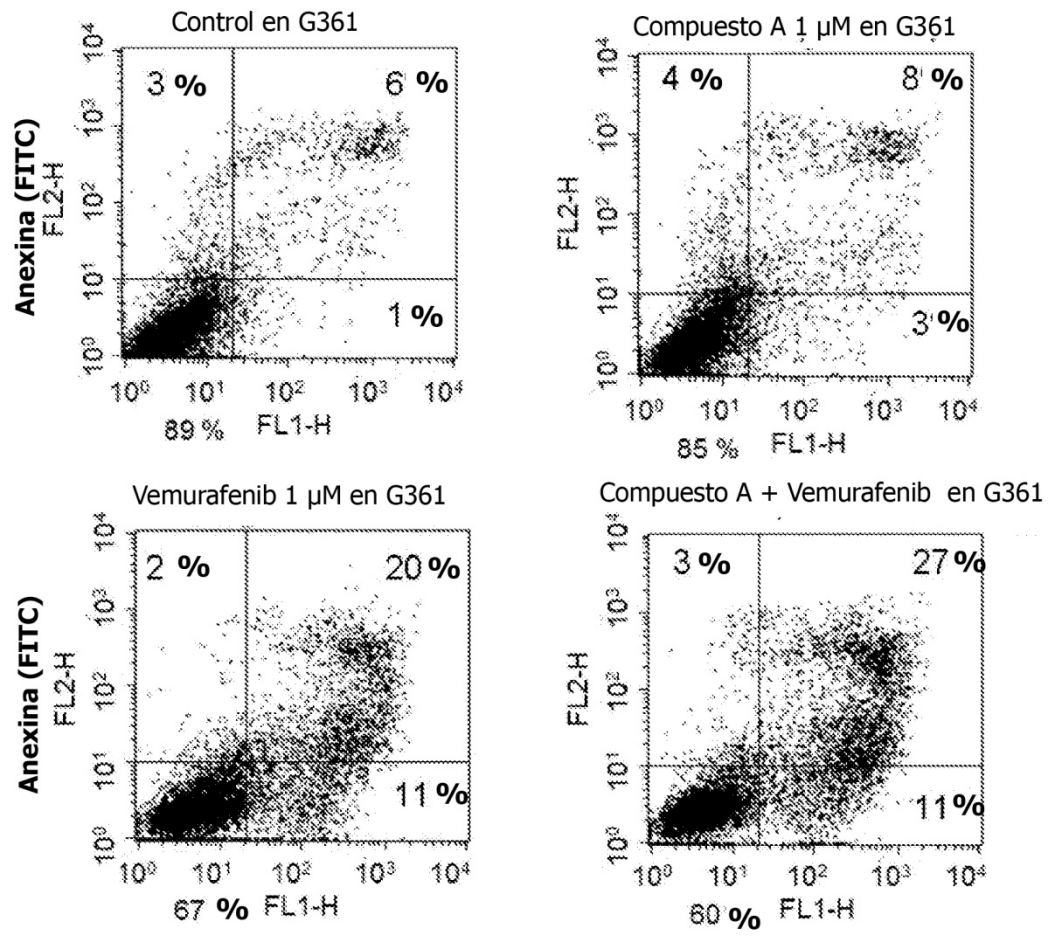


Figura 2

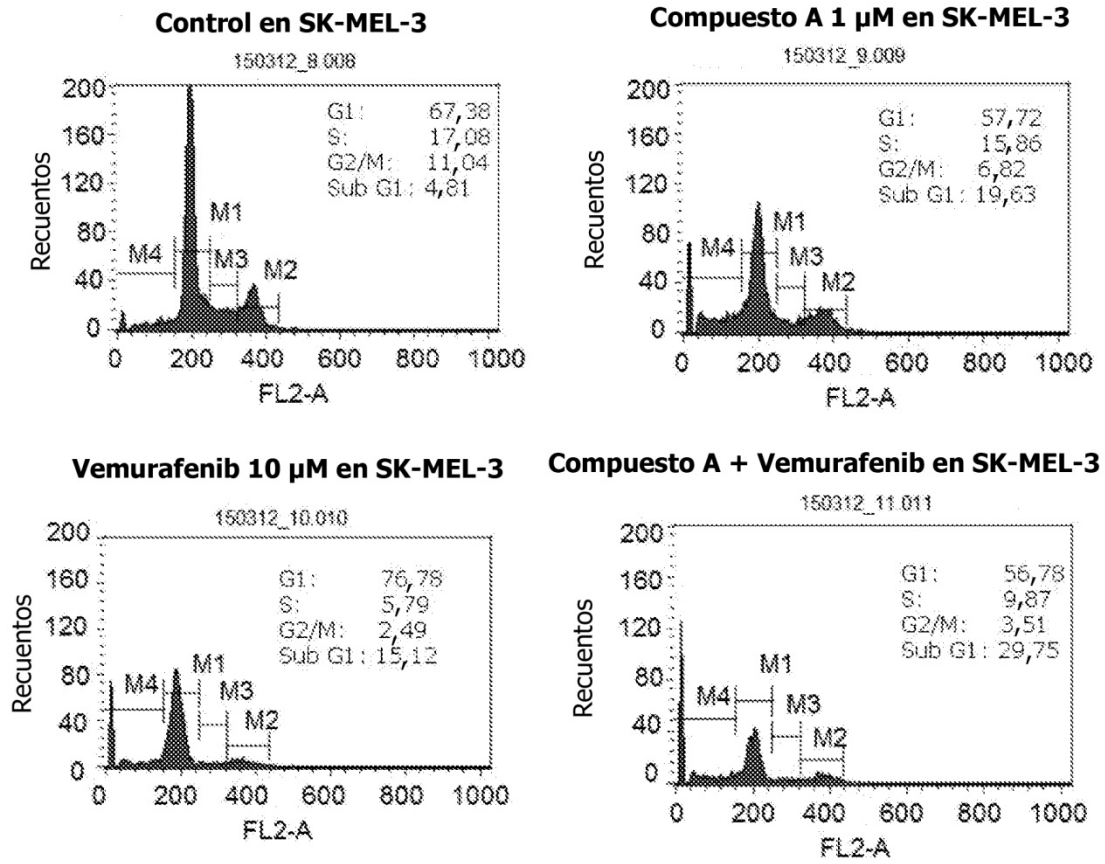


Figura 3

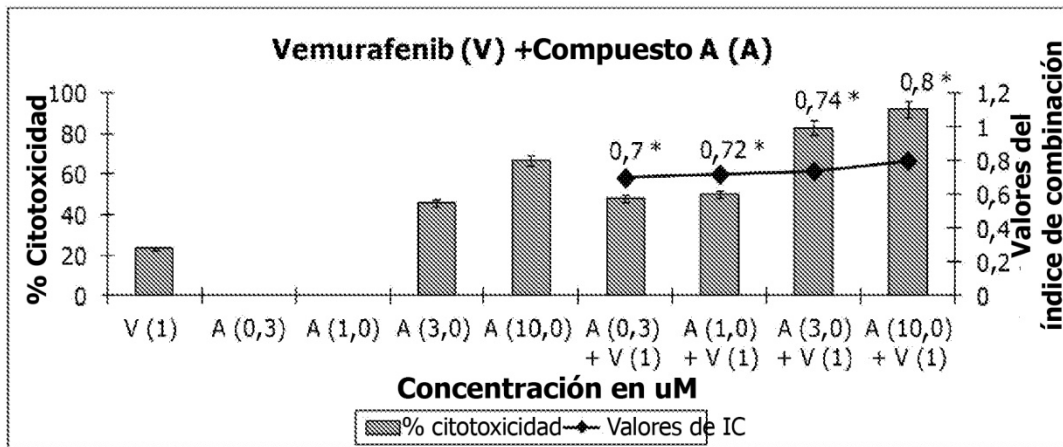


Figura 4

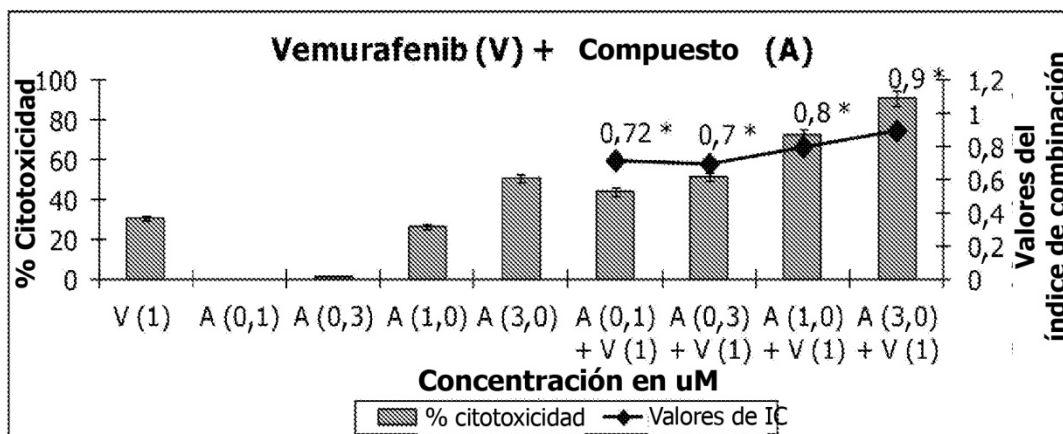


Figura 5

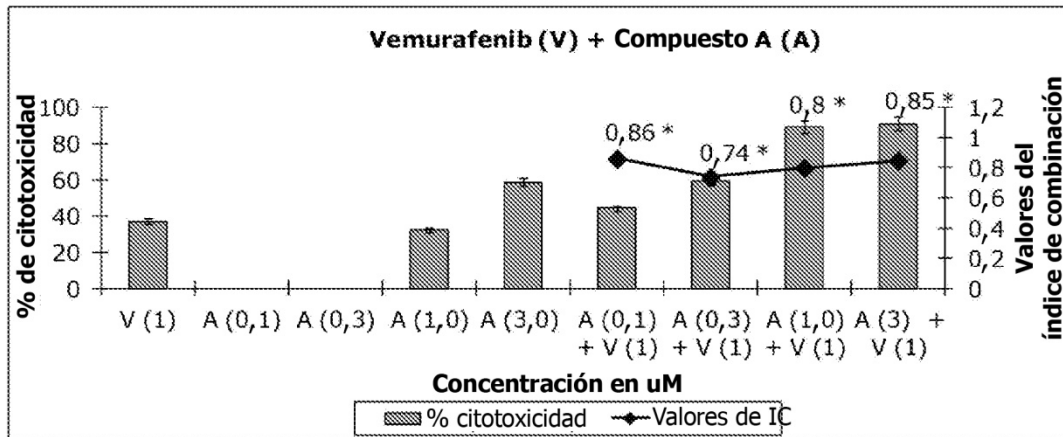


Figura 6

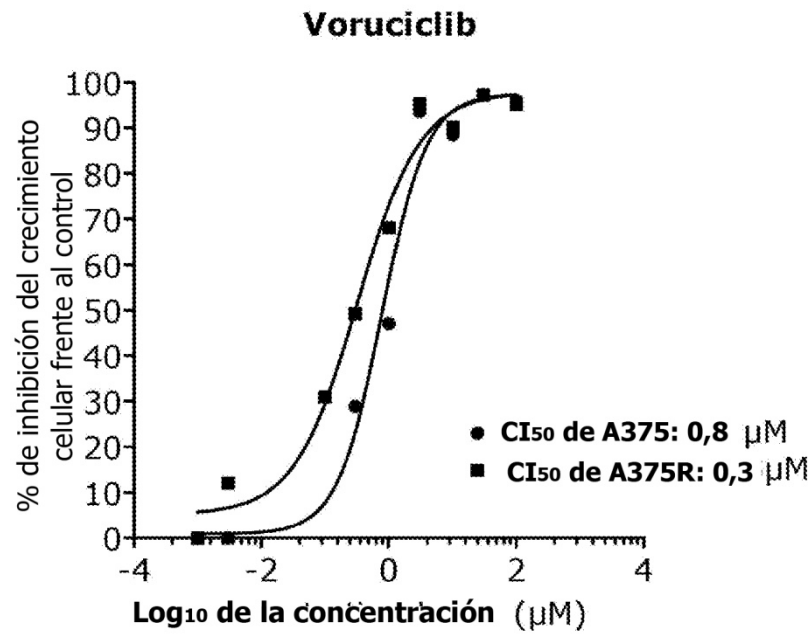


Figura 7a

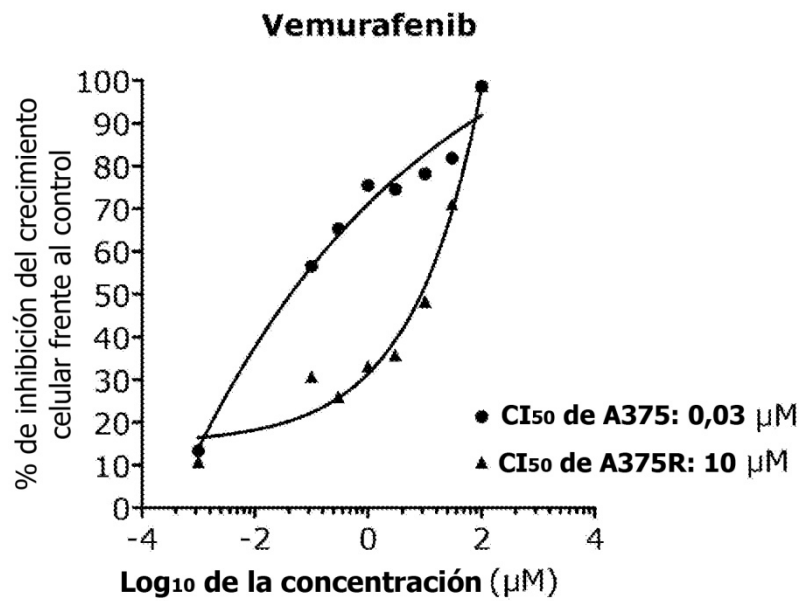


Figura 7b

Voruciclib y Vemurafenib
(A375)
(68 puntos de combinación)

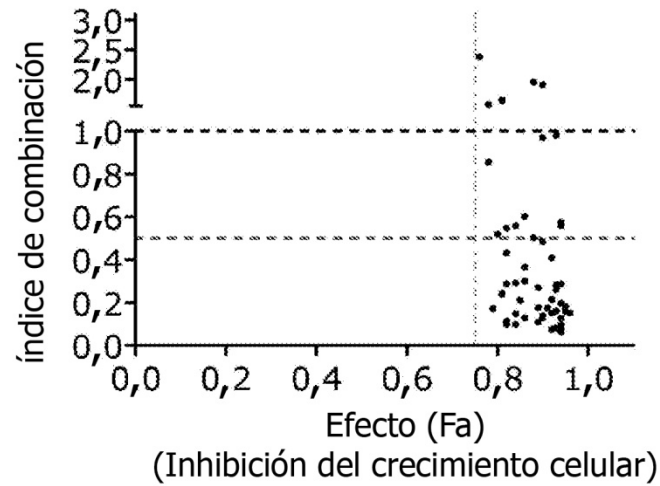


Figura 8a

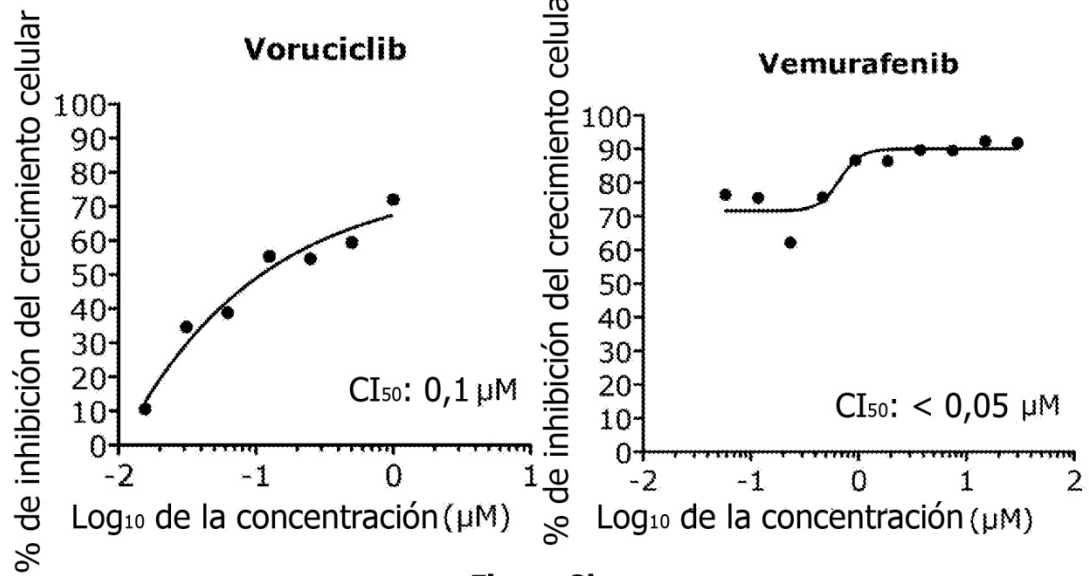


Figura 8b

Voruciclib y Vemurafenib
(A375R)
(68 puntos de combinación)

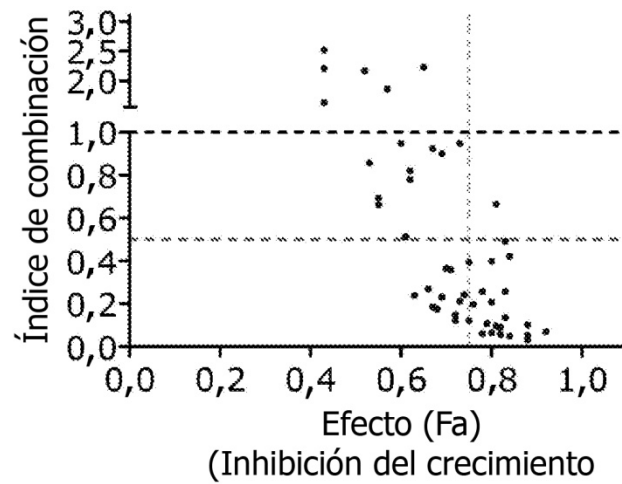


Figura 9a

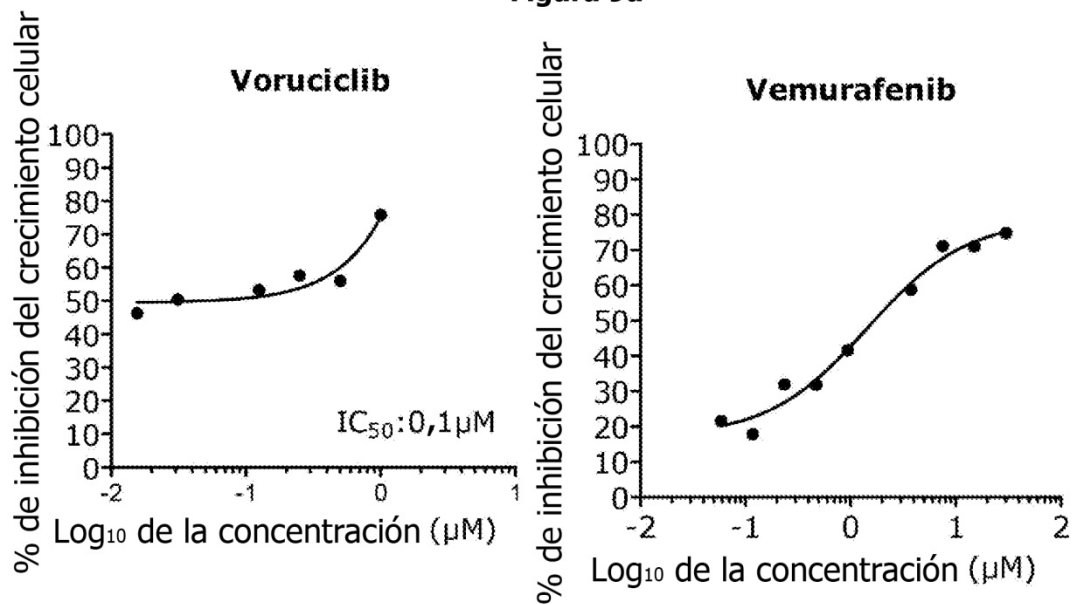


Figura 9b

**Voruciclib and Dabrafenib
(A375)**

(68 puntos de combinación)

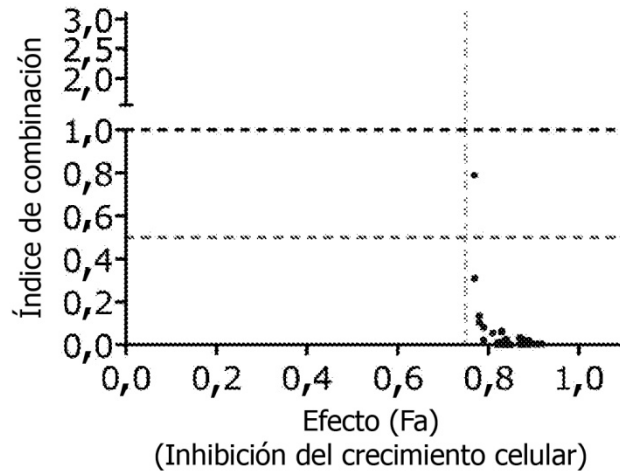


Figura 10a

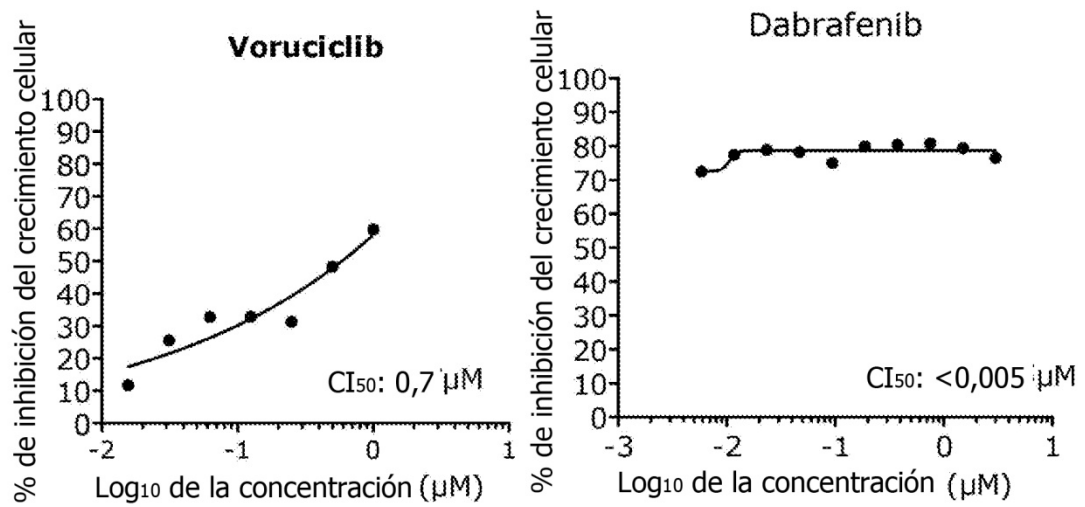


Figura 10b

Voruciclib y Dabrafenib

(A375R)

(68 puntos de combinación)

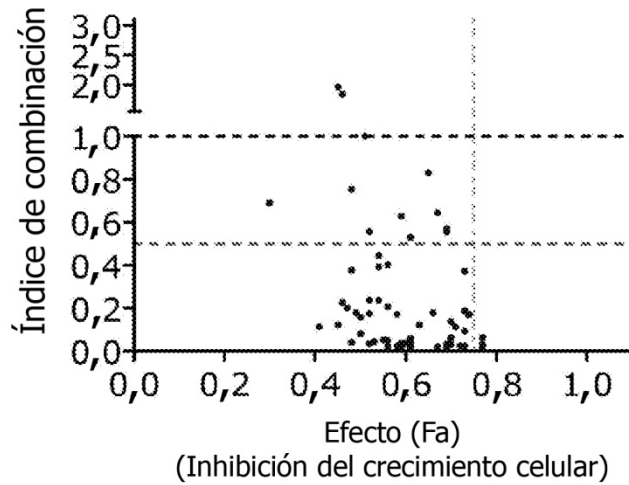


Figura 11a

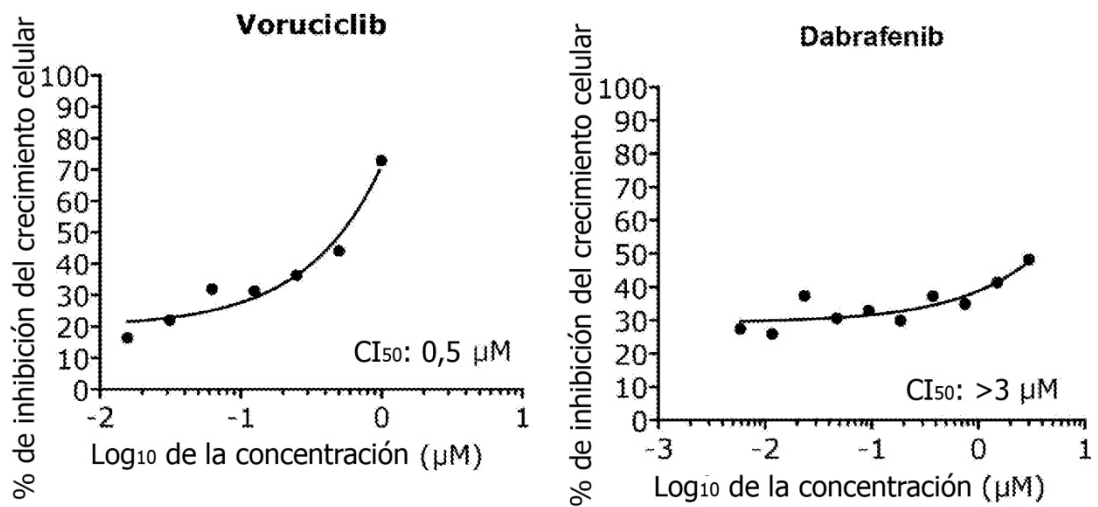


Figura 11b

Voruciclib y Trametinib (A375)

(68 puntos de combinación)

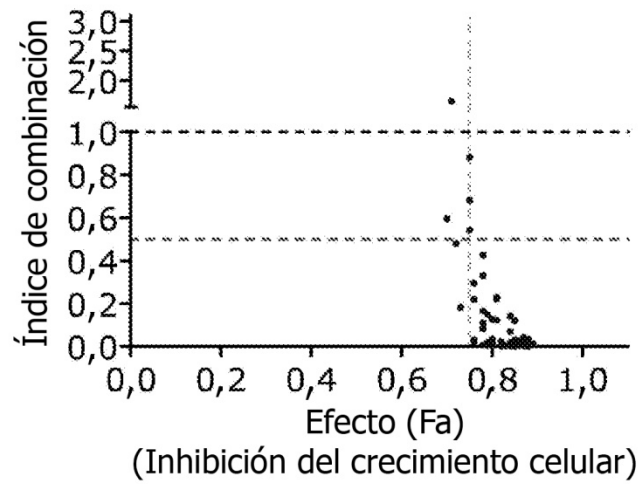


Figura 12a

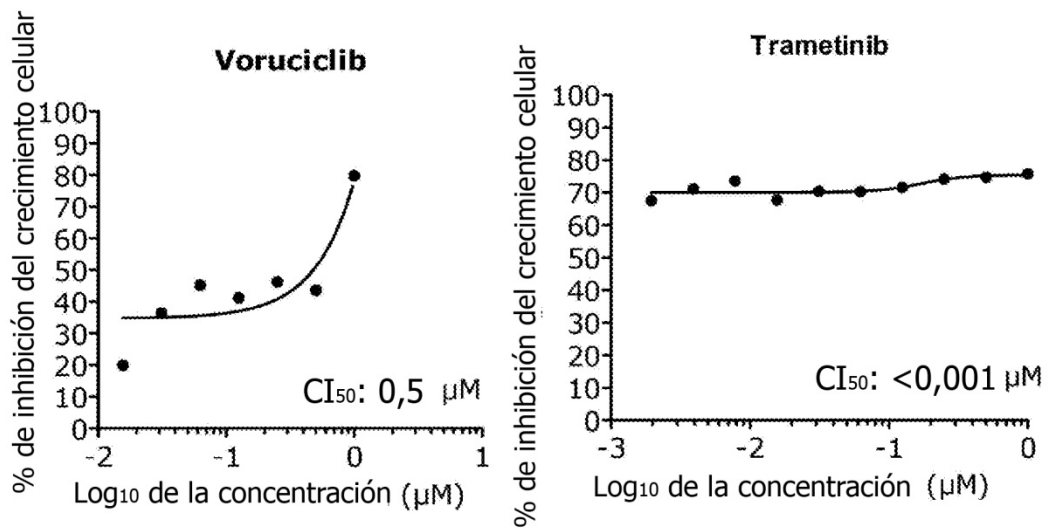


Figura 12b

**Voruciclib y Trametinib
(A375R)**
(68 puntos de combinación)

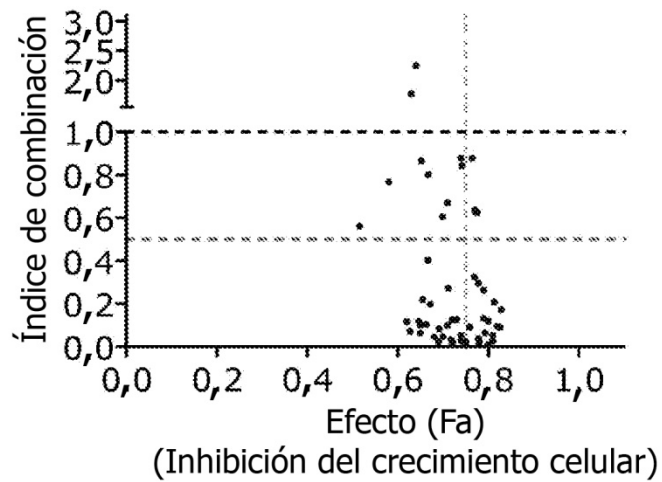


Figura 13a

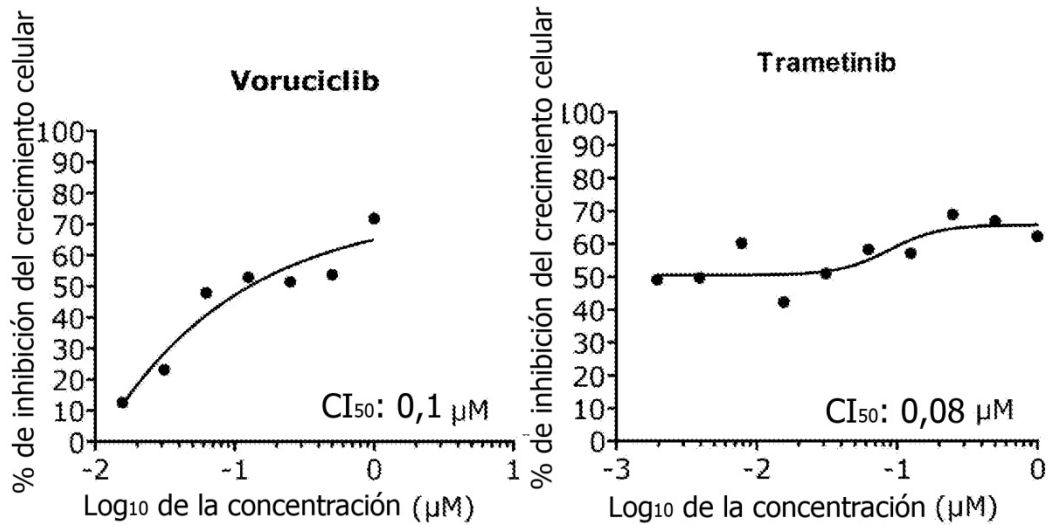


Figura 13b