

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 763**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/495</b>	(2006.01) <b>A61K 9/48</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01) <b>A61K 31/519</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/437</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/4184</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/4439</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/506</b>	(2006.01)	
<b>A61P 35/02</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/12</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2016 PCT/US2016/036063**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16197129**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2016 E 16804655 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3302478**

54 Título: **Terapia combinada de PAC-1**

30 Prioridad:

**05.06.2015 US 201562171882 P**  
**03.06.2016 US 201662345629 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.04.2022**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY  
OF ILLINOIS (100.0%)  
352 Henry Administration Building, 506 South  
Wright Street  
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

**HERGENROTHER, PAUL J. y  
PEH, JESSIE**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 906 763 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

Terapia combinada de PAC-1

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad bajo 35 U.S.C §119(e) para solicitud de patente provisional de Estados Unidos núms. 62/171,882, presentada el 5 de junio de 2015, y 62/345,629, presentada el 3 de junio de 2016.

10 Antecedentes de la invención

La apoptosis, o muerte celular programada, juega un papel central en el desarrollo y la homeostasis de todos los organismos multicelulares. Una característica frecuente del cáncer es la resistencia a las señales apoptóticas naturales. En dependencia del tipo de cáncer, esta resistencia puede deberse a la regulación positiva o negativa de proteínas clave en la cascada apoptótica. La resistencia también puede deberse a mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Estos cambios pueden ocurrir tanto en la vía apoptótica intrínseca, que se canaliza a través de las mitocondrias y la caspasa-9, como en la vía apoptótica extrínseca, que involucra la acción de los receptores de muerte y la caspasa-8. Por ejemplo, se han observado alteraciones en los niveles saludables de proteínas como p53, Bim, Bax, Apaf-1, FLIP y muchas otras en los diferentes tipos de cáncer. Estas alteraciones pueden dar lugar a una cascada apoptótica defectuosa, en la que la señal proapoptótica aguas arriba no se transmite adecuadamente para activar las caspasas ejecutoras, caspasa-3 y caspasa-7.

Como la mayoría de las vías apoptóticas implican en última instancia la activación de la procaspasa-3, las anomalías genéticas aguas arriba son efectivamente "rupturas" en el circuito apoptótico y, como resultado, tales células proliferan de forma atípica. Dado el papel central de la apoptosis en el cáncer, se han realizado esfuerzos para desarrollar terapias que se dirijan a proteínas específicas en la cascada apoptótica. Sin embargo, debido a que estas terapias apuntan a posiciones tempranas (o intermedias a altas) en la cascada apoptótica, los tipos de cáncer con mutaciones en proteínas cascada abajo de esos miembros aún pueden ser resistentes a los posibles efectos beneficiosos de esos compuestos.

Para fines terapéuticos, sería ventajoso identificar moléculas pequeñas que activen directamente una proteína proapoptótica cascada abajo en la cascada apoptótica. Este enfoque podría implicar una posición relativamente baja en la cascada, lo que permitiría matar incluso aquellas células que tienen mutaciones en su maquinaria apoptótica aguas arriba. Además, tales estrategias terapéuticas tendrían una mayor posibilidad de éxito si esa proteína proapoptótica aumentara en las células cancerosas. Por lo tanto, la identificación de moléculas pequeñas que se dirijan a la proteína efectora de la apoptosis cascada abajo, la procaspasa-3, ayudaría significativamente a la terapia actual contra el cáncer.

La conversión o activación de procaspasa-3 en caspasa-3 da como resultado la generación de la forma activa de caspasa "ejecutora" que subsecuentemente cataliza la hidrólisis de una multitud de sustratos proteicos. En ciertos tipos de cáncer, los niveles de procaspasa-3 están elevados con relación al tejido normal. Un estudio de aislamientos primarios de 20 pacientes con cáncer de colon reveló que, en promedio, la procaspasa-3 aumentaba seis veces en dichos aislamientos con relación al tejido no canceroso adyacente. Además, la procaspasa-3 aumenta en ciertos neuroblastomas, linfomas y tipos de cáncer de hígado. Además, se realizó una evaluación sistemática de los niveles de procaspasa-3 en el panel de 60 líneas celulares usado para la detección del cáncer por el Programa de Terapéutica del Desarrollo del Instituto Nacional del Cáncer. La evaluación reveló que ciertos tipos de cáncer de pulmón, melanoma, renal y de mama muestran niveles muy elevados de expresión de procaspasa-3. Debido al papel de la caspasa-3 activa en el logro de la apoptosis, los niveles relativamente altos de procaspasa-3 en ciertos tipos de células cancerosas y la intrigante supresión de su autoactivación mediada por capturas de seguridad, las pequeñas moléculas que modifican directamente la procaspasa-3 podrían tener gran aplicabilidad en la terapia dirigida contra el cáncer.

Además, la terapia combinada se ha vuelto cada vez más importante para el tratamiento de pacientes con cáncer. El objetivo de la terapia combinada es lograr un efecto sinérgico o aditivo entre los quimioterapéuticos, lo que facilita de esta manera tiempos de tratamiento más cortos, menor toxicidad y mayor supervivencia del paciente. Los fármacos que actúan en una vía bioquímica única son candidatos particularmente fuertes para la sinergia o la potenciación, ya que pueden imitar combinaciones genéticas "letales sintéticas". Por lo tanto, existe una necesidad urgente de terapias más efectivas para el tratamiento de muchas formas de cáncer, y nuevas combinaciones sinérgicas de fármacos contra el cáncer ayudarían en esta búsqueda. En consecuencia, existe la necesidad de identificar nuevas combinaciones de agentes citotóxicos que sean efectivas para destruir células cancerosas y, al mismo tiempo, protejan los tejidos normales del huésped de la toxicidad no deseada del agente citotóxico.

El documento WO 2010/091382 A1 describe composiciones y métodos relacionados con la inducción de muerte celular tal como en células cancerosas, métodos para la síntesis de compuestos y su uso, incluido el uso de compuestos en terapia para el tratamiento del cáncer y la inducción selectiva de apoptosis en células. Describe el uso de PAC-1 y PLX4032 en la terapia personalizada contra el cáncer.

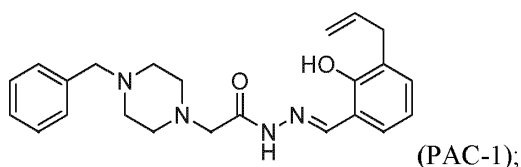
El documento Estados Unidos 2015/017264 A1 describe composiciones y métodos para la inducción de muerte celular, por ejemplo, muerte de células cancerosas. Describe composiciones que comprenden PAC-1 y otro agente activo para el tratamiento del cáncer.

## 5 Resumen

La invención proporciona composiciones que incluyen una combinación de principios activos para el tratamiento terapéutico del cáncer. Las composiciones incluyen fármacos de molécula pequeña capaces de inducir la muerte de células cancerosas. La combinación de medicamentos puede ser aplicable a una variedad de enfermedades cancerosas y tipos de células cancerosas, como melanoma, suprarrenal, cerebro, mama, colorrectal, esofágico, vesícula biliar, leucemia, hígado, pulmón, linfoma, neuroblastoma, ovario, pancreático, renal, tiroides, enfermedad de Erdheim-Chester (ECD), histiocitosis de células de Langerhans (HCL). En algunas modalidades, las composiciones interactúan directa o indirectamente con miembros de la vía de muerte celular programada, como la procaspasa-3. En varias modalidades, las composiciones son selectivas para un tipo particular de células cancerosas y pueden tener una neurotoxicidad reducida en comparación con otros compuestos que interactúan con los miembros de la vía de muerte celular programada, como la procaspasa-3.

La terapia combinada contra el cáncer descrita en la presente descripción puede incluir fármacos que se dirijan a diferentes vías bioquímicas, o fármacos que ataquen a diferentes objetivos en la misma vía, imitando combinaciones genéticas "sintéticas letales". La combinación del activador de procaspasa-3 PAC-1 y los inhibidores de la quinasa BRAF que tiene la mutación V600E muestra una sinergia considerable para inducir la muerte apoptótica de las células cancerosas en un grado que supera con creces el efecto aditivo. La combinación de PAC-1 y estos inhibidores del gen/enzima BRAF puede reducir efectivamente la carga tumoral en modelos tumorales en los que los compuestos solos tienen un efecto mínimo o nulo. Los datos indican una efectividad significativa para la combinación de PAC-1 y estos inhibidores de la enzima BRAF para el tratamiento del cáncer y, en términos más generales, muestran que esta combinación sinérgica puede proporcionar beneficios terapéuticos significativamente mayores.

En consecuencia, la invención proporciona una composición que comprende (a) el compuesto PAC-1:



- (b) un segundo agente activo, cuyo agente es un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib; y
- (c) un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

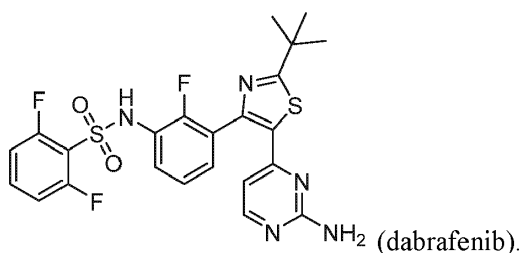
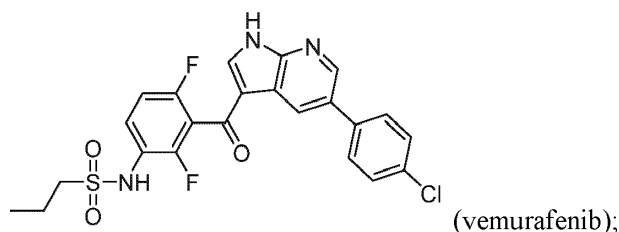
El inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib (LGX818) (Novartis). Inhibidores particularmente efectivos de la enzima BRAF son inhibidores de la enzima BRAF que tiene la mutación V600E o V600K. Dichos inhibidores incluyen vemurafenib y dabrafenib. En otras modalidades, la composición incluye además un inhibidor de MEK, como trametinib. En diversas modalidades, estos principios activos se pueden administrar a un paciente consecutiva o simultáneamente. Un portador para la composición puede incluir agua y/o componentes opcionales para administrar ventajosamente los activos tales como un tampón, un azúcar, una celulosa, una ciclodextrina o varias de sus combinaciones. En una modalidad, la ciclodextrina es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

La invención también proporciona un método ex vivo para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas. Este método incluye poner en contacto células cancerosas con una cantidad efectiva de una composición descrita en la presente descripción, en donde la composición puede incluir uno o ambos de PAC-1 (es decir, el primer agente activo) y uno o más segundos principios activos, donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. Cuando la composición incluye solo uno de PAC-1 y el segundo agente activo, el método puede incluir subsecuentemente poner en contacto las células cancerosas con la(s) otra(s). Por tanto, el método también puede incluir poner en contacto células cancerosas con una cantidad efectiva de un inhibidor de MEK, simultáneamente o secuencialmente con PAC-1 y el segundo agente activo. Poner en contacto las células cancerosas con estos activos (por ejemplo, PAC-1 y el segundo y/o tercer agente activo) inhibe efectivamente el crecimiento o la proliferación de las células cancerosas.

La invención proporciona además un método ex vivo para inducir la apoptosis en una célula cancerosa. El método puede incluir comprender poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad efectiva de PAC-1 y una cantidad efectiva de un segundo y/o tercer agente activo, en donde se induce de esta manera la apoptosis en la célula cancerosa. El contacto puede ser *in vitro*. Alternativamente, el contacto puede ser *in vivo*. En una modalidad, la célula cancerosa puede ponerse en contacto con PAC-1 y el segundo agente activo simultáneamente, en donde

segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. En otra modalidad, la célula cancerosa se puede poner en contacto con el segundo agente activo antes de poner en contacto la célula cancerosa con PAC-1. En otra modalidad más, la célula cancerosa se puede poner en contacto con PAC-1 antes de poner en contacto la célula cancerosa con el segundo agente activo. El tercer agente activo (por ejemplo, un inhibidor de MEK) se puede administrar a la célula cancerosa antes o después de PAC-1 y antes o después del segundo agente activo.

La invención también proporciona PAC-1 y un segundo agente activo para usar en un método para tratar un cáncer en un paciente que lo necesite. El método incluye administrar a un paciente, secuencial o simultáneamente, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de PAC-1 y un segundo agente activo, cuyo agente es un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación, por ejemplo, la mutación V600E o la mutación V600K, en donde el cáncer se trata de esta manera. El segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. En ciertas modalidades específicas, el segundo agente activo es vemurafenib o dabrafenib:



Como se discutió anteriormente, PAC-1 y el segundo agente activo pueden administrarse simultáneamente. En otra modalidad, PAC-1 y el segundo agente activo se administran secuencialmente. Cuando se administra secuencialmente, el segundo agente activo puede administrarse antes del PAC-1, o el segundo agente activo puede administrarse después del PAC-1. En modalidades adicionales, se puede administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de MEK. El inhibidor de MEK se puede administrar secuencial o simultáneamente con respecto a PAC-1 y el segundo agente activo. Por lo tanto, en varias modalidades, el inhibidor de MEK se puede administrar antes, simultáneamente que o después de PAC-1 o del segundo agente activo.

El cáncer (o células cancerosas, según sea el caso) contactado o tratado puede ser, por ejemplo, melanoma, cáncer suprarrenal, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de tiroides, enfermedad de Erdheim-Chester (ECD), histiocitosis de células de Langerhans (HCL) o leucemia, incluida la leucemia de células pilosas. El melanoma puede ser un melanoma resistente a BRAFi, incluidos los melanomas resistentes a vemurafenib. El cáncer de tiroides puede ser cáncer de tiroides papilar. El cáncer de pulmón puede ser cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En algunas modalidades, el cáncer puede ser cáncer de cerebro, linfoma o células cancerosas en el tejido óseo. Por ejemplo, el cáncer puede ser glioblastoma u oligodendroglioma. En otra modalidad, las células cancerosas pueden ser células de osteosarcoma y el cáncer tratado es cáncer de hueso. Otros tipos de células cancerosas que se pueden destruir o inhibir y otras afecciones cancerosas que se pueden tratar se describen más abajo.

Por lo tanto, la invención proporciona el uso de las composiciones descritas en la presente descripción para su uso en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, melanoma y/u otros tipos de cáncer citados en la presente descripción. La invención también proporciona el uso de una composición como se describe en la presente descripción para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, cáncer en un ser humano. El medicamento puede incluir un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

Las figuras siguientes forman parte de la presente descripción y se incluyen para demostrar adicionalmente determinadas modalidades o varios aspectos de la invención. En algunos casos, las modalidades de la invención se pueden entender mejor haciendo referencia a los dibujos adjuntos en combinación con la descripción detallada que se presenta en la presente descripción. La descripción y los dibujos adjuntos pueden resaltar un cierto ejemplo

específico o un cierto aspecto de la invención. Sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que partes del ejemplo o aspecto pueden usarse en combinación con otros ejemplos o aspectos de la invención.

Figuras 1A-C. El efecto de vemurafenib y PAC-1 en líneas celulares <sup>V600E</sup>BRAF o <sup>WT</sup>BRAF. (A) valores de IC<sub>50</sub> (día 5) de vemurafenib y PAC-1 en un panel de nueve líneas celulares. (B) y C): Las líneas celulares con <sup>V600E</sup>BRAF tienen un por ciento significativamente mayor de células que experimentan apoptosis (evaluado mediante tinción con Anexina V-FITC/PI) después del tratamiento con vemurafenib (10 µM) y PAC-1 (12 µM) (B), o vemurafenib (0,5 µM) y PAC-1 (12 µM) (C), durante 24 h, mientras que esta combinación tiene un efecto insignificante en las líneas celulares con fenotipo salvaje de BRAF. Las líneas horizontales discontinuas representan el nivel de muerte celular esperado de un mero efecto aditivo de los dos agentes. Los valores se informan como media ± SEM de al menos tres experimentos independientes. Los valores de p que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si la combinación para la inducción de la apoptosis es diferente de un efecto aditivo (líneas horizontales discontinuas) de los agentes individuales son estadísticamente significativos (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

Figuras 2A-E. PAC-1+vemurafenib se sinergizan poderosamente para inducir la muerte apoptótica y la actividad de la caspasa en las células A375. (A) Se muestra el por ciento de muerte celular apoptótica (evaluada mediante tinción con Anexina V/PI y citometría de flujo) inducida después de 24 h de tratamiento. Los valores que se muestran son mapas de calor con el blanco que representa un bajo % de muerte celular apoptótica y el gris oscuro que representa un alto % de muerte celular apoptótica. (B) Índices de Combinación (CI) calculados para cada combinación con el software Combosyn. Los valores de CI se asignan térmicamente con los valores más bajos en gris claro y los valores más altos en negro. (C) Se observa una actividad enzimática significativa de caspasa-3/-7 en células tratadas con la combinación de PAC-1 y vemurafenib. PAC-1 (12 µM) y vemurafenib (10 µM) solos tienen poco efecto (valores de p frente al control de DMSO > 0,1 en todos los puntos de tiempo). La actividad de caspasa-3/-7 en lisados celulares se evaluó con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC. La actividad se expresa como normalizada a la actividad mínima y máxima observada dentro del ensayo, con estaurosporina (STS) 1 µM como control positivo. Los valores p que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si la combinación es diferente de la aditiva son estadísticamente significativos en los puntos de tiempo indicados. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). (D) PAC-1 (12 µM) y vemurafenib (10 µM) solos tienen poco efecto sobre la escisión de PARP-1 en células A375, pero se observa una escisión significativa de PARP-1 mediante transferencia Western con la combinación. (E) Después de 24 h, se observó una inhibición nula/baja de la fosforilación de ERK1/2 a bajas concentraciones de vemurafenib (0,1 µM y 0,25 µM). A concentraciones más altas de vemurafenib (0,5 µM y 1 µM), la fosforilación de ERK1/2 se inhibió de forma efectiva con o sin la adición de PAC-1, lo que indica que el efecto de PAC-1 se produce cascada abajo de la vía MAPK. Sin embargo, la PARP-1 escindida solo se observó en células tratadas con la combinación de vemurafenib/PAC-1, incluso a concentraciones de vemurafenib (0,1 y 0,25 µM) en las que se observó una inhibición incompleta de la fosforilación de ERK1/2. Los valores se informan como media ± SEM de al menos tres experimentos.

Figuras 3A-C. La adición de PAC-1 a la combinación de vemurafenib + trametinib produce una poderosa sinergia para inducir la muerte apoptótica y la actividad de la caspasa en las células A375 y UACC-62. (A) Se muestra el por ciento de muerte celular apoptótica después de 24 h de tratamiento. La combinación de trametinib (100 nM) y vemurafenib (10 µM) conduce a un aumento mínimo de la población de células apoptóticas. La adición de PAC-1 (12 µM) conduce a un aumento dramático en la población de células apoptóticas que está más allá del efecto aditivo de los tres agentes. (B) Trametinib (100 nM) y vemurafenib (10 µM) en combinación tienen poco efecto sobre la escisión de PARP-1 en células A375 y UACC-62, pero se observa una escisión significativa de PARP-1 y una reducción en el nivel de procaspasa-3 a través de transferencia Western con la adición de PAC-1 (12 µM). (C) La combinación de vemurafenib y trametinib conduce a un aumento aditivo en la actividad de caspasa-3/-7, pero la adición de PAC-1 conduce a aumentos significativos en la actividad enzimática de caspasa-3/-7 en A375 y UACC-62 después de 24 h. PAC-1 (12 µM), vemurafenib (10 µM) y trametinib (100 nM) solos tienen poco efecto (valores de p frente a control DMSO > 0,1). La actividad se expresa como normalizada al control positivo. Las líneas horizontales discontinuas representan el nivel de muerte celular que se espera de un mero efecto aditivo de los dos agentes. Los valores se informan como media ± SEM de al menos tres experimentos. Los valores de p que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si la combinación para la inducción de la apoptosis es diferente de un efecto aditivo de los agentes individuales son estadísticamente significativos (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

Figuras 4A-E. La combinación PAC-1+vemurafenib retarda el crecimiento tumoral en un melanoma con modelo de xenoinjerto subcutáneo de ratón A375. (A) El efecto de PAC-1, vemurafenib y su combinación en el modelo A375. Los ratones que tenían tumores subcutáneos recibieron dosis durante 15 días. Los ratones recibieron dosis de PAC-1 una vez al día a 100 mg/kg (n=6) mediante inyección i.p., vemurafenib dos veces al día a 10 mg/kg (n=8) por (p.o.), o la combinación de PAC-1+vemurafenib (n=8). La línea negra más abajo del eje x indica el período de dosificación para los ratones durante el estudio. Los volúmenes tumorales se representan como media ± SEM. (B) Masas de los tumores extirpados. (C) Los lisados tumorales se analizaron mediante transferencia Western para detectar cambios en los niveles de procaspasa-3. Se usó actina como control de carga. La intensidad de la banda se cuantificó mediante el uso de Image J. (D) Gráfico de niveles de procaspasa-3 normalizados a los controles de carga de actina. (E) Porcentaje de células positivas para Ki-67 después de la tinción inmunohistoquímica de muestras tumorales fijadas con formalina. Se contaron 2000 células en cada muestra para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento. Los valores de p que se muestran son con respecto a los ratones de control. (\* p<0,05, \*\*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,001).

Figuras 5A-D. Las bajas concentraciones de PAC-1 (1  $\mu$ M) retrasan significativamente el rebrote celular en combinación con vemurafenib en experimentos de cultivo celular a largo plazo. (A) Comparación de valores de  $E_{\text{máx}}$  en células A375 tratadas con vemurafenib y PAC-1. (B) Células A375 y SK-MEL-5 tratadas con PAC-1 (4  $\mu$ M) o vemurafenib (10  $\mu$ M) durante 30 días. (C) Las células A375 se trataron con PAC-1 (1  $\mu$ M), vemurafenib (5  $\mu$ M o 10  $\mu$ M) o la combinación. Después de 5, 10 o 20 días, los pocillos se fijaron con ácido tricloroacético al 10 %, se tiñeron con colorante de sulforhodamina B (SRB) al 0,5 % y se tomaron imágenes con BioRad GelDoc RX. Las imágenes del día 20 de las muestras de control y PAC-1 no se muestran porque las celdas no eran viables debido al hacinamiento. (D) Cuantificación de (C) donde el colorante SRB se disuelve en 10 mM de base Tris a pH 10,4 y la absorbancia se lee a 510 nm. La absorbancia corregida a 510 nm se representó frente a los días de tratamiento continuo mediante la normalización frente a la absorbancia el Día 0 antes del inicio del tratamiento. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos. Prueba T realizada entre pocillos tratados solo con vemurafenib frente a vemurafenib y PAC-1 (1  $\mu$ M). En el día 10, solo los pocillos tratados con vemurafenib (10  $\mu$ M) y PAC-1 (1  $\mu$ M) son significativamente diferentes del tratamiento con vemurafenib (10  $\mu$ M) solo ( $p=0,049$ ). El día 20, los pocillos tratados con vemurafenib (5 o 10  $\mu$ M) y PAC-1 (1  $\mu$ M) son significativamente diferentes de vemurafenib (5 o 10  $\mu$ M), como se indica. (\*  $p<0,05$ , \*\*\*  $p<0,01$ , \*\*\*\*  $p<0,001$ ).

Figuras 6A-D. PAC-1 conserva la actividad en células A375VR resistentes a vemurafenib (A) Vemurafenib es significativamente menos activo en A375R que en A375 original. (B) El tratamiento con 0,5 o 1  $\mu$ M de vemurafenib no puede inhibir la fosforilación de ERK1/2 en A375VR después de 2 h. En las mismas condiciones, se observó una inhibición completa de la fosforilación de ERK1/2 en la línea celular parental A375. (C) PAC-1 conserva la actividad en la línea celular A375R. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. (D) El efecto de PAC-1, vemurafenib y su combinación en el modelo de xenoinjerto A375VR. Los ratones que tenían tumores subcutáneos recibieron dosis durante 15 días. Los ratones recibieron dosis de PAC-1 dos veces al día a 100 mg/kg ( $n=7$ ) por inyección i.p., vemurafenib dos veces al día a 10 mg/kg ( $n=5$ ) por (p.o.), o la combinación de PAC-1+vemurafenib ( $n=5$ ). La línea negra sobre el eje x indica el período de dosificación para los ratones durante el estudio. Los volúmenes tumorales se representan como media + SEM. Los valores de p que se muestran son con respecto a los ratones de control. (\*  $p<0,05$ ).

Figuras 7A-E. PAC-1 y vemurafenib se unen poderosamente para inducir la muerte celular apoptótica y la actividad de la caspasa en las células SK-MEL-5. (A) Se muestra el por ciento de muerte celular apoptótica (evaluada mediante tinción con Anexina V/PI y citometría de flujo) inducida después de 24 h de tratamiento. Los valores que se muestran son mapas de calor con el blanco que representa un bajo % de muerte celular apoptótica y el gris oscuro que representa un alto % de muerte celular apoptótica. (B) Índices de combinación (CI) calculados para cada combinación con el software Combosyn. Los valores de CI se asignan térmicamente con los valores más bajos en gris claro y los valores más altos en negro. (C) Se observa una actividad enzimática significativa de caspasa-3/-7 en células tratadas con la combinación de PAC-1 y vemurafenib; PAC-1 (12  $\mu$ M) y vemurafenib (10  $\mu$ M) solos tienen poco efecto (valores de p frente al control de DMSO  $> 0,1$  en todos los puntos de tiempo). La actividad de caspasa-3/-7 en lisados celulares se evaluó con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC. La actividad se expresa como normalizada a la actividad mínima y máxima observada dentro del ensayo, con 1  $\mu$ M de estaurosporina (STS) como control positivo. (D) PAC-1 (12  $\mu$ M) y vemurafenib (10  $\mu$ M) solos tienen poco efecto sobre la escisión de PARP-1 en células SK-MEL-5, pero se observa una escisión significativa de PARP-1 mediante transferencia Western con la combinación. (E) Después de 24 h, vemurafenib (0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) inhibió la fosforilación de ERK1/2 con o sin la adición de PAC-1, lo que indica que el efecto de PAC-1 está cascada abajo de la vía MAPK. Sin embargo, la PARP-1 escindida solo se observó en células tratadas con la combinación de vemurafenib/PAC-1. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Los valores p que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si la combinación es diferente de la aditiva son estadísticamente significativos en los puntos de tiempo indicados. (\*  $p<0,05$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).

Figuras 8A-E. PAC-1 y vemurafenib se unen poderosamente para inducir la muerte apoptótica y la actividad de la caspasa en las células UACC-62. (A) Se muestra el por ciento de muerte celular apoptótica (evaluada mediante tinción con Anexina V/PI y citometría de flujo) inducida después de 24 h de tratamiento. Los valores que se muestran son mapas de calor con el blanco que representa un bajo % de muerte celular apoptótica y el gris oscuro que representa un alto % de muerte celular apoptótica. (B) Índices de combinación (CI) calculados para cada combinación con el software Combosyn. Los valores de CI se asignan térmicamente con los valores más bajos en gris claro y los valores más altos en negro. (C) Se observa una actividad enzimática significativa de caspasa-3/-7 en células tratadas con la combinación de PAC-1 y vemurafenib. PAC-1 (12  $\mu$ M) y vemurafenib (10  $\mu$ M) solos tienen poco efecto (valores p frente a control DMSO  $> 0,1$  en todos los momentos). La actividad de caspasa-3/-7 en lisados celulares se evaluó con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC. La actividad se expresa como normalizada a la actividad mínima y máxima observada dentro del ensayo, con 1  $\mu$ M de STS como control positivo. (D) PAC-1 (12  $\mu$ M) y vemurafenib (10  $\mu$ M) solos tienen poco efecto sobre la escisión de PARP-1 en células UACC-62, pero se observa una escisión significativa de PARP-1 mediante transferencia Western con la combinación. (E) Después de 24 h, vemurafenib (0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) inhibió la fosforilación de ERK1/2 con o sin la adición de PAC-1, lo que indica que el efecto de PAC-1 está cascada abajo de la vía MAPK. Se observó PARP-1 escindida mínima en células tratadas con PAC-1 solamente, que aumentó notablemente en células tratadas con la combinación de vemurafenib/PAC-1. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Los valores p que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si

la combinación es diferente de la aditiva son estadísticamente significativos en los puntos de tiempo indicados. (\*\* $p < 0,001$ ).

Figuras 9A-D. Efecto de PAC-la (12  $\mu$ M) vs PAC-1 (12  $\mu$ M) en combinación con vemurafenib (30  $\mu$ M) en líneas celulares después de 24 h de tratamiento en (A) A375, (B) Líneas celulares SK-MEL-5 y (C) UACC-62 evaluadas mediante gráficos de Anexina V-FITC/PI. El por ciento de apoptosis informado se normaliza con relación a la muestra de control de DMSO. Las líneas horizontales discontinuas representan el nivel de muerte celular que se espera de un mero efecto aditivo de los dos agentes. (D) PAC-1 (12  $\mu$ M) y vemurafenib (10  $\mu$ M) solos tienen un efecto mínimo sobre la escisión de PARP-1 en células A375, pero se observa una mayor escisión de PARP-1 con la combinación. PAC-la (12  $\mu$ M) en combinación con vemurafenib (10  $\mu$ M) no aumenta la escisión de PARP-1. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Los valores de  $p$  que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si la combinación para la inducción de la apoptosis es diferente de un efecto aditivo (líneas horizontales discontinuas) de agentes individuales son estadísticamente significativos (\*\* $p < 0,001$ ).

Figuras 10A-C. Efecto de la combinación de PAC-1 y vemurafenib en MIA PaCa-2 (KRAS mutante y <sup>WT</sup>BRAF) y líneas celulares CHL-1 (<sup>WT</sup>Kras y <sup>WT</sup>BRAF) con <sup>WT</sup>BRAF (A) No se observa ningún efecto sobre la activación de procaspasa-3 en las líneas celulares MIA PaCa-2 y CHL-1 cuando se tratan con PAC-1 (12  $\mu$ M) + vemurafenib (30  $\mu$ M). La actividad de caspasa-3/-7 en lisados celulares se evaluó con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC. La actividad se expresa como normalizada a la actividad mínima y máxima observada dentro del ensayo, con 1  $\mu$ M de STS como control positivo. (B) No se observó ningún efecto sobre la escisión de PARP-1 en células MIA PaCa-2 después de 24 h. (C) PAC-1 (12  $\mu$ M) y vemurafenib (30  $\mu$ M) no tienen efecto sobre la escisión de PARP-1 en células CHL-1 después de 24 h de tratamiento. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes.

Figura 11. Imágenes de ratones portadores de tumores que se sacrificaron después de 15 días de dosificación continua. Los cuatro grupos de tratamiento son: control (n=6, 0 mg/kg PAC-1 y vemurafenib); ratones tratados una vez al día con 100 mg/kg de PAC-1 (n=6), dos veces al día con 10 mg/kg de vemurafenib (n=8) y la combinación de 100 mg/kg de PAC-1 (una vez al día) y 10 mg/kg de vemurafenib (dos veces al día) (n=8).

Figuras 12A-B. La adición de PAC-1 (1  $\mu$ M) en el tratamiento a largo plazo de células UACC-62 con vemurafenib retrasa significativamente el rebrote celular. (A) Las células UACC-62 se trataron con PAC-1 (1  $\mu$ M), vemurafenib (5  $\mu$ M o 10  $\mu$ M) o la combinación. Los medios se lavaron cada 2-3 días y se añadieron nuevos compuestos a cada pocillo. Después de 5, 10 o 20 días, los pocillos se fijaron con ácido tricloroacético al 10 %, se tiñeron con colorante de sulforhodamina B (SRB) al 0,5 % y se tomaron imágenes con BioRad GelDoc RX. Las imágenes del día 20 de las muestras de control y PAC-1 no se muestran porque las celdas no eran viables debido al hacinamiento. (B) Cuantificación de (A) donde el colorante SRB se disuelve en 10 mM de base Tris a pH 10,4 y la absorbancia se lee a 510 nm. La absorbancia corregida a 510 nm se representó frente a los días de tratamiento continuo mediante la normalización frente a la absorbancia el Día 0 antes del inicio del tratamiento. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Prueba t de 2 colas realizada entre pocillos tratados con vemurafenib solo frente a vemurafenib y PAC-1 (1  $\mu$ M). En el día 10, solo los pocillos tratados con vemurafenib (10  $\mu$ M) y PAC-1 (1  $\mu$ M) son significativamente diferentes del tratamiento con vemurafenib (10  $\mu$ M) solo ( $p = 0,035$ ). El día 20, los pocillos tratados con vemurafenib (5 o 10  $\mu$ M) y PAC-1 (1  $\mu$ M) son significativamente diferentes de vemurafenib (5 o 10  $\mu$ M), como se indica en el gráfico. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ ).

Figuras 13A-C. Efecto de la combinación de PAC-1 y vemurafenib en células A375VR. (A) Se muestra el por ciento de muerte celular apoptótica (evaluada mediante tinción con Anexina V/PI y citometría de flujo) inducida después de 24 h de tratamiento. (B) La muerte celular apoptótica observada en (A) es mayor que la predicha por el modelo independiente de Bliss. El exceso de muerte celular se calcula como  $[f_{(\text{observado, apoptótico})} - (f_{(\text{PAC-1, apoptótico})} + f_{(\text{vemurafenib, apoptótico})} - f_{(\text{PAC-1, apoptótico})} * f_{(\text{vemurafenib, apoptótico})})] * 100 \%$ . Esto indica que el efecto observado es sinérgico en lugar de aditivo. (C) El efecto sinérgico de PAC-1 y vemurafenib en la activación de la apoptosis en A375VR después de 24 h. Este efecto se anula cuando se usa el PAC-1a inactivo. Las líneas horizontales discontinuas representan el nivel de muerte celular que se espera de un mero efecto aditivo de los dos agentes. Los valores se informan como media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Los valores de  $p$  que se muestran para la interacción bidireccional para determinar si la combinación para la inducción de la apoptosis es diferente de un efecto aditivo (líneas horizontales discontinuas) de los agentes individuales son estadísticamente significativos (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## Descripción detallada

Muchos tipos de cáncer resisten la quimioterapia estándar o se vuelven resistentes a un quimioterapéutico en particular, después de un período de tiempo. La terapia combinada descrita en la presente descripción aprovecha la activación de procaspasa-1 por PAC-1, que puede crear sinergia con las propiedades quimioterapéuticas de un segundo agente activo, como un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación, para proporcionar eficacia en condiciones en las que uno de los principios activos solos podría ser menos efectivo o completamente inefectivo, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. Estos compuestos también pueden tener éxito en la terapia dirigida contra el cáncer, donde puede haber ventajas de selectividad en la eliminación de células cancerosas con reacciones adversas comparativamente reducidas a células no cancerosas que tienen niveles más bajos de procaspasa-3. Estas reacciones adversas reducidas pueden incluir reducciones en la toxicidad, particularmente la neurotoxicidad.

La combinación de compuestos, las composiciones y los métodos descritos en la presente descripción pueden actuar mediante la modulación de la apoptosis o la muerte celular programada y otros mecanismos quimioterapéuticos para ser efectivos en el tratamiento del cáncer. En una modalidad, la modulación de la apoptosis es por inducción o activación de la apoptosis. En diversas modalidades, la administración de compuestos puede ser concurrente o, alternativamente, secuencial.

Por lo tanto, la invención proporciona métodos para la potenciación de un agente activo por PAC-1, por ejemplo, para usar en el tratamiento de melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón o cáncer de ovario. Durante la apoptosis, el zimógeno procaspasa-3 se activa mediante proteólisis a caspasa-3, y esta caspasa-3 activa luego escinde decenas de sustratos celulares, ejecutando el programa apoptótico. Debido a que los niveles de proteína procaspasa-3 están elevados en diversas histologías tumorales, la activación directa de procaspasa-3 mediada por fármacos puede ser muy efectiva como estrategia selectiva contra el cáncer.

Ciertos compuestos pueden mejorar la actividad y la automaduración de la procaspasa-3 e inducir la apoptosis en las células cancerosas. El compuesto activador de procaspasa-1 (PAC-1) mejora la actividad de la procaspasa-3 a través de la quelación de iones de zinc inhibidores, induce la apoptosis en células cancerosas en cultivo y tiene eficacia en múltiples modelos de tumores murinos. Se ha encontrado que nuevas combinaciones de PAC-1 e inhibidores de la enzima BRAF que tiene una mutación son sinérgicamente efectivos en el tratamiento de células cancerosas, como se describe en la presente descripción. Debido a que PAC-1 actúa tarde en la cascada apoptótica, tiene la capacidad única de crear sinergias con un amplio intervalo de principios activos quimioterapéuticos, como se describe en la presente descripción.

El melanoma es la neoplasia maligna cutánea más común y, tras la metástasis, se considera la forma más mortal de cáncer de piel. Es el quinto cáncer más común en los Estados Unidos. Una mutación común en el melanoma es la sustitución de una valina por glutamato (V600E) en el dominio quinasa de la proteína BRAF Davies y otros, Nature 2002, 417, 949). La mutación V600E activa constitutivamente BRAF y la vía de señalización MEK-ERK cascada abajo, lo que lleva a la tumorigénesis. El descubrimiento de que aproximadamente el 50 % de los melanomas albergan la mutación V600E en la proteína BRAF impulsó el desarrollo de inhibidores de <sup>V600E</sup>BRAF y la posterior aprobación de vemurafenib en 2011. Los inhibidores de <sup>V600E</sup>BRAF como vemurafenib (y dabrafenib, aprobado en 2013) conducen a una reducción impresionante de la carga tumoral a las pocas semanas de la terapia y a una extensión de la supervivencia libre de progresión de tres a cuatro meses.

A pesar de su actividad inicial contra el melanoma, la resistencia a los inhibidores de <sup>V600E</sup>BRAF emergen rápidamente. En la mayoría de los tumores resistentes, se observa la reactivación de la vía de señalización de MAPK, lo que motiva la adición de inhibidores de MEK1/2 (por ejemplo, trametinib) al régimen de tratamiento del melanoma metastásico. Terapia combinada inicial con MEK1/2 y los inhibidores de <sup>V600E</sup>BRAF son efectivos para retrasar la mediana de tiempo hasta la resistencia entre 3,7 y 4,1 meses en pacientes que no han recibido tratamiento previo de inhibición de BRAF<sup>V600E</sup>, pero la adición del inhibidor de MEK1/2 a los pacientes que ya han fracasado antes la terapia con inhibidores de BRAF<sup>V600E</sup> solo da como resultado una mejora marginal en la eficacia contra el cáncer. Dadas las limitaciones clínicas actuales de las terapias existentes, se están explorando estudios combinados novedosos y racionalmente diseñados con otros inhibidores de la quinasa. A pesar de todos los esfuerzos realizados hasta la fecha, el desarrollo de resistencia a las terapias <sup>V600E</sup>BRAF surgen en prácticamente el 100 % de los pacientes tratados; la farmacoresistencia adquirida a esta clase de agentes sigue siendo un obstáculo significativo para mejorar drásticamente los beneficios de supervivencia de los pacientes con melanoma metastásico.

Por el contrario de muchos estudios que se han centrado en la combinación de vemurafenib con inhibidores de quinasas diversas y farmacológicas, la terapia combinada de vemurafenib con agentes que activan la vía apoptótica no se ha explorado de forma exhaustiva. En parte, esta falta de exploración podría atribuirse al hecho de que las células de melanoma poseen múltiples defectos en sus vías de señalización apoptótica, lo que las hace resistentes a muchos estímulos proapoptóticos. Presumimos que un agente proapoptótico adecuado que induce la apoptosis cascada abajo de estos defectos apoptóticos sería altamente sinérgico con inhibidores de <sup>V600E</sup>BRAF.

Dado que las aberraciones en las cascadas de señalización apoptótica en las células de melanoma están aguas arriba de la activación de la procaspasa-3, los fármacos que activan directamente la procaspasa-3 son candidatos intrigantes para esta terapia combinada. Además, debido a que los melanomas tienen una expresión elevada de procaspasa-3, un activador de procaspasa-3 debería ser potente y selectivo para tales células. Además, se sabe que los inhibidores de <sup>V600E</sup>BRAF inducen la muerte celular apoptótica mediada por caspasa-3; por lo tanto, la combinación de vemurafenib con un activador directo de procaspasa-3 podría conducir a una actividad de caspasa-3 dramáticamente mejorada y muerte de células cancerosas con relación al efecto de cualquier agente único. PAC-1 es una molécula pequeña que activa directamente la procaspasa-3 celular a través de la quelación del zinc inhibidor lábil. Debido a la sobreexpresión de procaspasa-3 en tipos de cáncer de diversos orígenes, PAC-1 y sus derivados inducen selectivamente la apoptosis en las células cancerosas sin afectar las células no cancerosas. PAC-1 ejerce actividad de agente único en múltiples modelos murinos de cáncer, incluido un modelo de xenoinjerto de melanoma. Es importante destacar que, además de la actividad preclínica favorable en modelos de tumores murinos, los



pacientes con cáncer humano han estado tomando PAC-1 como parte de un ensayo clínico de Fase I desde marzo de 2015 (NCT02355535).

Vemurafenib, el primer inhibidor de BRAF aprobado, es una terapia dirigida para pacientes con melanoma que tienen la proteína V600E BRAF (Bollag y otros, Nat. Rev. Drug Discov. 2012, 11, 873). El tratamiento con vemurafenib conduce a la apoptosis y a la rápida regresión del tumor, lo que prolonga la supervivencia libre de progresión de los pacientes con melanoma con la proteína V600E BRAF en 5,3 meses (McArthur y otros, Lancet Oncol. 2014, 15, 323). Si bien vemurafenib representa un avance significativo en el tratamiento del melanoma, la aparición de resistencia ha sido una preocupación importante en la clínica. La terapia combinada de vemurafenib con un inhibidor de MEK se probó clínicamente para extender la duración de la supervivencia libre de progresión en 3,7 meses, pero finalmente surge resistencia debido a la reactivación de la vía RAF-MEK-ERK (Larkin y otros, N. Engl. J. Med. 2014, 371, 1867).

Se ha informado una expresión elevada de procaspasa-3, la caspasa ejecutora en la cascada apoptótica, en varios tipos de cáncer, incluido el melanoma (Fink y otros, Melanoma Res. 2001, 11, 385; Chen y otros, Hum. Pathol. 2009, 40, 950). Por lo tanto, la activación de moléculas pequeñas de procaspasa-3 es una estrategia terapéutica atractiva para el melanoma debido al papel clave que desempeña la procaspasa-3 en la cascada apoptótica. El compuesto activador de procaspasa-3 1 (PAC-1) es una molécula pequeña que quelata el grupo lábil de iones de zinc, que inhiben la procaspasa-3, lo que prepara a las células cancerosas para la muerte apoptótica (Peterson y otros, J. Mol. Biol. 2009, 388, 144). PAC-1 ha demostrado eficacia como agente único en un modelo de xenoinjerto murino de melanoma, lo que valida el potencial de la activación de procaspasa-3 como estrategia anticancerígena (Wang y otros, Mol. Oncol. 2014, 8, 1640). Dado que PAC-1 prepara a las células para la muerte apoptótica y vemurafenib induce la apoptosis en las células cancerosas, encontramos que vemurafenib en combinación con PAC-1 mejora drásticamente la eficacia terapéutica.

Recientemente descubrimos que PAC-1 muestra una sinergia sobresaliente con los inhibidores de la enzima BRAF que tiene la mutación V600E, incluido el vemurafenib (comercializado como zelnoraf), un fármaco que se aprobó recientemente para el tratamiento del melanoma. Según nuestros datos (ver Figuras 1-13), PAC-1 mostrará una sinergia equivalente con todos los fármacos de esta clase (inhibidores de la enzima BRAF que tiene la mutación V600E o V600K), que también incluye dabrafenib (nombre comercial tafinlar) y otros.

En la presente descripción se describe la actividad sinérgica de los inhibidores de la enzima BRAF que tiene la mutación V600E, como vemurafenib, con PAC-1 para potenciar la muerte celular apoptótica en una variedad de líneas celulares de melanoma que contienen la proteína V600E BRAF. Es importante destacar que PAC-1 conserva la actividad en la línea celular A375R resistente a vemurafenib, lo que indica su utilidad en los melanomas que han progresado más allá del tratamiento con inhibidores de BRAF.

#### Definiciones

Las siguientes definiciones se incluyen para proporcionar una comprensión clara y consistente de la descripción y reivindicaciones. Como se usa en la presente descripción los términos citados tienen los significados siguientes. Todos los otros términos y frases usados en esta descripción tienen sus significados ordinarios como los entendería un experto en la técnica. Dichos significados ordinarios pueden obtenerse mediante referencia a diccionarios técnicos, tales como Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14ta Edición, por R.J. Lewis, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 2001.

Las referencias en la descripción a "una modalidad", "la modalidad", etcétera, indican que la modalidad descrita puede incluir un aspecto, rasgo, estructura, porción o característica particular, pero no todas las modalidades incluyen necesariamente ese aspecto, rasgo, estructura, porción o característica. Además, dichas frases pueden referirse, pero no necesariamente, a la misma modalidad a la que se hace referencia en otras partes de la descripción. Además, cuando se describe un aspecto, rasgo, estructura, porción o característica particular en relación con una modalidad, está dentro del conocimiento de un experto en la técnica afectar o conectar dicho aspecto, rasgo, estructura, porción o característica con otras modalidades, ya sea o no descrita explícitamente.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Así, por ejemplo, una referencia a "un compuesto" incluye una pluralidad de dichos compuestos, de modo que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para usar la terminología exclusiva, tal como por ejemplo "únicamente", "solamente" y similares, en relación con cualquier elemento descrito en la presente descripción, y/o la mención de elementos de reivindicación o uso de limitaciones "negativa(s)".

El término "y/o" significa cualquiera de los artículos, cualquier combinación de los artículos, o todos los artículos con los que se asocia este término. La frase "uno o más" y "al menos uno" se entienden fácilmente por un experto en la técnica, particularmente cuando se lee en el contexto de su uso. Por ejemplo, la frase puede significar uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez, 100 o cualquier límite superior aproximadamente 10, 100 o 1000 veces mayor que el límite

inferior citado. Por ejemplo, uno o más sustituyentes en un anillo de fenilo se refiere de uno a cinco o de uno a cuatro, por ejemplo, si el anillo de fenilo está disustituido.

El término "aproximadamente" puede referirse a una variación de  $\pm 5\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 20\%$ , o  $\pm 25\%$  del valor que se especifica. Por ejemplo, "aproximadamente 50" por ciento en algunas modalidades puede llevar a una variación entre 45 y 55 por ciento. Para intervalos de números enteros, el término "aproximadamente" puede incluir uno o dos números enteros mayores que y/o menores que un número entero citado en cada extremo del intervalo. A menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, el término "aproximadamente" pretende incluir los valores, por ejemplo, porcentajes en peso, cerca del intervalo citados que son equivalentes en términos de la funcionalidad del ingrediente individual, la composición o la modalidad. El término acerca de también puede modificar los puntos finales de un intervalo citado como se discutió anteriormente en este párrafo.

Como comprenderá el experto en la técnica, todos los números, lo que incluye los que expresan cantidades de reactivos, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etcétera, son aproximaciones y se entiende que se modifican opcionalmente en todos los casos mediante el término "aproximadamente". Estos valores pueden variar en dependencia de las propiedades deseadas que se pretende obtener por los expertos en la técnica al utilizar las enseñanzas de las descripciones en la presente descripción. Se entiende además que tales valores contienen inherentemente una variabilidad necesariamente resultante de las desviaciones estándar encontradas en sus respectivas mediciones de prueba.

Como comprenderá un experto en la técnica, para cualquiera y todos los propósitos, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos citados en la presente descripción también abarcan cualquiera y todos los subintervalos posibles y combinaciones de subintervalos de estos, así como también los valores individuales que componen el intervalo, particularmente los valores enteros. Un intervalo citado (por ejemplo, porcentajes en peso o grupos de carbono) incluye cada valor específico, número entero, decimal, o idéntico dentro del intervalo. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como descrito suficientemente y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, o décimos. Como un ejemplo no limitante, cada intervalo discutido en la presente descripción puede descomponerse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como comprenderá también un experto en la técnica, todo el lenguaje tal como "hasta", "al menos", "mayor que", "menos de", "más de", "o más", y similares, incluyen el número citado y dichos términos se refieren a intervalos que pueden descomponerse subsecuentemente en subintervalos como se analizó anteriormente. De la misma manera, todas las relaciones citadas en la presente descripción incluyen además todas las subrelaciones comprendidas dentro de la relación más amplia. En consecuencia, los valores específicos citados para radicales, sustituyentes e intervalos son solo ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de los intervalos definidos para radicales y sustituyentes.

Un experto en la técnica, además, reconocerá fácilmente que donde los miembros se agrupan juntos en una manera común, tal como en un grupo Markush, la invención abarca no solamente el grupo entero enumerado como un todo, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal. Adicionalmente, para todos los propósitos, la invención abarca no solamente el grupo principal, sino además el grupo principal en ausencia de uno o más de los miembros del grupo. La invención por lo tanto prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros de un grupo citado. En consecuencia, las condiciones pueden aplicarse a cualquiera de las categorías o modalidades descritas de manera que uno o más de los elementos, especies, o modalidades citados pueden excluirse de tales categorías o modalidades, por ejemplo, para usar en una limitación negativa explícita.

El término "contactar" se refiere al acto de tocar, hacer contacto o acercarse de forma inmediata o cercana, incluso a nivel celular o molecular, por ejemplo, para provocar una reacción fisiológica, una reacción química o un cambio físico, por ejemplo, en una solución, en una mezcla de reacción, *in vitro* o *in vivo*.

"Simultáneamente" significa (1) simultáneamente en el tiempo, o (2) en diferentes momentos durante el curso de un programa de tratamiento común.

"Secuencialmente" se refiere a la administración de un agente activo usado en el método seguido de la administración de otro agente activo. Después de la administración de un agente activo, el siguiente agente activo puede administrarse sustancialmente inmediatamente después del primero, o el siguiente agente activo puede administrarse después de un período de tiempo efectivo después del primer agente activo; el período de tiempo efectivo es la cantidad de tiempo dada para la realización del máximo beneficio de la administración del primer agente activo.

Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva para tratar una enfermedad, trastorno y/o afección, o para provocar un efecto citado, tal como activación o inhibición. Por ejemplo, una cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para reducir la progresión o gravedad de la afección o los síntomas que se están tratando. La determinación de una cantidad terapéutica efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. El término "cantidad efectiva" pretende incluir una cantidad de un compuesto descrito en la presente descripción, o una cantidad de una combinación de compuestos descritos en la presente descripción, por ejemplo, que es efectiva para

tratar una enfermedad o trastorno, o para tratar los síntomas de la enfermedad o desorden, en un anfitrión. Por tanto, una "cantidad efectiva" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado.

En una modalidad, una cantidad efectiva se refiere a una cantidad del agente activo descrito en la presente descripción que es efectivo, solo o en combinación con un portador farmacéutico, tras la administración de dosis única o múltiple a una célula o un sujeto, por ejemplo, un paciente, inhibiendo el crecimiento o la proliferación, induciendo la destrucción o deteniendo el crecimiento de células hiperproliferativas. Tal inhibición del crecimiento o destrucción puede reflejarse como una prolongación de la supervivencia del sujeto, por ejemplo, un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento, o cualquier mejora en el pronóstico del sujeto con relación a la ausencia de dicho tratamiento.

Los términos "tratado", "tratar" y "tratamiento" incluyen (i) inhibir la enfermedad, condición patológica o médica o detener su desarrollo; (ii) aliviar la enfermedad, condición patológica o médica; y/o (iii) la disminuir de los síntomas asociados con la enfermedad, patología o condición médica. Por lo tanto, los términos "tratado", "tratar" y "tratamiento" pueden incluir reducir, detener o revertir la progresión o gravedad de la afección o los síntomas que se están tratando. Como tal, el término "tratamiento" puede incluir la administración médica y/o terapéutica, según corresponda. En algunas modalidades, los términos "tratado", "tratar" y "tratamiento" pueden referirse a (i) una reducción o eliminación de los síntomas o la enfermedad de interés (terapia) o (ii) la eliminación o destrucción del tumor (cura).

Los términos "inhibir", "inhibiendo" e "inhibición" se refieren a ralentizar, detener o invertir el crecimiento o la progresión de una enfermedad, infección, afección o grupo de células. La inhibición puede ser superior a aproximadamente el 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, por ejemplo, en comparación con el crecimiento o progresión que se produce en ausencia del tratamiento o contacto. Adicionalmente, los términos "inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir" o similares denotan diferencias cuantitativas entre dos estados y pueden referirse al menos a diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados. Por ejemplo, "una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células hiperproliferativas" significa que la velocidad de crecimiento de las células puede ser, en algunas modalidades, al menos estadísticamente significativa diferente de las células no tratadas. Dichos términos pueden aplicarse en la presente descripción, por ejemplo, a tasas de proliferación.

La frase "inhibiendo el crecimiento o proliferación" de la célula hiperproliferativa, por ejemplo, célula neoplásica, se refiere a ralentizar, interrumpir, arrestar o detener su crecimiento y metástasis, y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento neoplásico.

El término "cáncer" generalmente se refiere a cualquiera de un grupo de más de 100 enfermedades causadas por el crecimiento descontrolado de células anormales. El cáncer puede adoptar la forma de tumores sólidos y linfomas, y tipos de cáncer no sólidos como la leucemia. A diferencia de las células normales, que se reproducen hasta la maduración y luego solo cuando es necesario para reemplazar las células dañadas, las células cancerosas pueden crecer y dividirse sin cesar, desplazando a las células cercanas y eventualmente extendiéndose a otras partes del cuerpo.

La invención proporciona composiciones para usar en el tratamiento del cáncer y de las afecciones cancerosas, y particularmente de los tipos de cáncer que portan la proteína V600E BRAF o la proteína V600K BRAF. El término "estado canceroso" se refiere a cualquier estado en el que las células se encuentran en un estado anormal o estado que se caracteriza por una rápida proliferación o neoplasia. Una afección cancerosa puede ser de naturaleza maligna o no maligna (por ejemplo, afección precancerosa). Para describir más detalladamente una "condición cancerosa", pueden usarse los términos "hiperproliferativo", "hiperplásico", "hiperplasia", "maligno", "neoplásico" y "neoplasia". Estos términos pueden usarse indistintamente y deben incluir todos los tipos de crecimientos hiperproliferativos, crecimiento hiperplásico, crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasividad, o determinación cancerosa (por ejemplo, maligno o no maligno).

El término "neoplasia" se refiere al crecimiento de nuevas células que da como resultado una pérdida de capacidad de respuesta a los controles de crecimiento normales, por ejemplo, crecimiento de células neoplásicas. Una "hiperplasia" se refiere a las células que experimentan una velocidad de crecimiento anormalmente alta. Sin embargo, estos términos pueden usarse indistintamente, como revelará su contexto, refiriéndose generalmente a las células que experimentan tasas de crecimiento celular anormales. "Neoplasias" e "hiperplasias" incluyen tumores, que pueden ser benignos, premalignos, carcinoma in situ, malignos, sólidos o no sólidos. Los ejemplos de algunas afecciones cancerosas que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, cáncer anal, cáncer de vejiga de células de transición, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi, leucemia, cáncer de pulmón como cáncer de pulmón broncogénico, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma maligno, neuroblastomas, carcinomas osteogénicos por ejemplo, cáncer de hueso), tipos de cáncer oftálmicos (por ejemplo, retinoblastomas y otros tipos de cáncer del ojo), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, tipos de cáncer de piel tales como melanoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de tiroides y tumor de Wilms. Otros ejemplos de condiciones hiperproliferativas no malignas (por ejemplo, condiciones precancerosas)

que están dentro del alcance de la invención incluyen, pero no se limitan a, adenomas, condromas, encondromas, fibromas, miomas, mixomas, neurinomas, osteoblastomas, osteocondromas, osteomas, tumores papilares y similares, incluyendo otros tipos de cáncer descritos en la presente descripción.

Los términos "leucemia" o "cáncer leucémico" se refieren a todos los tipos de cáncer o neoplasias de los sistemas hematopoyético e inmunológico (sangre y sistema linfático). Estos términos se refieren ampliamente a enfermedades malignas, progresivas de los órganos formadores de sangre y se caracteriza por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y médula ósea. Los mielomas se refieren a otros tipos de tumores de las células de la sangre y la médula ósea. Los linfomas se refieren a tumores del tejido linfático. Los ejemplos de leucemia incluyen la leucemia mielógena aguda (AML), la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y la leucemia mielógena crónica (CML).

Como se describe en la presente descripción, las composiciones de la invención pueden usarse para el tratamiento de varios trastornos neoplásicos que incluyen afecciones tales como melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma adenóide quístico, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de glándula de Bartolino, carcinoma de células basales, carcinomas de glándulas bronquiales, capilar, carcinoides, carcinoma, carcinosarcoma, cavernoso, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma del plexo coroideo, carcinoma de células claras, cistadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometriode, endimario, epiteliode, sarcoma de Ewing, fibrolamelar, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangiblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinooma, neoplasia intraepitelial, neoplasia interepitelial de células escamosas, neoplasia invasiva carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, leiomiomasarcoma, melanomas lentigo malignos, melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma meníngeo, mesotelial, carcinoma metastásico, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, carcinoma de células de avena, oligodendroglioma, osteosarcoma, polipéptido pancreático, adenocarcinoma seroso papilar, células pineales, tumores hipofisarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinomas de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, submesotelial, melanoma de extensión superficial, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, carcinoma bien diferenciado y tumor de Wilm. En consecuencia, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro (incluyendo neoplasias intracraneales tales como glioma, meningioma, neurinoma y adenoma), cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (SCLC o NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y/u otros tipos de cáncer citados en este documento.

En algunas modalidades, la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo (por ejemplo, un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación, por ejemplo, el agente activo vemurafenib) puede ser particularmente efectivo para tratar el melanoma. Otros tipos de cáncer que se pueden tratar incluyen, entre otros, oligodendrogliomas y glioblastomas, incluido el glioblastoma multiforme (GBM). Los tejidos afectados por las células cancerosas pueden estar en el propio cerebro (por ejemplo, el cráneo o el canal espinal central) o en el tejido linfático, en los vasos sanguíneos, en los nervios craneales, en las envolturas del cerebro (meninges), el cráneo, la glándula pituitaria, o glándula pineal. Las formas específicas de cáncer de cerebro que se pueden tratar incluyen astrocitomas, condromas, condrosarcomas, cordomas, linfomas del CNS (sistema nervioso central), craneofaringiomas, endimomas, gangliogliomas, ganglioneuromas (también llamados gangliocitomas), gliomas, incluidos astrocitomas, oligodendrogliomas y endimomas, hemangiblastomas (también llamados tumores vasculares), tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) como meduloblastomas, meningiomas y schwannomas vestibulares (anteriormente conocidos como neuroma acústico/schwannoma).

La combinación también se puede usar para tratar tumores metastásicos que invaden la esfera intracraneal de tipos de cáncer que se originan en otros órganos del cuerpo. Estas condiciones se conocen típicamente como tumores cerebrales secundarios. Los tumores cerebrales secundarios que pueden tratarse con la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo incluyen tumores metastásicos del cerebro que se originan a partir de cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de riñón, cáncer de colon y otros carcinomas.

Otros ejemplos de condiciones cancerosas que están dentro del alcance de la invención incluyen, pero no se limitan a, neuroblastomas y carcinomas osteogénicos (por ejemplo, cáncer de hueso o crecimiento neoplásico de tejido en el hueso). Los ejemplos de tumores óseos primarios malignos que pueden tratarse con la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo incluyen osteosarcomas, condrosarcomas, sarcoma de Ewing, fibrosarcomas y similares, y tumores óseos secundarios, como lesiones metastásicas que se han diseminado desde otros órganos, incluidos los carcinomas de mama, pulmón y próstata.

#### Agentes terapéuticos y actividad

Compuesto activador de procaspasa-1 (PAC-1; (2-(4-bencilpiperazin-1-il)-N-[(2-hidroxi-3-prop-2-enil-fenil)metilidenamino]acetamida) induce selectivamente la apoptosis en células cancerosas. Los métodos para

preparar PAC-1 se describen en patente de Estados Unidos núm 8,778,945 (Hergenrother y otros). PAC-1 mejora la actividad de la procaspasa-3 a través de la quelación de iones de zinc inhibidores, induce la apoptosis en las células cancerosas. PAC-1 puede mejorar la actividad y la automaduración de la procaspasa-3 e inducir la apoptosis en las células cancerosas. PAC-1 también mejora la actividad quimioterapéutica de los inhibidores de la enzima BRAF que tienen una mutación (el segundo activo), a menudo donde PAC-1 o el segundo activo son menos efectivos o completamente inactivos solos.

Sorprendentemente se descubrió que PAC-1 y sus derivados pueden sinergizar la actividad de los inhibidores de la enzima BRAF que tienen una mutación. Se divulgan adicionalmente, pero no forman parte de la invención, aspectos en los que el agente activo PAC-1 en las composiciones descritas en la presente descripción puede intercambiarse por un derivado de PAC-1 como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 8,592,584 (Hergenrother y otros) o la patente de Estados Unidos núm. 8,778,945 (Hergenrother y otros). Un ejemplo de tales derivados de PAC-1 es SPAC-1 (4-((4-(2-(2-(3-alil-2-hidroxibencilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)piperazin-1-il)metil)bencenosulfonamida). PAC-1 y sus derivados también pueden sinergizar la actividad de los inhibidores de MEK como trametinib.

En consecuencia, PAC-1 se puede combinar con un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación, como se describe en la presente descripción, y/o con un inhibidor de MEK como trametinib, cobimetinib, binimetinib (MEK162), selumetinib, PD-325901, CI-1040, PD035901 o TAK-733. Los inhibidores de MEK son fármacos que inhiben las enzimas MEK1 y/o MEK2 de la proteína quinasa quinasa activada por mitógeno. Pueden usarse para afectar la vía MAPK/ERK, que es hiperactiva en ciertos tipos de cáncer.

La cantidad o concentración de PAC-1 o el derivado de PAC-1 en una composición terapéutica puede ser la cantidad o concentración efectiva para inhibir el crecimiento de células cancerosas, para inducir la apoptosis en una célula cancerosa o para hacer sinergia con el segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. Por ejemplo, la concentración de PAC-1 puede ser de aproximadamente 0,2  $\mu$ M a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 2  $\mu$ M a aproximadamente 50  $\mu$ M, típicamente aproximadamente 2,5  $\mu$ M, aproximadamente 5  $\mu$ M, aproximadamente 7,5  $\mu$ M, aproximadamente 10  $\mu$ M, aproximadamente 12,5  $\mu$ M, aproximadamente 15  $\mu$ M, aproximadamente 20  $\mu$ M, aproximadamente 25  $\mu$ M, aproximadamente 30  $\mu$ M, aproximadamente 40  $\mu$ M o aproximadamente 50  $\mu$ M, o un intervalo entre cualquiera de los valores antes mencionados. De manera similar, la concentración del segundo agente activo (por ejemplo, inhibidores de la enzima BRAF que tienen una mutación, como vemurafenib o dabrafenib) puede ser de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 1 mM, típicamente aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 750 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1  $\mu$ M, aproximadamente 2,5  $\mu$ M, aproximadamente 5  $\mu$ M, aproximadamente 7,5  $\mu$ M, aproximadamente 10  $\mu$ M, aproximadamente 12,5  $\mu$ M, aproximadamente 15  $\mu$ M, aproximadamente 20  $\mu$ M, aproximadamente 25  $\mu$ M, aproximadamente 30  $\mu$ M, aproximadamente 40  $\mu$ M, aproximadamente 50  $\mu$ M, aproximadamente 75  $\mu$ M, aproximadamente 100  $\mu$ M, aproximadamente 125  $\mu$ M, aproximadamente 150  $\mu$ M, aproximadamente 200  $\mu$ M, aproximadamente 250  $\mu$ M, aproximadamente 300  $\mu$ M, aproximadamente 500  $\mu$ M, aproximadamente 750  $\mu$ M o aproximadamente 1 mM, o un intervalo entre cualquiera de los valores antes mencionados. Un experto en la técnica puede convertir fácilmente la cantidad de agente activo en una dosis de una concentración particular en una cantidad de agente activo, por ejemplo, para usar en una unidad de dosificación sólida.

Los datos de varios experimentos se muestran en las Figuras 1-13. PAC-1 y vemurafenib ejercen una potente sinergia para inducir la muerte apoptótica y la actividad de la caspasa en las células de melanoma. Se observa una activación espectacular de procaspasa-3 en células tratadas con PAC-1 + vemurafenib. Adicionalmente, 12  $\mu$ M de PAC-1 y 10  $\mu$ M de vemurafenib solos tienen poco efecto sobre la escisión de PARP-1 en células A375, pero se observa una escisión significativa de PARP (mediante transferencia Western) con la combinación. Además, la adición de PAC-1 a la combinación de vemurafenib y un inhibidor de MEK, trametinib, mejora significativamente la actividad de la caspasa-3 y el efecto proapoptótico de la combinación. Además, la adición de bajas concentraciones de PAC-1 retrasa el rebrote de las células cancerosas después del tratamiento con vemurafenib. PAC-1 también sigue siendo potente contra las células A375VR resistentes a vemurafenib en cultivo celular y actúa sinérgicamente con vemurafenib para ejercer efectos antitumorales en el crecimiento de células A375VR *in vivo*. Nuestros datos indican que la inhibición de la señalización de MAPK combinada con la activación simultánea de procaspasa-3 es una estrategia efectiva para mejorar la actividad antitumoral de vemurafenib y mitigar el desarrollo de resistencia. En consecuencia, la invención proporciona un método para superar la resistencia a vemurafenib mediante la administración de PAC-1 en combinación con terapia con vemurafenib y/o terapia con vemurafenib/inhibidor de MEK a pacientes que tienen cáncer resistente a vemurafenib.

#### Métodos de la invención

La invención proporciona métodos *ex vivo* para inducir selectivamente la apoptosis en una célula cancerosa, que comprenden administrar a una célula cancerosa una combinación de compuestos capaces de modificar una molécula de procaspasa-3 de dicha célula cancerosa; en donde la combinación de compuestos es PAC-1 y un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. También se

describe un método para inducir selectivamente la apoptosis en una célula cancerosa, que comprende administrar a una célula cancerosa una combinación de compuestos capaces de modificar una molécula de procaspasa-3 de la célula cancerosa; en donde la combinación de compuestos es PAC-1 y un segundo agente activo, por ejemplo, donde la célula, en donde la cancerosa está en un paciente que necesita tratamiento.

La invención proporciona métodos *ex-vivo* adicionales en los que la combinación citada de compuestos es PAC-1 y un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib, por ejemplo, como un método *ex-vivo* para tratar una célula cancerosa, que comprende (a) identificar una susceptibilidad potencial al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) exponer la célula cancerosa a una cantidad efectiva de una combinación de un compuesto activador de procaspasa y un segundo agente activo. También se proporciona un método *ex-vivo* para tratar una célula cancerosa, que comprende (a) identificar una susceptibilidad potencial al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) exponer dicha célula cancerosa a una cantidad efectiva de PAC-1 y un segundo agente activo; en donde el PAC-1 es capaz de activar al menos uno de procaspasa-3 y procaspasa-7. También se proporciona un método *ex-vivo* para inducir la muerte en una célula cancerosa (por ejemplo, matar una célula cancerosa), que comprende administrar a una célula cancerosa un agente activo y un compuesto capaz de activar una molécula de procaspasa-3 de la célula cancerosa, tal como PAC-1.

La invención proporciona además un medicamento o composición que comprende una cantidad efectiva de la combinación de PAC-1 y un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. El medicamento puede usarse en un método para inducir la apoptosis en una célula. En algunas modalidades, la combinación de compuestos no cruza la barrera hematoencefálica en la medida en que provoca efectos neurotóxicos apreciables en un paciente. Los métodos de la invención incluyen poner en contacto una o más células con una cantidad efectiva de una combinación de compuestos descritos en la presente descripción, *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, la invención también proporciona métodos para tratar una célula que incluyen poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de una combinación de compuestos descritos en la presente descripción y tratar a un paciente que necesita terapia contra el cáncer con una cantidad efectiva de una combinación de compuestos descritos en la presente descripción.

Como se describe en la presente descripción, la invención proporciona PAC-1 y un segundo agente activo para usar en el tratamiento de un paciente que tiene células tumorales que tienen niveles elevados de procaspasa-3, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. Los métodos pueden incluir administrar a un paciente que tiene células tumorales con niveles elevados de procaspasa-3 una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de PAC-1 y un segundo agente activo descrito en la presente descripción, o una composición del mismo. La invención proporciona además PAC-1 y un segundo agente activo para usar en el tratamiento de una célula tumoral que tiene un nivel elevado de procaspasa-3 que comprende exponer la célula tumoral a una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de PAC-1 y un segundo agente activo descrito en la presente descripción, en donde la célula tumoral se trata, se destruye o se inhibe su crecimiento. El tumor o las células tumorales pueden ser células tumorales malignas. En algunas modalidades, las células tumorales son células de cáncer de colorrectal, de tiroides, de pulmón, de ovario o melanomas.

PAC-1 se puede combinar con un segundo agente activo en una forma de dosificación unitaria para la administración a un paciente, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. La terapia combinada puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

La terapia combinada puede proporcionar "sinergia", es decir el efecto logrado cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan al usar los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando PAC-1 y un segundo agente activo son: (1) coformulado y administrado o entregado simultáneamente en una formulación combinada; (2) entregado por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. Cuando se entregan en una terapia de alternancia, puede lograrse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o entregan secuencialmente, por ejemplo, en comprimidos, píldoras o cápsulas separadas, o por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosis efectiva de cada ingrediente activo se puede administrar de forma secuencial, es decir, consecutivamente, mientras que, en una terapia combinada, las dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas. Un efecto anticanceroso sinérgico denota un efecto anticanceroso que es mayor que los efectos puramente aditivos predichos de los compuestos individuales de la combinación. La terapia combinada se describe además por la patente de Estados Unidos núm. 6,833,373 (McKearn y otros), que incluye agente activo adicionales que pueden combinarse con PAC-1 y tipos adicionales de cáncer y otras afecciones que pueden tratarse con PAC-1.

En consecuencia, PAC-1 puede usarse en combinación con el segundo agente activo para el tratamiento del cáncer, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. PAC-1 puede preceder o seguir a la administración del segundo agente activo por intervalos que van desde minutos hasta semanas. En las modalidades en las que el segundo agente activo y PAC-1 se administran por separado a la célula, uno generalmente se asegura que no transcurra un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de

manera que el agente y PAC-1 todavía puedan ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que uno puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con las dos modalidades sustancialmente simultáneas (es decir, en menos de unos pocos minutos). En otros aspectos, el segundo agente activo de la combinación se puede administrar dentro de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 45 horas, o de aproximadamente 48 horas o más, antes y/o después de administrar PAC-1. En ciertas otras modalidades, el segundo agente activo puede administrarse dentro de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 20 días o aproximadamente 21 días, antes y/o después de administrar PAC-1. En algunas situaciones, puede ser conveniente extender significativamente el período del tratamiento, sin embargo, durante un lapso de varias semanas (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 semanas o más) entre las administraciones respectivas.

La administración de las composiciones quimioterapéuticas de la invención a un paciente seguirá típicamente los protocolos generales para la administración de quimioterapéuticos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que varias terapias estándar o adjuntas, así como también la intervención quirúrgica, pueden aplicarse en combinación con las combinaciones descritas. Estas terapias incluyen, pero no se limitan a quimioterapia, inmunoterapia, terapia génica y cirugía.

#### Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden usarse para preparar composiciones, por ejemplo, combinando los compuestos con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Los compuestos se pueden añadir a un portador en forma de sal o solvato. Por ejemplo, en los casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no tóxicas estables, puede ser apropiada la administración del compuesto como sales. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales orgánicas de adición ácida que, formadas con ácidos, que forman un anión fisiológico aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato,  $\alpha$ -cetoglutarato y  $\beta$ -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales de clorhidrato, haluro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse mediante el uso de procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la reacción de un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado para proporcionar un compuesto iónico fisiológicamente aceptable. Metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos pueden prepararse además mediante métodos análogos.

Los compuestos de las fórmulas descritos en la presente descripción pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto mamífero, tal como un paciente humano, en una variedad de formas. Las formas pueden adaptarse específicamente a una vía de administración elegida, por ejemplo, administración oral o parenteral, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden administrarse en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Para la administración oral, los compuestos pueden estar encerrados en cápsulas de cubierta dura o suave, pueden comprimirse en comprimidos o pueden incorporarse directamente con la comida de la dieta del paciente. El compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones contendrán típicamente al menos 0,1 % del compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar y puede ser convenientemente de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 % o de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles puede ser de manera que pueda obtenerse un nivel de dosis efectiva.

Las comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como la goma tragacanto, acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrador tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido alginico y similares; y un lubricante tal como estearato de magnesio. Un agente edulcorante como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo; o

se puede agregar un agente aromatizante como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Diversos materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de cualquier otra manera la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden estar recubiertas con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como el sabor a cereza o naranja. Cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debería ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo puede administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales pueden prepararse en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina o sus mezclas, o en un aceite farmacéuticamente aceptable. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones acuosas estériles, dispersiones o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo adaptado para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. La forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un solvente o medio de dispersión líquido que comprenda, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y/o antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse mediante agentes de absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, opcionalmente seguido de la esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación pueden incluir técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo en adición a cualquier ingrediente adicional deseado presente en la solución.

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, dimetilsulfóxido (DMSO), alcoholes, glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que un compuesto puede disolverse o dispersarse a niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivo no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse desde almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o rociarse sobre el área afectada mediante el uso de pulverizadores de tipo bomba o de aerosol. Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y ésteres, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también pueden emplearse con portadores líquidos.

Las dosis útiles de los principios activos descritos en la presente descripción pueden determinarse mediante la comparación de sus actividades *in vitro* y la actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosis efectivas en ratones y otros animales, a humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm 4,938,949 (Borch y otros). La cantidad de un compuesto, o una sal activa requerida o derivada del mismo, para usar en el tratamiento variará no solo con el compuesto o la sal particular seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se trata y la edad y estado del paciente, y será finalmente a discreción del médico o clínico.

En general, sin embargo, una dosis adecuada de principios activos estará en el intervalo de aproximadamente de 0,5 a aproximadamente de 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día, tal como de 3 a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferentemente en el rango de 6 a 90 mg/kg/día, con la máxima preferencia en el rango de 15 a 60 mg/kg/día. El compuesto puede formularse convenientemente en forma de dosificación unitaria; por ejemplo, que contiene de 5 a 1000 mg, convenientemente 10 a 750 mg, de máxima conveniencia, 50 mg a 500 mg del ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. En algunas modalidades, una dosificación de PAC-1 será de aproximadamente 50-250 mg/kg, aproximadamente 75-150 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg. En diversas modalidades, la dosificación del inhibidor del gen BRAF o de la enzima será de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg o de aproximadamente 10 mg/kg. Las dosis



de inhibidor de MEK pueden ser de cantidades similares a cualquiera de estos principios activos, o en aproximadamente la mitad a aproximadamente una décima parte de la cantidad de cualquiera de estos principios activos. En una modalidad, la invención proporciona una composición que comprende un agente activo o una combinación de agentes activos descritos en la presente descripción, formulados en una o más de dichas formas de dosificación unitaria.

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis simple o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí misma puede dividirse aún más, por ejemplo, en una serie de administraciones discretas y poco espaciadas; tales como inhalaciones múltiples de un insuflador o mediante la administración oral.

La combinación de principios activos se puede administrar convenientemente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, que contiene de 100 a 5000 mg/m<sup>2</sup>, 300 a 4000 mg/m<sup>2</sup>, 370 a 3700 mg/m<sup>2</sup>, 50 a 750 mg/m<sup>2</sup>, o 750 a 4000 mg/m<sup>2</sup> de agente activo por forma de dosificación unitaria. Cada agente activo, individualmente o en combinación, también se puede administrar de aproximadamente de 1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, aproximadamente de 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente de 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente de 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente de 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 150 mg/kg, o un intervalo de cualquiera de los valores antes mencionados a cualquier otro de los valores antes mencionados. El agente activo también se puede administrar a un sujeto para proporcionar una concentración plasmática en estado estacionario de los fármacos, solos o en combinación, de aproximadamente 1 µmol/L a aproximadamente 25 µmol/L, o aproximadamente 10 µmol/L, o aproximadamente 15 µmol/L.

En algunas modalidades, la invención proporciona el agente activo en concentraciones efectivas de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 µM. En otra modalidad, las concentraciones efectivas son de aproximadamente 200 nM a aproximadamente de 50 µM, de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 40 µM, de aproximadamente 750 nM a aproximadamente 25 µM, de aproximadamente de 1 µM a aproximadamente 20 µM, o de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 10 µM. En otra modalidad, se considera que la concentración efectiva es un valor como una concentración de actividad del 50 % en un ensayo de activación directa de procaspasa, en un ensayo de inducción de apoptosis celular o en una evaluación terapéutica clínica en animales. En una modalidad, dicho valor es inferior a aproximadamente 200 µM. En otra modalidad, el valor es inferior a aproximadamente 10 µM, pero superior a aproximadamente 10 nM. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis simple o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La propia subdosis se puede dividir, además, por ejemplo, en varias administraciones discretas poco espaciadas.

Los principios activos descritos en la presente descripción pueden ser agentes antitumorales efectivos y tener una mayor potencia y/o una toxicidad reducida en comparación con la administración de cualquier agente único. La invención proporciona composiciones para usar en el tratamiento del cáncer en un paciente o sujeto, tal como un mamífero, que implican administrar a un mamífero que tiene cáncer una cantidad efectiva de un compuesto o composición descritos en la presente descripción. Un mamífero incluye primates, humanos, roedores, caninos, felinos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos, caprinos, bovinos y similares. Cáncer se refiere a cualquier tipo de neoplasia maligna, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de mama, melanoma, o leucemia, entre otros descritos en la presente descripción, y en general se caracteriza por una proliferación celular indeseable, por ejemplo, crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejidos locales y metástasis.

La capacidad de una composición para tratar el cáncer puede determinarse mediante el uso de ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen el diseño de protocolos de tratamiento, la evaluación de la toxicidad, el análisis de datos, la cuantificación de la destrucción de células tumorales y la importancia biológica del uso de exámenes de detección de tumores trasplantables. Además, la capacidad de una composición para tratar el cáncer se puede determinar mediante el uso de los ensayos en las citas y documentos de patente citados en la presente descripción.

Los métodos no reivindicados para realizar las pruebas y evaluar las líneas de células cancerosas se pueden llevar a cabo como se describe en Putt y otros, Nature Chemical Biology 2006, 2(10), 543-550; Peterson y otros., J. Mol. Biol. 2009, 388, 144-158; y Peterson y otros, Cancer Res. 2010, 70(18), 7232-7241.

Los siguientes Ejemplos pretenden ilustrar la invención anterior y no deben interpretarse, de ninguna manera, como limitantes de su alcance. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los Ejemplos sugieren muchas otras formas en las que podría practicarse la invención.

## Ejemplos

**Ejemplo 1.** La Combinación de Activación de Vemurafenib y Procaspsa-3 es Sinérgica en Melanomas BRAF Mutantes

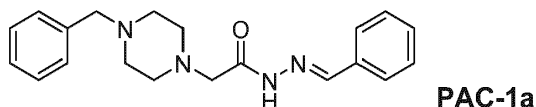
El desarrollo de resistencia a vemurafenib limita la eficacia a largo plazo de este fármaco para el tratamiento de melanomas metastásicos con la mutación <sup>V600E</sup>BRAF. La inhibición de la señalización de MAPK cascada abajo con vemurafenib induce la muerte celular apoptótica mediada por caspasa-3, lo que sugiere que la adición de un activador de procaspasa-3 podría mejorar los efectos contra el cáncer. Aquí mostramos que la combinación de PAC-1, un compuesto activador de procaspasa, y vemurafenib es altamente sinérgico para mejorar la actividad de caspasa-3 y la muerte celular apoptótica en líneas celulares de melanoma que albergan la mutación <sup>V600E</sup>BRAF. *In vivo*, la combinación muestra un perfil de seguridad favorable en ratones y ejerce efectos antitumorales significativos. Además, demostramos que la adición de PAC-1 a la combinación clínicamente útil de vemurafenib y un inhibidor de MEK, trametinib, mejora notablemente la actividad de la caspasa-3 y el efecto proapoptótico de la combinación. Además, la adición de PAC-1 de baja concentración también retrasa el rebrote de las células después del tratamiento con vemurafenib. Finalmente, PAC-1 sigue siendo potente contra las células A375VR resistentes a vemurafenib en cultivo celular y se sinergiza con vemurafenib para ejercer efectos antitumorales en el crecimiento de células A375VR *in vivo*. En conjunto, nuestros datos indican que la inhibición de la señalización de MAPK combinada con la activación simultánea de procaspasa-3 es una estrategia efectiva para mejorar la actividad antitumoral de vemurafenib y mitigar el desarrollo de resistencia.

Aquí informamos la actividad sinérgica de PAC-1+vemurafenib y PAC-1+vemurafenib+trametinib en la mejora de la actividad de caspasa-3 y la muerte celular apoptótica en melanoma <sup>V600E</sup>BRAF. Como resultado del aumento de la muerte celular apoptótica, la combinación de PAC-1+vemurafenib induce una reducción significativa en el volumen del tumor en un modelo de xenoinjerto murino de melanoma <sup>V600E</sup>BRAF, mucho más allá de los efectos antitumorales de los agentes individuales. Además, esta mejora de la muerte apoptótica en el melanoma sensible a vemurafenib mediante la adición de PAC-1 retrasa significativamente el rebrote de las células después de la exposición a vemurafenib. Finalmente, PAC-1 sigue siendo efectivo en células A375VR resistentes a vemurafenib en cultivo y actúa sinérgicamente con vemurafenib para retardar el crecimiento tumoral de estas células *in vivo*, lo que demuestra la utilidad de esta combinación en melanomas que han progresado más allá del tratamiento con inhibidores de BRAF, para los cuales actualmente hay pocas opciones de tratamiento disponibles.

*La combinación de PAC-1 y vemurafenib potencia la apoptosis en células con la mutación <sup>V600E</sup>BRAF.* En un panel de nueve líneas celulares de diversos orígenes y estado mutacional BRAF, vemurafenib es potente (valores de IC<sub>50</sub> entre 200 - 550 nM) solo en líneas celulares que albergan la mutación <sup>V600E</sup>BRAF, consistente con valores informados previamente (Figura 1A). La evaluación de PAC-1 en el mismo panel de líneas celulares muestra que PAC-1 conserva una actividad similar en todas las líneas celulares (valores de IC<sub>50</sub> entre 1-4 µM), independientemente del estado mutacional BRAF (Figura 1A). A continuación, se evaluó en estas líneas celulares la capacidad de la combinación de PAC-1+vemurafenib para inducir la muerte celular apoptótica. En condiciones (24 h de incubación con compuestos) en las que ni el vemurafenib ni el PAC-1 indujeron una muerte apoptótica significativa (≤ 10 %) como agentes únicos, la combinación de PAC-1+vemurafenib induce una apoptosis significativa (20-45 %) en líneas celulares con la mutación <sup>V600E</sup>BRAF (Figura 1B). También se observó una tendencia similar cuando se evaluó una concentración más baja de vemurafenib (0,5 µM) en combinación con PAC-1 en líneas celulares <sup>V600E</sup>BRAF (Figura 1C). Sin embargo, la combinación PAC-1+vemurafenib no induce apoptosis sinérgica en líneas celulares con BRAF de fenotipo salvaje (Figura 1B).

*PAC-1 y vemurafenib se sinergizan para mejorar la actividad de la caspasa-3 y la apoptosis en células A375, SK-MEL-5 y UACC-62.* Para explorar más ampliamente la sinergia observada, se evaluó la muerte apoptótica en tres líneas celulares humanas <sup>V600E</sup> BRAF de melanoma tratadas con una matriz de concentraciones de PAC-1 y vemurafenib que inducen una apoptosis mínima como agentes únicos. En estos experimentos, se observaron grandes aumentos en las poblaciones de células apoptóticas (más allá del efecto aditivo de agentes individuales solos) en A375 (Figura 2A), SK-MEL-5 (Figura 7A) y UACC-62 (Figura 8A). Para cuantificar la sinergia de esta combinación de fármacos, se calcularon los índices de combinación (CI). Una combinación de fármacos que es sinérgica tendrá un valor de CI inferior a 1, mientras que un valor de 1 refleja un efecto aditivo (Chou, Pharmacol Rev 2006;58:621-81). El 93 % de los valores de CI calculados son inferiores a 1 (A375 en la Figura 2B, SK-MEL-5 en la Figura 7B y UACC-62 en la Figura 8B), lo que indica sinergismo para la combinación a través de las tres líneas celulares ensayadas. Para evaluar si el aumento de la apoptosis era el resultado de una mayor activación de las procaspasas ejecutoras, se evaluó la actividad enzimática de la caspasa-3/-7 en células A375 (después de la lisis) mediante el uso de un sustrato fluorogénico. En células A375 tratadas con vemurafenib o PAC-1 solo (a las mismas concentraciones usadas en la Figura 1B), se observaron aumentos insignificantes en la actividad de la caspasa-3 en estos puntos de tiempo y concentraciones (Figura 2C). Sin embargo, cuando las células A375 se trataron con PAC-1 y vemurafenib, se observó un aumento significativo en la actividad de la caspasa-3 tan pronto como 7 h después del tratamiento (Figura 2C). En los análisis de transferencia Western, ninguno de los agentes individuales tuvo un efecto sobre la escisión de PARP-1 en estos puntos de tiempo y concentraciones; sin embargo, la combinación dio como resultado una PARP-1 escindida significativa (Figura 2D), un resultado del aumento de la actividad de caspasa-3/-7 en células tratadas con la combinación PAC-1+vemurafenib. Después del tratamiento con la combinación durante 24 h, se observó una escisión casi completa de PARP-1 en las células A375 (Figura 2D). También se observaron resultados similares para el ensayo de actividad de la caspasa-3/-7 y la escisión de PARP-1 en SK-MEL-5 (Figura 7C y 7D) y células UACC-62 (Figura 8C y 8D).

El derivado de PAC-1, PAC-1a, carece del motivo quelante de zinc y, por lo tanto, no activa la procaspasa-3 ni induce la apoptosis.



El uso de PAC-1a en combinación con vemurafenib no resultó en un aumento significativo en la proporción de células que sufrieron apoptosis en las células A375, SK-MEL-5 o UACC-62 (Figura 9A-C). Este resultado también es consistente con la ausencia de una mayor escisión de PARP-1 en las células tratadas con la combinación de PAC-1a y vemurafenib. (Figura 9D), indicando que las células no sufrieron muerte apoptótica.

*Inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y la activación de la procaspasa-3 son necesarias para aumentar la muerte celular apoptótica.* De acuerdo con los datos de la Figura 1B, no se observó mejora en la actividad de la caspasa-3 o escisión de PARP-1 en dos líneas celulares <sup>WT</sup>BRAF cuando se tratan con la combinación de PAC-1+vemurafenib (Figura 1A-C). La falta de sinergia PAC-1+vemurafenib en líneas celulares que albergan <sup>WT</sup>BRAF sugiere que tanto la inhibición de ERK1/2 como la activación de la procaspasa-3 son necesarias para inducir el aumento drástico de la muerte celular apoptótica. De hecho, después de 24 h de tratamiento con vemurafenib, no se observó inhibición de la fosforilación de ERK1/2 en líneas celulares <sup>WT</sup>BRAF incluso a altas concentraciones (30  $\mu$ M) de vemurafenib (Figura 1B y 1C). Esta observación es consistente con informes previos donde vemurafenib no inhibe la fosforilación de ERK1/2 en células <sup>WT</sup>BRAF, pero paradójicamente lo activa.

Para seguir investigando esto, células A375 (que albergan <sup>V600E</sup>BRAF) se trataron con PAC-1, vemurafenib o la combinación y se sondearon para detectar la presencia de fosforilación de PARP-1 y ERK1/2 escindida. Después de 24 h, no se observaron bandas de fosfo-ERK1/2 en las células tratadas con vemurafenib (a 0,5 y 1,0  $\mu$ M) y la combinación (Figura 2E). Sin embargo, solo se observaron aumentos significativos en la cantidad de PARP-1 escindida en células tratadas con PAC-1 y vemurafenib (Figura 2E). También se observaron resultados similares en SK-MEL-5 (Figura 7E) y células UACC-62 (Figura 8E). A bajas concentraciones de vemurafenib (0,1 y 0,25  $\mu$ M), donde se observó una inhibición incompleta de la fosforilación de ERK1/2, también se observó un ligero aumento en la escisión de PARP-1 sobre los efectos del agente único (Figura 2E). Este resultado sugiere que incluso con una inhibición incompleta de la fosforilación de ERK1/2, la activación de procaspasa-3, que está cascada abajo de la señalización de ERK1/2, se puede mejorar con la adición de PAC-1 a los tratamientos con vemurafenib. En conjunto, los datos muestran que la activación de procaspasa-3 a través de PAC-1 mejora drásticamente el efecto proapoptótico de vemurafenib en líneas celulares con mutación <sup>V600E</sup>BRAF.

*La adición de PAC-1 a vemurafenib y trametinib aumenta la actividad de la caspasa-3 y la apoptosis.* La adición de un inhibidor de MEK1/2, como trametinib, se usa ampliamente en la clínica para mejorar la eficacia de vemurafenib en melanomas <sup>V600E</sup>BRAF. Para explorar el efecto de PAC-1 con esta combinación, las células se trataron con vemurafenib+trametinib, en presencia o ausencia de PAC-1, y se evaluó la apoptosis. En ambas líneas celulares A375 y UACC-62, el tratamiento conjunto con vemurafenib+trametinib condujo a meros aumentos aditivos en la población de células apoptóticas (Figura 3A). Por el contrario, la adición de PAC-1 condujo a un gran aumento en la población de células apoptóticas, más allá del efecto aditivo de los agentes individuales solos (Figura 3A). El cotratamiento con vemurafenib+trametinib no condujo a la escisión de PARP-1, mientras que la adición de PAC-1 condujo a una escisión casi cuantitativa de PARP-1 (Figura 3B). Se evaluó explorar si el aumento de la muerte celular apoptótica en presencia de PAC-1 es el resultado de una actividad enzimática mejorada de las caspasas ejecutoras, la actividad de caspasa-3/-7 de las células A375 y UACC-62 tratadas con vemurafenib+trametinib, más o menos PAC-1. Nuevamente, se observó un aumento dramático en la actividad de caspasa-3/-7 cuando se incluyó PAC-1, un efecto que estuvo ausente sin la adición de PAC-1 (Figura 3C).

*La combinación de vemurafenib y PAC-1 reduce significativamente la carga tumoral en un modelo de xenoinjerto A375.* Para determinar el efecto antitumoral de la combinación PAC-1+vemurafenib *in vivo*, se usó un modelo de xenoinjerto A375 (Yadav y otros, Mol Cancer Ther 2014;13:2253-63). En este modelo, los ratones desnudos se inocularon por vía subcutánea con células A375 y, después de permitir que los tumores crecieran, los ratones se aleatorizaron según el volumen tumoral en cuatro grupos [ $F=0,03 < F_{\text{crítico}}(3,01)$ ] y dosificado con PAC-1, vemurafenib o la combinación durante 15 días. El tratamiento con PAC-1 solo condujo a una reducción mínima en la masa y el volumen tumoral en comparación con los ratones de control no tratados (Figura 4A y 4B). Los ratones que recibieron una dosis de solo vemurafenib experimentaron una reducción moderada (53 %;  $p=0,04$ ) en el volumen y la masa tumoral en comparación con el control (Figura 4A y 4B), con 3 de 8 ratones que tienen una masa tumoral comparable a la de los ratones de control (Figura 4B). Por el contrario, los ratones tratados con la combinación de PAC-1 y vemurafenib tenían una carga tumoral significativamente menor en comparación con los ratones de control (Figura 4A, 4B y Figura 11). En estos ratones, se observó una reducción del 78 % en el volumen del tumor (Figura 4A,  $p=0,0008$  frente al control), con 6 de 8 ratones que tenían tumores de menos de 0,2 g de masa (Figura 4B), lo que indica que la adición de PAC-1 mejora los efectos antitumorales de vemurafenib *in vivo* y reduce la variabilidad en respuesta al tratamiento.

El examen de los niveles de procaspasa-3 en las muestras tumorales por transferencia Western mostró una reducción apreciable y consistente en la cantidad de procaspasa-3 solo en muestras tumorales derivadas de ratones que recibieron el tratamiento combinado, frente a respuestas variables para los otros grupos de dosificación (Figura 4C y 4D). Mediante el uso de tinción inmunohistoquímica se observó una reducción significativa en el porcentaje de células que expresan Ki-67 en tumores tratados con PAC-1+vemurafenib (Figura 4E), lo que indica que la combinación PAC-1+vemurafenib fue capaz no solo de amplificar la activación de procaspasa-3, sino también de atenuar la proliferación celular. Finalmente, en ratones tratados con PAC-1 +vemurafenib, no se observaron toxicidades hematológicas (Tabla 1), lo que indica un perfil de seguridad favorable para la combinación. En conjunto, los datos *in vivo* son consistentes con los resultados del cultivo celular que muestran que la sinergia de PAC-1+vemurafenib conduce a un aumento en la actividad de la caspasa-3 y la inducción de la muerte celular apoptótica, así como también una reducción en la proliferación celular.

Tabla 1. Toxicidad hematológica y bioquímica de PAC-1 y vemurafenib. Datos promedio de 4 ratones tratados con 100 mg/kg de PAC-1 una vez al día y 10 mg/kg de vemurafenib dos veces al día durante 15 días. No se identificaron pruebas clínicamente significativas de mielosupresión, daño renal o toxicidad hepática. \*Los recuentos de plaquetas fueron bajos porque se observaron grumos de plaquetas.<sup>1</sup>Los valores del intervalo normal se obtuvieron de Charles River para ratones hembra NU/NU de entre 8 y 10 semanas de edad.

Química sanguínea	Promedio $\pm$ SEM	Intervalo Normal <sup>1</sup>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,20 $\pm$ 0,04	0,2 – 0,4
<b>BUN (Urea) (mg/dL)</b>	32,3 $\pm$ 1,0	11 - 39
<b>Proteína Total (g/dL)</b>	4,7 $\pm$ 0,1	4,8 – 6,6
<b>Albúmina (g/dL)</b>	2,2 $\pm$ 0,1	2,8 – 4,0
<b>Globulina (g/dL)</b>	2,5 $\pm$ 0,1	
<b>Calcio (mg/dL)</b>	9,2 $\pm$ 0,2	9,5 – 12,1
<b>Fósforo (mg/dL)</b>	10,8 $\pm$ 0,5	8,0 – 15,5
<b>Sodio (mmol/L)</b>	161,0 $\pm$ 0,8	140,7 – 165,1
<b>Potasio (mmol/L)</b>	7,9 $\pm$ 0,2	7,0 – 10,8
<b>Cloruro (mmol/L)</b>	119,0 $\pm$ 0,9	108,8 – 133,2
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	182,3 $\pm$ 12,5	149 - 271
<b>Fósforo Alcalino Total (U/L)</b>	70,8 $\pm$ 9,0	76 - 301
<b>ALT (SGPT) (U/L)</b>	50,5 $\pm$ 4,6	31 - 115
<b>Bilirrubina Total (mg/dL)</b>	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 – 0,5
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	111,5 $\pm$ 4,4	98 - 202
<b>Estimación de Plaquetas* (10<sup>3</sup>/μL)</b>	229,3 $\pm$ 7,5	376 - 1796
<b>Estimación de leucocitos (10<sup>3</sup>/μL)</b>	3,2 $\pm$ 0,4	1,4 – 10,3
<b>Seg %</b>	31,5 $\pm$ 8,7	14,0-54,7
<b>Linfa %</b>	61,5 $\pm$ 9,6	23,6 – 79,3

El tratamiento a largo plazo con PAC-1 previene el rebrote celular y la adición de PAC-1 al vemurafenib retrasa el inicio del nuevo crecimiento celular. El  $E_{m\acute{a}x}$  de vemurafenib (el por ciento de muerte celular inducida por altas concentraciones del compuesto) en células A375 es del 96,8  $\pm$  0,3 % después de 5 días (Figura 5A), lo que indica que ~el 3 % de las células A375 son insensibles a vemurafenib. En las mismas condiciones, el PAC-1 tiene una  $E_{m\acute{a}x}$  de 99,4  $\pm$  0,7 % (Figura 5A), lo que indica que PAC-1 mata cuantitativamente las células A375, con muy pocas células insensibles. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que el tratamiento a largo plazo con vemurafenib conduciría a un nuevo crecimiento de las células cancerosas, mientras que el tratamiento con PAC-1 debería prevenir el nuevo crecimiento. Para investigar esta hipótesis, las células A375 y SK-MEL-5 se sembraron en placas a bajas densidades y se trataron continuamente con PAC-1 (4 μM) o vemurafenib (10 μM) durante un máximo de 30 días. En células A375 y SK-MEL-5 tratadas con vemurafenib, se observó un rebrote de las células en tan solo 20 días (Figura 5B). Sin embargo, en pocillos tratados con PAC-1, no se observó rebrote incluso después de 30 días (Figura 5B). Por lo tanto, en consonancia con el mayor valor de  $E_{m\acute{a}x}$ , PAC-1 es capaz de matar cuantitativamente las células para evitar de esta manera que vuelvan a crecer.

Para investigar si la adición de bajas concentraciones de PAC-1 podría combinarse con vemurafenib para prevenir el rebrote de células cancerosas, se sembraron células A375 y UACC-62 a bajas densidades en placas de 96 pocillos y se trataron continuamente con PAC-1 (1 μM), vemurafenib (5 μM o 10 μM) o la combinación hasta por 20 días.

Después de 5 días, el tratamiento con PAC-1, vemurafenib o la combinación resultó en una reducción significativa en el número de células en comparación con el control (A375: Figura 5Cy5D; UACC-62: Figura 12Ay12B). En el día 10, no hay diferencia observable entre los pocillos tratados con PAC-1 y el control. En pocillos tratados con vemurafenib 5  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ , la muerte celular fue del  $89,4 \pm 1,4 \%$  y del  $93,2 \pm 1,1 \%$ , respectivamente. Sin embargo, en pocillos en los que se trataron células A375 con PAC-1 1  $\mu\text{M}$  y vemurafenib 5  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ , se observó un aumento de la muerte celular,  $96,1 \pm 1,0 \%$  y  $97,9 \pm 0,7 \%$ , respectivamente. Como consecuencia de lograr una muerte celular más completa, queda una proporción más pequeña de células en los pocillos tratados con PAC-1 y vemurafenib. Después de 20 días de tratamiento, se observó un rebrote significativo de colonias en los pocillos tratados con vemurafenib solo, pero no en los pozos que recibieron el cotratamiento (A375: Figura 5Cy5D; UACC-62: Figura 12Ay12B). Este resultado indica que la muerte celular más completa inducida por el tratamiento conjunto de células con PAC-1 y vemurafenib es efectivo para retrasar el rebrote de A375 y UACC-62.

*PAC-1 se sinergiza con vemurafenib en melanoma resistente a vemurafenib in vivo.* Para evaluar si PAC-1 permanece activo en una línea celular que ha adquirido resistencia a vemurafenib, se generó una línea celular A375VR resistente a vemurafenib cultivando la línea celular parental A375 en concentraciones de vemurafenib secuencialmente más altas (0,5  $\mu\text{M}$  a 1,0  $\mu\text{M}$ ) durante 2 meses. Para determinar el mecanismo de resistencia de A375VR, se secuenciaron los genes para MEK1/2, NRAS y AKT, pero no se encontraron mutaciones comúnmente informadas que pudieran conferir resistencia (Rizos y otros, Clinical Cancer Research 2014;20:1965-77). De manera similar, la variante de empalme del ARNm de <sup>V600E</sup>BRAF tampoco se observó. A través de qPCR, las células A375VR tienen niveles aproximadamente 3 veces más altos de ARNm de MDR1 en comparación con A375. Sin embargo, en comparación con niveles hasta 1000 veces más altos de ARNm de MDR1 en células ováricas resistentes a la doxorubicina o al cisplatino, el nivel de sobreexpresión de ARNm de MDR1 se considera bajo, lo que indica que es poco probable que haya resistencia debido a una regulación al alza espectacular del fenotipo de MDR.

Vemurafenib mata la línea celular A375VR en 5 días con un valor  $\text{IC}_{50}$  de 1,5  $\mu\text{M}$ , 12 veces menos potente en comparación con la sensibilidad del A375 parental (Figura 6A). Además, la  $\text{E}_{\text{máx}}$  de vemurafenib para A375VR es  $79 \pm 6,3 \%$ , que es un 14 % más bajo que la línea celular parental A375. Si bien el tratamiento de las células A375 parentales con vemurafenib (0,5 o 1  $\mu\text{M}$ ) durante 2 h da como resultado la inhibición completa de la fosforilación de ERK1/2, este efecto no se observa en A375VR, consistente con la resistencia de A375VR a vemurafenib y la señalización continua de MAPK (Figura 6B). Por el contrario, PAC-1 retiene actividad contra A375VR con un valor  $\text{IC}_{50}$  de 2,4  $\mu\text{M}$  (frente a 1,2  $\mu\text{M}$  para la línea celular parental, Figura 6C) y una  $\text{E}_{\text{máx}}$  similar. Presumimos que, a pesar de la incapacidad de vemurafenib para inhibir la fosforilación de ERK1/2 y la señalización de MAPK en la línea celular resistente A375VR, la combinación podría retener una capacidad parcial para ejercer un efecto sinérgico basado en la escisión de PARP-1 observada para el tratamiento con PAC-1+vemurafenib, incluso en condiciones de inhibición incompleta de la fosforilación de ERK1/2 (Figura 2E). Para investigar si PAC-1 puede volver a sensibilizar a las células A375VR a la apoptosis inducida por vemurafenib, las células A375VR se trataron con PAC-1 en combinación con bajas concentraciones de vemurafenib. Este tratamiento combinado condujo a un aumento en la proporción de células que experimentan apoptosis. (Figura 13A, 13C), lo que indica que la adición de PAC-1 puede eludir el mecanismo de resistencia de A375VR a vemurafenib. Este efecto se eliminó cuando se usó la variante inactiva de PAC-1 (Figura 13C). La combinación de PAC-1+vemurafenib fue sinérgica e indujo una población promedio de células apoptóticas un 7,5 % mayor que la predicha por el modelo de independencia de Bliss (Bliss, Ann Appl Biol 1939;26:585-615) (Figura 13A y 13B). Finalmente, para determinar si PAC-1 puede hacer sinergia con vemurafenib *in vivo*, se implantaron células A375VR por vía subcutánea en ratones desnudos, y los ratones recibieron dosis diarias durante 15 días de vemurafenib (10 mg/kg), PAC-1 (100 mg/kg) o la combinación. El tratamiento con vemurafenib o PAC-1 solo no ejerce ningún efecto antitumoral en este modelo *in vivo*, mientras que el tratamiento con combinación condujo a una reducción significativa en el volumen tumoral en comparación con el control no tratado (Figura 6D).

Discusión. Dado que las aberraciones en las cascadas de señalización apoptótica en las células de melanoma están aguas arriba de la activación de la procaspasa-3, las moléculas pequeñas que activan directamente la procaspasa-3 pueden inducir la apoptosis al pasar por alto el circuito apoptótico defectuoso. Se ha demostrado previamente que la activación de procaspasa-3 con PAC-1 tiene eficacia de agente único contra células de melanoma en cultivo (Wang y otros, Mol Oncol 2014;8:1640-52; Peterson y otros, Cancer Res 2010;70:7232-41; Putt y otros., Nat Chem Biol 2006;2:543-50), y ahora mostramos que PAC-1+vemurafenib, o PAC-1+vemurafenib+trametinib, son poderosamente sinérgicos en la inducción de la actividad de la caspasa-3 y la muerte celular apoptótica en melanomas con mutación <sup>V600E</sup>BRAF. Además de los melanomas, la mutación <sup>V600E</sup>BRAF se ha informado en varios otros tipos de cáncer, incluida la enfermedad de Erdheim-Chester (ECD) (54 %), la histiocitosis de células de Langerhans (LCH) (57 %), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (1,5 %) y leucemia de células pilosas (100 %). En dos ensayos de Fase II recientes, se informó la eficacia de vemurafenib en varios tipos de cáncer no melanoma que albergan la mutación <sup>V600E</sup>BRAF, con resultados prometedores observados en pacientes con NSCLC, ECD, LCH y leucemia de células pilosas refractaria. Dados estos datos clínicos y nuestro trabajo actual que muestra una potente sinergia entre PAC-1, vemurafenib y trametinib en melanomas <sup>V600E</sup>BRAF, estas combinaciones de PAC-1/fármaco pueden tener eficacia en otras neoplasias malignas que albergan la mutación <sup>V600E</sup>BRAF.

El parámetro  $\text{E}_{\text{máx}}$  es una métrica útil para evaluar la capacidad de un compuesto para eliminar cuantitativamente las células cancerosas en cultivo (Fallahi-Sichani y otros, Nat Chem Biol 2013;9:708-14). Los valores  $\text{E}_{\text{máx}}$  inferiores al

100 % implican heterogeneidad en la capacidad del fármaco para destruir la población de células cancerosas. Aquí mostramos que vemurafenib tiene una  $E_{\text{máx}}$  de ~97 % en células A375<sup>V600E</sup>BRAF mutantes, pero el valor de  $E_{\text{máx}}$  para PAC-1 se aproxima al 100 %. Debido a esto, no se observa un rebrote de células A375 o SK-MEL-5 en experimentos a largo plazo con PAC-1. Sin embargo, se observó un rebrote extenso en células A375, UACC-62 y SK-MEL-5 tratadas solo con vemurafenib durante 20 días. Con la adición de una concentración baja de PAC-1 (1  $\mu\text{M}$ ) a vemurafenib, se observó poco o ningún rebrote en las células. Estos resultados indican que la adición de bajas concentraciones de PAC-1 (1  $\mu\text{M}$ , una concentración de PAC-1 que se logra fácilmente *in vivo* (Lucas y otros, Invest New Drugs 2011;29:901-11)) puede ser efectiva clínicamente para retrasar la resistencia. El aumento significativo de la actividad de la caspasa-3, seguido de la inducción masiva de la apoptosis al comienzo del tratamiento combinado, probablemente elimine una gran proporción de las células que inicialmente eran insensibles al vemurafenib. En consecuencia, hay una población residual de células significativamente menores que no se ve afectada por el tratamiento, lo que es crucial para retrasar el rebrote de las células.

Actualmente, existen pocas opciones para los pacientes que han desarrollado melanomas resistentes al vemurafenib. El inhibidor de MEK1/2, trametinib, aunque aprobado para melanomas con la mutación <sup>V600E</sup>BRAF ejerce una actividad limitada en combinación con el inhibidor de BRAF en pacientes en los que ha fallado la terapia previa (Kim y otros, J Clin Oncol 2013;31:482-89). Nuestros resultados muestran que PAC-1 todavía se sinergiza con vemurafenib para ejercer efectos antitumorales en tumores resistentes a vemurafenib. Por lo tanto, la adición de PAC-1 podría ser una opción terapéutica viable y alternativa para pacientes cuyos melanomas han progresado después del tratamiento con vemurafenib. La combinación PAC-1+vemurafenib es bien tolerada, tiene un buen perfil de seguridad y exhibe efectos antitumorales significativos *in vivo*. PAC-1 se encuentra actualmente en un ensayo clínico de Fase I (NCT02355535), y tanto vemurafenib como trametinib están aprobados como tratamiento de primera línea para melanoma <sup>V600E</sup>BRAF. Por lo tanto, existe una trayectoria clara para traducir la demostración preclínica de la sinergia descrita en este trabajo a ensayos clínicos en los que esta nueva combinación pueda evaluarse en pacientes humanos con tipos de cáncer que albergan la mutación <sup>V600E</sup>BRAF.

#### Materiales y métodos

Cultivo celular y reactivos. A375 (CRL-1619) y CHL-1 (CRL-9446) se compraron a ATCC el 5/11/2014 y el 18/11/2014 respectivamente. El A375SM fue proporcionado por el Prof. Isiah Fidler (MD Anderson, Texas) el 30/10/2014. Todas las líneas celulares excepto B16-F10, H460 y HCT 116 se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 % (Gemini). B16-F10, H460 y HCT 116 se cultivaron en RPMI con FBS al 10 %. Vemurafenib, trametinib y Anexina V-FITC (10040-02) se adquirieron de LC Laboratories, MedChemExpress y SouthernBiotech respectivamente. Los siguientes anticuerpos se adquirieron de Cell Signaling Technology: anti-PARP-1 (9542), anti-caspasa-3 (9662), anti- $\beta$ -actina (4967), anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (4370), anti-ERK1/2 (4695) y anti-conejo IgG ligado a HRP (7074). El anticuerpo anti-PARP-1-escindido (ab32561) se adquirió de Epitomics. PAC-1 y PAC-1a se sintetizaron como se informó anteriormente (Putt y otros, Nat Chem Biol 2006;2:543-50).

Autenticación de línea celular. Todas las líneas celulares humanas (A375, A375SM, CHL-1, H460, HCT 116, MIA PaCa-2, SK-MEL-5 y UACC-62) se han autenticado mediante el uso del Ensayo PowerPlex16HS (Promega): 15 Loci Autosómicos, X/Y en el Núcleo de Genética de la Universidad de Arizona. Se registraron los resultados de la prueba y los ferogramas. Se han realizado pruebas de micoplasma para la línea celular A375 mediante el uso del PCR de detección de Micoplasma en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Illinois.

Ensayos de proliferación celular. Se sembraron 1000 - 2000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se permitió que se adhirieran antes de añadir soluciones de DMSO de PAC-1 o vemurafenib a cada pocillo. La proliferación se evaluó mediante el ensayo de sulforhodamina B (SRB).

Análisis de citometría de flujo de anexina V/PI. Se sembraron 70 000 células en placas de 12 pocillos y se permitió que se adhirieran antes de añadir los compuestos. Las células se trataron con compuestos durante 24 h a 37 °C, después de lo cual se recolectaron y se resuspendieron en 450  $\mu\text{L}$  de tampón frío (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7,4) premezclado con colorantes Anexina V-FITC y PI (0,55  $\mu\text{g/mL}$ ). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD Biosciences LSR II y el análisis de datos se realizó mediante el uso de FCS Express V3-2.

Ensayo de actividad de caspasa-3/7. Se sembraron 5000-8000 células en placas de 96 pocillos y se permitió que se adhirieran. Las células se trataron con 1  $\mu\text{M}$  de estaurosporina durante 24 h o con 13  $\mu\text{M}$  de raptinal (Palchaudhuri y otros, Cell Rep 2015;13:2027-36) durante 3 h como control positivo, DMSO como control negativo y concentraciones indicadas de PAC-1 y vemurafenib durante 0, 2, 4, 7, 10, 12, 16, 20 o 24 h. A continuación, se evaluó la actividad de caspasa-3/7 en las placas mediante la adición de lisis bifuncional y tampón de actividad (200 mM de HEPES, 400 mM de NaCl, 40 mM de DTT, 0,4 mM de EDTA, Triton-X al 1 %, pH 7,4) con 20  $\mu\text{M}$  de Ac-DEVD-AFC (Cayman Chemicals) como sustrato fluorogénico ( $\lambda_{\text{ex}}$ =400 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =505nm). Las placas se preincubaron a 37 °C durante 30 min en el lector multimodo Synergy (BioTek) y luego se leyeron durante 30 min a intervalos de 3 min. Se calcularon las pendientes de cada pozo. La actividad se expresa normalizada a la actividad mínima y máxima observada dentro del ensayo.

**Ensayo de resistencia in vitro.** Se sembraron 800 células A375 o UACC-62 en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se trataron vemurafenib (5 o 10  $\mu$ M) o PAC-1 (1  $\mu$ M) en seis repeticiones técnicas durante 5, 10 y 20 días. Se añadieron medios y compuestos frescos cada 2-3 días durante la duración del estudio. Al cabo de 5, 10 o 20 días, los pocillos se fijaron con ácido tricloroacético frío al 10 % durante 1 hora a 4 °C. A continuación, los pocillos se lavaron, se dejaron secar y se tiñeron con colorante SRB al 0,5 % durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron con ácido acético al 0,1 % y se dejaron secar. En este punto, se tomaron imágenes de las placas con GelDoc XR (BioRad). Finalmente, se añadieron 200  $\mu$ L de base Tris 10 mM (pH > 10,4) al pocillo y se leyó la absorbancia a 510 nm mediante el uso del SpectraMax Plus (Molecular Devices). La absorbancia a 510 nm se representa frente a los días posteriores al tratamiento como indicación de la proliferación celular durante el transcurso del experimento.

**Inmunotransferencia.** Las células y los tejidos tumorales se lisaron mediante el uso de un tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem). La concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante el ensayo BCA (Pierce). Se cargaron lisados celulares que contenían 20  $\mu$ g de proteína en cada carril de geles de gradiente al 4-20 % (BioRad) para SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a la membrana PDVF para el análisis de transferencia Western.

**PCR y secuenciación.** Las células A375 y A375VR se lisaron y se extrajo el ARN mediante el uso del kit RNeasy (Qiagen). Se usaron 900 ng de ARN para la reacción de transcripción inversa mediante el uso del kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Las reacciones de qPCR se realizaron en el sistema de PCR rápido en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR regulares se realizaron mediante el uso del kit MyFi Mix PCR (Bioline) durante 35 ciclos y se realizaron en un gel de agarosa al 1 %. Los amplicones diana se extrajeron en gel y se secuenciaron en la instalación de secuenciación central de la UIUC. Los cebadores usados se pueden encontrar en la siguiente tabla.

Secuencias de cebadores usadas para caracterizar A375VR resistente a vemurafenib.

<b>MDR1 F</b>	ACACCATGGGGAAGGTGAAG	(SEQ ID NO: 1)
<b>MDR1R</b>	GTGACCAGGCGCCCAATA	(SEQ ID NO: 2)
<b>GAPDH F</b>	ACACCATGGGGAAGGTGAAG	(SEQ ID NO: 3)
<b>GAPDH R</b>	GTGACCAGGCGCCCAATA	(SEQ ID NO: 4)
<b>BRAF F</b>	GGCTCTCGGTTATAAGATGGC	(SEQ ID NO: 5)
<b>BRAF R</b>	ACAGGAACGCACCATATCC	(SEQ ID NO: 6)
<b>MEK1 Amp F</b>	CGTTACCCGGGTCCAAAATG	(SEQ ID NO: 7)
<b>MEK1 Amp R</b>	CTTTGTCACAGGTGAAATGC	(SEQ ID NO: 8)
<b>MEK1 Sec F</b>	CATGGATGGAGGTTCTCTGG	(SEQ ID NO: 9)
<b>MEK1 Sec R</b>	AGGGCTTGACATCTCTGTGC	(SEQ ID NO: 10)
<b>MEK2 Amp F</b>	CTCCCGGCCCGCCCCCTATG	(SEQ ID NO: 11)
<b>MEK2 Amp R</b>	GTGGAGGCGCCAGCCTGTCC	(SEQ ID NO: 12)
<b>MEK2 Sec F</b>	GTCAGCATCGCGTTCTCC	(SEQ ID NO: 13)
<b>MEK2 Sec R</b>	TCACCCCGAAGTCACACAG	(SEQ ID NO: 14)
<b>NRAS F</b>	AGCTTGAGGTTCTTGCTGGT	(SEQ ID NO: 15)
<b>NRAS R</b>	TCAGGACCAGGGTGTCAGTG	(SEQ ID NO: 16)
<b>AKT1 F</b>	AGCGCCAGCCTGAGAGGA	(SEQ ID NO: 17)
<b>AKT1 Amp R</b>	TCTCCATCCCTCCAAGCTAT	(SEQ ID NO: 18)
<b>AKT1 Sec R</b>	GACAGGTGGAAGAACAGCT	(SEQ ID NO: 19)

A375 y modelo de xenoinjerto A375VR. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las pautas de UIUC IACUC (protocolo núm. 14292). Se inyectaron 0,1 mL de A375 o A375VR en DMEM: matrigel 1:1 (Corning) en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos hembra de 6-7 (A375) o 5 (A375VR) semanas de edad (Charles River). En ambos modelos, los ratones se aleatorizaron en cuatro grupos: control, 100 mg/kg de PAC-1, 10 mg/kg de vemurafenib y la combinación de 100 mg/kg de PAC-1 y 10 mg/kg de vemurafenib (n=8). Se tomaron medidas iniciales del volumen tumoral y se inició la dosificación durante un período de 15 días. Vemurafenib se formuló como DMSO al 5 % en metilcelulosa al 1 % y se administró dos veces al día por sonda oral (p.o.). PAC-1 se formuló en

200 mg/mL de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a pH 5,5 y se administró mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Se tomaron medidas de longitud y ancho del tumor tres veces por semana y el volumen se calculó como  $0,52 \cdot L \cdot W^2$ . Al final del estudio, se sacrificó a los ratones y se extirparon los tumores. Los tumores se pesaron y se usaron para transferencia Western e inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica de tumores A375 y cuantificación del índice Ki-67. La inmunohistoquímica (IHC) se realizó en tumores A375 fijados en formalina e incluidos en parafina de 4  $\mu$ m de espesor después de que la tinción con H&E confirmara la presencia de una población de células neoplásicas junto con una integridad de tejido adecuada. Se usó anticuerpo contra Ki-67 (Biocare Medical #CRM325) para IHC y la tinción se visualizó mediante el uso del kit de cromógeno IntelliPATH FLX DAB (Biocare Medical #IPK 5010 G80). Se usó amígdala humana como tejido de control positivo. El suero de control negativo de polímero (ratón y conejo) (Biocare Medical #NC499) se sustituyó por el anticuerpo primario como control negativo. Para la cuantificación del índice Ki-67 se contaron 2000 células neoplásicas y se calculó el porcentaje de células positivas. En tumores demasiado pequeños para cuantificar 2000 células, se contó el número máximo de células neoplásicas. Todos los portaobjetos fueron revisados por un único patólogo veterinario.

## Ejemplo 2. Formas de dosificación farmacéutica

Las siguientes formulaciones ilustran formas de dosificación farmacéuticas representativas que pueden usarse para la administración terapéutica o profiláctica de los compuestos combinados descritos en la presente descripción (por ejemplo, PAC-1 y el segundo agente activo, en el que el segundo agente activo es donde vemurafenib, dabrafenib o encorafenib), o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos (en lo sucesivo denominados 'Compuestos X', que pueden ser un agente activo o una combinación de dos principios activos):

(i) Comprimido 1		mg/comprimido
'Compuestos X'		200,0
Lactosa		77,5
Povidona		15,0
Croscarmelosa sódica		12,0
Celulosa microcristalina		92,5
Estearato de magnesio		3,0
		400,0
(ii) Comprimido 2		mg/comprimido
'Compuestos X'		120,0
Celulosa microcristalina		410,0
Almidón		50,0
Glicolato sódico de almidón		15,0
Estearato de magnesio		5,0
		600,0
(iii) Cápsula		mg/cápsula
'Compuestos X'		110,0
Dióxido de silicio coloidal		1,5
Lactosa		465,5
Almidón pregelatinizado		120,0
Estearato de magnesio		3,0
		700,0



	(iv) Inyección 1 (1 mg/mL)	mg/mL
5	'Compuestos X'	1,0
	Fosfato dibásico de sodio	12,0
	Fosfato monobásico de sodio	0,7
	Cloruro de sodio	4,5
10	1,0 N de solución de hidróxido de sodio (ajuste de pH a 7,0-7,5)	c.s.p.
	Agua para inyección	c.s.p. a 1 mL
	(v) Inyección 2 (10 mg/mL)	mg/mL
15	'Compuestos X'	10,0
	Fosfato monobásico de sodio	0,3
	Fosfato dibásico de sodio	1,1
20	Polietilenglicol 400	200,0
	0,1 N de solución de hidróxido de sodio (ajuste de pH a 7,0-7,5)	c.s.p.
	Agua para inyección	c.s.p. a 1 mL
25	(vi Aerosol)	mg/lata
	'Compuestos X'	20
30	Ácido oleico	10
	Tricloromonofluorometano	5000
	Diclorodifluorometano	10 000
35	Diclorotetrafluoroetano	5000

Estas formulaciones pueden prepararse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se apreciará que las composiciones farmacéuticas anteriores pueden variar de acuerdo con técnicas farmacéuticas bien conocidas para adaptarse a diferentes cantidades y tipos de ingrediente(s) activo(s) 'Compuestos X'. La formulación en aerosol (vi) puede usarse junto con un dispensador de aerosol de dosis medida estándar. Adicionalmente, los ingredientes y proporciones específicos son para fines ilustrativos. Los ingredientes se pueden intercambiar por equivalentes adecuados (por ejemplo, los componentes descritos anteriormente) y las proporciones se pueden variar, de acuerdo con las propiedades deseadas de la forma de dosificación de interés.

#### Ejemplo 3. Formas de Comprimidos

La siguiente formulación ilustra formas de dosificación farmacéuticas representativas que pueden usarse para la administración terapéutica o profiláctica de los compuestos combinados descritos en la presente descripción (por ejemplo, PAC-1 y el segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib), o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos:

(i) Comprimido A	mg/comprimido
PAC-1	250,0
Celulosa microcristalina	127,5
Manitol	50,0
Glicolato sódico de almidón	50,0
Sílice pirogenada	2,5
Hidroxipropilcelulosa	15,0
Estearil fumarato de sodio	5,0
	500,0

(ii) Comprimido B	mg/comprimido
Segundo agente	250,0
Celulosa microcristalina	127,5
Manitol	50,0
Glicolato sódico de almidón	50,0
Sílice pirogenada	2,5
Hidroxipropilcelulosa	15,0
Estearil fumarato de sodio	5,0
	500.

El segundo agente puede ser vemurafenib, dabrafenib o encorafenib (LGX818). Además, puede usarse una tercera forma de dosificación farmacéutica similar al Comprimido B para administrar el inhibidor de MEK (por ejemplo, como una tercera administración separada y secuencial de un activo). Estas formulaciones pueden prepararse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se apreciará que las composiciones farmacéuticas anteriores pueden variar de acuerdo con técnicas farmacéuticas bien conocidas para adaptarse a diferentes cantidades y tipos de principios activos. Adicionalmente, los ingredientes y proporciones específicos son para fines ilustrativos. Los ingredientes se pueden intercambiar por equivalentes adecuados (por ejemplo, los componentes descritos anteriormente) y las proporciones se pueden variar, de acuerdo con las propiedades deseadas de la forma de dosificación de interés.

Si bien anteriormente se han descrito modalidades específicas con referencia a las modalidades y ejemplos descritos, tales modalidades son solo ilustrativas y no limitan el alcance de la invención.

Listado de secuencias

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

<120> TERAPIA COMBINADA DE PAC-1

<130> P122558EP00

<150> US 62/171,882

<151> 2015-06-05

<150> US 62/345,629

<151> 2016-06-03

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Desconocido

	<220>		
	<223> Péptido sintético		
5	<400> 1 acaccatggg gaaggtgaag	20	
	<210> 2		
	<211> 18		
10	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Péptido sintético		
15	<400> 2 gtgaccaggc gcccaata	18	
	<210> 3		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Péptido sintético		
25	<400> 3 acaccatggg gaaggtgaag	20	
	<210> 4		
30	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
35	<223> Péptido sintético		
	<400> 4 gtgaccaggc gcccaata	8	
40	<210> 5		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
45	<220>		
	<223> Péptido sintético		
	<400> 5 ggctctcggg tataagatgg c	21	
50	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
55	<220>		
	<223> Péptido sintético		
	<400> 6 acaggaaaacg caccatatcc	20	
60	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Desconocido		

	<220>		
	<223> Péptido sintético		
5	<400> 7 cgttaccggtgtccaaaatg	20	
	<210> 8		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Péptido sintético		
15	<400> 8 ctttgtcaca ggtgaaatgc	20	
	<210> 9		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Péptido sintético		
25	<400> 9 catggatgga ggttctctgg	20	
	<210> 10		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
	<220>		
	<223> Péptido sintético		
35	<400> 10 agggcttgac atctctgtgc	20	
	<210> 11		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
45	<220>		
	<223> Péptido sintético		
	<400> 11 ctcccgcccc gccccctatg	20	
50	<210> 12		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Desconocido		
55	<220>		
	<223> Péptido sintético		
	<400> 12 gtggaggcgc cagcctgtcc	20	
60	<210> 13		
	<211> 19		
	<212> ADN		
65	<213> Desconocido		

	<220>	
	<223> Péptido sintético	
5	<400> 13 gtcagcatcg cggttctcc	19
	<210> 14	
	<211> 19	
10	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
15	<400> 14 tcaccccgaa gtcacacag	19
	<210> 15	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
25	<400> 15 agcttgaggt tcttgctggt	20
	<210> 16	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
35	<400> 16 tcaggaccag ggtgtcagtg	20
	<210> 17	
	<211> 18	
40	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
45	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 17 agcgcagcc tgagagga	18
50	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
55	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 18 tctccatccc tccaagctat	20
	<210> 19	
	<211> 19	
60	<212> ADN	
65	<213> Desconocido	

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 19

5

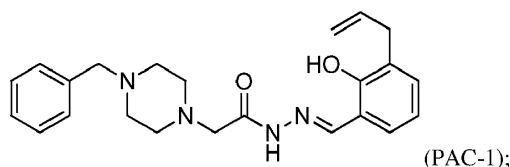
gacaggtgga agaacagct

19

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

(a) el compuesto PAC-1:



(b) un segundo agente activo, cuyo agente es un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación; y  
(c) un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable;

en donde el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1 en donde la composición comprende además un inhibidor de MEK.

3. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración de PAC-1 es de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 50  $\mu$ M.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración del segundo agente activo es de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 1 mM.

5. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración del segundo agente activo es de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100  $\mu$ M.

6. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración del segundo agente activo es de aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 750 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1  $\mu$ M, aproximadamente 2,5  $\mu$ M, aproximadamente 5  $\mu$ M, aproximadamente 7,5  $\mu$ M, aproximadamente 10  $\mu$ M, aproximadamente 12,5  $\mu$ M, aproximadamente 15  $\mu$ M, aproximadamente 20  $\mu$ M, aproximadamente 25  $\mu$ M, aproximadamente 30  $\mu$ M, aproximadamente 40  $\mu$ M, aproximadamente 50  $\mu$ M, aproximadamente 75  $\mu$ M, aproximadamente 100  $\mu$ M, aproximadamente 125  $\mu$ M, aproximadamente 150  $\mu$ M, aproximadamente 200  $\mu$ M, aproximadamente 250  $\mu$ M, aproximadamente 300  $\mu$ M, aproximadamente 500  $\mu$ M, aproximadamente 750  $\mu$ M o aproximadamente 1 mM.

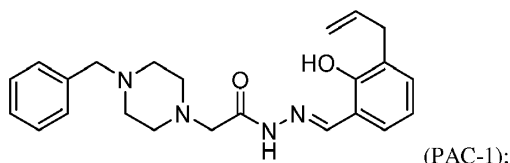
7. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el segundo agente activo es vemurafenib y la concentración de vemurafenib es de aproximadamente 0,5  $\mu$ M a aproximadamente 50  $\mu$ M;

o  
en donde el segundo agente activo es dabrafenib y la concentración de dabrafenib es de aproximadamente 0,5  $\mu$ M a aproximadamente 50  $\mu$ M.

8. Un método *ex-vivo* para inhibir el crecimiento o proliferación de células cancerosas que comprende poner en contacto células cancerosas con una cantidad efectiva de una composición de conformidad con la reivindicación 1, para inhibir de esta manera el crecimiento o proliferación de células cancerosas;

en donde, opcionalmente, las células cancerosas son células de melanoma, células de linfoma, células de leucemia, células de osteosarcoma, células de cáncer de mama o células de carcinoma de ovario.

9. Un método *ex-vivo* para inducir la apoptosis en una célula cancerosa que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad efectiva del compuesto PAC-1:



y una cantidad efectiva de un segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación y el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib, en donde se induce de esta manera la apoptosis en la célula cancerosa.

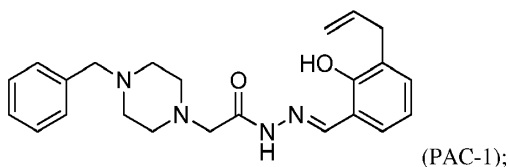
10. El método *ex-vivo* de conformidad con la reivindicación 9 que comprende además poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad efectiva de un inhibidor de MEK.

11. El método *ex-vivo* de cualquiera de las reivindicaciones 9-10 en donde la célula cancerosa se pone en contacto con PAC-1 y el segundo agente activo simultáneamente; o

en donde la célula cancerosa se pone en contacto con PAC-1 antes de poner en contacto la célula cancerosa con el segundo agente activo; o

en donde la célula cancerosa se pone en contacto con PAC-1 después de poner en contacto la célula cancerosa con el segundo agente activo.

12. PAC-1 y un segundo agente activo para usar en un método para tratar un cáncer en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a un paciente, secuencial o simultáneamente, una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto PAC-1:



y una cantidad efectiva del segundo agente activo, en donde el segundo agente activo es un inhibidor de la enzima BRAF que tiene una mutación y el segundo agente activo es vemurafenib, dabrafenib o encorafenib, en donde se trata de esta manera el cáncer.

13. El PAC-1 y el segundo agente activo para el uso de conformidad con la reivindicación 12, en donde el compuesto PAC-1 y el segundo agente activo se administran simultáneamente; o

en donde el compuesto PAC-1 y el segundo agente activo se administran secuencialmente; o

en donde el compuesto PAC-1 se administra antes que el segundo agente activo; o

en donde el compuesto PAC-1 se administra después del segundo agente activo.

14. El PAC-1 y el segundo agente activo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde el cáncer es melanoma, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, enfermedad de Erdheim-Chester (ECD) o histiocitosis de células de Langerhans (LCH) y, opcionalmente, que comprende además administrar al paciente, secuencial o simultáneamente, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de MEK.



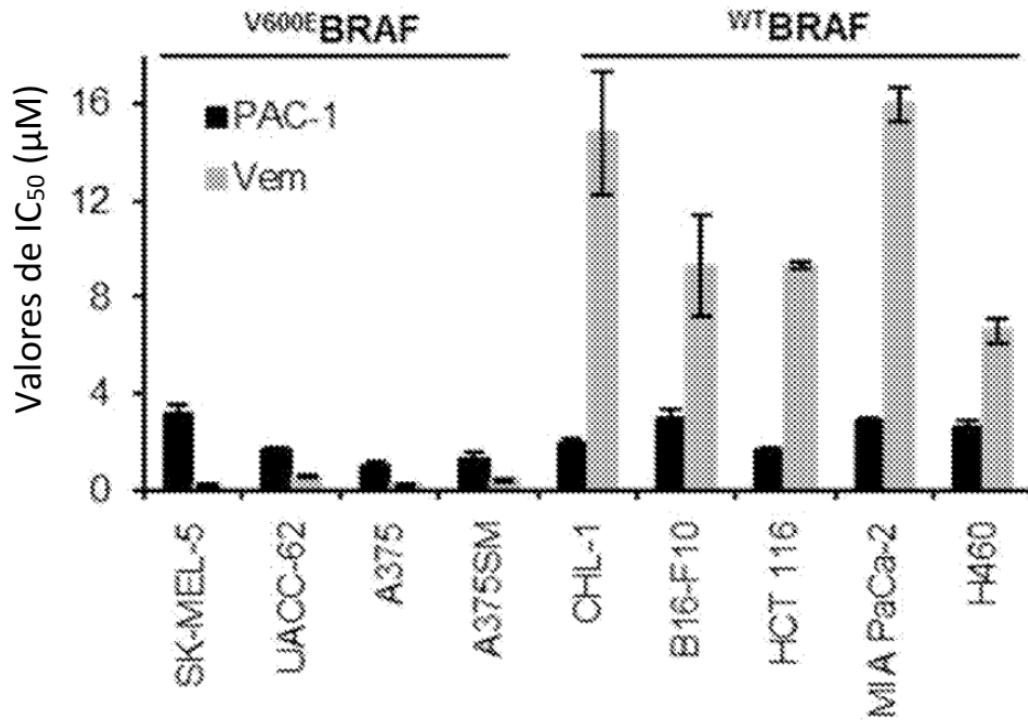


Figura 1A

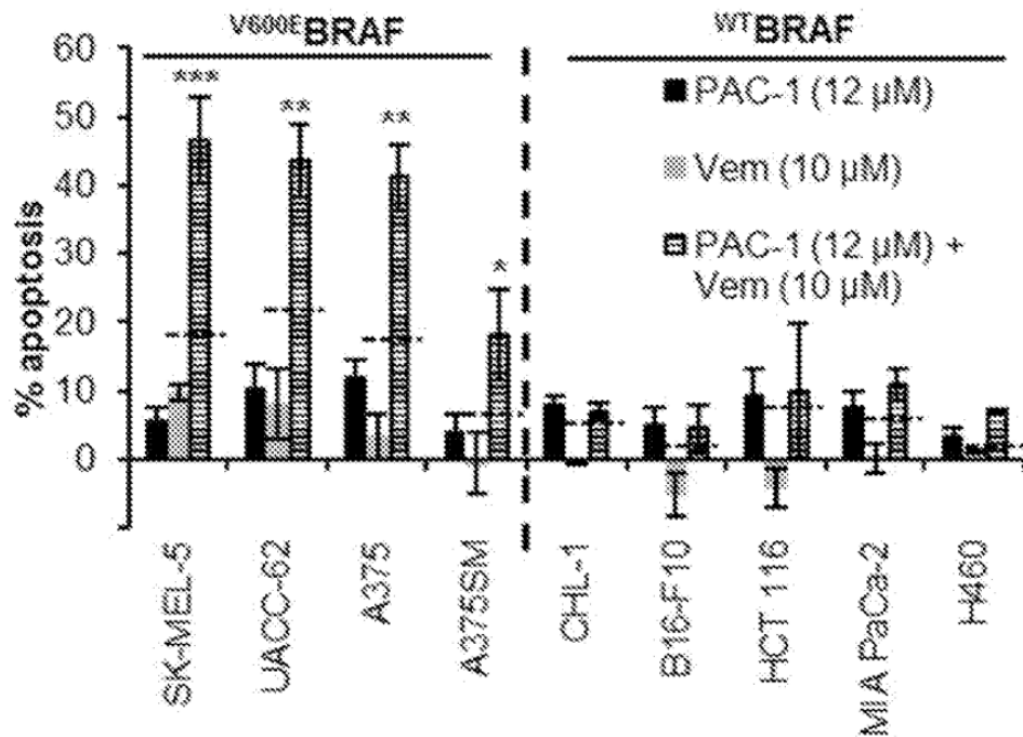


Figura 1B

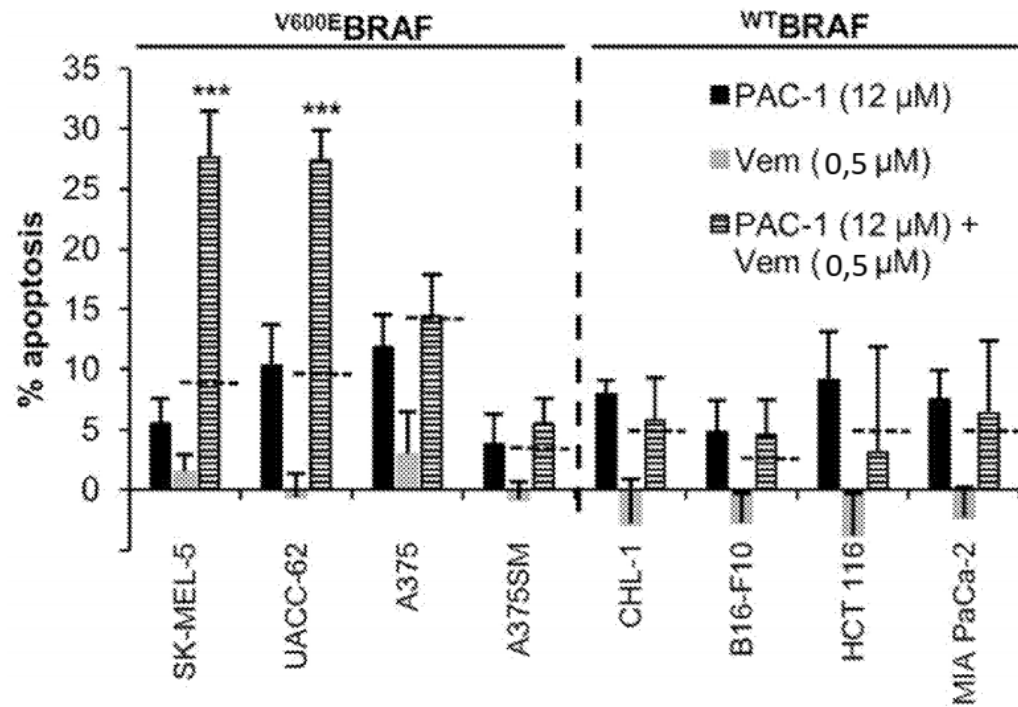



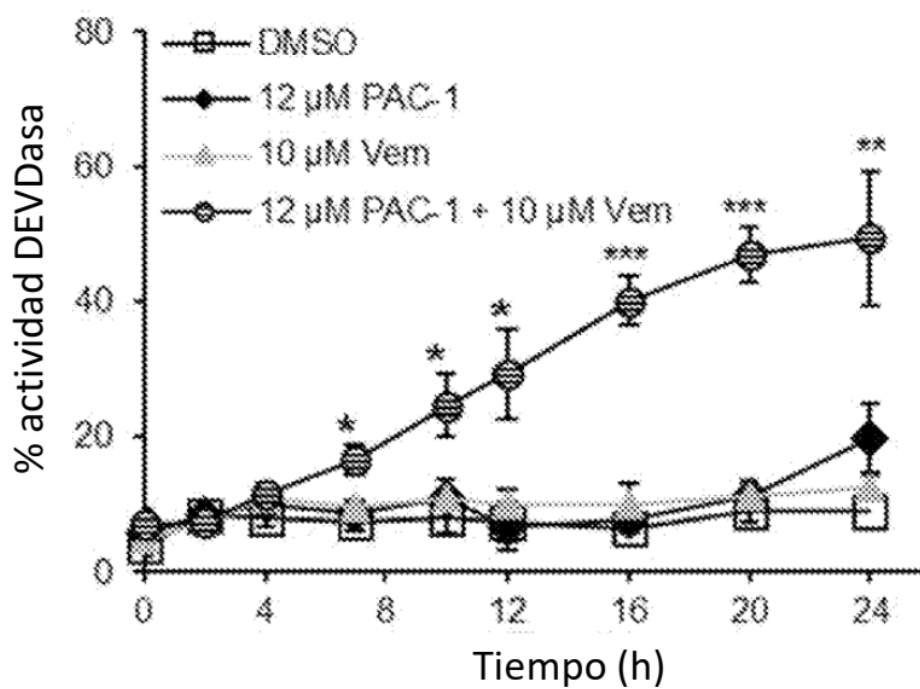
Figura 1C

		[PAC-1] ( $\mu$ M)					
		0	4	6	8	10	12
% más bajo de muerte celular apoptótica	[Vemurafenib] ( $\mu$ M)						
% más alto de muerte celular apoptótica	0	0,0 $\pm$ 0,0	2,9 $\pm$ 1,5	7,3 $\pm$ 2,2	11,2 $\pm$ 2,4	12,0 $\pm$ 3,7	11,8 $\pm$ 2,8
	0,5	3,0 $\pm$ 3,0	6,3 $\pm$ 1,8	9,9 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 1,0	14,0 $\pm$ 2,6	14,4 $\pm$ 3,5
	1	0,9 $\pm$ 1,0	3,5 $\pm$ 1,8	7,8 $\pm$ 2,5	12,3 $\pm$ 7,2	11,8 $\pm$ 5,3	11,3 $\pm$ 4,1
	5	-1,9 $\pm$ 2,2	6,0 $\pm$ 1,6	9,4 $\pm$ 1,1	14,2 $\pm$ 3,9	17,4 $\pm$ 5,2	19,2 $\pm$ 4,9
	10	3,2 $\pm$ 3,4	23,1 $\pm$ 6,1	37,5 $\pm$ 8,6	32,6 $\pm$ 4,9	35,1 $\pm$ 4,6	41,1 $\pm$ 4,8
	20	10,3 $\pm$ 1,4	25,0 $\pm$ 2,6	37,6 $\pm$ 3,4	39,2 $\pm$ 1,1	41,1 $\pm$ 2,6	38,1 $\pm$ 3,6
	30	10,0 $\pm$ 4,1	30,4 $\pm$ 3,3	36,3 $\pm$ 2,3	39,1 $\pm$ 1,8	40,6 $\pm$ 4,7	39,4 $\pm$ 0,4

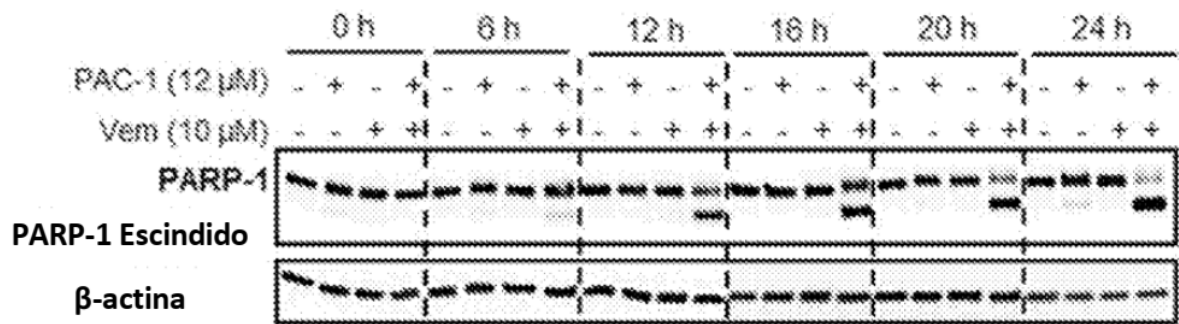
Figura 2A

		[PAC-1] (μM)						
			4	6	8	10	12	
	antagonista	[Vemurafenib] (μM)	0,5	0,69	0,71	0,75	0,88	1,03
			1	1,16	0,88	0,80	1,02	1,27
	aditivo		5	1,03	0,91	0,79	0,79	0,86
			10	0,32	0,24	0,37	0,41	0,40
	sinérgico		20	0,37	0,28	0,33	0,37	0,47
			30	0,34	0,33	0,36	0,41	0,49

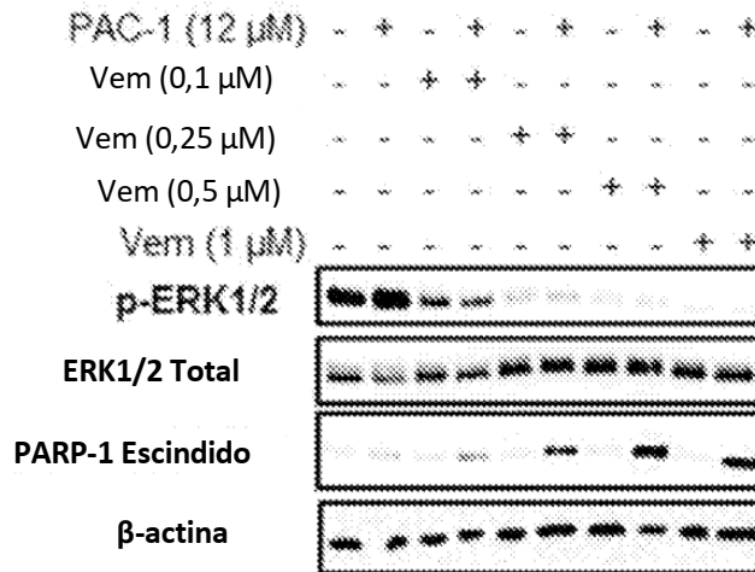
**Figura 2B**



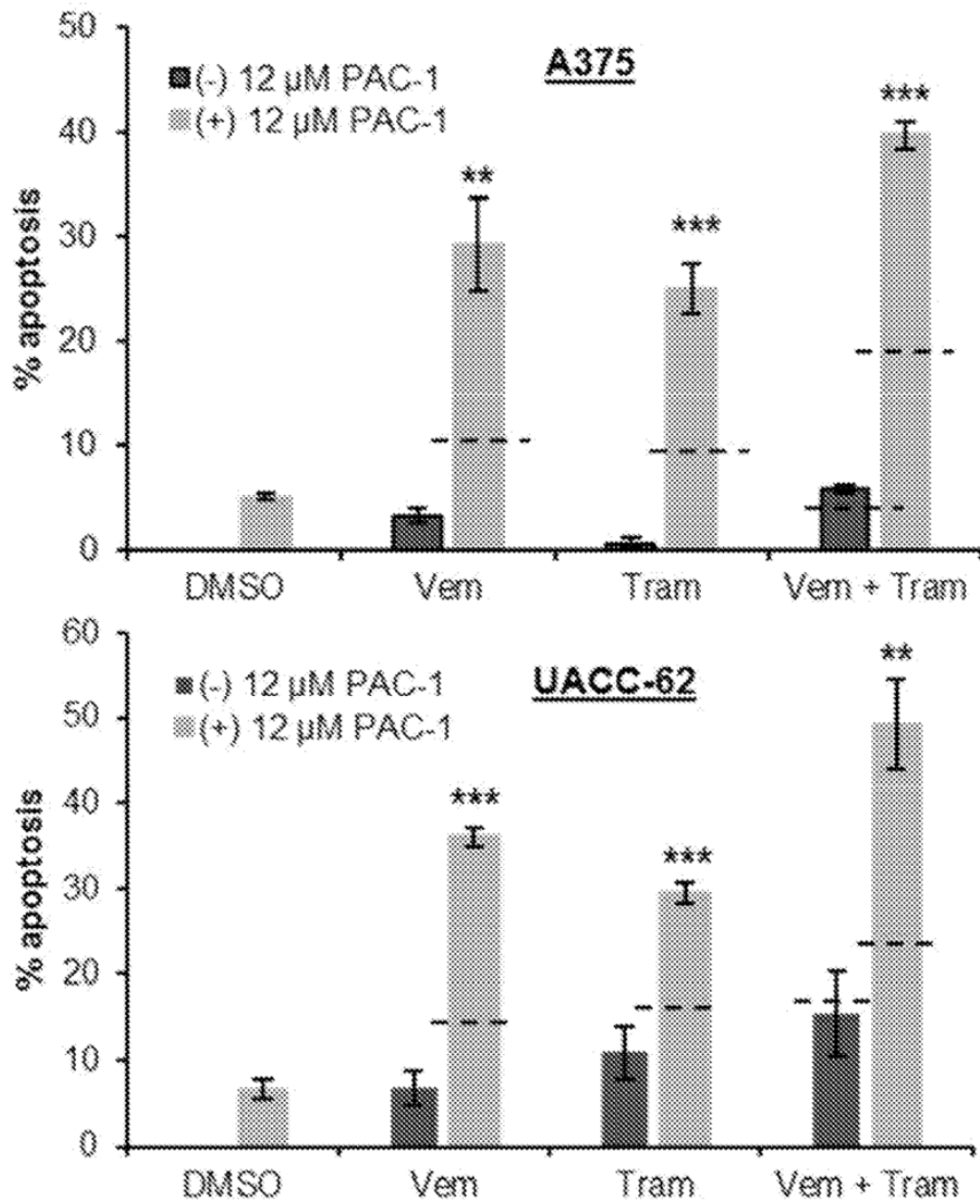
**Figura 2C**

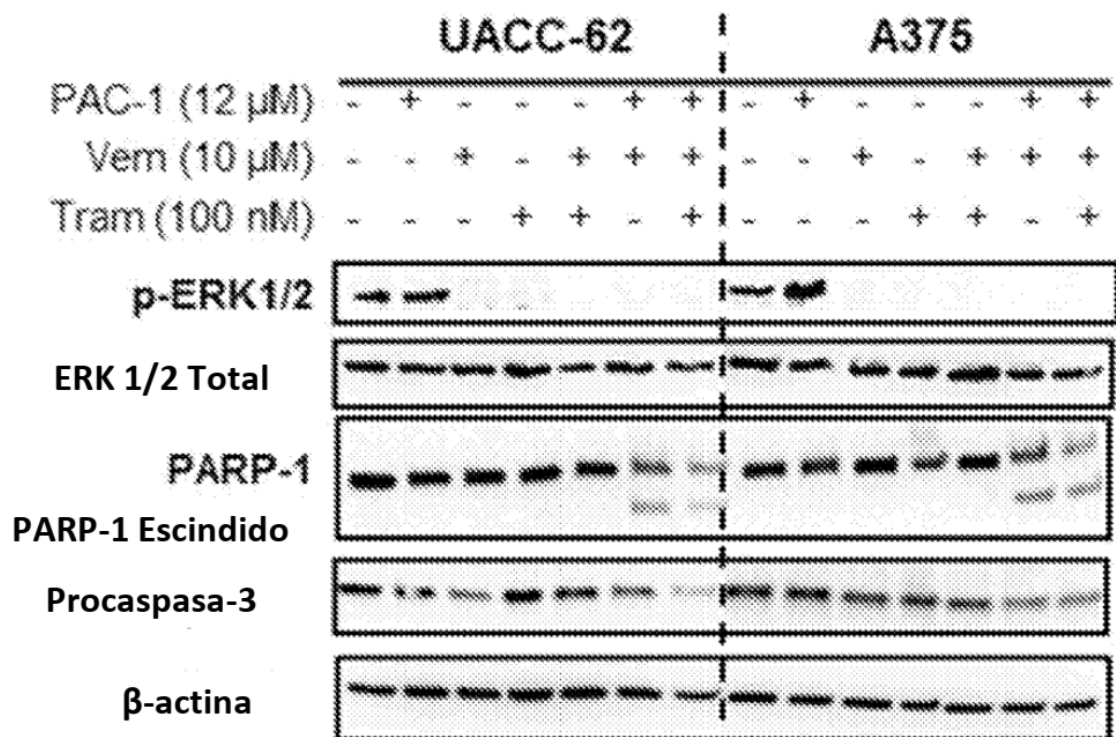


**Figura 2D**

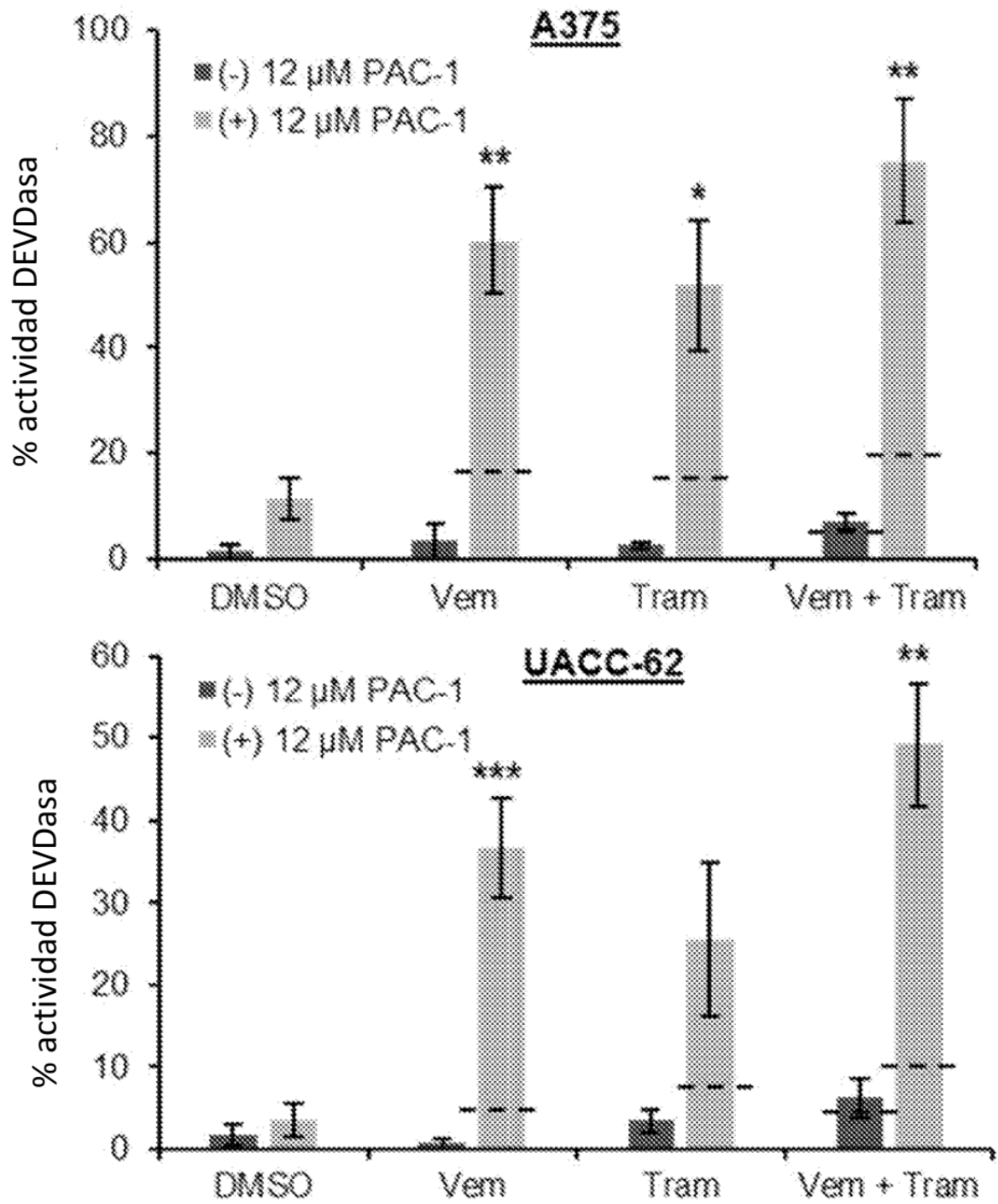


**Figura 2E**

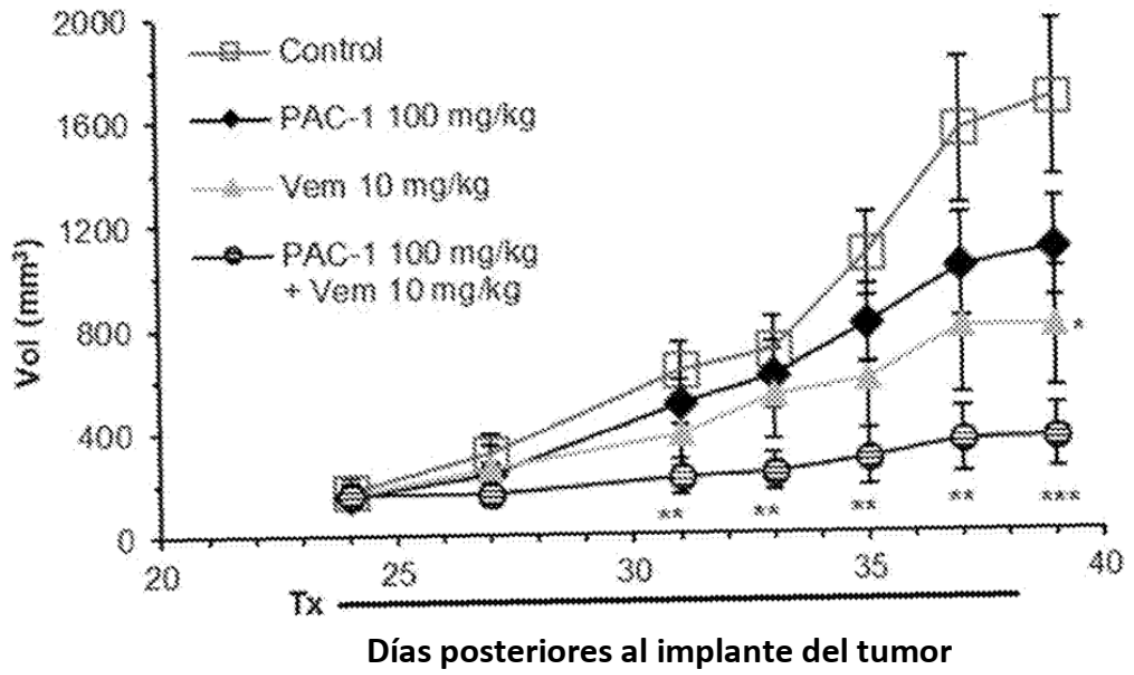
**Figura 3A**



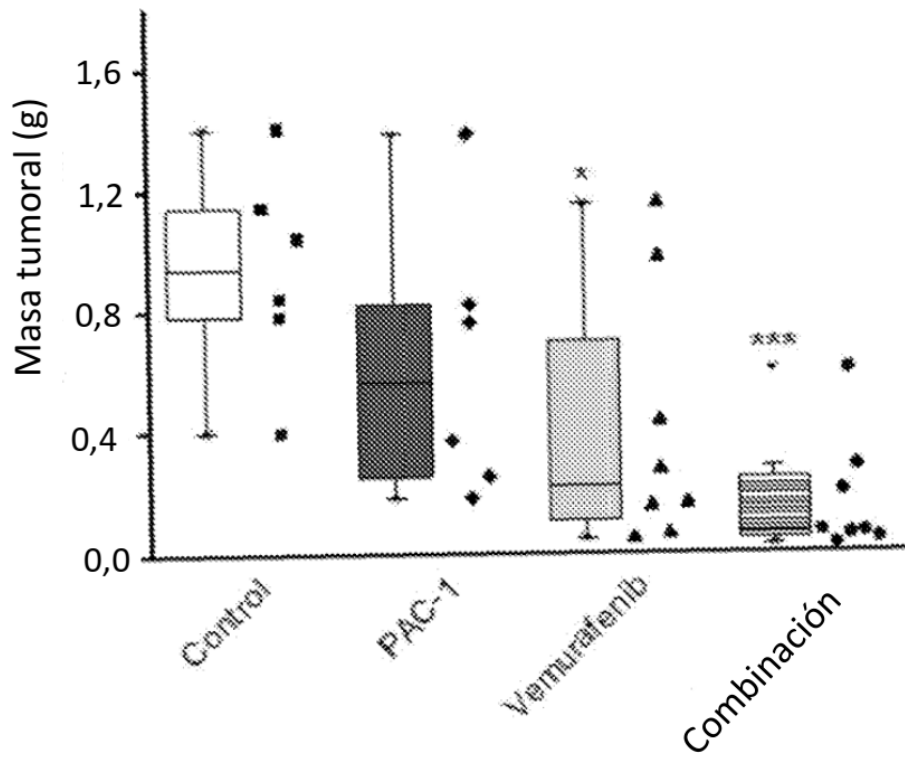
**Figura 3B**



**Figura 3C**

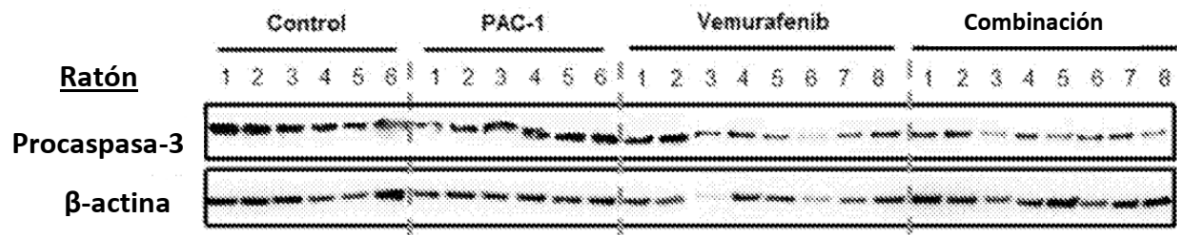


**Figura 4A**

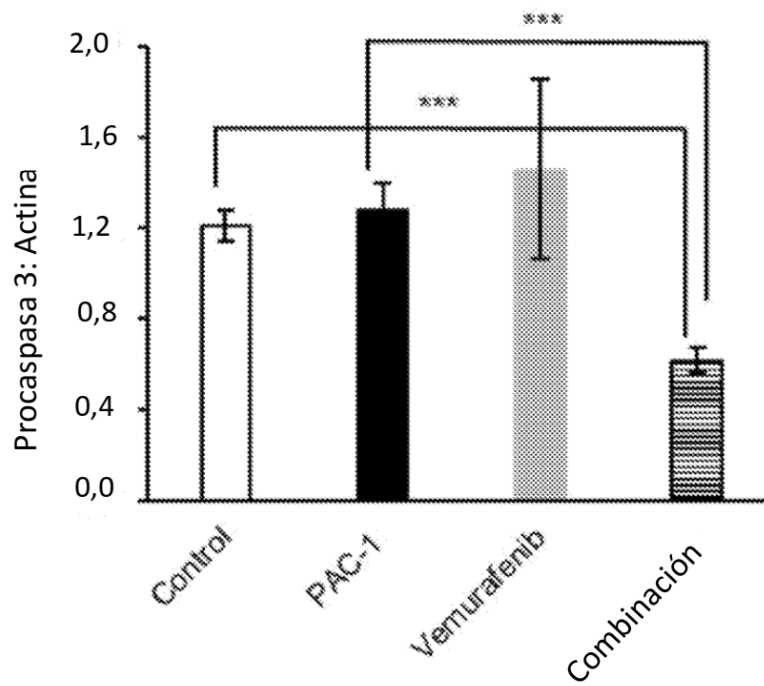


**Figura 4B**

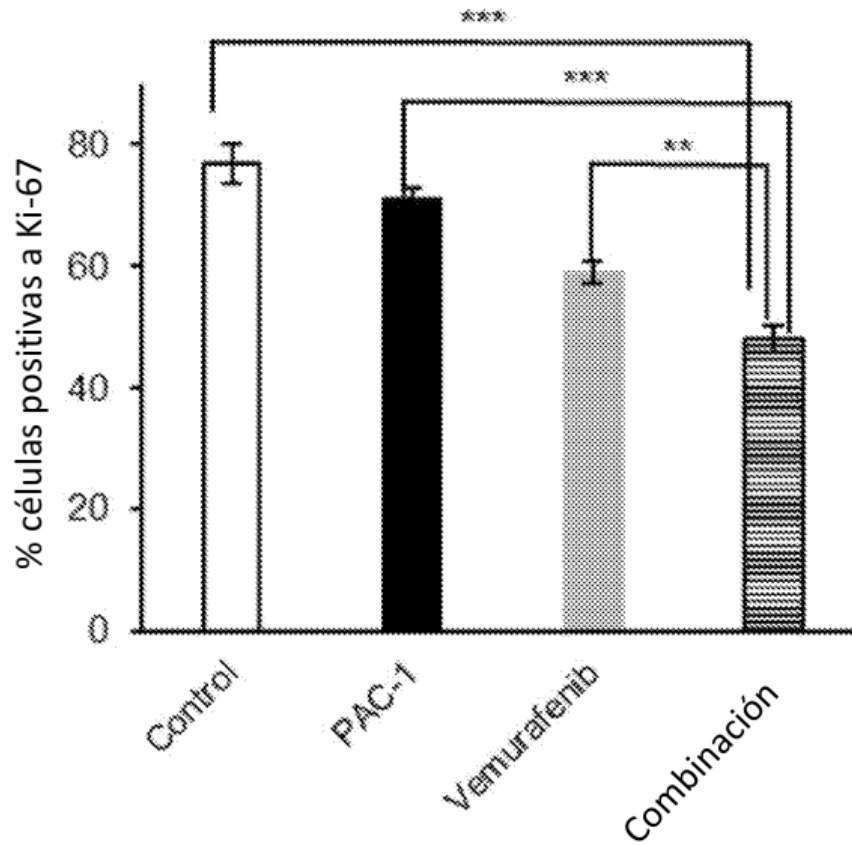




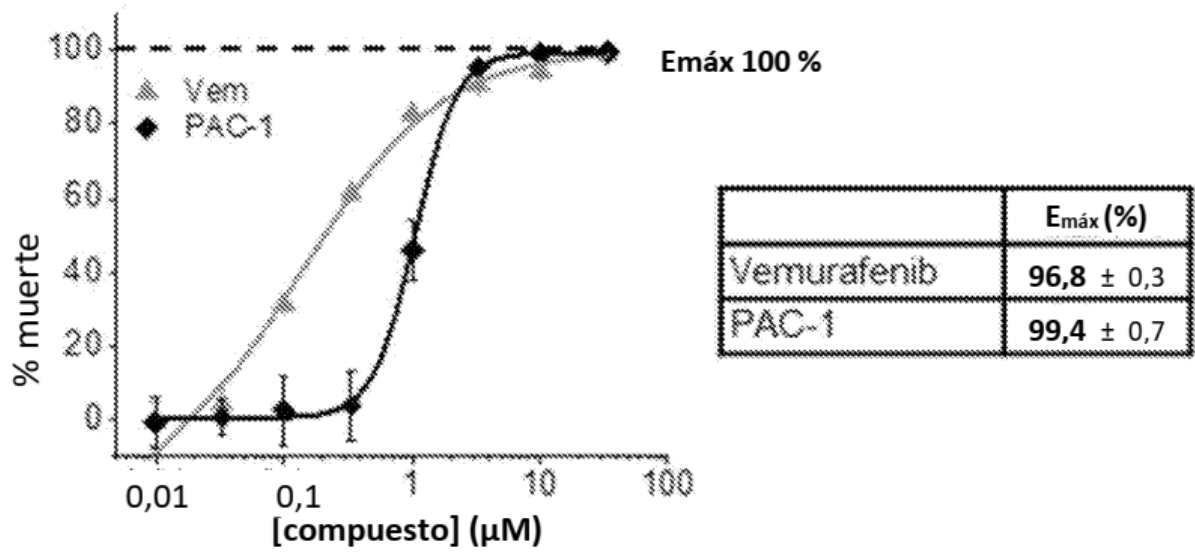
**Figura 4C**



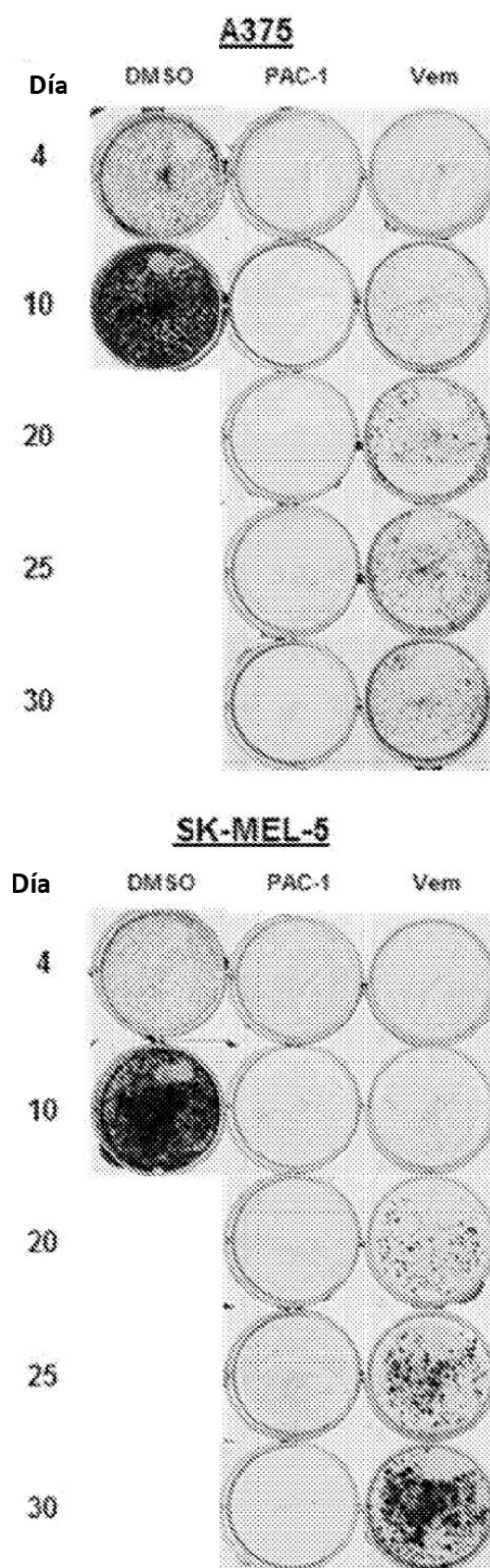
**Figura 4D**



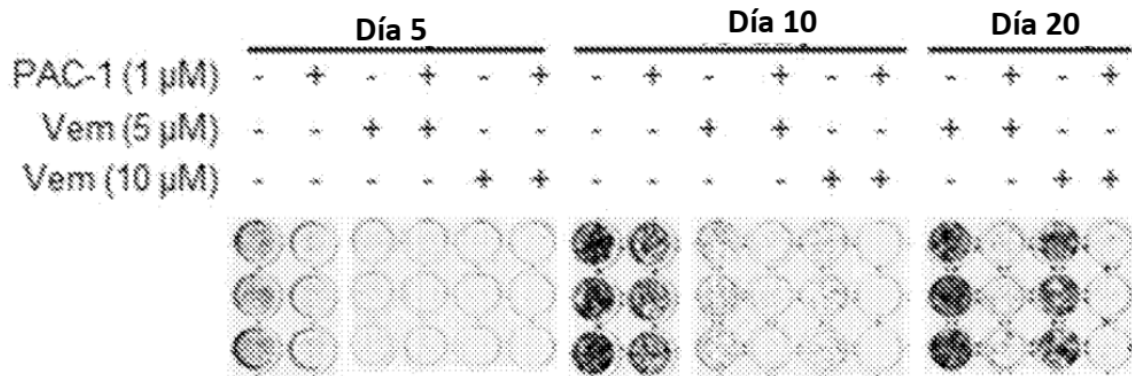
**Figura 4E**



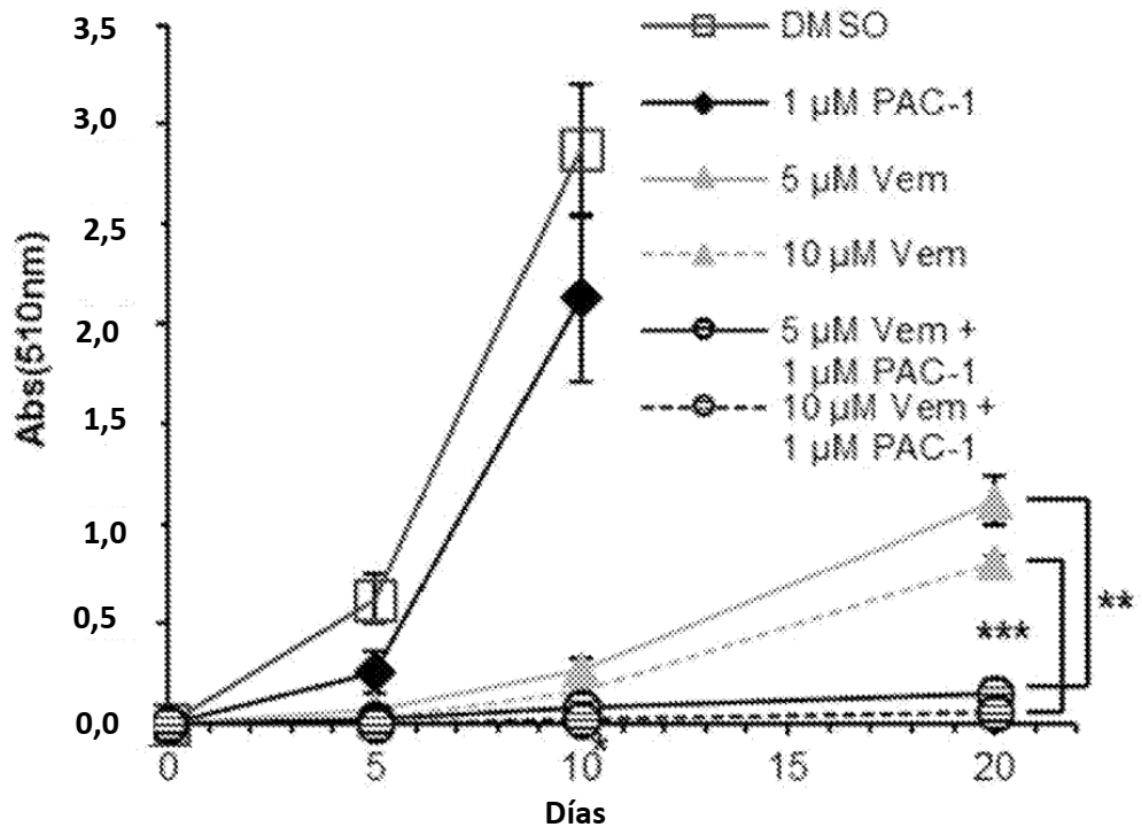
**Figura 5A**



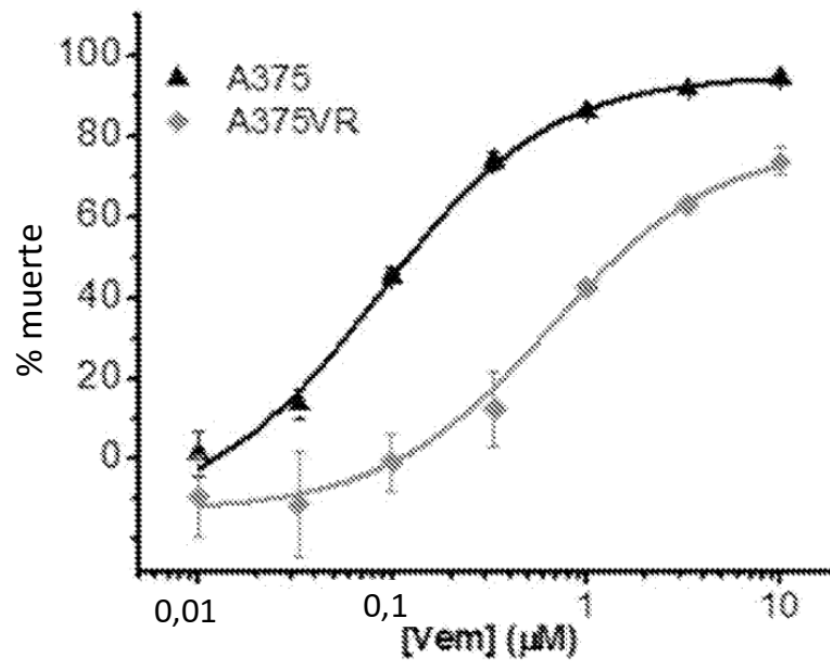
**Figura 5B**



**Figura 5C**

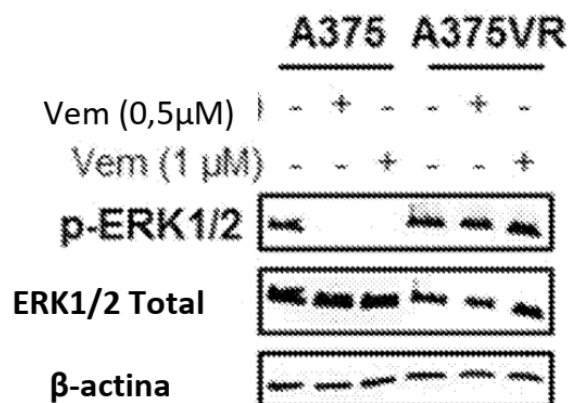


**Figura 5D**

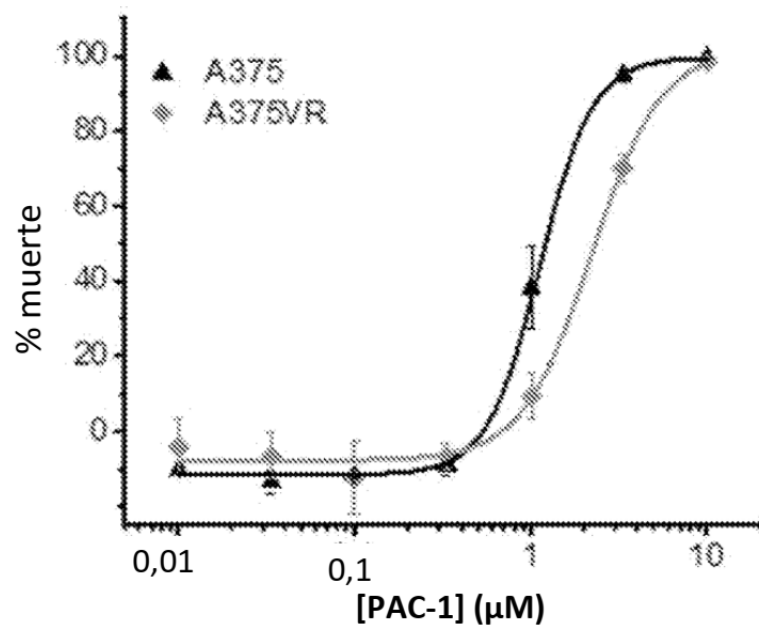


	A375	A375VR
Día 5 Vem IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	0,13 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
E <sub>máx</sub> Vem (%)	93 $\pm$ 1,2	79 $\pm$ 6,3

**Figura 6A**

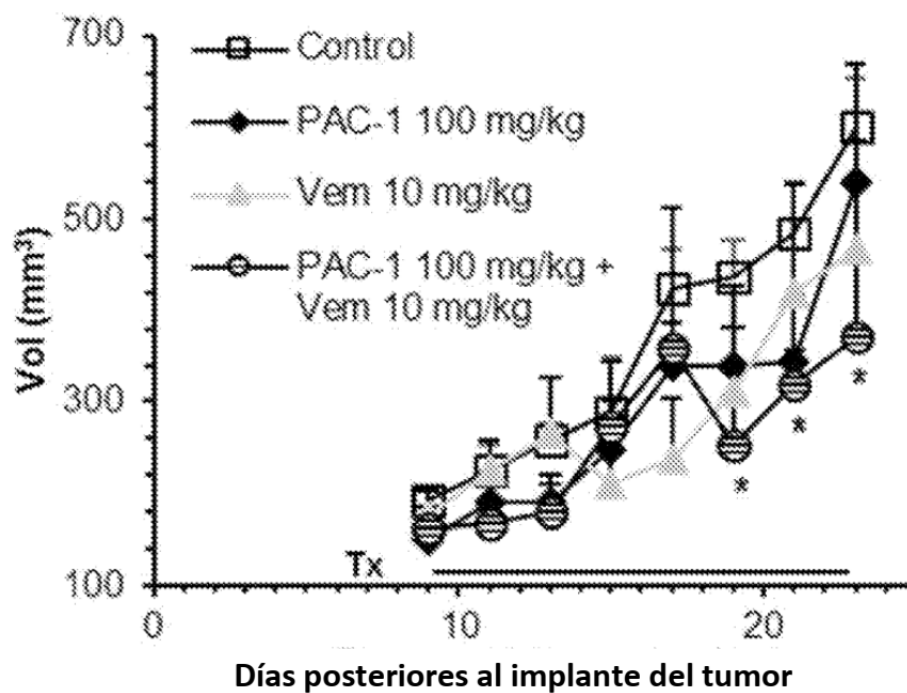


**Figura 6B**

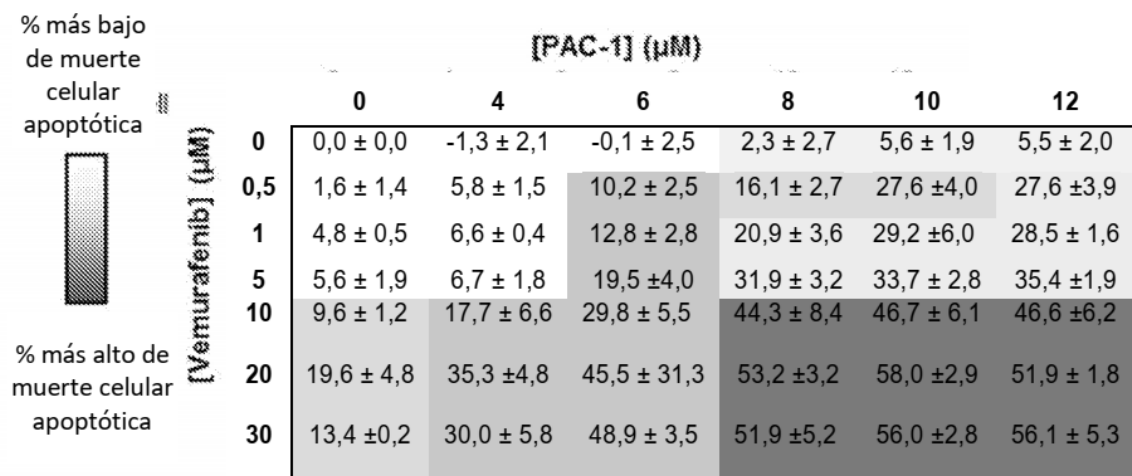


	A375	A375VR
Día 5 PAC-1 IC <sub>50</sub> (μM)	1,2 ± 0,1	2,4 ± 0,3
E <sub>máx</sub> PAC-1 (%)	99 ± 0,1	100 ± 1,4

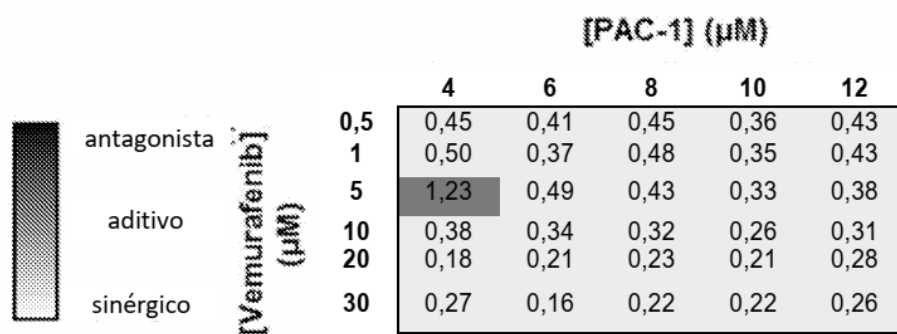
**Figura 6C**



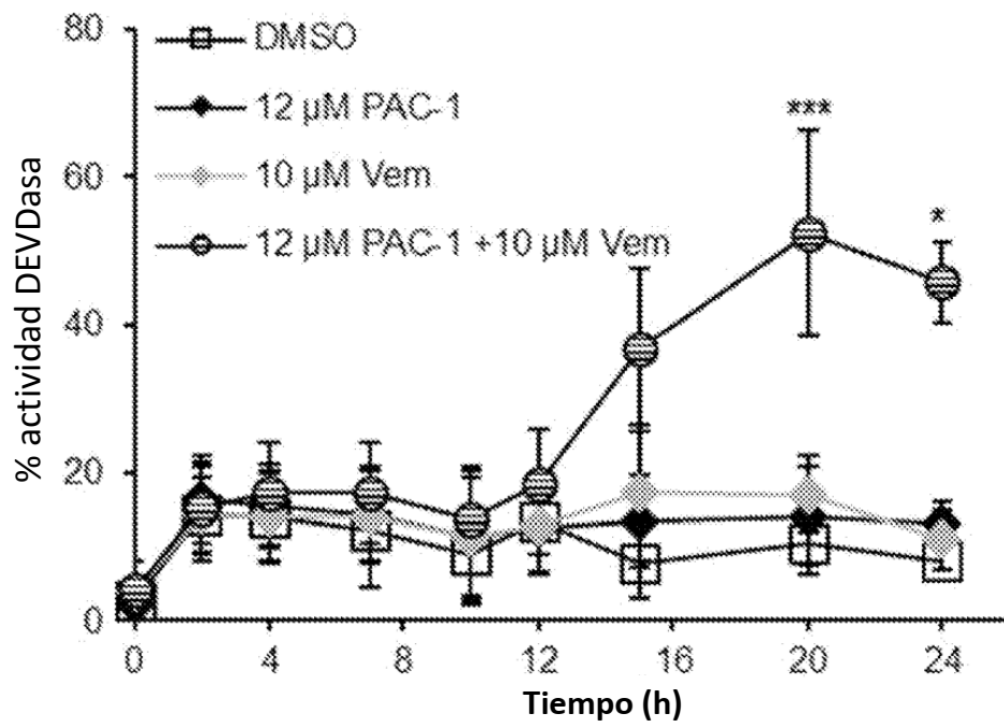
**Figura 6D**



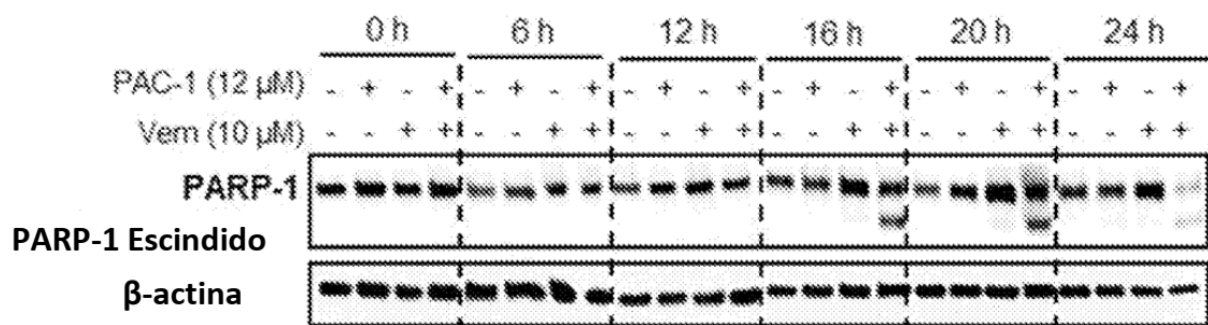
**Figura 7A**



**Figura 7B**

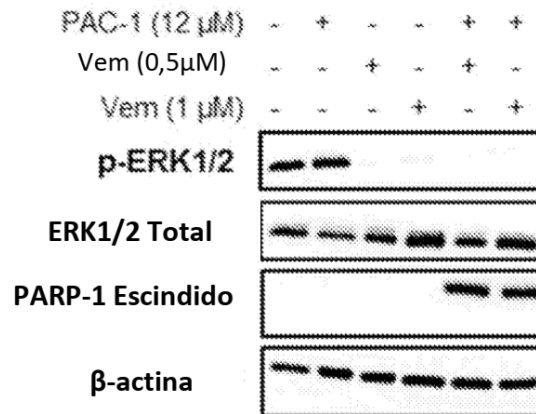


**Figura 7C**

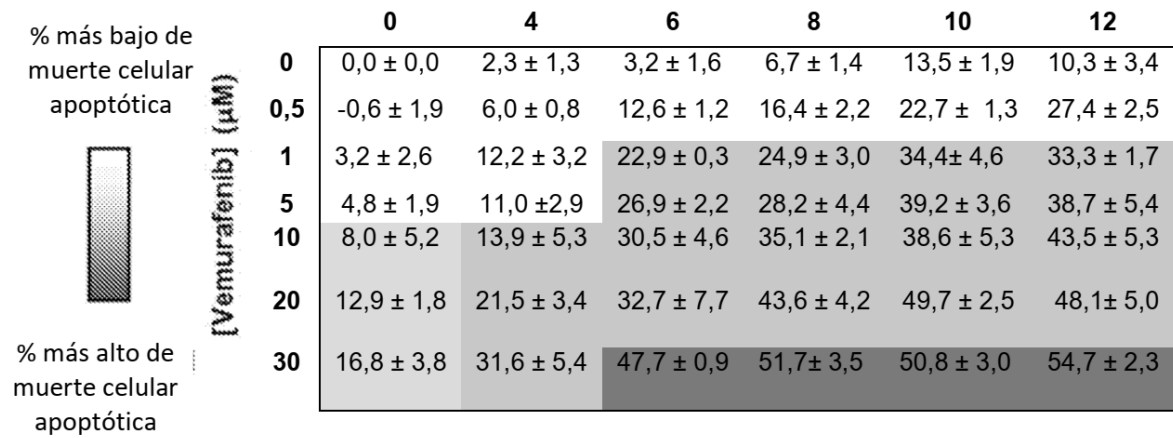


**Figura 7D**

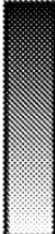


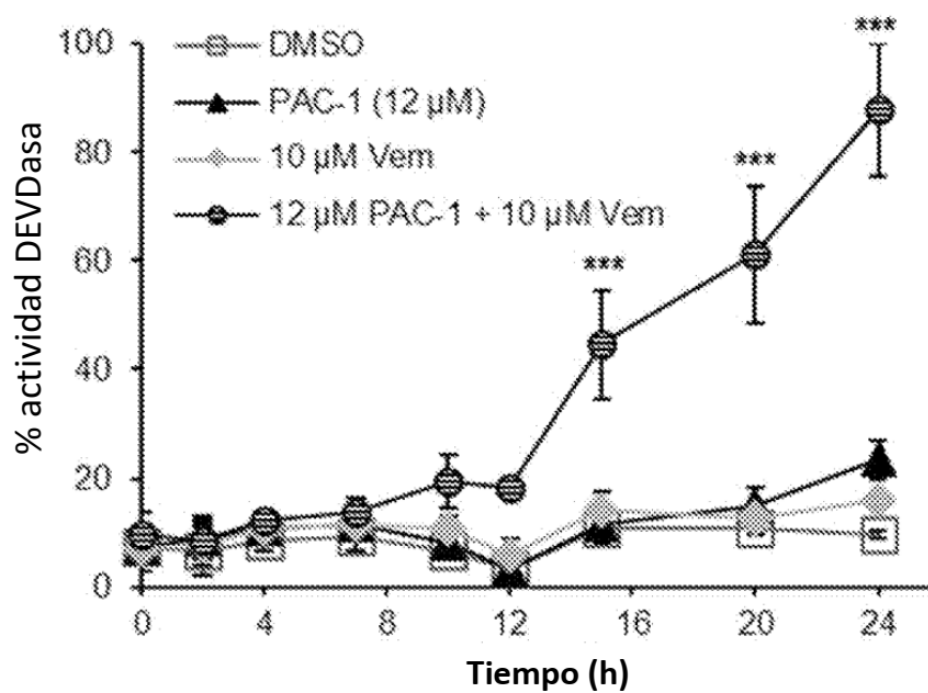


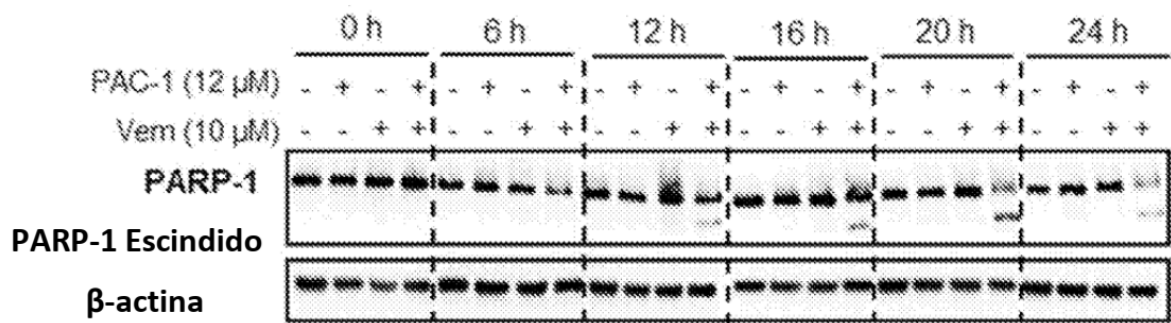
**Figura 7E**



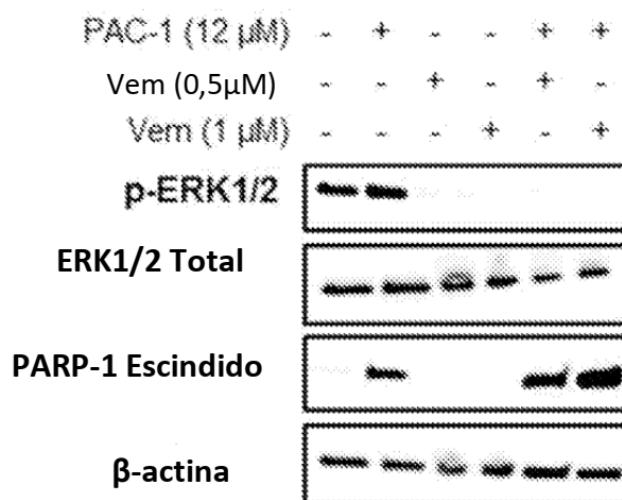
**Figura 8A**

		[PAC-1] (μM)						
			4	6	8	10	12	
	antagonista	[Vemurafenib] (μM)	0,5	0,64	0,53	0,57	0,56	0,58
			1	0,39	0,34	0,43	0,40	0,50
	aditivo		5	0,68	0,33	0,41	0,37	0,45
			10	0,70	0,32	0,35	0,39	0,41
			20	0,52	0,35	0,30	0,30	0,38
	sinérgico		30	0,33	0,22	0,25	0,31	0,32

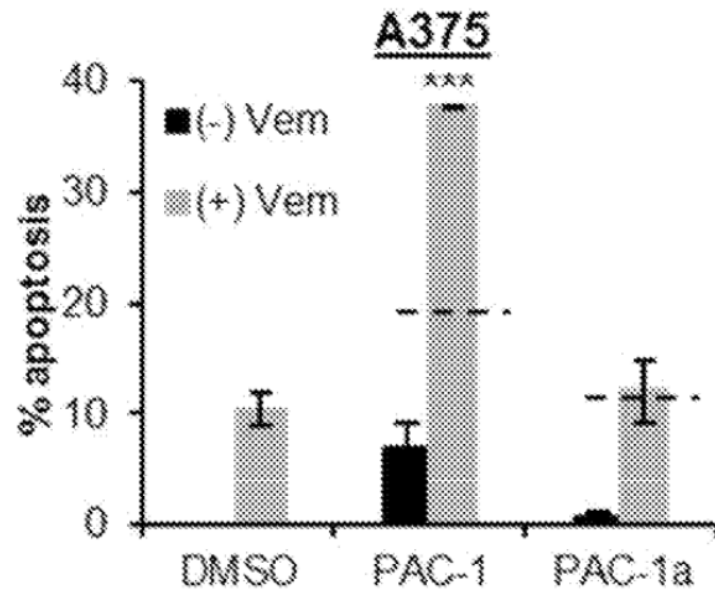
**Figura 8B****Figura 8C**



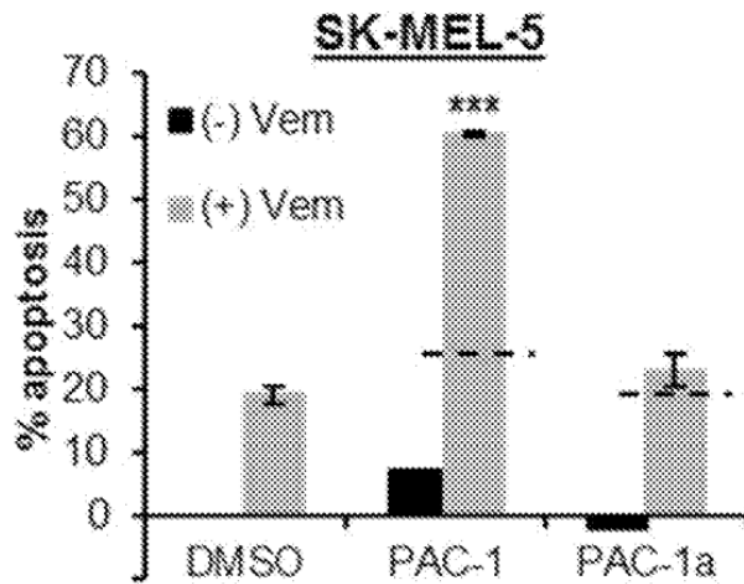
**Figura 8D**



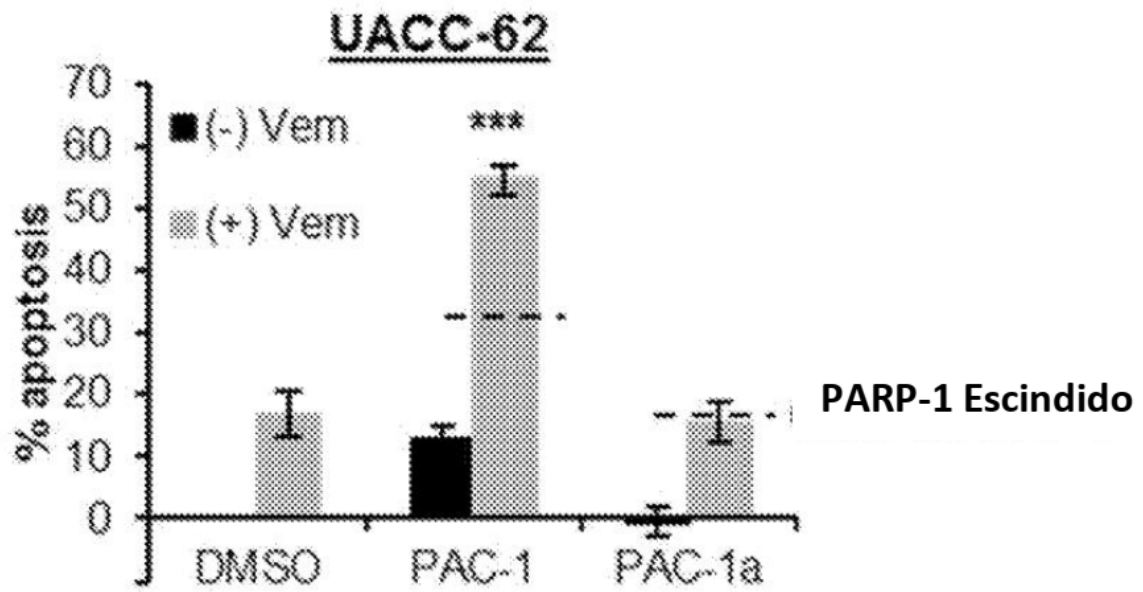
**Figura 8E**



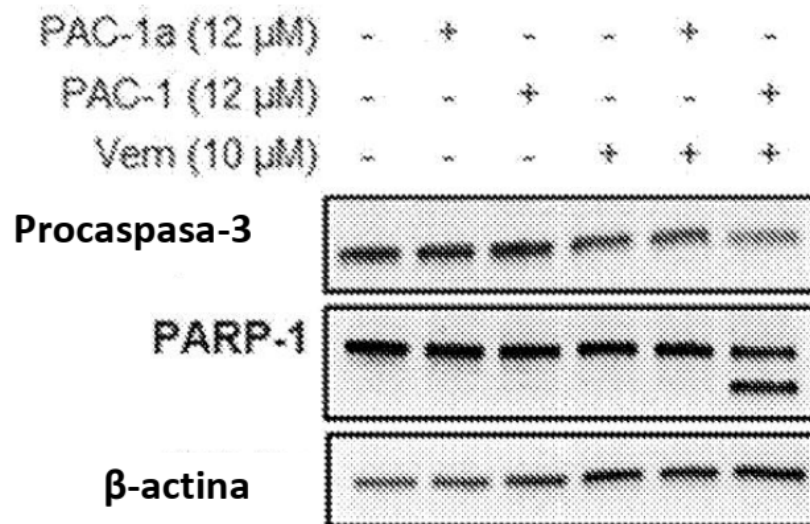
**Figura 9A**



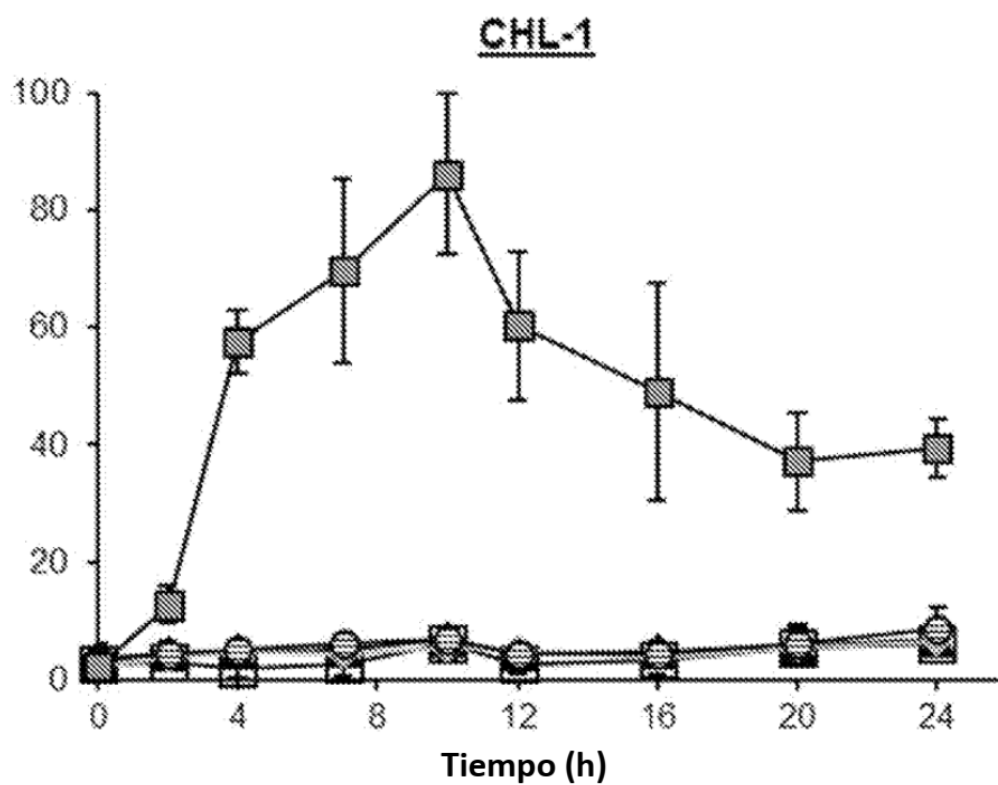
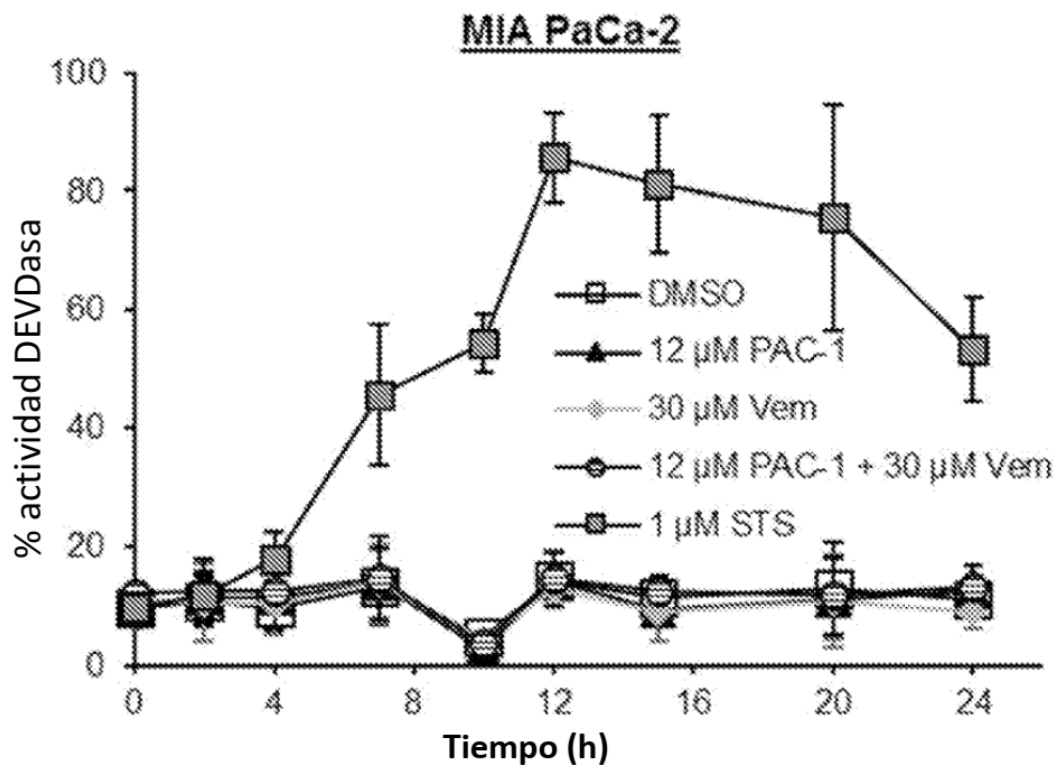
**Figura 9B**



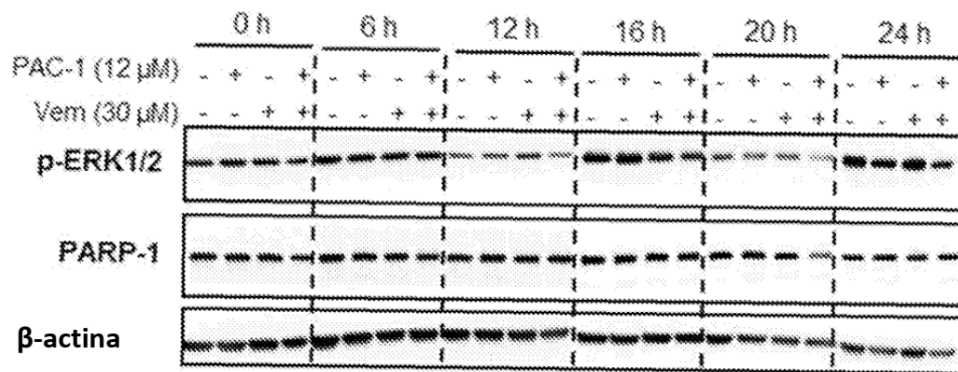
**Figura 9C**



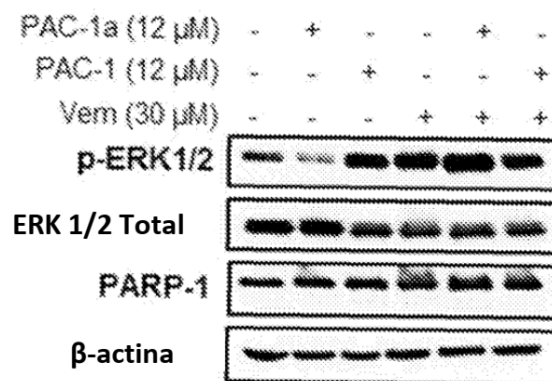
**Figura 9D**



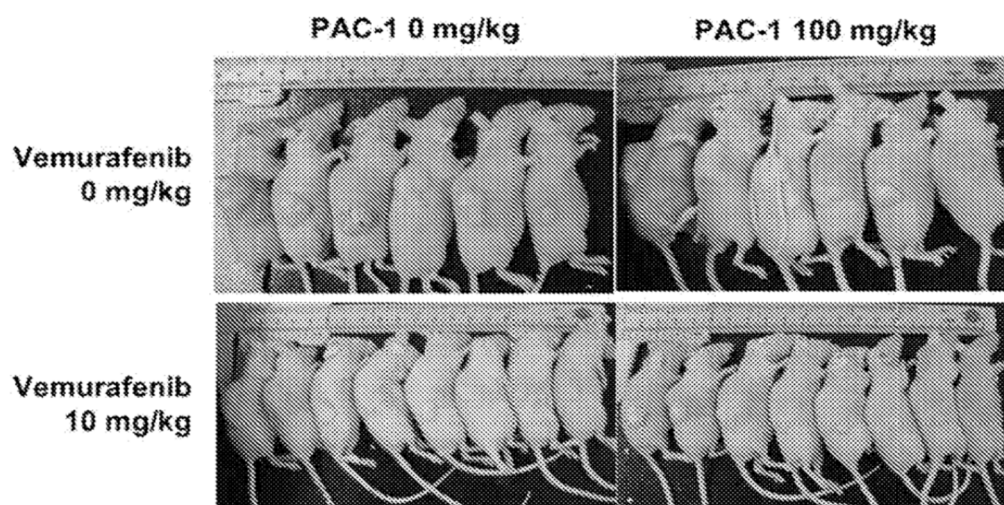
**Figura 10A**



**Figura 10B**

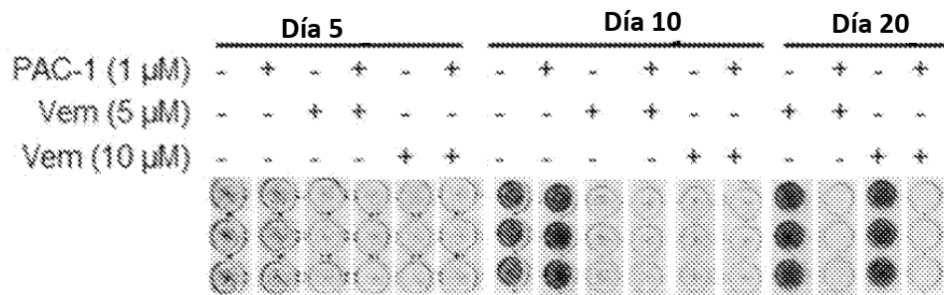


**Figura 10C**

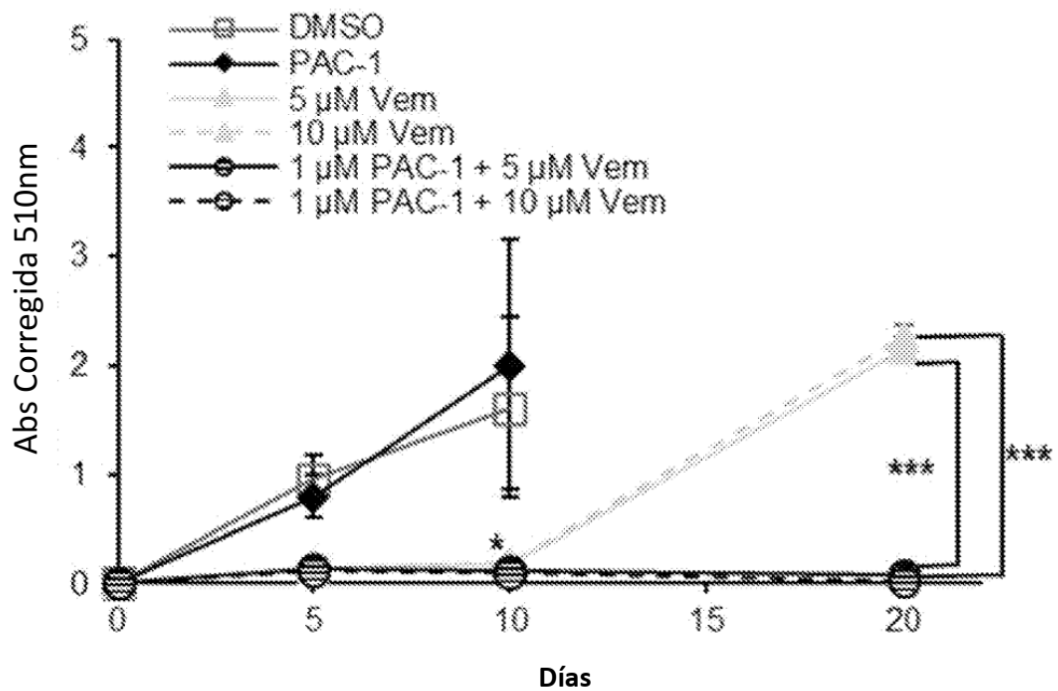


**Figura 11**

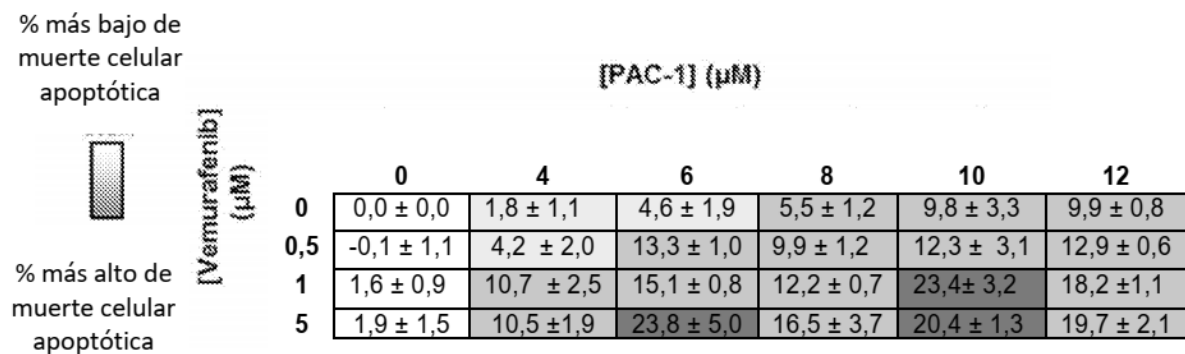




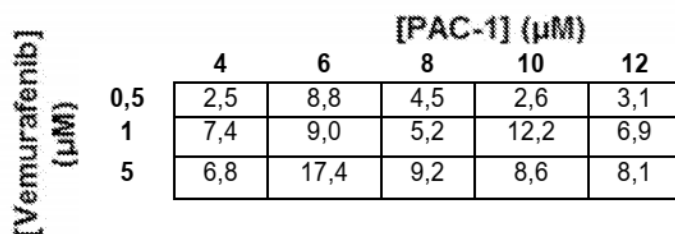
**Figura 12A**



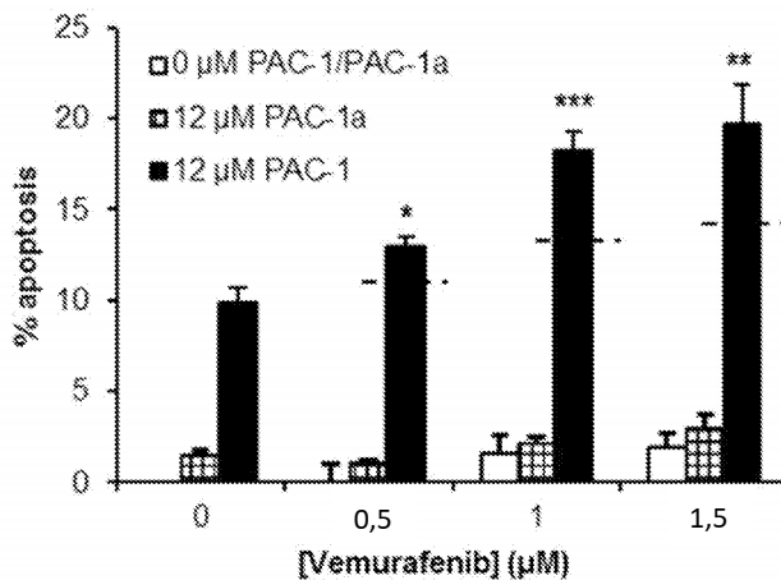
**Figura 12B**



**Figura 13A**



**Figura 13B**



**Figura 13C**