

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 885**

51 Int. Cl.:

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2016 PCT/IB2016/055044**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17037576**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2016 E 16763585 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3340990**

54 Título: **Combinaciones farmacéuticas que comprenden (a) el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6) LEE011 (= ribociclib) y (b) el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) erlotinib, para el tratamiento o la prevención del cáncer**

30 Prioridad:

28.08.2015 US 201562211031 P

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

21.05.2020

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CAPONIGRO, GIORDANO;
HORN-SPIROHN, THOMAS y
LEHAR, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 761 885 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

5 Combinaciones farmacéuticas que comprenden (a) el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6) LEE011 (= ribociclib) y (b) el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) erlotinib, para el tratamiento o la prevención del cáncer

Campo técnico

10 La presente divulgación se refiere a combinaciones farmacéuticas que comprenden (a) un compuesto inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6) y (b) un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), para el tratamiento o la prevención del cáncer. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento o prevención del cáncer relacionados.

Antecedentes

15 El desarrollo de tumores está estrechamente relacionado con la alteración genética y la desregulación de cinasas dependientes de ciclina (CDK) y sus reguladores, lo cual sugiere que los inhibidores de CDK podrían ser agentes terapéuticos útiles contra el cáncer. Es más, los primeros resultados sugieren que las células transformadas y las normales difieren en su requerimiento de, por ejemplo, ciclina D/CDK4/6 y que podría ser posible desarrollar agentes antineoplásicos novedosos que no presentaran la toxicidad en el hospedador general observada con fármacos citostáticos y citotóxicos convencionales.

20 La función de las CDK consiste en fosforilar y, por lo tanto, activar o desactivar ciertas proteínas, que incluyen, por ejemplo, proteínas de retinoblastoma, láminas, histona H1 y componentes del husillo mitótico. El paso catalítico mediado por las CDK implica una reacción de transferencia de un grupo fosfo desde el ATP hasta el sustrato enzimático macromolecular. Se ha descubierto que varios grupos de compuestos (revisados, por ejemplo, en Fischer, P. M. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 2001, 4, 623-634) poseen propiedades antiproliferativas debidas al antagonismo de ATP específico de CDK.

25 A nivel molecular, la mediación de la actividad del complejo de CDK/ciclina requiere una serie de eventos estimuladores o inhibidores de la fosforilación o desfosforilación. La fosforilación de CDK es llevada a cabo por un grupo de cinasas activadoras de CDK (CAK) y/o cinasas tales como wee1, Myt1 y Mik1. La desfosforilación es llevada a cabo por fosfatasas tales como Cdc25(a & c), PP2A o KAP.

30 La actividad del complejo de CDK/ciclina puede ser regulada además por dos familias de inhibidores proteínicos celulares endógenos: la familia Kip/Cip o la familia INK. Las proteínas INK se unen específicamente a CDK4 y CDK6. p16^{ink4} (que también se conoce como MTS1) es un gen supresor de tumores potencial que está mutado o eliminado en un gran número de cánceres primarios. La familia Kip/Cip contiene proteínas tales como p21^{Cip1,Waf1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, donde p21 es inducido por p53 y es capaz de desactivar el complejo de CDK2/ciclina(E/A). Se han observado niveles anómalamente bajos de la expresión de p27 en cánceres de mama, colon y próstata. Por el contrario, se ha demostrado que la sobreexpresión de la ciclina E en tumores sólidos se correlaciona con un pronóstico desfavorable para el paciente. La sobreexpresión de la ciclina D1 se ha asociado con carcinomas esofágicos, de mama, escamosos y pulmonares no microcíticos.

35 Las funciones fundamentales de las CDK y sus proteínas asociadas, en la coordinación y conducción del ciclo celular en las células en proliferación, han sido expuestas anteriormente. También se han descrito algunas de las vías bioquímicas en las que las CDK juegan un papel clave. Por lo tanto, el desarrollo de monoterapias para el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cánceres, usando agentes terapéuticos dirigidos genéricamente a las CDK o a CDK específicas, es potencialmente muy deseable.

40 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, también conocido como ErbB-1; HER1 en seres humanos) es un receptor para ligandos de la familia del factor de crecimiento epidérmico. Existe constancia de que varios tipos de cánceres dependen de la sobreactividad o sobreexpresión de EGFR, tales como el cáncer de pulmón, cánceres anales, glioblastoma multiforme y muchos otros cánceres principalmente epiteliales.

45 El cáncer a menudo depende de la alteración genética de tirosina cinasas de tipo receptor (RTK), por ejemplo, por mutación puntual, amplificación génica o translocación cromosómica, lo que conduce a una actividad descontrolada de estas RTK que se vuelven de este modo oncogénicas. La proliferación celular de células cancerosas depende de la actividad de estas RTK anómalas.

50 Cuando se tratan las enfermedades proliferativas resultantes, a menudo se usan inhibidores del oncogén RTK involucrado. Sin embargo, a menudo, después de un cierto tiempo de tratamiento, se observa resistencia al fármaco utilizado. Un mecanismo de resistencia puede involucrar la RTK diana, comprometiendo la unión o la actividad del agente terapéutico. Otro mecanismo es la activación compensatoria de una cinasa alternativa que continúa impulsando el crecimiento del cáncer cuando se inhibe la cinasa primaria. Un ejemplo bien caracterizado que cubre ambos tipos

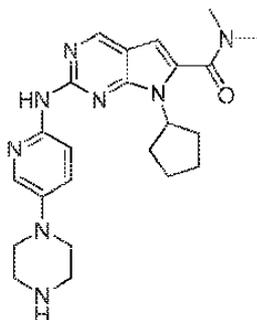
de mecanismos es la resistencia adquirida al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) gefitinib y erlotinib en el cáncer no microcítico (CPNM) portador de mutaciones de EGFR activadoras (remítase a Lynch, T.J., *et al.*, *N Engl J Med*, 350: 2129-2139, 2004; o Paez, J. G., *et al.*, *Science*, 304: 1497-1500, 2004). Por ejemplo, la activación de MET puede compensar la pérdida de actividad de EGFR (por inhibición) mediante la activación posterior de moléculas señal tales como HER3, por ejemplo, la amplificación de MET puede ofrecer compensación, o su factor de crecimiento de hepatocitos ligado puede activar MET (remítase a Engelman, J.A., *et al.*, *Science*, 316: 1039-1043, 2007; Yano, S., *et al.*, *Cancer Res*, 68: 9479-9487, 2008; y Turke, A. B., *et al.*, *Cancer Cell*, 17: 77-88, 2010). También existe constancia de que las líneas celulares de cáncer dependientes de MET (cuya proliferación depende de la actividad de MET) pueden ser rescatadas de los inhibidores de MET mediante la activación de EGFR inducida por un ligando (remítase a Bachleitner-Hofmann, T., *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 7: 3499-3508, 2008).

A pesar de las numerosas opciones de tratamiento para pacientes con cáncer, sigue siendo necesario disponer de agentes terapéuticos eficaces y seguros y su uso preferencial en terapia combinada. En particular, se necesitan métodos eficaces para tratar cánceres, especialmente aquellos cánceres que han sido resistentes y/o refractivos a las terapias actuales.

Compendio

En un primer aspecto, en la presente se proporciona una combinación farmacéutica que comprende:

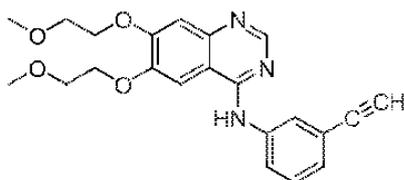
(a) un primer compuesto que tiene la estructura de fórmula (I):



(I)

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este y

(b) un segundo compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una realización, el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, están en la misma formulación.

En una realización, el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, están en formulaciones separadas.

En una realización, la combinación del primer aspecto es para la administración simultánea o secuencial.

En una realización particular de las combinaciones farmacéuticas descritas anteriormente, el primer compuesto es la sal de tipo succinato del compuesto que tiene la estructura de fórmula (I).

En un segundo aspecto, en la presente se proporciona un método para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

5 En una realización, el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

10 En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

En un tercer aspecto, en la presente se proporciona una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.

15 En un cuarto aspecto, en la presente se proporciona una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

20 En ciertas realizaciones de los aspectos tercero y cuarto, el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

25 En un quinto aspecto, en la presente se proporciona el uso de una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

En un sexto aspecto, en la presente se proporciona el uso de una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para el tratamiento o la prevención del cáncer.

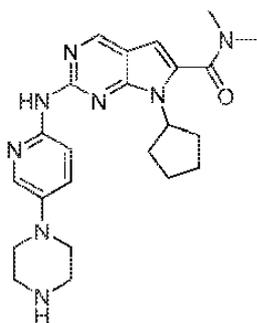
30 En realizaciones particulares de los aspectos quinto y sexto, el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

35 En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

En un séptimo aspecto, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende:

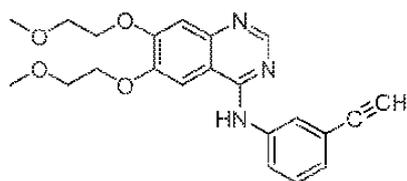
40 (a) un primer compuesto que tiene la estructura de fórmula (I):



(I)

45 o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este y

(b) un segundo compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

5 En una realización, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes.

Breve descripción de las figuras

10 La **Figura 1** muestra las curvas de dosis-respuesta para LEE011 y erlotinib y la combinación de LEE011 y erlotinib en 15 líneas celulares de cáncer colorrectal. El eje de las x indica el log10 de la dilución del tratamiento; el eje de las y indica el recuento celular después del tratamiento respecto al DMSO. La línea discontinua fuerte indica el número de células antes del inicio del tratamiento («línea de base»).

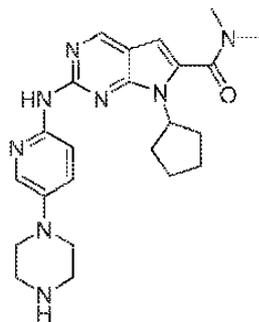
15 La **Figura 2** muestra la inducción máxima de la Caspasa 3/7 para LEE011 y erlotinib y la combinación de LEE011 y erlotinib en 15 líneas celulares de cáncer colorrectal y después de 24 h, 48 h y 72 h (diferentes tonos de gris). El eje de las x indica el tratamiento; el eje de las y indica la inducción máxima de la Caspasa 3/7 (% de células) observada para cada tratamiento.

Descripción detallada

20

En un primer aspecto, en la presente se proporciona una combinación farmacéutica que comprende:

(a) un primer compuesto que tiene la estructura de fórmula (I):



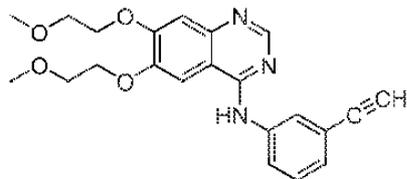
(I)

25

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este y

30

(b) un segundo compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

35 En una realización, el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, están en la misma formulación.

En una realización, el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II), o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, están en formulaciones separadas.

5 En una realización, la combinación del primer aspecto es para la administración simultánea o secuencial.

En una realización particular de las combinaciones farmacéuticas descritas anteriormente, el primer compuesto es la sal de tipo succinato del compuesto que tiene la estructura de fórmula (I).

10 En un segundo aspecto, en la presente se proporciona un método para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

15 En una realización, el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

20 En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

En un tercer aspecto, en la presente se proporciona una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.

25 En un cuarto aspecto, en la presente se proporciona una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

30 En ciertas realizaciones de los aspectos tercero y cuarto, el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

35 En un quinto aspecto, en la presente se proporciona el uso de una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

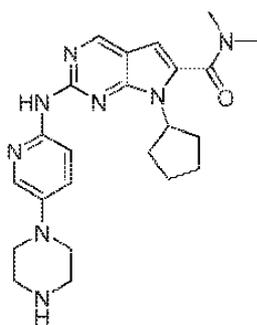
En un sexto aspecto, en la presente se proporciona el uso de una combinación farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para el tratamiento o la prevención del cáncer.

40 En realizaciones particulares de los aspectos quinto y sexto, el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

45 En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

En un séptimo aspecto, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende:

50 (a) un primer compuesto que tiene la estructura de fórmula (I):

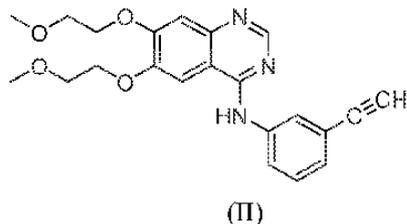


(I)

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este y

(b) un segundo compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):

5



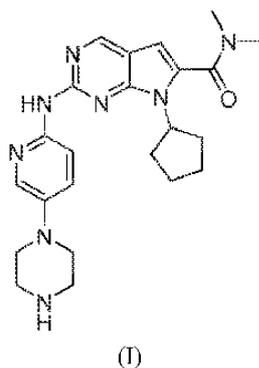
o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 En una realización, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes.

Compuestos inhibidores

En la presente se hace referencia al inhibidor de CDK 4/6 dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-ilpiridin-2-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico (que también se conoce como «LEE011» o «ribociclib») como el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), o compuesto (I):

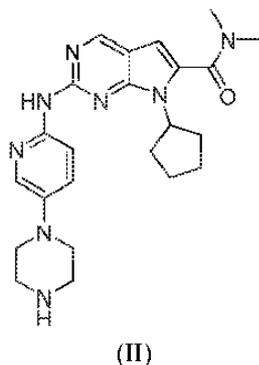
15



20 El compuesto (I) y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables se describen en la Publicación Internacional N.º WO 2010/020675 (por ejemplo, en el Ejemplo 74).

En la presente, se hace referencia al inhibidor de EGFR *N*-(3-etilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (que también se conoce como «erlotinib») como el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II), o compuesto (II):

25



El compuesto (II) y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables se describen en la Publicación Internacional N.º WO 96/30347 (por ejemplo, Ejemplo 20).

30

Sales y solvatos

Las sales de los compuestos inhibidores descritos en la presente pueden estar presentes solas o en una mezcla con la forma de base libre, y son preferentemente sales farmacéuticamente aceptables. Una «sal farmacéuticamente aceptable», tal como se utiliza en la presente, a menos que se indique lo contrario, incluye sales de grupos ácidos y básicos que pueden estar presentes en los compuestos de la presente invención. Tales sales pueden formarse, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferentemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, tras la reacción con un átomo de nitrógeno básico. Los ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos de halógeno tales como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como el ácido fumárico o ácido metanosulfónico. Con fines de aislamiento o purificación también es posible usar sales que no sean farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, picratos o percloratos.

En una realización preferida de las combinaciones farmacéuticas descritas en la presente, el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I) está en forma de una sal de tipo succinato.

Para uso terapéutico, se emplean únicamente sales, solvatos o compuestos libres farmacéuticamente aceptables (cuando corresponda en forma de preparados farmacéuticos) y, por lo tanto, estos son los preferidos. En vista de la estrecha relación entre los compuestos en su forma libre y aquellos en forma de sus sales, incluidas aquellas sales que pueden usarse como intermedios, por ejemplo, en la purificación o identificación de los compuestos novedosos, debe entenderse que cualquier referencia a los compuestos libres en lo anterior y en lo sucesivo de la presente se refiere también a las sales correspondientes, según sea apropiado y conveniente. Las sales contempladas en la presente son preferentemente sales farmacéuticamente aceptables; los contraiones adecuados que forman sales farmacéuticamente aceptables son conocidos en el campo.

Combinaciones y composiciones farmacéuticas

Las combinaciones y composiciones pueden administrarse a un sistema que comprende células o tejidos, así como a un sujeto humano (por ejemplo, un paciente) o un sujeto animal.

La combinación y composición de la presente invención se puede administrar en diversas formas farmacéuticas y concentraciones, en una cantidad farmacéuticamente eficaz o en una cantidad clínicamente eficaz.

Las composiciones farmacéuticas para la administración por separado de ambos componentes de la combinación, o para la administración en una combinación fija, por ejemplo, una composición galénica única que comprende la combinación, se pueden preparar de cualquier manera conocida en la técnica y son las adecuadas para la administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluidos los seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden contener de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 99,9%, preferentemente de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 60%, del(de los) agente(s) terapéutico(s). Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la terapia combinada para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas farmacéuticas unitarias, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, o ampollas. Si no se indica lo contrario, estas se preparan de una manera conocida *per se*, por ejemplo, por medio de diversos procesos convencionales de mezcla, trituración, compresión directa, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución, liofilización o técnicas de fabricación muy evidentes para los expertos en la técnica. Se apreciará que el contenido unitario de un componente de la combinación contenido en una dosis individual de cada forma farmacéutica no necesita constituir en sí mismo una cantidad eficaz ya que la cantidad eficaz necesaria puede alcanzarse mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

Una forma farmacéutica unitaria que contiene la combinación de agentes o los agentes individuales de la combinación de agentes pueden estar en forma de microcomprimidos contenidos dentro de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina. Para esto, se puede utilizar una cápsula de gelatina como la que se emplea en las formulaciones farmacéuticas, tal como la cápsula de gelatina dura conocida como CAPSUGEL, que se puede adquirir de Pfizer.

Las formas farmacéuticas unitarias de la presente invención pueden comprender opcionalmente además portadores o excipientes convencionales adicionales utilizados para productos farmacéuticos. Los ejemplos de tales portadores incluyen, sin carácter limitante, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, estabilizantes y rellenos, diluyentes, colorantes, sabores y conservantes. Un experto en la técnica puede seleccionar uno o más de los portadores mencionados anteriormente con respecto a las propiedades particulares deseadas de la forma farmacéutica mediante experimentación rutinaria y sin ninguna dificultad excesiva. La cantidad de cada uno de los portadores utilizados puede variar dentro de los intervalos convencionales en la técnica. Las siguientes referencias describen técnicas y excipientes utilizados para formular formas farmacéuticas orales. Remítase a *The Handbook of*

Pharmaceutical Excipients, 4.^a edición, Rowe *et al.*, Eds., *American Pharmaceuticals Association* (2003); y *Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a edición, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2003).

5 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «excipiente farmacéuticamente aceptable» o «portador farmacéuticamente aceptable» incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes farmacológicos, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares y combinaciones de estos, tal como serían conocidos por los expertos en la técnica (remítase, por ejemplo, a *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Salvo en lo que concierne a cualquier portador convencional que sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

15 Estos portadores convencionales adicionales opcionales pueden incorporarse en la forma farmacéutica oral incorporando dicho uno o más portadores convencionales en la mezcla inicial antes o durante la granulación o combinando dicho uno o más portadores convencionales con gránulos que comprenden la combinación de agentes o los agentes individuales de la combinación de agentes en la forma farmacéutica oral. En la última realización, la mezcla combinada puede mezclarse adicionalmente, por ejemplo, en un mezclador en forma de V, y posteriormente prensarse o moldearse para obtener un comprimido, por ejemplo, un comprimido monolítico, encapsulado en una cápsula o introducido en un sobre.

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

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

35 Los ejemplos de lubricantes farmacéuticamente aceptables y deslizantes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin carácter limitante, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, almidones, talco, fosfato de calcio tribásico, estearato de magnesio, estearato de aluminio, estearato de calcio, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, polietilenglicol, celulosa en polvo y celulosa microcristalina. El lubricante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0% a aproximadamente un 10% en peso de la composición. En una realización, el lubricante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 1,5% en peso de la composición. El deslizante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 10% en peso.

45 Los ejemplos de rellenos farmacéuticamente aceptables y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin carácter limitante, azúcar de repostería, azúcar comprimible, dextratos, dextrina, dextrosa, lactosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, sorbitol, sacarosa y talco. El relleno y/o diluyente, por ejemplo, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0% a aproximadamente un 80% en peso de la composición.

50 La dosis óptima de cada componente de la combinación para el tratamiento del cáncer se puede determinar empíricamente para cada individuo utilizando métodos conocidos y dependerá de una variedad de factores, que incluyen, sin carácter limitante, el grado de avance de la enfermedad; la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del individuo; el tiempo y la vía de administración; y otros medicamentos que el individuo esté tomando. Las dosis óptimas se pueden establecer utilizando pruebas y procedimientos rutinarios que son muy conocidos en la técnica.

55 La cantidad de cada componente de la combinación que puede combinarse con los materiales portadores para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del individuo tratado y el modo particular de administración. En algunas realizaciones, las formas farmacéuticas unitarias que contienen la combinación de agentes tal como se describe en la presente contendrán las cantidades de cada agente de la combinación que se administran habitualmente cuando los agentes se administran solos.

60 La dosificación eficaz de cada uno de los componentes de la combinación que se emplea en la combinación de la invención puede variar dependiendo del compuesto particular o la composición farmacéutica empleada, el modo de administración, la afección que se esté tratando y la gravedad de la afección que se esté tratando. Por lo tanto, el

régimen de dosificación de las combinaciones descritas en la presente se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la vía de administración y la función renal y hepática del paciente.

5 La dosificación eficaz de cada uno de los componentes de la combinación puede requerir la administración más frecuente de uno de los compuestos en comparación con el(los) otro(s) compuesto(s) de la combinación. Por lo tanto, para permitir una dosificación adecuada, los productos farmacéuticos envasados pueden contener una o más formas farmacéuticas que contienen la combinación de compuestos, y una o más formas farmacéuticas que contienen uno de los compuestos de la combinación, pero no el(los) otro(s) compuesto(s) de la combinación.

10 El compuesto (I) («LEE011») (basado en el peso del compuesto no solvado/en forma no salina), en general, se administra con una dosis comprendida en el intervalo de 10 mg a 2000 mg por día en seres humanos. En una realización, LEE011 se administra con una dosis de 600 mg QD. En otra realización, LEE011 se administra con una dosis de 300 mg QD. En otra realización, LEE011 se administra con una dosis de 900 mg QD.

15 El compuesto (II) (erlotinib), en general, se administra con una dosis comprendida en el intervalo de 10 mg a 300 mg. En una realización, erlotinib se administra con una dosis de 100 mg QD. En otra realización, erlotinib se administra con una dosis de 150 mg QD.

20 En todas las formulaciones, el(los) principio(s) activo(s) que forma(n) parte de un producto combinado de acuerdo con la presente invención puede(n) estar presente(s) cada uno en una cantidad relativa de un 0,5 a un 95% en peso de la formulación correspondiente (con respecto a la formulación como tal, es decir, sin envase ni prospecto), por ejemplo, de un 1 a un 90, de un 5 a un 95, de un 10 a un 98 o de un 10 a un 60 o de un 40 a un 80% en peso, respectivamente.

25 La dosificación del principio activo que se ha de aplicar a un animal de sangre caliente depende de una variedad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la gravedad de la condición que se ha de tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular empleado. Un facultativo, médico o veterinario experto puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener el avance de la afección. La precisión óptima a la hora de conseguir la concentración del fármaco dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco en los sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco. Una combinación farmacéutica tal como se describe en la presente puede estar, por ejemplo, en una dosificación unitaria de aproximadamente 1-1000 mg de principio(s) activo(s) para un sujeto de aproximadamente 50-70 kg, o aproximadamente 1-500 mg o aproximadamente 1-250 mg o aproximadamente 1-150 mg o aproximadamente 0,5-100 mg, o aproximadamente 1-50 mg de cualquiera o en particular la suma de principios activos; o (especialmente para el inhibidor de EGFR) de 50 a 900, de 60 a 850, de 75 a 800 o de 100 a 600 mg, respectivamente, para cualquiera o en particular la suma de principios activos. La dosificación terapéuticamente eficaz de un compuesto, la composición farmacéutica o las combinaciones de estos, depende de la especie del sujeto, el peso corporal, la edad y el estado individual, el trastorno o enfermedad, o la gravedad de esta, que se esté tratando. Un facultativo, médico o veterinario (en el uso con animales) experto puede determinar fácilmente la cantidad eficaz de cada uno de los principios activos necesaria para prevenir, tratar o inhibir la evolución del trastorno o la enfermedad.

45 Las proporciones, dosis individuales y combinadas, y concentraciones óptimas de los componentes de la combinación de la invención (es decir, el compuesto (I) y el compuesto (II)) que producen eficacia sin toxicidad se basan en la cinética de la disponibilidad de los agentes terapéuticos en los sitios diana, y se determinan utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

50 La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo del compuesto utilizado y la afección particular que se ha de tratar o prevenir. En general, se prefiere el uso de la dosis mínima que sea suficiente para proporcionar una terapia eficaz. En general, se puede monitorizar a los pacientes para determinar la efectividad terapéutica utilizando ensayos adecuados para la afección que se esté tratando o previniendo, con lo que estarán familiarizados los expertos en la técnica.

55 En ciertos aspectos, las combinaciones farmacéuticas descritas en la presente son útiles para el tratamiento o la prevención del cáncer, o para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer. En una realización particular, las combinaciones farmacéuticas descritas en la presente son útiles para el tratamiento del cáncer o para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

60 En ciertos aspectos, se proporciona un método para el tratamiento o la prevención del cáncer (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer), que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica descrita en la presente.

65 La naturaleza del cáncer es multifactorial. En ciertas circunstancias, se pueden combinar fármacos con diferentes mecanismos de acción. Sin embargo, tan solo el hecho de considerar cualquier combinación de agentes terapéuticos que tengan un modo de acción diferente no conduce necesariamente a combinaciones con efectos ventajosos.

La administración de una combinación farmacéutica tal como se describe en la presente puede dar como resultado no solo un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, por ejemplo, con respecto a aliviar, retrasar la evolución o inhibir los síntomas, sino también efectos beneficiosos sorprendentes adicionales, por ejemplo, menos efectos secundarios, una respuesta más duradera, una mejor calidad de vida o una disminución de la morbilidad, en comparación con una monoterapia que aplica solo uno de los agentes farmacéuticamente terapéuticos utilizados en la combinación de la invención.

Un beneficio adicional consiste en que se pueden utilizar dosis más bajas de los agentes terapéuticos de una combinación farmacéutica tal como se describe en la presente, por ejemplo, de modo que las dosis no solo pueden ser a menudo más pequeñas, sino que también se pueden aplicar con menos frecuencia o se pueden utilizar para disminuir la incidencia de efectos secundarios observados solo con uno de los componentes de la combinación por sí solo. Esto está de acuerdo con los deseos y requisitos de los pacientes que se han de tratar.

Puede demostrarse mediante modelos de prueba establecidos que una combinación farmacéutica tal como se describe en la presente da como resultado los efectos beneficiosos descritos anteriormente en la presente. El experto en la técnica está totalmente capacitado para seleccionar un modelo de prueba relevante para demostrar tales efectos beneficiosos. La actividad farmacológica de una combinación de la invención puede, por ejemplo, demostrarse en un estudio clínico o en un modelo con animales.

La determinación de una interacción sinérgica entre uno o más componentes, el intervalo óptimo para el efecto y los intervalos de dosis absolutas de cada componente para el efecto se puede medir definitivamente mediante la administración de los componentes en diferentes intervalos de relaciones p/p y dosis para pacientes que necesiten tratamiento. Para los seres humanos, la complejidad y el coste de llevar a cabo estudios clínicos en pacientes pueden hacer poco práctico el uso de esta forma de prueba como modelo primario para la sinergia. Sin embargo, la observación de sinergia en ciertos experimentos (remítase, por ejemplo, al ejemplo 1) puede predecir el efecto en otras especies y existen modelos con animales para medir adicionalmente un efecto sinérgico. Los resultados de tales estudios también se pueden utilizar para predecir intervalos eficaces de relaciones de dosis y las dosis absolutas y las concentraciones en plasma.

En una realización, las combinaciones y/o composiciones proporcionadas en la presente muestran un efecto sinérgico.

En una realización, en la presente se proporciona una combinación sinérgica para su administración a un ser humano, comprendiendo dicha combinación los inhibidores descritos en la presente, donde el intervalo de dosis de cada inhibidor corresponde a los intervalos sinérgicos sugeridos en un modelo de tumor o estudio clínico adecuado.

Cuando los componentes de la combinación, que se emplean en la combinación de la invención, se aplican en la forma comercializada como fármacos individuales, su dosificación y modo de administración pueden estar de acuerdo con la información proporcionada en el prospecto del envase del fármaco comercializado respectivo, si no se menciona en la presente lo contrario.

Definiciones

A continuación se describen ciertos términos utilizados en la presente. Los compuestos se describen utilizando la nomenclatura estándar. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que sobreentiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

La expresión «composición farmacéutica» se define en la presente como referente a una mezcla o solución que contiene al menos un agente terapéutico que se ha de administrar a un sujeto, por ejemplo, un mamífero o ser humano, para prevenir o tratar una enfermedad o afección particular que afecta al mamífero o ser humano.

La expresión «farmacéuticamente aceptable» se define en la presente como referente a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para entrar en contacto con los tejidos de un sujeto, por ejemplo, un mamífero o ser humano, sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y otras complicaciones problemáticas proporcionales a una relación de beneficio/riesgo razonable.

El término «tratar» o «tratamiento», tal como se utiliza en la presente, comprende un tratamiento que atenúa, reduce o alivia al menos un síntoma en un sujeto o que produce un retraso del avance de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o la erradicación completa de un trastorno tal como el cáncer. Dentro del significado de la presente invención, el término «tratar» también denota detener, retrasar el inicio (es decir, el periodo previo a la manifestación clínica de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollar o empeorar una enfermedad. El término «prevenir», «que previene» o «prevención», tal como se utiliza

en la presente, comprende la prevención de al menos un síntoma asociado con o causado por el estado, enfermedad o trastorno que se ha de prevenir.

5 La expresión «cantidad farmacéuticamente eficaz» o «cantidad clínicamente eficaz» de una combinación de agentes terapéuticos es una cantidad suficiente para proporcionar una mejora observable respecto a los signos y síntomas clínicamente observables de la línea base del trastorno tratado con la combinación.

10 Las expresiones «combinación», «combinación terapéutica» o «combinación farmacéutica», tal como se utilizan en la presente, se refieren a una combinación fija en una forma farmacéutica unitaria o a una combinación no fija o a un kit de partes para la administración combinada donde dos o más agentes terapéuticos se pueden administrar de manera independiente a la vez o por separado en intervalos de tiempo, especialmente donde estos intervalos de tiempo permiten que los componentes de la combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

15 La expresión «terapia combinada» se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico que se describe en la presente divulgación. Tal administración engloba la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única formulación que tiene una proporción fija de los principios activos o en formulaciones separadas (por ejemplo, cápsulas y/o formulaciones intravenosas) para cada principio activo. Además, tal administración también engloba el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial o por separado, ya sea aproximadamente a la vez o en momentos diferentes. Independientemente de si los principios activos se administran como una formulación única o en formulaciones separadas, los agentes terapéuticos se administran al mismo paciente como parte del mismo curso de terapia. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos en el tratamiento de las afecciones o trastornos que se describen en la presente.

25 La expresión «efecto sinérgico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la acción de dos agentes terapéuticos tales como, por ejemplo, el inhibidor de CDK LEE011 y el inhibidor de EGFR Erlotinib, que producen un efecto, por ejemplo, la ralentización del avance sintomático de una enfermedad proliferativa, particularmente el cáncer, o sus síntomas, que es mayor que la simple adición de los efectos de cada agente terapéutico administrado por sí solo. Se puede calcular un efecto sinérgico, por ejemplo, utilizando métodos adecuados tales como la ecuación sigmoide de Emáx (Holford, N. H. G. y Scheiner, L. B., *Clin. Pharmacokinet.* 6: 429-453 (1981)), la ecuación de la aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., *Arch. Exp. Pathol Pharmacol.* 114: 313-326 (1926)) y la ecuación del efecto mediano (Chou, T. C. y Talalay, P., *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación mencionada anteriormente se puede aplicar a los datos experimentales para generar una gráfica correspondiente con el fin de ayudar a evaluar los efectos de la combinación farmacológica. Las gráficas correspondientes asociadas con las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, la curva de isoblograma y la curva del índice de combinación, respectivamente.

40 El término «sujeto» o «paciente», tal como se utiliza en la presente, incluye animales que son capaces de sufrir o padecer un cáncer o cualquier trastorno que implique, directa o indirectamente, un cáncer. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que padece, que corre el riesgo de padecer o que es potencialmente capaz de padecer cáncer.

45 Las expresiones «combinación fija» y «dosis fija» y «formulación única», tal como se utilizan en la presente, se refieren a un único portador o vehículo o formas farmacéuticas que se formulan para administrar una cantidad, que es de forma conjunta terapéuticamente eficaz para el tratamiento del cáncer, de dos o más agentes terapéuticos a un paciente. El vehículo único está diseñado para suministrar una cantidad de cada uno de los agentes, junto con cualesquiera portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el vehículo es un comprimido, 50 cápsula, píldora o parche. En otras realizaciones, el vehículo es una solución o una suspensión.

Las expresiones «combinación no fija», «kit de partes» y «formulaciones separadas» significan que los principios activos, por ejemplo, LEE011 y Erlotinib, se administran ambos a un paciente como entidades separadas ya sea de forma simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo específicos, donde tal administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del animal de sangre caliente que lo necesite. Esto último también se aplica a la politerapia, por ejemplo, la administración de tres o más principios activos.

60 La expresión «dosis unitaria» se utiliza en la presente para referirse a la administración simultánea de dos o tres agentes juntos, en una forma farmacéutica, al paciente que está siendo tratado. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es una formulación única. En ciertas realizaciones, la dosis unitaria incluye uno o más vehículos de manera que cada vehículo incluye una cantidad eficaz de al menos uno de los agentes junto con portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es uno o más comprimidos, cápsulas, píldoras, inyecciones, infusiones, parches o similares, que se administran al paciente al mismo tiempo.

65 Una «forma farmacéutica oral» incluye una forma farmacéutica unitaria prescrita o destinada a la administración oral.

Las expresiones «que comprende» y «que incluye» se utilizan en la presente en su sentido abierto y no limitante, a menos que se indique lo contrario.

5 Se debe interpretar que los términos «un», «una», «el», «la» y referencias similares que se utilizan en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones adjuntas) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Cuando se utiliza la forma del plural para compuestos, sales y similares, se considera que esto significa también un único compuesto, sal o similares.

10 El término «aproximadamente» o «alrededor de» tendrá el significado de dentro de un 10%, más preferentemente dentro de un 5%, de un valor o intervalo dado.

Ejemplos

15 Materiales y Métodos

Los compuestos se disolvieron en DMSO al 100% (Sigma, número de catálogo D2650) con concentraciones de 20 mM y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los compuestos se distribuyeron en placas maestras de fármacos (Greiner, número de catálogo 788876) y se diluyeron en serie con un factor de 3 (7 pasos) con una concentración de X2000.

25 Las líneas celulares de cáncer colorrectal utilizadas para este estudio se obtuvieron, cultivaron y procesaron a partir de los proveedores comerciales ATCC, CellBank Australia, DMSZ, ECACC y HSRRB (Tabla 1). Todos los medios de la línea celular se complementaron con FBS al 10% (HyClone, número de catálogo SH30071.03). El medio para LIM2551 se complementó adicionalmente con 0,6 µg/mL de insulina (SIGMA, número de catálogo I9278), 1 µg/mL de hidrocortisona (SIGMA, número de catálogo H0135) y 1-tioglicerol 10 µM (SIGMA, número de catálogo M6145).

Línea celular	Mutaciones impulsoras	Fuente	Num. de cat. de la fuente	Medio	Proveedor del medio	Num. de cat. del medio	N.º de células	Tratamiento (h)
DLD-1	KRAS, PIK3CA	ATCC	CCL-221	RPMI	ThermoFisher	22400-071	500	72
HCT-116	KRAS, PIK3CA	ATCC	CCL-247	McCoy's 5A	ATCC	30-2007	500	72
LS-180	KRAS, PIK3CA	ATCC	CCL-187	EMEM	ATCC	30-2003	800	72
GP2d	KRAS, PIK3CA	ECACC	85090714	DMEM	ATCC	30-2002	900	72
SW480	KRAS	ATCC	CCL-228	RPMI	ATCC	30-2001	700	72
SW837	KRAS	ATCC	CCL-235	RPMI	ATCC	30-2001	1250	72
LoVo	KRAS	ATCC	CCL-229	F-12K	ATCC	30-2004	1250	96
RKO	BRAF, PIK3CA	ATCC	CRL-2577	EMEM	ATCC	30-2003	500	72
LIM2551	BRAF, PIK3CA	CellBank Australia	CBA-0170	RPMI	ATCC	30-2001	1000	72
HT-29	BRAF, PIK3CA	ATCC	HTB-38	McCoy's 5A	ATCC	30-2007	800	72
OUMS-23	BRAF	HSRRB	JCRB1022	DMEM	ATCC	30-2002	900	72
LS411N	BRAF	ATCC	CRL-2159	RPMI	ATCC	30-2001	900	72
COLO-205	BRAF	ATCC	CCL-222	RPMI	ATCC	30-2001	800	72
NCI-H508	PIK3CA	ATCC	CCL-253	RPMI	ATCC	30-2001	1000	72
COLO-320		DMSZ	ACC-144	RPMI	ATCC	30-2001	800	72

30 **Tabla 1.** Información de las líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en una incubadora a 37 °C y con un 5% de CO₂ y se expandieron en frascos T-75. En todos los casos, las células se descongelaron a partir de patrones congelados, se expandieron a través de ≥ 1 pasaje utilizando diluciones 1:3, se contaron y se evaluaron para determinar la viabilidad utilizando un contador ViCell (Beckman-Coulter) antes de la colocación en placas. Para dividir y expandir las líneas celulares, las células se desprendieron de los frascos utilizando tripsina-EDTA al 0,25% (GIBCO, número de catálogo 25200). Se determinó que todas las líneas celulares estaban exentas de contaminación por micoplasma según se determinó mediante una metodología de detección por PCR realizada en Idexx Radil (Columbia, MO, EE. UU.) y se identificaron correctamente mediante la detección de un panel de SNP.

Las imágenes se analizaron después de adaptar los métodos descritos anteriormente (Horn, Sandmann *et al.* 2011) y utilizando el paquete Bioconductor EBImage en R (Pau, Fuchs *et al.* 2010). Los objetos en ambos canales, DAPI (para Hoechst/ADN) y FITC (para Caspasa 3/7), se segmentaron por separado mediante un umbral adaptativo y se contaron. Se definió manualmente un umbral para los objetos positivos de Caspasa 3/7 por línea celular después de comparar controles negativos (DMSO) y controles positivos (Estaurosporina). Al analizar 17 características adicionales de objeto/núcleo en el canal de ADN (características de forma e intensidad) se identificaron residuos/núcleos fragmentados. Con este fin por línea celular, las distribuciones de las características adicionales entre controles

positivos (Estaurosporina) y controles negativos (DMSO) se compararon manualmente. Las características que podían distinguir entre las condiciones (por ejemplo, un cambio en la distribución de una medición de características que compara DMSO con Estaurosporina) se utilizaron para definir la población de «residuos» frente a la población de núcleos «viables». Los recuentos de residuos se restaron de los recuentos de núcleos en bruto. El número de núcleos resultante se utilizó como medida de la proliferación celular («recuento celular»).

El efecto del compuesto sobre la proliferación celular se calculó a partir de los recuentos celulares de los tratamientos en relación con los recuentos celulares del control negativo (DMSO), en la Figura 1 denominado «Recuento celular normalizado» (= « x_{norm} ») en el eje de las y. Las combinaciones sinérgicas se identificaron utilizando el modelo de agente único más alto (HSA) como hipótesis nula (Berenbaum 1989). El exceso respecto al modelo HSA predice una conexión funcional entre las dianas inhibidas (Lehar, Zimmermann *et al.* 2007, Lehar, Krueger *et al.* 2009). Los datos de entrada del modelo fueron valores de inhibición por dosis de fármaco:

$$I = 1 - x_{norm}$$

I: inhibición

x_{norm} : recuento celular normalizado (mediana de tres repeticiones)

En cada punto de dosis del tratamiento combinado, se calculó la diferencia entre la inhibición de la combinación y la inhibición del más potente de los dos agentes únicos (= residuales del modelo). Para favorecer los efectos de la combinación en una inhibición alta, los residuales se ponderaron con la inhibición observada en el mismo punto de dosis. La puntuación general de la combinación C para una combinación farmacológica es la suma de los residuales ponderados para todas las concentraciones:

$$C = \sum_{Conc} (I_{dato} * (I_{dato} - I_{modelo}))$$

I_{dato} : inhibición medida

I_{modelo} : inhibición de acuerdo con la hipótesis nula de HSA

Se calcularon puntuaciones robustas de la combinación z (z_C) como la relación de las puntuaciones de la combinación de los tratamientos C y la desviación absoluta mediana (dam) de combinaciones que no interactúan:

$$z_C = C / \text{dam}(C_{cero})$$

C_{cero} : puntuaciones de la combinación para combinaciones que no interactúan

z_C es un indicador de la potencia de la combinación con:

$z_C \geq 3$: sinergia

$3 > z_C \geq 2$: sinergia débil

$z_C < 2$: sinergia nula

La CI50 es la concentración del compuesto que da como resultado un 50% de los recuentos celulares respecto al DMSO. Los cálculos de CI50 (remítase a la Tabla 2) se realizaron utilizando el paquete DRC en R (Ritz y Streibig 2005) y ajustando una función log-logística de cuatro parámetros a los datos.

El efecto del compuesto sobre la apoptosis se determinó calculando el porcentaje de células con Caspasa 3/7 activada por tratamiento y punto de evaluación respecto a los recuentos celulares en bruto (antes de la sustracción de los residuos) (eje de las y en la Figura 2). Los recuentos celulares en puntos de evaluación que no se midieron experimentalmente se obtuvieron mediante análisis de regresión ajustando un modelo lineal para recuentos celulares transformados logarítmicamente en el día 0 y al final del tratamiento (suponiendo un crecimiento celular exponencial).

Ejemplo 1: Efecto *in vitro* sobre la proliferación de combinar el inhibidor de CDK4/6 LEE011 con el inhibidor de EGFR erlotinib en líneas celulares de cáncer colorrectal

Para evaluar el efecto de la combinación de LEE011 y erlotinib sobre la proliferación celular, las células se sembraron en microplacas negras de 384 pocillos con fondo transparente (Matrix/Thermo Scientific, número de catálogo 4332) en 50 μ L de medio por pocillo con densidades celulares comprendidas entre 500 y 1250 células/pocillo (Tabla 1) y se dejaron incubar a 37 grados, con un 5% de CO₂ durante 24 h. Después de 24 h, se preparó una placa de 384 pocillos por línea celular para el recuento celular mediante microscopía (remítase más adelante) sin recibir tratamiento (=

«línea de base»). Las otras placas celulares se trataron transfiriendo 25 nL del compuesto X2000 desde las placas maestras del fármaco utilizando un dispensador de líquidos acústico ATS (ECD Biosystems) y dando como resultado una concentración final de X1. LEE011 se utilizó con un intervalo de concentraciones finales de 13 nM - 10 μ M, y erlotinib se utilizó con un intervalo de concentraciones finales de 13 nM - 10 μ M (7 pasos de dilución 1:3). Para la combinación de LEE011 con erlotinib, los agentes individuales se combinaron en una proporción fija de 1:1 en cada dilución, dando como resultado 7 tratamientos combinados. Además, los controles negativos (DMSO = «vehículo») y los controles positivos (Estaurosporina = células destructoras, series de dilución 1: 2 de 7 puntos para un intervalo de dosis de 16 nM - 1 μ M) se transfirieron como controles de tratamiento, y los compuestos sin eficacia en las líneas celulares evaluadas se utilizaron en combinaciones con LEE011 y erlotinib como controles de combinación (combinaciones que no exceden la eficacia del agente único más eficaz = combinaciones «que no interactúan»). Después de la adición del compuesto, se añadieron 50 nL de reactivo de detección verde para Caspasa-3/7 CellEvent 2 mM (ThermoFisher, número de catálogo C10423) a una de las tres réplicas utilizando el dispensador digital HP D300 (Tecan). La inducción de la Caspasa 3/7 se midió como un indicador de la apoptosis inducida por los tratamientos. Las células se trataron durante de 72 h a 96 h dependiendo de su tiempo de duplicación (Tabla 1), y la activación de la Caspasa 3/7 se midió cada 24 h por microscopía utilizando un analizador InCell 2000 (GE Healthcare) dotado de un objetivo X4 y filtros de excitación/emisión de FITC. Al final del tratamiento, las células se prepararon para el recuento celular por microscopía. Las células se fijaron y se permeabilizaron durante 45 minutos en PFA al 4% (Electron Microscopy Sciences, número de catálogo 15714), TX-100 al 0,12% (Electron Microscopy Sciences, número de catálogo 22140) en PBS (Boston Bioproducts, número de catálogo BM-220). Después de lavar las células tres veces con PBS, su ADN se tiñó durante 30 minutos con Hoechst 33342 (ThermoFisher, número de catálogo H3570) con una concentración final de 4 μ g/mL. Las células se lavaron tres veces con PBS y a continuación las placas se sellaron con calentamiento utilizando un PlateLoc (Agilent Technologies) con sellos de aluminio (Agilent Technologies, número de catálogo 06644-001) y se almacenaron a 4 ° C hasta la obtención de imágenes. Todas las células por pocillo/tratamiento fueron capturadas en una sola imagen por microscopía de fluorescencia utilizando un analizador un InCell 2000 (GE Healthcare) dotado de un objetivo X4 y filtros de excitación/emisión de DAPI.

Las eficacias del inhibidor de CDK4/6 LEE011 y el inhibidor EGFR erlotinib se evaluaron individualmente y en combinación en un total de 15 líneas celulares de cáncer colorrectal. Las líneas celulares estaban mutadas en KRAS, BRAF y/o PIK3CA, o eran de origen natural para los 3 genes (Tabla 1). LEE011 como agente único inhibió el crecimiento de todas las líneas celulares excepto dos (SW837, OUMS-23) con valores de CI50 de submicromolares a micromolares (Figura 1 y Tabla 2). El erlotinib como agente único solo logró CI50 para el intervalo de concentraciones evaluado en 5/15 líneas celulares (Figura 1 y Tabla 2). El tratamiento combinado provocó una inhibición sinérgica (según el modelo HSA) en 7/15 líneas evaluadas y una inhibición sinérgica débil en 1/15 líneas (Tabla 2). Las sinergias fueron significativamente más intensas en los modelos mutados de KRAS en comparación con los modelos mutados de BRAF ($p = 0,005$, prueba t de una cola), y las inhibiciones y sinergias también fueron significativamente más intensas en los modelos de origen natural de KRAS/BRAF en comparación con los modelos mutados de BRAF ($p = 0,05$ y $p = 4 \times 10^{-6}$, respectivamente, prueba t de una cola). La combinación no induce apoptosis (evaluada midiendo la inducción de la Caspasa 3/7) (Figura 2). La inhibición combinada de CDK4/6 y EGFR en cáncer colorrectal puede proporcionar una modalidad terapéutica eficaz capaz de mejorar las respuestas en comparación con cada uno de los agentes individuales y conducir a respuestas más duraderas en el centro de salud.

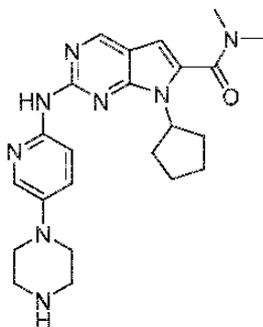
Célula	CI50 para LEE011	CI50 para Erlotinib	Puntuación Z de sinergia Z_c
LoVo	0,8	0,716	13,9
GP2d	4,5	8,861	9,6
LS-180	1,8	>10	7,6
DLD-1	4,1	7,064	7
COLO-320	2,8	6,92	4,3
NCI-H508	0,7	0,>102	4,3
SW837	>10	>10	3,7
SW480	1,6	>10	2,7
HCT-116	4,5	>10	1,2
LIM2551	1,3	>10	1,1
COLO-205	1,1	>10	1
HT-29	0,8	>10	0,6
RKO	1,5	>10	0,3
OUMS-23	>10	>10	0
LS411N	2,1	>10	-0,1

Tabla 2. Valores de CI50 del agente individual para cada compuesto y medidas de sinergia de puntuación z para la combinación de LEE011 y erlotinib.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende:

5 (a) un primer compuesto que tiene la estructura de fórmula (I):

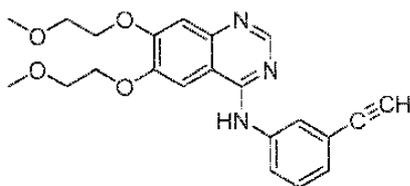


(I)

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este y

10

(b) un segundo compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

15 o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

2. La combinación farmacéutica de la reivindicación 1, donde el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I) y el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II) están en la misma formulación.

20 3. La combinación farmacéutica de la reivindicación 1, donde el compuesto que tiene la estructura de fórmula (I) y el compuesto que tiene la estructura de fórmula (II) están en formulaciones separadas.

4. La combinación farmacéutica de la reivindicación 1, donde la combinación es para la administración simultánea o

25

5. La combinación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el primer compuesto es la sal de tipo succinato de la fórmula (I).

30 6. La combinación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento del cáncer.

7. La combinación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la prevención del cáncer.

8. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde el cáncer se selecciona del grupo constituido por melanoma, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (CR), cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), cáncer de tiroides, cáncer pancreático, neurofibromatosis y carcinoma hepatocelular.

9. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el cáncer es cáncer colorrectal.

40

10. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer colorrectal tiene KRAS mutado y PIK3CA mutado.

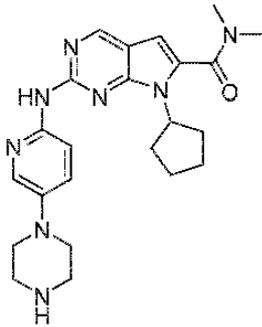
11. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer colorrectal tiene KRAS mutado.

5 12. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer colorrectal tiene BRAF mutado y PIK3CA mutado.

13. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer colorrectal tiene PIK3CA mutado.

10 14. Una composición farmacéutica que comprende:

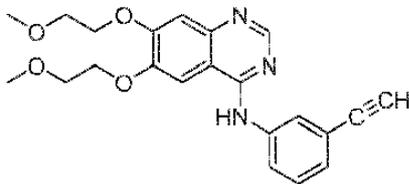
(a) un primer compuesto que tiene la estructura de fórmula (I):



(I)

15 o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este y

(b) un segundo compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

20 o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, que comprende además uno o más excipientes.

FIGURA 1

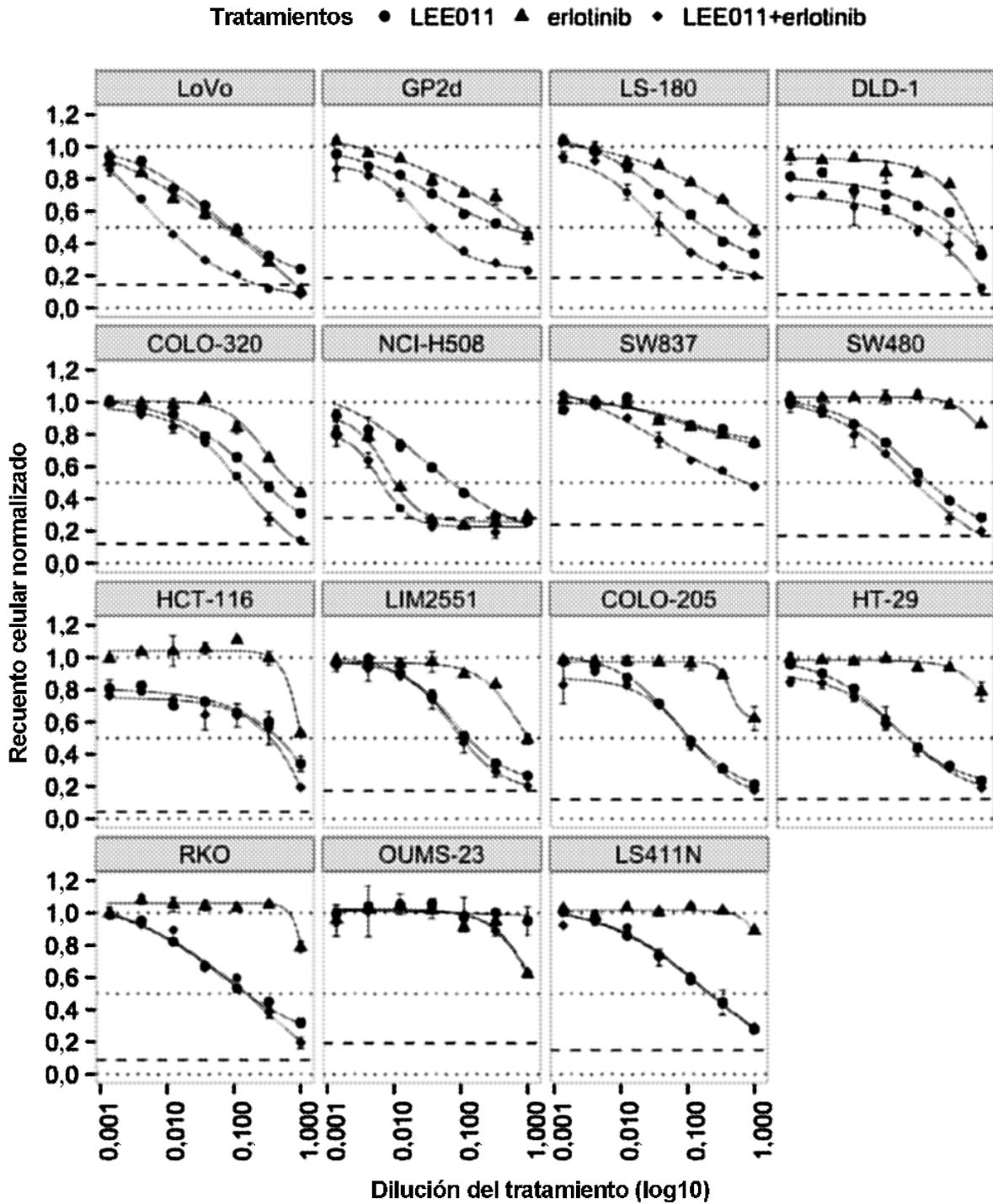


FIGURA 2

