

ÖZET**FARMASÖTİK KOMBİNASYONLAR**

Eş zamanlı, ayrı veya sıralı uygulamaya yönelik (a) bir protein kinaz C (PKC) inhibitör bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ve (b) en az bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitörü veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuz ve isteğe bağlı olarak farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içeren bir farmasötik kombinasyon; bu tür kombinasyonun proliferatif hastalıkların tedavisinde kullanılması ve bu tür kombinasyonun terapötik olarak etkili bir miktarının uygulanmasını içeren proliferatif bir hastalıktan muzdarip bir öznenin tedavi edilmesi yöntemleri.

İSTEMLER

1. Kanserin tedavisinde kullanıma yönelik, eş zamanlı, ayrı veya sıralı uygulamaya yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği aşağıdakileri içermesi veya bunlardan oluşmasıdır:
 - (a) 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olan bir protein kinaz C (PKC) inhibitör bileşiği ve
 - (b) 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid olan bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitör bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur.
2. İstem 1'e göre kullanıma yönelik bir farmasötik kombinasyon olup, özelliği en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içermesidir.
3. İstem 1 veya 2'ye göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği PKC inhibitör bileşiği ve MEK inhibitör bileşiğinin eş zamanlı uygulanmasına yönelik olmasıdır.
4. İstem 3'e göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği PKC inhibitör bileşiği ve MEK inhibitör bileşiğinin ayrı dozaj formları olarak uygulanmasıdır.
5. İstem 1 veya 2'ye göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği PKC inhibitör bileşiği ve MEK inhibitör bileşiklerinin sıralı uygulanmasına yönelik olmasıdır.
6. İstemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği farmasötik kombinasyonun oral uygulama için formüle edilmesidir.
7. İstem 6'ya göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği farmasötik bileşimin bir tablet veya tabletler olarak formüle edilmesidir.

8. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği kanserin uveal melanom, metastatik uveal melanom, GNAQ mutant uveal melanom, veya GNA11 mutant uveal melanom olmasıdır.
- 5
9. İstem 8'e göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği kanserin GNAQ mutant uveal melanom olmasıdır.
10. İstem 8'e göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği kanserin GNA11 mutant uveal melanom olmasıdır.
- 10
11. İstemler 1-10'dan herhangi birine göre kullanıma yönelik farmasötik bir kombinasyon olup, özelliği (a) PKC inhibitör bileşiği ve (b) MEK inhibitör bileşiğinin kanser tedavisine yönelik sinerjik olarak etkili miktarlarda sağlanmasıdır.
- 15
12. Kombine bir preparat olup, özelliği şunları içermesidir: (a) PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dionun bir veya daha fazla birim dozaj formu veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amidin bir veya daha fazla birim dozaj formu veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu.
- 20
13. Bir farmasötik bileşim olup, özelliği istem 1'e göre bir kombinasyon ve en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içermesidir.
- 25
14. İstem 13'e göre bir farmasötik bileşim olup, özelliği PKC inhibitörü ve MEK inhibitörünün kanser tedavisine yönelik sinerjik olarak etkili miktarlarda sağlanmasıdır.
- 30

TARİFNAME

FARMASÖTİK KOMBİNASYONLAR

BULUŞ SAHASI

5

Mevcut buluş, (a) bir protein kinaz C (PKC) inhibitör bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve (b) bir veya en az bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitör bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içeren bir farmasötik kombinasyon ve bu tür kombinasyonun kanser gibi proliferatif hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde kullanımları ile ilgilidir. Mevcut buluş, (a) bir protein kinaz C (PKC) inhibitör bileşik 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve (b) 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olan bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitörü ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içeren farmasötik bir kombinasyon, bu tür kombinasyonun kanser gibi proliferatif hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde kullanımları ile ilgilidir.

20

BULUŞUN ALT YAPISI

Uveal melanom, spesifik olarak iri, silyer cisim veya koroid olmak üzere gözün pigmentli kısımlarında meydana gelen malign bir neoplazmdır. Uveal melanom yönelik terapi, enükleasyon veya brakiterapi ile lokal terapiyi içerir. Hastaların yaklaşık olarak yarısı, tipik olarak karaciğer ve sıklıkla akciğer ve kemiğe yönelik metastatik hastalık geliştirir ve yeni metastazların meydana gelmesi, hastalığın yavaş büyüyen olduğunu belirten süre ile artmaya devam eder. Metastatik hastalığı olan hastalara yönelik sonuç sıkıntılıdır. Bu hastalığa yönelik günümüze kadar herhangi bir terapi onaylanmamıştır.

30

Heterotrimerik G protein komplekslerinin (GNAQ ve GNA11) G protein alfa alt birimlerini kodlayan iki genin birini etkileyen mutasyonlar, tümörlerin büyük çoğunluğunda keşfedilmiştir (Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al, Nature (2009); 457:599-601 ve Van Raamsdonk CD, Griewank KG, et al (2010), N Eng J Med; 363:2191-9). Tanımlanan mutasyonlar, diğer G proteinlerini etkileyen tipik

35

aktive edici mutasyonlardır. Molecular Cancer Therapeutics, 11: 1905-1914 (2012), oküler melanom barındıran GNAQ mutasyonlarında protein kinaz C inhibitör AEB071'in terapötik etkisini açıklar. Kanseri hastalara yönelik sayısız tedavi seçeneklerine rağmen etkili ve güvenli terapötik ajanlara yönelik bir ihtiyaç ve etkili uzun süreli kanser tedavisine yönelik uygulanabilen yeni kombinasyon terapilerine yönelik bir ihtiyaç bulunur.

Mevcut buluşçular bu noktada bu G proteinlerinin aşağı yönlü sinyalleme kaskadının inhibisyonu, örneğin bir Gα mutasyonu (GNA11/GNAQ) olan bir tümör olmak üzere kanser gibi bir proliferatif hastalığın ve özellikle uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom tedavisinde faydalı olabilir. Bu noktada bir protein kinaz C (PKC) inhibitör bileşiği ve bir MEK inhibitör bileşiğin bir kombinasyonunun, özellikle uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom olmak üzere bir proliferatif hastalığın ilerlemesinin geciktirilmesi ve tedavisine yönelik etkili olduğu bulunmuştur.

Bu noktada şaşırtıcı bir şekilde protein kinaz C (PKC) inhibitör, 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, örneğin bunun asetatının etkili bir miktarının bir MEK inhibitör bileşiği, 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amidin etkili bir miktarı ile kombinasyonunun, özellikle kanser ve daha belirgin olarak uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom olmak üzere proliferatif hastalıkların tedavisinde ön görülmemiş gelişme ile sonuçlandığı keşfedilmiştir.

Eş zamanlı olarak, sıralı olarak ve ayrı olarak uygulandığında protein kinaz C (PKC) inhibitör bileşiği ve MEK inhibitör bileşiği, hücre proliferasyonunu güçlü şekilde inhibe etmek üzere sinerjik bir şekilde etkileşime girer ve uveal melanom modellerinde şaşırtıcı şekilde etkilidir. Bu ön görülmemiş sinerjik reaksiyon, tedavide bileşiklerin uzun süreli etkinliğinin artmasına ve yan etkilerde bir azalmaya yol açarak, her bir bileşik için gerekli dozda azalmaya olanak tanır.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Buluş, bir Gα mutasyonu (GNA11/GNAQ) olan bir tümörün hücre büyümesinin inhibe edilmesi için ve özellikle kanser ve daha belirgin olarak uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom olmak üzere proliferatif hastalıkların tedavi edilmesi için faydalı olabilen farmasötik kombinasyonlar sağlar.

5 Mevcut buluş, aşağıdakileri içeren farmasötik kombinasyonları sağlar: (a) bir protein kinaz C (PKC) inhibitörü, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) en az bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitör ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı.

10 Mevcut buluş ayrıca aşağıdakilerden oluşan farmasötik kombinasyonları sağlar: (a) bir protein kinaz C (PKC) inhibitörü, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitör ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı.

15 Diğer kombinasyonlarda PKC inhibitör bileşiği aşağıdakidir

3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion;
veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu.

20 Diğer kombinasyonlarda MEK inhibitörü aşağıdakidir

6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik
asit (2-hidroksietoksi)-amid,
veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu,

25

Mevcut buluşa göre kombinasyon partnerleri (a) bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) bir MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-

30 hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu.

Mevcut buluş ayrıca kombine bir preparat veya aşağıdakileri içeren farmasötik bir bileşim ile ilgilidir: (a) bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir

35 tuzu, ve (b) 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-

karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olan bir MEK inhibitör bileşiği ve en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı. Bir düzenlemede mevcut buluş, aşağıdakileri içeren kombine bir preparat ile ilgilidir: (i) kombinasyon partnerinin (a) bir veya daha fazla birim dozaj formu ve (ii) kombinasyon partnerinin (b) bir veya daha fazla birim dozaj formu.

Mevcut buluş özellikle buna ihtiyacı olan bir öznde bir proliferatif hastalığın tedavi edilmesi veya önlenmesine yönelik faydalı (a) bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) -(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olan bir MEK inhibitör bileşiği ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içeren bir farmasötik kombinasyon ile ilgilidir.

Mevcut tarifname ayrıca bir proliferatif hastalığın ilerlemesinin geciktirilmesi veya tedavisinde kullanıma yönelik eş zamanlı, ayrı veya sıralı uygulamasına yönelik talimatlar ile birlikte, terapötik ajanlar olarak (a) bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olan bir MEK inhibitör bileşiği içeren bir kombinasyon içeren ticari bir paket sağlar.

Yukarıdaki kombinasyonlar ayrıca özellikle bir proliferatif hastalığın tedavi edilmesi veya önlenmesine yönelik eş zamanlı, ayrı veya sıralı uygulamaya yönelik sağlar. Proliferatif hastalık kanser ve daha belirgin olarak uveal melanom, metastatik uveal melanom, GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom ve kanser ve daha belirgin olarak uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant metastatik uveal melanomdur.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

ŞEKİL 1, -(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) ve 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-

benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amidin (BİLEŞİK B) in vitro uveal melanom proliferasyon üzerindeki etkisini gösterir. Uveal melanom hücre hatlarının 6 gün boyunca büyümesi, 0.5µM DMSO, 0.5µM AEB071, 0.5µM BİLEŞİK B veya 0.5µM AEB071 + 0.5µM BİLEŞİK B varlığında xCELLigence teknolojisi aracılığıyla ölçülmüştür. Sırasıyla AEB071 gecikmeli hücre büyümesi, GNAQ ve GNA11 mutasyonlarına sahip olan 92.1 ve OMM1 hücre hatlarında bu etki, BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde olduğunda daha da kötüleşmiştir. Tek bir ajan olarak BİLEŞİK B'nin her iki uveal melanom hücre hattı 92.1 ve OMM1'in büyümesi üzerinde ılımlı bir etkiye sahip olduğundan iki ajanın kombinasyonu, her iki hücre hattının proliferasyonunu tamamen şaşırtıcı bir şekilde baskılayabilmektedir.

ŞEKİL 2, 92.1 uveal melanom hücre hattında AEB071 ile BİLEŞİK B arasındaki sinerji desenindeki yakın bir görünüşü gösterir ve iki ajan arasındaki sinerjik etkiyi gösterir. İki ajan arasındaki doz matriksi gösterilir; tedavi edilmemiş hücrelere göre hücre büyümesi üzerindeki etki üst yan panelde gösterilir, merkezi paneldeki aşırı inhibisyon ve sıfır gün normalleştirilmesine göre büyüme inhibisyonu alt panelde gösterilir. Her iki ajan BİLEŞİK B ve AEB071, 92.1'de aktiftir ancak önemli şekilde, birlikte her iki ajanın kombinasyonu gösterilerek, daha düşük dozlardaki ek yanıt büyüklüklerinden daha fazla verim sağlayan iki ajanın kombine edilmesi, in vitro uveal melanom hücre hattı 92.1'in proliferasyonunun inhibe edilmesinde tek başına bir ajandan daha etkilidir.

ŞEKİL 3: Bu ajanların biyo kimyasal etkisi, uveal melanom hücre hatları 92.1 ve OMM-1'de birlikte 0.5 µM AEB071, 0.5 µM BİLEŞİK B veya 0.5 µM her bir ajan ile tedaviyi takiben değerlendirilir. pMARCKS seviyesi, azaltılır. BİLEŞİK B'nin AEB071'e eklenmesinin, pMARCKS ifadesi üzerinde ilave bir etkisi bulunmaz. Aynı hücrelerin BİLEŞİK B ile tedavisi, 2 saatte görülebildiği üzere pERK1/2 seviyelerinde bir azalmaya yol açmıştır; 24 saate kadar pERK1/2 ifadesi dönmeye başlamıştır. Ek olarak tek ajan BİLEŞİK B tedavisi, her iki hücre hattında zamanla pMEK1/2 ifadesinin indüksiyonuna yol açmıştır; bu 48 saatlik tedaviyi takiben açık bir şekilde gözlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde sadece AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonu, pERK1/2 ve pMEK1/2'nin sürekli baskılanmasını sağlamıştır. Önemli bir şekilde AEB071, BİLEŞİK B tek ajan tedavisinden kaynaklanan pMEK indüksiyonunu belirgin şekilde önlenmiştir.

Dolayısıyla AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonu, pMEK, pERK ve pMARCKS'nin sürekli fosforprotein inhibisyonuna yol açmıştır.

5 ŞEKİL 4, 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenograft modelinde AEB071 ve BİLEŞİK B'nin in vivo aktivitesini gösterir. AEB071, 21 gün boyunca 91mg/kg günlük üç kez dozlamada (TID) uygulanmıştır. Etkinlik, çalışmada tüm fareler ile son gün olan 17. günde tümör büyüme inhibisyonundan belirlenmiştir. Aktivite, tümör/kontrol (T/C), araç ile tedavi edilen farelere karşı ilaç ile tedavi edilen farelerde (ΔT) 1. günden 17. güne ortalama tümör hacmi değişim yüzdesi olarak veya bir T/T0, 1. günden grup ortalama tümör hacmindeki azalma yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Şekil 4'te gösterildiği üzere monoterapi AEB071 tedavisi, %3'lük bir T/C ($p < 0.01$) ile sonuçlanmıştır ve 3.5mg/kg'de günlük iki kez dozlanan BİLEŞİK B'nin AEB071 rejimine eklenmesi, -%22'lik bir T-T0 ($p < 0.001$ medyan aktivite, ancak tek başına AEB071'e kıyasla önemli değildir) 10 sağlamıştır. BİLEŞİK B, %84'lük bir T/C ile bu *in vivo* modelde kendi içinde herhangi bir aktiviteye sahip değildir. AEB071 ve BİLEŞİK B ile tedavi dolayısıyla 92.1 in vivo uveal melanom modelde etkilidir.

20 ŞEKİL 5, >70 günü takiben 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenograft modelinde in vivo tümör büyümesini gösterir. Fareler, 21 gün boyunca dozlanmıştır, daha sonra tedavi durdurulmuştur ve tümör dışı büyümesi izlenmiştir. Kombinasyon grubunda tümörler daha yavaş bir oranda gelişim gösterirken dozlama periyodunu takiben iki hafta tümörler, kontrol AEB071 monoterapi tedavi gruplarında kontrol hızında gelişim göstermiştir. Tümör 25 büyüme gecikmesi, her grup için iki veya daha fazla tümörün başlangıçtaki bir büyüme periyodundan sonra statik olması nedeniyle hesaplanmamıştır ancak tümör dışı büyüme oranı eğilimi, AEB071 artı BİLEŞİK B kombinasyon tümörlerinin AEB071 tek ajandan daha yavaş bir şekilde dışı büyüdüğünü göstermiştir. BİLEŞİK B tek ajanı ile tedavi edilen tümörler, etkinlik eksikliği 30 nedeniyle izlenmemiştir. Veriler, AEB071'in BİLEŞİK B ile kombinasyonunun uveal melanomun 92.1 in vivo modelinde tek ajan ile karşılaştırıldığında daha büyük yanıt büyüklüğü ve süresine sahip olduğunu göstermiştir.

35 ŞEKİL 6, 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenograft modelde günlük iki kez dozlama rejimi ile 3.5 mg/kg'de BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde 21 gün

boyunca günlük üç kez dozlama (TID) ile 90.95, 45.58 ve 22.74 mg/kg'de (80, 40 ve 20 mg/kg serbest baza eşdeğer) uygulanan AEB071'nin *in vivo* aktivitesini gösterir. Etkinlik, 22. günde tümör büyüme inhibisyonundan belirlenmiştir. Etkinlik, tümör/kontrol (T/C), araç ile tedavi edilen farelere karşı ilaç ile tedavi edilen farelerde (ΔT) 1. günden 22. güne ortalama tümör hacmi değişim yüzdesi olarak veya bir T/T0, 1. günden grup ortalama tümör hacmindeki azalma yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Şekil 6'da gösterildiği üzere 90.95mg/kg'de mono terapi AEB071, %18 T/C ($p<0.05$) ile sonuçlanmıştır. 45.5 ve 22.7 mg/kg ile AEB071 mono terapi, sırasıyla %52 ve %92 T/C ile ve önemli olmayan medyan inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. 90.95 ve 45.58 mg/kg'lik AEB071 dozları ile 3.5mg/kg'de günde iki kez dozlanan BİLEŞİK B ilavesi, sırasıyla -%52 ve -%12 T-T0 ($p<0.001$) sağlamıştır. BİLEŞİK B, %56'lık bir T/C ile bu *in vivo* modelde kendi içinde herhangi bir aktiviteye sahip değildir. Yüksek doz kombinasyonu, dört kısmi regresyon sağlamıştır. BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde çoklu AEB071 dozlarında tedavi, 92.1 *in vivo* uveal melanom modelinde etkilidir. Kombinasyon etkinliği, daha büyük bir yanıt büyüklüğü sağlayan BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde artan AEB071 dozu ile, dozdan bağımsız bir şekilde artar.

20 BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Buluşun çeşitli sıralanan düzenlemeleri burada açıklanır. Her bir düzenlemede belirtilen özelliklerin, mevcut buluşun ilave düzenlemelerini sağlamak üzere diğer belirtilen özellikler ile kombine edilebildiği bilinecektir.

25

Mevcut buluş, aşağıdakileri içeren farmasötik kombinasyonları sağlar: (a) bir protein kinaz C (PKC) inhibitör, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) istemlerde tanımlandığı üzere en az bir mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MEK) inhibitör ve isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı.

30

Mevcut buluş, özellikle bir proliferatif hastalığın tedavisi veya önlenmesinde kullanıma yönelik eş zamanlı, ayrı veya sıralı uygulamaya yönelik bu tür farmasötik kombinasyonlar ile ilgilidir.

Burada kullanılan genel terimler, açık bir şekilde aksi belirtilmedikçe aşağıdaki anlamlar ile tanımlanır:

- 5 “İçeren” ve “dahil eden” burada açık uçlu şekilde ve aksi belirtilmedikçe sınırlandırıcı olmayan anlamda kullanılır.

- 10 Buluşun açıklanması bağlamında (özellikle aşağıdaki istemler bağlamında) “bir” ve “bu” terimleri ve benzer referansların, burada aksi belirtilmedikçe veya belirgin şekilde bağlam ile ters düşmedikçe hem tekil hem de çoğul olanları kapsadığı şeklinde yorumlanacaktır. Çoğul form, bileşikler, tuzlar ve benzeri için kullanıldığında bu ayrıca tek bir bileşik, tuz veya benzerini ifade ettiği şeklinde alınır.

- 15 “Kombinasyon” veya “farmasötik kombinasyon” terimi burada bir dozaj birim formunda sabit bir kombinasyon, bir sabit olmayan kombinasyon veya kombine uygulamanın parçalarının bir kitini refere etmek üzere kullanılır burada PKC inhibitör bileşiği, BİLEŞİK A, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve the MEK inhibitör bileşiği, BİLEŞİK B, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, eş zamanlı olarak, aynı sürede bağımsız olarak veya kombinasyon partnerlerinin bir iş birliğini, örneğin sinerjik etkiyi göstermesine olanak tanıyan zaman aralıklarında ayrı olarak uygulanabilir. “Sabit kombinasyon” terimi, aktif bileşenler, örneğin bir BİLEŞİK A ve bir kombinasyon partneri, örneğin BİLEŞİK B'nin tek bir birim veya dozaj formunda eş zamanlı olarak ir hastaya uygulanır. “Sabit olmayan kombinasyon” terimi, aktif bileşenler, örneğin BİLEŞİK A, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve bir kombinasyon partneri, 25 örneğin BİLEŞİK B, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun, spesifik zaman sınırları olmaksızın eş zamanlı olarak, aynı zamanda veya sıralı olarak ayrı birimler olarak bir hastaya uygulanır, burada bu tür uygulama hasta gövdesinde iki bileşiğin terapötik olarak etkili seviyelerini sağlar. sonraki ayrıca kokteyl terapiye, örneğin üç veya daha fazla aktif bileşenin uygulanması gibi uygulanır.

30

"Bir protein kinaz C inhibitör" terimi burada protein kinaz C'yi hedef alan, azaltan veya inhibe eden bir bileşiğe refere edecek şekilde tanımlanır. PKC terimi genellikle bütün izoform familyasına refere eder: klasik izoformlar; alfa, beta ($\beta 1$ ve $\beta 2$) ve gamma, yeni izoformlar; delta, epsilon, eta, ve teta, ve atipik izoformlar; zeta ve tau/lambda.

Uygun PKC inhibitörleri US Patent Nos. 5,545,636; 5,668,152; 5,672,681; 5,698,578; 5,710,145; 6,645,970; 7,220,774; 7,235,555; US Yayın No. 2008/0318975; Avrupa Patent No. 0776895 B1; 0817627 B1; 1449529 B1; 1337527 B1; ve PCT Yayın No. WO03/082859; ve WO07/006533'te açıklanan bileşikler gibi maleimid derivelerini içerir.

Spesifik PKC inhibitör bileşikleri aşağıdakileri içerir

sotrastaurin (ayrıca AEB071 olarak bilinir ve US Patent No. 6,645,970'de açıklanır),
 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(piperazin-1-il)kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (PCT Yayın No. WO 2002/038561'e ait Örnek 70'te veya US Patent No. 6,645,970'te açıklanan),
 3-[2-kloro-7-[(dimetilamino)metil]-1-naftalenil]-4-[7-[2-(2-metoksietoksi)etoksi]-1*H*-indol-3-il]-1*H*-pirol-2,5-dion ((CAS No. 919992-85-1, PCT Yayın No. WO07/006533 ve US Yayın No. 2008/0318975'te açıklanır),
 3-[3-(4,7-diaza-spiro[2,5]okt-7-il)-izoquinolin-1-il]-4-(7-metil-1*H*-indol-3-il)-pirol-2,5-dion (US Patent No. 7,235,555'e ait Örnek 69'da açıklanır);
 ruboksistaurin ((9*S*)-9-[(dimetilamino)metil]-6,7,10,11-tetrahidro-9*H*,18*H*-5,21:12,17-dimetenodibenzo-[e,k]pirolo[3,4-h][1,4,13]oksadiazasikloheksadesin-18,20(19*H*)-dion (ayrıca LY-333531 olarak bilinir ve US Patent No. 5,698,578'de açıklanır)) ve ruboksistaurin mesilat tuzu (US Patent No. 5,710,145 ve Avrupa patent No. 0776895 B1'de açıklanır);
 ve 12-(2-siyanoetil)-6,7,12,13-tetrahidro-13-metil-5-okso-5*H*-indolo(2,3-a)pirolo(3,4-c)-karbazol (CAS No. 136194-77-9, Calbiochem®'den temin edilebilir ve US Patent No. 5,489,608'de açıklanır).

Diğer PKC inhibitörleri, AD 198, aprinokarsen, balanol, bryostatin 1, balfostin, cedefingol, CGP 53353, keleritrin klorid, sikloplatam, delkasertib, enzastaurin, EP 70905, GF 109203X, gnidimakrin, GO 6976, GO 7716, GO 7775, GO 7852, HO 0303, ingenol mebutat, ISI 641, JTV 519, KAI 1678, LY 290181, LY 317644, midostaurin, NA 0345, NPC 15437, NSC 639365, NSC 639366, NSC 646958, p XSC, RD 65071, RO 317549, RO 318220, RO 318425, RO 318830, RO 320432, Safingol, SPC 104065, staurosporin, teprenon, tokoferol süksinat, UCN 01 ve UCN 1028C'den oluşan gruptan seçilebilir. Bazı düzenlemelerde PKC inhibitörü midostaurin, enzastaurin, veya

staurosporindir. Bazı düzenlemelerde PKC inhibitörü, 3-(1H-İndol-3-il)-4-[2-(piperazin-1-il)kinazolin-4-il]-1H-pirol-2,5-diondur (PCT Yayın No. WO 2002/038561'e ait Örnek 70'te veya US Patent No. 6,645,970'te açıklanır).

- 5 "Bir MEK inhibitör" terimi burada MAP kinaz, MEK'nin kinaz aktivitesini hedef alan, azaltan veya inhibe eden bir bileşiğe refere edecek şekilde tanımlanır. Bir MEK inhibitörünün bir hedefi bunlarla sınırlı olmamak üzere ERK içerir. Bir MEK inhibitörünün bir indirekt hedefi bunlarla sınırlı olmamak üzere siklin D1 içerir.
- 10 "Farmasötik bileşim" terimi burada örneğin bir memeli veya insan olmak üzere bir özneye, belirli bir hastalığı veya memeliyi veya insani etkileyen durumu önlemek veya tedavi etmek amacıyla uygulanacak en az bir terapötik ajan içeren bir karışım veya solüsyona refere edecek şekilde tanımlanır.
- 15 "Farmasötik olarak kabul edilebilir" terimi burada mantıklı medikal karar kapsamı içerisinde, makul bir fayda / risk oranı ile uyumlu aşırı toksisite, iritasyon allerjik yanıt ve diğer problem komplikasyonları olmaksızın örneğin bir memeli veya insan olmak üzere bir öznenin dokuları ile temas için uygun olan bu bileşikler, materyaller, bileşimler ve/veya dozaj formlarına refere edecek şekilde tanımlanır.
- 20 Burada kullanıldığı üzere "eş-uygulama" veya "kombine uygulama" terimi, seçilen terapötik ajanların tek bir hastaya uygulanmasını kapsayacak şekilde tanımlanır ve ajanların, aynı uygulama yolu ile veya aynı sürede zorunlu olarak uygulanmadığı tedavi rejimlerini içermesi tasarlanır.
- 25 Burada kullanıldığı üzere "tedavi etme" veya "tedavi" terimi, bir öznedeki en az bir semptomu rahatlatan, azaltan veya hafifleten veya bir hastalığın ilerleyişinin gecikmesini etkileyen bir tedaviyi içerir. Örneğin tedavi, kanser gibi bir bozukluğun bir veya birkaç semptomlarının azaltılması veya bir bozukluğun tam eradikasyonu olabilir.
- 30 Mevcut buluş amacı içerisinde "tedavi etmek" terimi ayrıca başlangıcın (diğer bir ifadeyle bir hastalığın klinik göstergesinden önceki periyod) duraklatılmasını, geciktirilmesini ve/veya bir hastalığın gelişmesi veya kötüleşme riskinin azaltılmasını gösterir. "Korumak" terimi burada örneğin bir memeli veya insan gibi bir öznedeki bir hastalığın gelişmesi veya devam etmesi veya kötüleşmesini önlemek, geciktirmek veya

tedavi etmek veya uygun görüldüğü şekilde gelişmesi, hepsini ifade etmek üzere kullanılır.

5 Burada kullanıldığı üzere “önlemek”, “önleyen” veya “önleme” terimi, önlenen durum, hastalık veya bozukluk ile ilişkili veya bundan kaynaklanan en az bir semptomun önlenmesini içerir.

10 Burada kullanıldığı üzere “birlikte terapötik olarak aktif” veya “birlikte terapötik etki” terimi, terapötik ajanların, tedavi edilecek sıcakkanlı hayvanlarda, özellikle insanda, yine (tercihen sinerjik) bir etkileşim (birlikte terapötik etki) göstermeyi tercih ettikleri bu tür zaman aralıklarında ayrı olarak verilebildiğini (kronolojik olarak aşamalı bir şekilde, özellikle bir diziye spesifik bir şekilde) ifade eder. Durumun bu olup olmaması, diğerleri arasında, her iki bileşiğin en azından belirli zaman aralıkları boyunca tedavi edilecek insan kanında bulunduğunu gösteren, kan seviyesi takip edilerek belirlenebilir.

15 Terapötik ajanların bir kombinasyonunun “terapötik olarak etkili miktarı” veya “klinik olarak etkili miktarı” terimi, kombinasyon ile tedavi edilen bozukluğun klinik olarak gözlemlenebilir belirtileri ve semptomlarını taban çizgisi boyunca gözlemlenebilir bir gelişme sağlamak üzere yeterli bir miktardır.

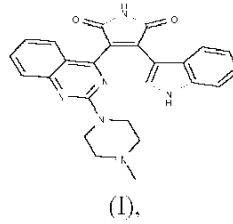
20 Burada kullanıldığı üzere “sinerjik etki” terimi, iki terapötik ajanın örneğin bir formül (I) bileşiği, *örneğin* Bileşik A ve mevcut buluşa ait bir MEK inhibitör bileşiği, *örneğin*, kendi kendilerine uygulanan er bir ilacın etkilerinin asit ilavesinden daha büyük olan, örneğin özellikle kanser olmak üzere bir proliferatif hastalığın veya semptomlarının semptomatik ilerlemesinin yavaşlatılması gibi bir etki üreten Bileşik B'nin hareketine refere eder. Sinerjik bir etki, örneğin, Sigmoid-Emax denklemi (Holford, N. H. G. ve Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), Loewe toplanırlık denklemi (Loewe, S. ve Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) ve medyan etki denklemi (Chou, T. C. ve Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)) gibi uygun yöntemler kullanılarak hesaplanabilir. Yukarıda refere edilen her bir denklem, ilaç kombinasyonunun etkilerinin değerlendirilmesine yardım etmek üzere uygun bir grafik üretmek üzere deneysel verilere uygulanabilir. Yukarıda refere edilen denklemler ile ilişkili uygun grafikler sırasıyla konsantrasyon etki eğrisi, isobologram eğrisi ve kombinasyon indeks eğrisidir.

35

Burada kullanıldığı üzere “özne” veya “hasta” terimi, bir kanser veya doğrudan veya dolaylı bir kanseri içeren herhangi bir bozukluktan muzdarip olabilen veya bundan etkilenebilen hayvanları içerir. Öznelerin örnekleri memelileri, örneğin insanlar, köpekler, inekler, atlar, domuzlar, koyunlar, keçiler, kediler, fareler, tavşanlar, sıçanlar veya transgenik insan dışı hayvanları içerir. Tercih edilen düzenlemede özne, bir insan, örneğin kanserlerden muzdarip olan, muzdarip olma riskinde olan veya potansiyel olarak muzdarip olabilen bir insandır.

“Yaklaşık” veya “yaklaşık olarak” terimi, belirli bir değer veya aralığında %10’u dahilinde, daha çok tercihen %5’i dahilinde anlama sahiptir.

Mevcut buluşa ait farmasötik kombinasyonlar, bir protein kinaz C inhibitörü olarak PKC bileşik 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (buradan sonra (“BİLEŞİK A”) olarak refere edilir) içerir. BİLEŞİK A, Formüle (I) ait bir protein kinaz C (PKC) inhibitörüdür



BİLEŞİK A, WO02/38561 ve US Patent No. 6,645,970’te açıklanır. BİLEŞİK A ve bunun asetat tuzu sentezi, WO WO02/38561’e ait Örnek 56’da açıklanır.

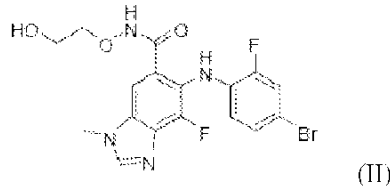
BİLEŞİK A referans alındığında “tuz” veya “tuzlar” teriminin, tek başına veya Formüle (I) ait serbest bileşik ile karışım halinde bulunabilen ve tercihen farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar olan BİLEŞİK A’ya ait bir tuz olduğu anlaşılır. Bu tür tuzlar, örneğin, özellikle farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar olmak üzere, asit ilave tuzları olarak, tercihen organik veya inorganik asitler ile, bazik bir nitrojen atomu ile Formül (I) bileşiğinden oluşturulur. Uygun inorganik asitler, örneğin, halojen asitler, örneğin hidroklorik asit, sülfürik asit veya fosforik asittir. Uygun organik asitler örneğin karboksilik asitler veya sülfonik asitler, örneğin asetik asit, fumarik asit veya metansülfonik asittir. İzolasyon veya saflaştırma amaçlarına yönelik olarak ayrıca örneğin pikratlar veya perkloratlar gibi farmasötik olarak kabul edilebilir tuzların kullanılması mümkündür. Terapötik kullanım için sadece farmasötik olarak kabul

edilebilir tuzlar veya serbest bileşikler kullanılır (farmasötik preparatlar formunda uygulanabilir olduğunda) ve bunlar bu nedenle tercih edilir. Örneğin yeni bileşiklerin saflaştırılması veya tanımlanmasında, ara ürünler olarak kullanılabilen bu tuzlar dahil olmak üzere, serbest formdaki yeni bileşikler ile bunların tuzları formundakiler arasındaki yakın ilişki bakımından buradan önce ve buradan sonra serbest bileşiklere herhangi bir referans, uygun ve yararlı olduğunda, ayrıca uygun tuzlara refere eden şekilde anlaşılabacaktır. BİLEŞİK A tuzları tercihen farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarıdır; farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları oluşturan uygun ters iyonlar alanda bilinir. BİLEŞİK A'nın en çok tercih edilen bir tuzu asetat tuzudur.

10

Mevcut buluşa ait farmasötik kombinasyonlar MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içerir.

15 MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B), formüle (II) ait bir bileşiktir



20

MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B), PCT Başvuru No. WO 03/077914'te açıklanır ve bunun hazırlanmasına yönelik yöntemler örneğin burada Örnek 18'de açıklanmıştır.

25

Burada açıklananlar hariç mevcut buluşta kullanılan bileşikler, bir veya daha fazla asimetrik merkeze sahip olabilir ve PCT Başvuru No. WO03/077914'te açıklandığı üzere ayrı (R)- veya (S)-stereoizomerler olarak veya bunların karışımları olarak üretilir. Aksi gösterilenler hariç spesifikasyonda ve istemlerde belirli bir bileşiğin açıklaması veya adlandırması, her iki ayrı enantiyomeri, diastereomerik karışımı, rasemik veya başka maddeyi içermesi tasarlanır. Buna uygun olarak bu buluş ayrıca, bu buluşa ait bileşiklerin diastereomerik karışımları ve çözünük enantiyomerleri dahil bu

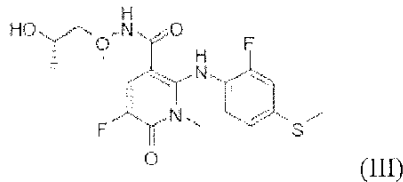
30

tür izomerlerini içerir. Diastereomerik karışımları, örneğin kromatografi veya fraksiyonel kristalizasyon aracılığıyla teknikte uzman kişilerce bilinen yöntemler ile bunların fiziksel kimyasal farklılıkları temelinde bunların ayrı diastereomerlere ayrılabilir. Enantiyomerler, diastereomerler ayrılarak ve ayrı diastereomerler karşılık gelen saf enantiyomerlere dönüştürülerek (örneğin hidrolize edilerek), uygun optik olarak aktif bir bileşik (örneğin alkol) ile reaksiyon aracılığıyla enantiyomer karışım bir diastereomerik karışıma dönüştürülmesi ile ayrılabilir. Stereokimyanın belirlenmesi ve stereoizomerlerin ayrılmasına yönelik yöntemler teknikte iyi bilinir (bakınız Chapter 4 of "Advanced organic Chemistry", 4th edition, J. March. John Wiley ve Sons, New York, 1992'deki tartışma).

Mevcut buluşa ait kombinasyonda kullanılabilen ek MEK inhibitörleri (S)-5-fluoro-2-(2-fluoro-4-(metilthio)fenilamino)-N-(2-hidroksipropoksi)-1-metil-6-okso-1,6-dihidropiridin-3-karboksamid (BİLEŞİK C), PD0325901 (Pfizer)(Bakınız PCT Yayın No. WO02/06213), PD-184352 (Pfizer), RDEA119 (Ardea Biosciences), GSK1120212 (GlaxoSmithKline)(Bakınız PCT Yayın No. WO05/121142), XL518 (Exelexis), AS-701255 (Merck Serono), AS-701173 (Merck Serono), AS703026 (Merck Serono), RDEA436 (Ardea Biosciences, E6201 (Eisai) (Bakınız Goto *et al*, Journal of Pharmacology ve Experimental Therapeutics, 3331(2): 485-495 (2009)), RO4987655 (Hoffmann-La Roche), JTP-74057, RG7167 ve/veya RG7420 içerir.

MEK inhibitör bileşiği (S)-5-fluoro-2-(2-fluoro-4-(metilthio)fenilamino)-N-(2-hidroksipropoksi)-1-metil-6-okso-1,6-dihidropiridin-3-karboksamid (BİLEŞİK C), bir formül (III) bileşiğidir

25



MEK inhibitör bileşiği (S)-5-fluoro-2-(2-fluoro-4-(metilthio)fenilamino)-N-(2-hidroksipropoksi)-1-metil-6-okso-1,6-dihidropiridin-3-karboksamid (BİLEŞİK C), PCT Başvuru No. WO2007/044084'e ait Örnek 25-BB'de açıklanır ve bunun hazırlanmasına yönelik yöntemler burada açıklanmıştır.

30

Mevcut buluşa ait kombinasyonda kullanılan MEK inhibitör bileşiği, 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B), veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur.

- 5 Mevcut tarifnameye ait kombinasyonda faydalı bir MEK inhibitör bileşiği ayrıca PD0325901 N-[2(R),3-Dihidroksipropoksi]-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-iyodofenilamino)benzamiddir (Bakınız PCT Yayın No. WO02/06213).

MEK inhibitörleri ile ilişkili olarak “tuz” veya “tuzlar” terimi, aksi gösterilmedikçe, mevcut buluşa ait bileşiklerinde bulunabilen asidik ve bazik gruplarının tuzlarını içerir. Yapı bakımından bazik olan mevcut buluşa ait bileşikler, çeşitli inorganik veya organik asitleri olan geniş çeşitlilikte tuzları oluşturabilir. Mevcut buluşa ait bu tür bazik bileşiklerin farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilave tuzlarını hazırlamak üzere kullanılabilen asitler, toksik olmayan asit ilave tuzlarını, diğer bir ifadeyle asetat, benzoat, bromid, klorid, sitrat, fumarat, hidrobromid, hidroklorid, iyodid, laktat, maleat, mandelat, nitrat, oksalat, salisilat, süksinat ve tartrat tuzlarını içeren farmasötik olarak kabul edilebilir anyonları içeren tuzları oluşturabilenlerdir. Mevcut buluşa ait tek bir bileşiğin birden fazla asidik veya bazik kısım içerebilmesi nedeniyle mevcut buluşa ait bileşikler tek bir bileşikte mono, di veya tri-tuzları içerebilir.

20

Mevcut buluşa ait bir bileşikte bir asidik kısım durumunda bir tuz, özellikle bir inorganik baz olmak üzere bir bazik bileşik ile mevcut buluşa ait bir bileşiğin işleme tabi tutulması ile oluşturulabilir. Tercih edilen inorganik tuzlar, lityum, sodyum, potasyum, baryum ve kalsiyum gibi alkali ve alkalın toprak metalleri ile oluşturulanlardır. Tercih edilen organik baz örneğin amonyum, dibenzilamonyum, benzilamonyum, 2-hidroksietilamonyum, bis(2-hidroksietil)amonyum, feniletilbenzilamin, dibenzil-etilendiamin, ve benzeri tuzları içerir. Asidik kısımların diğer tuzları örneğin prokain, kinin ve N-metilgluzoamin ile oluşturulan bu tuzları, artı glisin, ornitin, histidin, fenilglisin, lisin ve arjinin gibi bazik amino asitler ile oluşturulan tuzlar içerebilir. Özellikle tercih edilen bir tuz, mevcut buluşa ait bir bileşiğin bir sodyum veya potasyum tuzudur.

30

Bazik kısımlara göre bir tuz, mevcut buluşa ait bir bileşiğin özellikle inorganik bir asit olmak üzere asidik bir bileşik ile işleme tabi tutulması oluşturulur. Bu türde tercih edilen inorganik tuzlar, örneğin hidroklorik, hidrobromik, sülfürik, fosforik veya benzeri tuzları içerebilir. Bu türde tercih edilen organik tuzlar örneğin asetik, süksinik, sitrik, maleik,

35

fumarik, D-glutamik, glikolik, benzoik, sinnamik ve benzeri organik asitler ile oluşturulan tuzları içerebilir. Bu türde özellikle tercih edilen bir tuz, mevcut buluşa ait BİLEŞİK B'nin bir hidroklorid veya sülfat tuzudur.

- 5 Mevcut buluş için uygun BİLEŞİK B'nin ek farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, PCT Başvuru No. WO 03/077914 ve PCT Başvuru No. WO2007/044084'te açıklanan tuzları içerir.

- 10 Aksi belirtilmedikçe veya belirgin şekilde metin ile gösterilmedikçe mevcut buluşa ait farmasötik kombinasyonda faydalı terapötik ajanlara referans, bileşiklerin serbest bazını ve bileşiklerin tüm farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarını içerir.

- Kod no., jenerik veya ticari adları ile tanımlanan bileşiklerin yapısı, standart inceleme "The Merck Index" gerçek baskısından veya örneğin Patents International (IMS World
15 Publications) gibi veri tabanlarından alınabilir.

- Mevcut buluşa ait farmasötik kombinasyonlarda terapötik ajanlar olarak kullanılan bileşikler, sırasıyla alıntı yapılan belgelerde açıklanan şekilde hazırlanabilir ve uygulanabilir. Ayrıca yukarıda belirtildiği üzere iki ayrı terapötik ajanın kombinasyonu
20 bu buluş kapsamı içerisindedir, diğer bir ifadeyle bu buluş kapsamı içerisindeki farmasötik bir kombinasyon, üç terapötik ajanı veya daha fazlasını içerir.

- İstemlerde tanımlandığı üzere (a) bir PKC inhibitör bileşiği, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) en az bir MEK inhibitör bileşiği, veya farmasötik olarak
25 kabul edilebilir bir tuzu ve isteğe bağlı olarak farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren farmasötik bir kombinasyon, buradan sonra BULUŞA AİT bir KOMBİNASYON olarak refere edilecektir. Bu terim, PKC inhibitör bileşiği, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) MEK inhibitör bileşiği, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve isteğe bağlı olarak farmasötik olarak kabul edilebilir
30 bir taşıyıcıdan oluşan farmasötik bir kombinasyonu ifade edecek şekilde alınır, burada PKC inhibitörü ve MEK inhibitör bileşiği, tek terapötik bileşiklerdir.

- Mevcut buluşa göre kombinasyon partnerleri (a) bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1H-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1H-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya
35 farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) bir MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-

fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur.

- 5 Bir düzenlemede mevcut buluş, aşağıdakileri içeren kombine bir preparat ile ilgilidir: (i) kombinasyon partnerinin (a) bir veya daha fazla birim dozaj formu ve kombinasyon partnerinin (b) bir veya daha fazla birim dozaj formu.

- 10 Mevcut buluş özellikle buna ihtiyacı olan bir öznde bir proliferatif hastalığın tedavi edilmesi veya önlenmesi için faydalı BULUŞA AİT bir KOMBİNASYON ile ilgilidir. Mevcut buluşa ait bu düzenlemede BULUŞA AİT KOMBİNASYON, bir PKC inhibitör, 3-(1H-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1H-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A), veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve MEK inhibitör bileşiği, 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid, veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunun etkili bir
- 15 miktarını içeren, bir kombinasyon terapisinin özneye uygulanmasını içeren bir proliferatif hastalığın tedavisi veya önlenmesine yönelik kullanılır. Tercihen MEK inhibitör bileşiği, kombine edildiğinde faydalı bir etki saplayan terapötik olarak etkili dozajlarda uygulanır. Uygulama eş zamanlı veya sıralı olabilir.

- 20 BULUŞA AİT KOMBİNASYON ile tedavi edilen veya önlenen proliferatif hastalık esas olarak tümör ve/veya kanserdir. Proliferatif hastalıkların örnekleri melanom, özellikle uveal melanom, metastatik uveal melanom, GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom ve kanser, ve daha belirgin olarak uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant metastatik uveal melanom içerir.

25

- Mevcut buluşa ait bir düzenlemede proliferatif hastalık, bir solid tümördür. "Solid tümör" terimi özellikle melanom, özellikle uveal melanom örneğin metastatik uveal melanomu ifade eder. Ek olarak tümör tipine ve kullanılan belirli kombinasyona bağlı olarak tümör hacmindeki bir azalma elde edilebilir. Burada açıklanan kombinasyonlar ayrıca
- 30 tümörlerin metastatik yayılımını ve mikro metastazların büyümesini veya gelişmesini önlemek için uygundur. Burada açıklanan kombinasyonlar özellikle metastatik uveal melanoma sahip bu tür kötü prognozlu hastalar olmak üzere kötü prognozlu hastaların tedavisi için özellikle uygundur.

İlave bir düzenlemede proliferatif hastalık, melanom, özellikle uveal melanom, örneğin metastatik uveal melanomdur.

5 İlave bir düzenlemede proliferatif hastalık, uveal melanom, örneğin metastatik uveal melanomdur.

BULUŞA AİT KOMBİNASYONUN, yalnızca mevcut buluşa göre proliferatif bir hastalığın tedavisi için kullanılabildiği anlaşılabacaktır.

10 BULUŞA AİT KOMBİNASYONU içeren kombinasyon terapisinin, mono terapi ile karşılaştırıldığında proliferatif hastalıkların tedavisi veya önlenmesinde beklenmeyen gelişme ile sonuçlandığı bulunmuştur. Eş zamanlı olarak, sıralı olarak veya ayrı olarak uygulandığında PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) ve the MEK inhibitör bileşiği 6-(4-bromo-2-
15 fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid, (BİLEŞİK B), hücre proliferasyonunu inhibe etmek üzere sinerjik olarak etkilime girer.

20 Proliferatif hastalıkların yapısı çok bileşenlidir. Belirli şartlar altında farklı hareket mekanizmaları olan ilaçlar kombine edilebilir. Ancak sadece farklı hareket moduna sahip terapötik ajanların herhangi bir kombinasyonunun göz önünde bulundurulması zorunlu olarak, çeşitli etkilere sahip kombinasyonlara yol açmaz.

25 Buluşa ait bir farmasötik kombinasyonun uygulanması sadece *örneğin* semptomların hafifletilmesi, ilerlemesinin geciktirilmesi veya inhibe edilmesine göre faydalı bir etki *örneğin* sinerjik terapötik bir etki ile değil aynı zamanda buluşa ait kombinasyonda kullanılan farmasötik olarak terapötik ajanların sadece birinin uygulandığı bir mono terapi ile karşılaştırıldığında ilave şaşırtıcı faydalı etkiler, *örneğin* daha az yan etki, gelişmiş bir yaşam kalitesi veya azalmış bir hastalık oranı ile sonuçlanabilir.

30

İlave bir fayda, örneğin sadece genellikle daha küçük olması gereken değil aynı zamanda genellikle daha az uygulanan ve tek başına kombinasyon partnerlerinin biri ile gözlenen yan etkilerin oluş sıklığını azaltmak amacıyla kullanılabilen dozlar olmak üzere BULUŞA AİT KOMBİNASYONUN terapötik ajanlarının düşük dozlarının
35 kullanılabilmesidir. Bu, tedavi edilecek hastaların istekleri ve gereksinimlerine göredir.

Belirli test modelleri aracılığıyla BULUŞA AİT bir KOMBİNASYONUN burada daha önce açıklanan faydalı etkiler ile sonuçlandığı gösterilebilir. Teknikte uzman kişinin bu tür faydalı etkilerini kanıtlamak üzere ilgili bir test modelini seçmesi tam olarak sağlanır.

- 5 BULUŞA AİT bir KOMBİNASYONUN farmakolojik aktivitesi örneğin, esas olarak buradan sonra açıklanan bir test prosedüründe veya klinik bir çalışmada gösterilebilir.

- Uygun klinik çalışmaları özellikle, örneğin, bir proliferatif hastalığı olan hastalarda açık etiketli, doz arttırma çalışmalarıdır. Bu tür çalışmalar özellikle BULUŞA KOMBİNASYONUNA ait terapötik ajanların sinerjisini kanıtlar. Proliferatif hastalıklar üzerindeki faydalı etkileri direkt olarak teknikte uzman bir kişi tarafından olduğu gibi bilinen bu çalışmaların sonuçları yoluyla belirlenebilir. Bu çalışmalar, özellikle, terapötik ajan ve BULUŞA AİT bir KOMBİNASYON kullanılarak mono terapi etkilerinin karşılaştırılması için uygun olabilir.

15

- Bir düzenlemede PKC inhibitör bileşiği A dozu, Maksimum Tolere Edilen Dozaja ulaşılana kadar arttırılır ve mevcut buluşa ait bir MEK inhibitör bileşiği, sabit bir doz ile uygulanır. Alternatif olarak PKC inhibitör bileşiği A, sabit bir dozda uygulanabilir ve mevcut buluşa ait en azından MEK inhibitörünün dozu arttırılabilir. Her bir hasta, günlük olarak veya aralıklı olarak mevcut buluşa ait bir MEK inhibitörü ve/veya PKC inhibitör bileşiği A'nın dozlarını alabilir. Tedavi etkinliği, bu tür çalışmalarda *örneğin* semptom skorlarının değerlendirilmesi ile 12, 18 veya 24 hafta sonra örneğin her 6 haftada belirlenebilir.

- 25 Buluşa göre MEK inhibitörü, BİLEŞİK B veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur. Tercih edilen bir düzenlemede MEK inhibitörü, BİLEŞİK B'dir.

- Bir veya daha fazla bileşen arasındaki sinerjik bir etkileşimin belirlenmesinden sonra etkiye yönelik optimum aralık ve etkiye yönelik her bir bileşenin mutlak doz aralıkları, farklı w/w oran aralıklarında bileşenlerin ve tedaviye ihtiyacı olan hastalara dozların uygulanması ile tam olarak ölçülebilir.

- Mevcut buluşa ait tercih edilen bir düzenlemede BULUŞA AİT KOMBİNASYON, örneğin uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom, tercihen GNAQ veya GNAQ11'de uveal melanom barındıran

35

mutasyonlar gibi bir proliferatif hastalığın tedavisi veya önlenmesinde kullanıma yönelik bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) olan bir MEK inhibitör bileşiği veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içerir.

Bir açıda mevcut buluş, sinerjik bir etkileşimi tanımlamak üzere kullanılan, örneğin aşağıdaki Örneklerde açıklanan şekilde, bir tümör modelinde gözlemlenen aralıklara karşılık gelen mevcut buluşa ait (a) bir PKC inhibitör bileşiği 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) bir MEK inhibitör bileşiğini içeren insan uygulamasına yönelik sinerjik bir kombinasyon sağlar.

İlave bir açıda mevcut buluş, mevcut buluşa ait (a) bir PKC inhibitör 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu, ve (b) bir MEK inhibitör bileşiği, BİLEŞİK B veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren insanlara uygulamaya yönelik sinerjik bir kombinasyon sağlar, burada her bir bileşenin doz aralığı, esas olarak sinerjik bir etkileşimi tanımlamak üzere kullanılan, örneğin aşağıdaki Örneklerde açıklanan tümör modelleri olmak üzere uygun bir tümör modelinde gözlenen sinerjik aralıklara karşılık gelir.

Bu buluşun bir amacı, BULUŞA AİT KOMBİNASYONU içeren bir proliferatif hastalığa karşı birlikte terapötik olarak etkili olan bir miktar içeren farmasötik bir bileşimin sağlanmasıdır. Bu bileşimde kombinasyon partnerleri (a) ve (b), uygun herhangi bir yolda aynı zamanda ancak ayrı olarak uygulanan veya sıralı olarak uygulanan tek bir formülasyon veya birim dozaj formunda uygulanabilir. Birim dozaj formu da sabit bir kombinasyon olabilir.

30

Her iki kombinasyon partnerinin ayrı uygulanmasına yönelik veya sabit bir kombinasyon halinde uygulamaya yönelik farmasötik bileşimler, *diğer bir ifadeyle* BULUŞA AİT KOMBİNASYONU içeren tek bir galenik bileşim, *kendi başına* bilinen bir şekilde hazırlanabilir ve özellikle enteral veya parenteral uygulama için uygun, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ile kombinasyon halinde veya

35

örneğin yukarıda gösterildiği üzere, tek başına en az bir farmasötik olarak aktif kombinasyonun terapötik olarak etkili bir miktarını içeren, insanlar dahil olmak üzere memelilere (sıcak-kanlı hayvanlara) enteral, *örneğin* oral veya rektal veya parenteral uygulama için uygun olanlardır.

5

Yeni farmasötik bileşim, yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %99.9, tercihen yaklaşık %1 ila yaklaşık %60 terapötik ajan içerebilir.

Enteral veya parenteral uygulamaya yönelik kombinasyon terapisine yönelik uygun farmasötik bileşimler, *örneğin*, şeker kaplı tabletler, tabletler, kapsüller veya supozituarlar veya ampuller gibi birim dozaj formunda olanlardır. Aksinin gösterilmemesi halinde bunlar, *örneğin* çeşitli klasik karıştırma, ufalama, direkt sıkıştırma, granüle etme, şeker kaplama, çözündürme, liyofilize etme prosesleri veya teknikte uzman kişiler için kolay bir şekilde görünür olan üretim teknikleri yoluyla *kendi*

15 *başına* bilinen bir şekilde hazırlanır. Her bir dozaj formunun her bir dozunda bulunan bir kombinasyon terapisinin birim içeriğinin, gerekli etkili miktarın birçok dozaj biriminin uygulanması yoluyla ulaşılabilmesi nedeniyle kendi kendine etkili bir miktar oluşturması gerekmediği kabul edilecektir.

20 Ajanların kombinasyonunun ayrı ajanları ve ajanların kombinasyonunu içeren bir birim dozaj formu, *örneğin* bir jelatin kapsül olmak üzere bir kapsül içerisinde kapatılan mikro tabletler formunda olabilir. Buna yönelik olarak, farmasötik formülasyonda kullanılan gibi bir jelatin kapsül, *örneğin* Pfizer'den temin edilebilen, CAPSUGEL olarak bilinen sert jelatin kapsül kullanılabilir.

25

Mevcut buluşa ait birim dozaj formları isteğe bağlı olarak ayrıca ek klasik taşıyıcıları veya farmasötiklere yönelik kullanılan eksipyanları içerebilir. Bu tür taşıyıcıların örnekleri bunlarla sınırlı olmamak üzere ayırıcılar, bağlayıcılar, yağlayıcılar, glidanlar, stabilizörler ve dolgu maddeleri, seyrelticiler, renklendiriciler, lezzet vericiler ve

30 koruyucuları içerir. Teknike uzman bir kişi, rutin deney yoluyla ve gereksiz herhangi bir yük olmaksızın dozaj formunun belirli istenen özelliklerine göre yukarıda açıklanan taşıyıcıların bir veya daha fazlasını seçebilir. Kullanılan her bir taşıyıcının miktarı, teknikte klasik aralıkları içerisinde değişkenlik gösterebilir. Aşağıdaki referanslar, oral dozaj formlarını formüle etmek üzere kullanılan teknikleri ve eksipyanları açıklar.

35 Bakınız The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, Rowe et al., Eds.,

American Pharmaceuticals Association (2003); ve Remington: the Science ve Practice of Pharmacy, 20th edition, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2003).

Bu ek klasik taşıyıcılar, granülasyondan önce veya sırasında bir veya daha fazla klasik taşıyıcının başlangıç karışımına eklenmesi ile ve bir veya daha fazla klasik taşıyıcının ajanların kombinasyonu veya oral dozaj formunda ajanların kombinasyonunun ayrı ajanlarını içeren granüller ile kombine edilmesi ile oral dozaj formunda eklenebilir. Sonraki düzenlemede kombine edilen karışım, örneğin bir V-karıştırıcı yoluyla ayrıca karıştırılabilir ve daha sonra sıkıştırılabilir veya örneğin bir monolitik tablet, gibi bir tablet halinde kalıplanabilir, bir kapsül ile kapsüllenebilir veya bir şaseye doldurulabilir.

Farmasötik olarak kabul edilebilir ayırıcıların örnekleri nişastalar; killer, selülozlar, aljinatlar, zamklar, çapraz bağlı polimerler, örneğin çapraz bağlı polivinil pirolidon veya krospovidon, örneğin International Specialty Products2dan (Wayne, NJ) POLYPLASDONE XL; çapraz bağlı sodyum karboksimetilselüloz veya kroskarmeloz sodyum, örneğin FMC'den AC-DI-SOL ve çapraz bağlı kalsiyum karboksimetilselüloz; soya polisakkaritler ve guar zımkı içerir. Ayırıcı, ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %10 bileşim aralığında bulunabilir. Bir düzenlemede ayırıcı, ağırlıkça yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %5 bileşim aralığındaki bir miktarda bulunur.

20

Farmasötik olarak kabul edilebilir bağlayıcıların örnekleri nişastalar; selülozlar ve derivelerini, örneğin mikrokristalin selüloz, örneğin FMC'den AVICEL PH (Philadelphia, PA), hidroksipropil selüloz hidroksietil selüloz ve hidroksipropilmetil selüloz Dow Chemical Corp.'dan (Midland, MI) METHOCEL; sukroz; dekstroze; mısır şurubu; polisakkaritler ve jelatin içerir. Bağlayıcı, ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %50, örneğin %2-20 bileşim aralığında bir miktarda bulunur.

25

Farmasötik olarak kabul edilebilir yağlayıcılar ve farmasötik olarak kabul edilebilir glidanların örnekleri koloidal silika, magnezyum trisilikat, nişastalar, talk, tribazik kalsiyum fosfat, magnezyum stearat, alüminyum stearat, kalsiyum stearat, magnezyum karbonat, magnezyum oksit, polietilen glikol, toz haline getirilmiş selüloz ve mikrokristalin selüloz içerir. Yağlayıcı, ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %10 bileşim aralığındaki bir miktarda bulunabilir. Bir düzenlemede yağlayıcı, ağırlıkça yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %1.5 bileşim aralığındaki bir miktarda bulunabilir. Glidan, ağırlıkça yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %10 aralığındaki bir miktarda bulunabilir.

35

Farmasötik olarak kabul edilebilir dolgu maddeleri ve farmasötik olarak kabul edilebilir seyrelticilerin örnekleri pudra şekeri, sıkıştırılabilir şeker, dekstratlar, dekstrin, dekstroz, laktoz, mannitol, mikrokristalin selüloz, toz haline getirilmiş selüloz, sorbitol, sukroz ve talk içerir. Dolgu maddesi ve/veya seyreltici örneğin ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %80 bileşim aralığındaki bir miktarda bulunabilir.

Bir düzenlemede mevcut buluş ayrıca buna ihtiyacı olan bir özneye bir proliferatif hastalığın tedavisi veya önlenmesine yönelik farmasötik bir bileşim veya ilacın hazırlanmasında kullanıma yönelik BULUŞA AİT bir KOMBİNASYON ile ilgilidir.

Mevcut buluşa göre BULUŞA AİT KOMBİNASYONUN kombinasyon partnerinin her birinin terapötik olarak etkili bir miktarı eş zamanlı olarak veya sıralı olarak ve herhangi bir sırada uygulanabilir ve bileşenler, ayrı olarak veya sabit bir kombinasyon olarak uygulanabilir. Örneğin buluşa göre bir proliferatif hastalığın tedavi edilmesi yöntemi, *örneğin* burada açıklanan miktarlara karşılık gelen günlük veya aralıklı dozajlarda, tercihen sinerjik olarak etkili miktarlarda, birlikte terapötik olarak etkili miktarlarda, herhangi bir sırada eş zamanlı olarak veya sıralı olarak (i) serbest veya farmasötik olarak kabul edilebilir toz formunda birinci ajanın (a) ve (ii) serbest veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuz formunda bir ajanın (b) uygulanmasını içerebilir. BULUŞA AİT KOMBİNASYONUN ayrı kombinasyon partnerleri, terapi süresince farklı zamanlarda ayrı olarak veya bölünmüş veya tekli kombinasyon formlarında aynı zamanda uygulanabilir. Ek olarak “uygulama” terimi ayrıca olduğu gibi kombinasyon partnerine *in vivo* dönüşen bir kombinasyon partnerinin bir ön ilacının kullanımını kapsar. Bu nedenle mevcut buluş, bu tür eş zamanlı veya alternatif tedavi rejimlerinin tümünü kapsadığı anlaşılır ve “uygulama” terimi buna uygun şekilde yorumlanacaktır.

BULUŞA AİT KOMBİNASYONDA kullanılan kombinasyon partnerlerinin her birinin etkili dozajı, kullanılan belirli bileşik veya farmasötik bileşim, uygulama modu, tedavi edilen durum ve tedavi edilen durumun ciddiyetine bağlı olarak değişkenlik gösterilebilir. Dolayısıyla BULUŞA AİT KOMBİNASYONUN dozaj rejimi, uygulama yolu ve hastanın renal ve hepatik fonksiyonu dahil çeşitli faktörlere göre seçilir. Bir klinik tedavi uzmanı veya uzman hekim, durumun ilerlemesini hafifletmek, ters çevirmek veya duraklatmak üzere gerekli tek terapötik ajanların etkili miktarını kolay bir şekilde belirleyebilir veya reçete yazabilir.

Toksisite olmaksızın etkinlik sağlayan BULUŞA AİT KOMBİNASYONUN kombinasyon partnerlerinin (a) ve (b) optimum oranları, ayrı veya kombine dozajları ve konsantrasyonları, terapötik ajanların hedef alanlara ulaşılabilirlik kinetiklerine dayanır ve teknikte uzman kişilerce bilinen yöntemler kullanılarak belirlenebilir.

Kombinasyon partnerlerinin her birinin etkili dozajı, kombinasyon halinde diğer bileşik(ler) ile karşılaştırıldığında bileşik(lerin) daha sık uygulamasını gerektirebilir. Bu nedenle uygun dozlamaya izin vermek üzere paketlenmiş farmasötik ürünler, bileşiklerin kombinasyonunu içeren bir veya daha fazla dozaj formu ve bileşiklerin kombinasyonunun birini içeren ancak kombinasyonun diğer bileşik(lerini) içermeyen bir veya daha fazla dozaj formunu içerebilir.

BULUŞA AİT KOMBİNASYONDA kullanılan kombinasyon partnerleri, tek ilaçlar olarak pazarlanan formda uygulandığında bunların dozajı ve uygulama modu, burada başka şekilde açıklanmadığı sürece ilgili pazarlanan ilacın paket eki üzerinde sağlanan bilgiye uygun şekilde olabilir.

PKC inhibitör bileşiği BİLEŞİK A, tek veya bölünmüş dozlarda, her gün için kg vücut ağırlığı başına yaklaşık 0.05 ila yaklaşık 50 mg, tercihen yaklaşık 0.1-25 mg/kg/gün, daha çok tercihen yaklaşık 0.5-10 mg/kg/gün aralığında etkili bir dozajda tek veya bölünmüş dozlarda günlük olarak uygun bir özneye uygulanabilir. 70 kg'lık bir insan için bu, her gün için yaklaşık 35-700 mg'lık tercih edilebilir bir dozaj aralığı miktarı olabilir.

MEK inhibitör bileşiği BİLEŞİK B, tek veya bölünmüş dozlarda, her gün için kg vücut ağırlığı başına yaklaşık 0.001 ila yaklaşık 100, tercihen yaklaşık 1 ila yaklaşık 35 mg/kg/gün aralığında etkili bir dozajda tek veya bölünmüş dozlarda günlük olarak uygun bir özneye uygulanabilir. 70 kg'lık bir insan için bu, yaklaşık 0.05 ila 7 g/gün, tercihen yaklaşık 0.05 ila yaklaşık 2.5 g/günlük tercih edilebilir bir dozaj aralığı miktarı olabilir.

Bir proliferatif hastalığın tedavisine yönelik olarak her bir kombinasyon partnerinin optimal dozajı, bilinen yöntemler kullanılarak her bir birey için empirik olarak belirlenebilir ve bunlarla sınırlı olmamak üzere hastalığın ilerleme derecesi; bireyin yaşı, vücut ağırlığı, genel sağlığı, cinsiyeti ve beslenmesi; uygulama süresi ve yolu ve

bireyin aldığı diğer ilaçlar dahil çeşitli faktörlere bağlı olacaktır. Optimal dozajlar, teknikte iyi bilinen rutin test ve prosedürler kullanılarak belirlenebilir.

5 Tek bir dozaj formu üretmek üzere taşıyıcı materyaller ile kombine edilebilen her bir kombinasyon partnerinin miktarı, tedavi edilen bireye ve belirli uygulama moduna bağlı olarak değişkenlik gösterecektir. Bazı düzenlemelerde burada açıklanan ajanların kombinasyonunu içeren birim dozaj formları, ajanlar tek başına uygulandığında tipik olarak uygulanan kombinasyonun her bir ajanının miktarlarını içerecektir.

10 Dozaj sıklığı, kullanılan bileşik ve tedavi edilecek veya önleneyecek belirli duruma bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Genellikle etkili terapi sağlamak üzere yeterli minimum dozaj kullanımı tercih edilir. Hastalar genellikle teknikte uzman kişiler için bilindik olacak, tedavi edilen veya önlenen durum için uygun analiz kullanılarak terapötik etkinlik için gözlenebilir.

15

Mevcut tarifname, bir proliferatif hastalığa karşı birlikte terapötik olarak etkili olan bir miktarda BULUŞA AİT bir KOMBİNASYONUN söz konusu özneye uygulanmasını içeren proliferatif hastalığı olan bir öznenin tedavi edilmesine yönelik bir yöntem ile ilgilidir. Özellikle BULUŞA AİT bir KOMBİNASYON ile tedavi edilecek proliferatif hastalık melanom, uveal melanom, metastatik uveal melanom, GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom ve GNAQ veya GNA11 mutant metastatik uveal melanomdan seçilir.

20

Ek olarak tedavi ameliyat veya radyo terapiyi içerebilir.

25

Mevcut buluş ayrıca bir proliferatif hastalık, özellikle kanser, örneğin uveal melanom, metastatik uveal melanom, GNAQ veya GNA11 mutant uveal melanom ve kanser ve daha belirgin olarak uveal melanom, metastatik uveal melanom, ve GNAQ veya GNA 11 mutant metastatik uveal melanom tedavisinde kullanıma yönelik BULUŞA AİT KOMBİNASYON ile ilgilidir.

30

Mevcut buluş ayrıca buna ihtiyacı olan bir özneye bir proliferatif hastalığın ilerlemesi veya tedavisinin gecikmesinde kullanıma yönelik eş zamanlı, ayrı veya sıralı uygulanmasına yönelik talimatlar ile birlikte, terapötik ajanlar olarak BULUŞA AİT KOMBİNASYONU içeren ticari bir paket sağlar.

35

Aşağıdaki ÖRNEKLER, yukarıda açıklanan buluşu gösterir; Mevcut buluşa ait farmasötik kombinasyonun faydalı etkileri ayrıca ilgili teknikte uzman kişi için olduğu gibi bilinen diğer test modelleri ile belirlenebilir.

5

ÖRNEKLER

ÖRNEK 1

10 Hücre hatları ve hücre kültürü

92.1 ve OMM-1 uveal melanom hücre hatları, %10 fetal bovin serum ile arttırılan Roswell Park Memorial Institute ortamında (RPMI 1640) (American Type Culture Collection (ATCC #30-2001)) kültürlenmiştir ve 37°C/%5 karbon dioksitte inkübe edilmiştir. 92.1 hücre hattı, bir GNAQ mutasyonuna sahiptir ve OMM1 hücre hattı, GNA11'de bir mutasyon barındırır.

15

İn vitro deneye yönelik bileşik hazırlanışı

20 3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion, buradan sonra AEB071'in ve 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid, buradan sonra BİLEŞİK B'nin bileşik stokları 10 mM'lik nihai bir konsantrasyonda dimetilsüfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanmıştır.

25 xCELLigence aracılığıyla proliferasyon ölçümü

Uveal hücrelerin büyümesi, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile sürekli olarak izlenmiştir. E-plakalar (Roche #05 232 368 001), göz başına her 100 µl için 3000 hücrelik nihai bir konsantrasyonda eklenen hücreler ile inkübe edilmiştir. Empedans, 24 saat boyunca her 2 saat ölçülmüştür. 24 saat sonra DMSO, BİLEŞİK B, AEB071 veya her iki bileşik, 120 µl'lik toplam bir hacme bileşik başına 1 µM'lik nihai bir konsantrasyonda gözlene eklenmiştir. Empedans, 7 gün boyunca her 2 saatte ölçülmüştür. Veriler, bileşik ilavesinden önceki 0. güne normalleştirilmiştir.

30

3-(1*H*-indol-3-il)-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-kinazolin-4-il]-1*H*-pirol-2,5-dion (BİLEŞİK A) ve 6-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-7-fluoro-3-metil-3*H*-benzoimidazol-5-karboksilik asit (2-hidroksietoksi)-amid (BİLEŞİK B) on uveal melanom proliferasyonunun *in vitro* etkisi gösterilir (Şekil 1). 6 günlük süre boyunca uveal melanom hücre hatlarının büyümesi, 0.5µM DMSO, 0.5µM AEB071, 0.5µM BİLEŞİK B veya 0.5µM AEB071 + 0.5µM BİLEŞİK B varlığında xCELLigence teknolojisi ile ölçülmüştür. Sırasıyla GNAQ ve GNA11 mutasyonlarına sahip olan 92.1 ve OMM1 hücre hatlarında, AEB071 gecikmiş hücre büyümesi; bu etki, BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde olduğunda artırılmıştır. Tek bir ajan olarak BİLEŞİK B, her iki uveal melanom hücre hattı 92.1 ve OMM1'in büyümesi üzerinde ılımlı bir etkiye sahiptir; iki ajan kombinasyonunun her iki hücre hattının proliferasyonunu tamamen baskılayabildiği oldukça etkileyicidir.

ÖRNEK 2

15 Hücre hatları ve Hücre Kültürü

Örnek 1'e göre

İn vitro deneye yönelik bileşik hazırlanışı

20

Örnek 1'er göre.

Kombinasyon doz matrisinde hücre proliferasyonu

25 Hücreler, 96 gözlü plakalarda (Costar #3904) göz başına 100 µl'lik ortam başına 3000 hücrelik bir yoğunlukta tohumlanmıştır ve bileşik ilavesinden önce bir gece inkübe edilmiştir. Bileşik stoğu uygun kültür ortamında taze olarak hazırlanmıştır ve manuel olarak üç kopya halinde elektronik çok kanallı pipet aracılığıyla plakalara eklenmiştir. Hücreler, tek başına bileşik ile ve 0.039 µM ila 10 µM aralığında on noktalı bir dilüsyon için 1:2 seyreltilen bir AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonu ile işleme tabi tutulmuştur. Hücrelerin canlılığı, bileşik ilave zamanında ve üreticinin protokolüne göre Cell Titer Glo (Promega #G7571) vasıtasıyla hücresel ATP'nin miktarının belirlenmesi yoluyla 144 saatlik işlemten sonra değerlendirilmiştir. Plakalar, bir lüminesans plaka okuyucu (Victor X4, Perkin Elmer) üzerinde okunmuştur. Büyümenin fraksiyonel inhibisyonu, 35 Xlfit kullanılarak hesaplanmıştır ve bileşik olmayan gözlere normalleştirilmiştir.

Büyüme inhibisyonuna yönelik olarak 0. gün değerleri, inhibisyon hesaplanmadan önce çıkartılmıştır. Veri, büyüme inhibisyonu, inhibisyon ve HSA fazlalığını hesaplamak üzere Chalice yazılımı (<http://chalice.zalocus.com/documentation/analyzer/index.jsp>) ile analiz edilmiştir.

5

SONUÇLAR

BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde AEB071'in anti-proliferatif etkisi, Şekil 2'de gösterildiği üzere iki ajan arasındaki sinerjiden kaynaklanır. Şekil 2, 92.1 hücre hattında iki ajan arasındaki sinerji desenlerine yakın bir görüş sağlar. İki ajan arasındaki doz matriksi gösterilir; işlem görmemiş hücrelere göre hücre büyümesi üzerindeki etki süt panelde gösterilir, merkez panelde aşırı inhibisyon (HSA) ve sıfırıncı gün normalizasyonuna göre büyüme inhibisyonu alt panelde gösterilir. Büyüme inhibisyonu, inhibisyon ve HSA fazlalığına yönelik hesaplama yöntemleri teknikte bilinir.

15

Her iki tek ajan BİLEŞİK B ve AEB071, hücre hattı 92.1'de aktiftir ancak önemli şekilde iki ajanın kombine edilmesi, düşük dozlarda ilave yanıt büyüklüklerinden fazlasını sağlamıştır. Örneğin 0.16 μ M tek ajan BİLEŞİK B, %57'lik bir büyüme inhibisyonu sağlamıştır ve 0.16 μ M'de tek ajan AEB071, %19 büyüme inhibisyonu sağlamıştır ancak bu dozlarda iki ajanın kombinasyonu %82'lik bir büyüme inhibisyonu sağlamıştır (Şekil 2, üst panel). Bu doz kombinasyonu, Şekil 2 orta panelde görüldüğü üzere 25 olan bir aşırı inhibisyonu temsil etmiştir. Tüm doz kombinasyonlarına yönelik inhibisyon ve aşırı inhibisyon değerleri Şekil 2'de görülebilir. 3 günlük analiz boyunca hücrelerin büyüme hızı, Şekil 2, alt panelde gösterilen büyüme inhibisyon yüzdesinin hesaplanması için hesaba katılmıştır. %100 gösterilen durağanlık, hücrelerin büyümediğini ve analiz süresince ölmediği anlamına gelir, 100'den fazla değerler ölümü gösterir, 200 tam hücre ölümüdür ve 100'ün altındaki değerler, analizin başlangıcından 3 günlük son noktaya kadar büyümeyi gösterir.

ÖRNEK 3: Uveal melanom hücre hatları 92.1 ve OMM1'in ilaç tedavisini takiben protein immünoiblot aracılığıyla biyokimyasal profil.

Uveal melanom hücreleri 0.5 μ M AEB071, 0.5 μ M BİLEŞİK B, her iki bileşik veya tek başına DMSO ile inkübe edilmiştir. Hücreler, PhosStop Fosfataz inhibitör kokteyl tableti (Roche Diagnostics #04 906 837 001) ve Tam Fosfataz İnhibitör kokteyl tableti (Roche

35

Diagnostics # 11 836 145 001) içeren M-PER memeli protein ekstraksiyonunda 2, 4, 8, 24 veya 48 saatlik işlem sonrasında parçalanmıştır. Proteinler, bir %4-12 Bis-Tris NuPAGE SDS jel (Invitrogen #WG1403Bx10) üzerinde ayrılmıştır ve daha sonra bir kuru blotlama sistemi (Invitrogen iBLOT) kullanılarak bir nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Proteinler, anti-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies # 4377), anti-pMARCKS (Cell Signaling Technologies #2741), anti-pMEK1/2 (Cell Signaling Technologies # 9121) ve anti-Beta Aktin (Ambion# AM4202) 1:1000 dilüsyonları ile tespit edilmiştir. Beta aktin, uygun ikincil antikor ve üretici protokolüne göre bir kıvılcıkta boya tespit sistemi (Odyssey IRDye, LI-COR) kullanılarak tespit edilmiştir. Diğer tüm proteinler, bir anti-tavşan-HRP ikincil antikor kullanılarak tespit edilmiştir ve bir Syngene görüntüleme sisteminde SuperSignal West Dura Kemilüminesan Substrat (Thermo Scientific # 34076) ile geliştirilmiştir.

SONUÇLAR

15

Bu ajanların biyokimyasal etkisi, uveal melanom hücre hatları 92.1 ve OMM-1'de 0.5 μ M AEB071, 0.5 μ M BİLEŞİK B veya birlikte her bir ajanın 0.5 μ M'si ile tedaviyi takiben analiz edilmiştir. pMARCKS seviyesi, azaltılmıştır (Şekil 3). BİLEŞİK B'nin AEB071'e eklenmesi, pMARCKS ifadesi üzerinde herhangi bir ilave etkiye sahip değildir. Aynı hücrelerin BİLEŞİK B ile tedavisi, pERK1/2 seviyelerinde bir azalmaya yol açmıştır, 2 saatte görülebildiği üzere 24 saate kadar pERK1/2 ifadesi dönmeye başlamıştır. Ek olarak tek ajan BİLEŞİK B tedavisi, her iki hücre hattında zamanla pMEK1/2 ifadesinin indüksiyonuna yol açmıştır; bu 48 saatlik tedaviyi takiben açık bir şekilde gözlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde sadece AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonu, pERK1/2, pMEK1/2'nin sürekli baskısını sağlamıştır. Önemli bir şekilde AEB071, BİLEŞİK B tek ajan tedavisinden kaynaklı pMEK indüksiyonunu belirgin şekilde önlemiştir. AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonu, yolak bileşenlerini tek ajana kıyasla daha çok büyüklüğe ve devam süresine baskılamıştır.

30

Bir GNAQ mutasyonuna sahip 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenogrefti, AEB071, BİLEŞİK B ve Örnekler 4, 5 ve 6'da gösterildiği üzere bir AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonunun *in vivo* aktivitesini değerlendirmek üzere kullanılmamıştır. Elde edilen sonuçlardan görülebildiği üzere BİLEŞİK B ile AEB071 arasında gözlenen *in vitro* sinerji, *in vivo* etkinliği transle etmiştir. Şekil 4'te görüldüğü üzere mono terapi AEB071 tedavisi, %3'lük bir T/C ($p < 0.01$) ile sonuçlanmıştır, 3.5mg/kg'de günlük iki kez

35

dozlanan BİLEŞİK B'nin AEB071 rejimine ilavesi -%22 T-T0 sağlamıştır ($p < 0.001$ medyan aktivitesi ancak tek başına AEB071'e kıyasla önemli değildir). BİLEŞİK B, %84'lük bir T/C ile kendi içinde herhangi bir aktiviteye sahip değildir. İki bileşiğin kombinasyonu, *in vivo* uveal melanom 92.1 modelindeki tümör büyümesini güçlü şekilde önlemiştir. Ek olarak BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde çoklu AEB071 dozlarında tedavi, Şekil 6'da gösterildiği üzere 92.1 *in vivo* uveal melanom modelinde etkilidir. Kombinasyon etkinliği, daha büyük bir yanıt büyüklüğü sağlayan BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde artan AEB071 dozu ile, doza bağımlı bir şekilde artmıştır.

10 **ÖRNEK 4: 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenograft modelinde *in vivo* aktivitenin değerlendirilmesi.**

İn vivo deneye yönelik bileşik hazırlanışı

- 15 NVP-AEB071 (ayrıca AEB071 olarak refere edilir) (asetat tuzu, %87.96 serbest baz) tozu, Araç 1 olarak tasarlanan su içerisinde 5 dekstrozun (D5W) %75'ine eklenmiştir ve berrak kırmızı bir solüsyon elde etmek üzere karıştırılmıştır. NVP-BİLEŞİK B (ayrıca BİLEŞİK B olarak refere edilmiştir), iyondan arındırılmış su içerisinde 1 karboksimetil selüloz: %0.5 Tween® 80 içinde homojen bir süspansiyon olarak formüle edilmiştir.
- 20 Taze bir süspansiyon, her bir bileşik için her hafta başına bir kez hazırlanmıştır ve 4°C'de depolanmıştır.

Fareler

- 25 Dişi atimik çıplak fareler (CrI:NU(Ncr)-Foxn1nu, Charles River), 9 haftalıktır ve çalışmanın D1 zamanında 20.6-26.9 g aralığında bir vücut ağırlığına (BW) sahiptir. Hayvanlar istenildiği zaman su (revers osmoz, 1 ppm Cl) ve %18.0 ham protein, %5.0 ham yağ ve %5.0 ham fiberden oluşan NIH 31 Modifiye ve Işınlanmış Lab Diet® ile beslenmiştir. Fareler, 20-22°C (68-72°F) ve %40-60 nemde 12 saatlik bir ışık
- 30 döngüsünde statik mikro izole ediciler içerisinde ışınlanmış Enrich-o'cobs™ Laboratuvar Hayvan Yatağında muhafaza edilmiştir. DRS-NC spesifik olarak direnç, bakım, cerrahi prosedürler, yem ve sıvı regülasyonu ve veteriner bakımına göre Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanıma yönelik Kılavuz tavsiyeleri ile uyumludur. DRS-NC'deki hayvan programı, laboratuvar hayvanları bakım ve
- 35 kullanımına yönelik kabul edilen standartlar ile uyum sağlayan Uluslararası Laboratuvar

Hayvan Bakım Değerlendirme ve Akreditasyon Kurumu (AAALAC) tarafından onaylanmıştır.

Tümör İmplantasyonu ve Ölçümü

5

92.1 uveal melanom hücreleri, üstel büyüme sırasında hasat edilmiştir ve %50 Matrigel™ (BD Biosciences) ile soğuk PBS (fosfat tamponlu salin) içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Her bir fare 5×10^6 hücre (0.2 mL hücre süspansiyonu) ile sağ yanakta subkütanöz olarak inoküle edilmiştir. Tümörler, ortalama hacimleri istenen 100-150 mm³ aralığına ulaştığında büyümeyi izlemek üzere iki boyut halinde kaliper uygulanmıştır. Tümör boyutu, mm³ cinsinden, aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Tümör Hacmi} = (w^2 \times l)/2$$

15 Burada tümöre ait mm cinsinden w = genişlik ve l = uzunluk. Tümör ağırlığı, 1 mg'nin 1 mm³ tümör hacmine eşdeğer olduğu varsayımı ile tahmin edilebilir. Tümör hücre implantasyonundan on iki gün sonra, çalışmanın 1. gününde 108-256 mm³'lük ayrı tümör hacimleri olan hayvanlar, 153-159 mm³'lük grup ortalama tümör hacmi ile altı grup (n = 10/grup) halinde sıralanmıştır.

20

AEB071, 21 gün boyunca 91mg/kg üç kez günlük (TID) dozlama şeklinde uygulanmıştır. Etkinlik, çalışmada fareler ile son gün olan 17. günde tümör büyüme inhibisyonundan belirlenmiştir. Aktivite, araç ile tedavi edilen farelere karşı ilaç ile tedavi edilen farelerde (ΔT) 1. günden 17. güne kadarki ortalama tümör hacmi değişim yüzdesi, tümör/kontrol (TC) olarak veya 1. günden grup ortalama tümör hacminde azalma yüzdesi, bir T/T0 olarak hesaplanmıştır. Şekil 4'te gösterildiği üzere mono terapi AEB071 tedavisi, %3'lük bir T/C (p<0.01) ile sonuçlanmıştır. 3.5mg/kg'de günlük iki kez dozlanan BİLEŞİK B'nin AEB071 rejimine ilavesi -%22 T-T0 sağlamıştır (p<0.001 medyan aktivitesi ancak tek başına AEB071'e kıyasla önemli değildir).

25 BİLEŞİK B, %84'lük bir T/C ile kendi içinde herhangi bir aktiviteye sahip değildir.

30

ÖRNEK 5

İn vivo deneye yönelik bileşik hazırlanışı

Örnek 4'e göre

Fareler

5

Örnek 4'e göre

Tümör İmplantasyonu ve Ölçümü

10 Örnek 4'e göre

ÖRNEK 6

İn vivo deneye yönelik bileşik hazırlanışı

15

Örnek 4'e göre

Fareler

20 Örnek 4'e göre

Tümör İmplantasyonu ve Ölçümü

Örnek 4'e göre

25

Kombinasyon en ılımlı ortalama tümör azalmasına neden olurken dozlama periyodu boyunca AEB071 mono terapi, tama yakın ortalama tümör durağanlığı üretmiştir. Dozlama periyodunu takiben iki hafta boyunca tümörler, AEB071 mono terapi tedavi gruplarında kontrol hızında ilerlerken tümörler, kombinasyon grubunda daha yavaş bir şekilde ilerlemiştir (Şekil 5).

30

Şekil 5, >70 günü takiben 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenograft modelinde in vivo tümör büyümesini gösterir. Fareler, 21 gün boyunca dozlanmıştır, daha sonra tedavi durdurulmuştur ve tümör dışı büyümesi izlenmiştir. Dozlama periyodunu takiben iki hafta tümörler, AEB071 mono terapi tedavi gruplarında kontrol hızından ilerlerken

35

tümörler, kombinasyon grubunda daha yavaş bir hızda ilerlemiştir. Tümör büyüme gecikmesi, grup başına iki veya daha fazla tümörün bir başlangıç büyüme periyodundan sonra statik olması nedeniyle hesaplanmamıştır ancak tümör dışı büyüme hızı eğilimi, AEB071 artı BİLEŞİK B kombinasyon tümörlerinin AEB071 tek

5 ajandan daha yavaş dışı büyüdüğünü göstermiştir. BİLEŞİK B tek ajanı ile tedavi edilen tümörler, etkinlik eksikliği nedeniyle izlenmemiştir. Bu veri, AEB071'in BİLEŞİK B ile kombinasyonunun 92. uveal melanomun 92.1 in vivo modelinde tek ajan ile karşılaştırıldığında daha büyük yanıt büyüklüğü sahip olduğunu göstermiştir.

- 10 Şekil 6, BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde çoklu AEB071 dozlarında tedavinin, 92.1 uveal melanom modeli kullanılarak ilave bir *in vivo* çalışmasında etkili olduğu gösterir. Kombinasyon etkinliği, daha büyük bir yanıt büyüklüğü sağlayan BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde artan AEB071 dozu ile, doza bağımlı bir şekilde artmıştır. AEB071, 92.1 insan uveal melanom çıplak fare ksenogreft modelde iki kez günlük
- 15 dozlama ile 3.5 mg/kg'de BİLEŞİK B ile kombinasyon halinde 21 gün boyunca üç kez günlük dozlama (TID) ile 90.95, 45.58 ve 22.74 mg/kg'de (80, 40 ve 20 mg/kg serbest baza eşdeğer) uygulanmıştır. Etkinlik, 22. günde tümör büyüme inhibisyonundan belirlenmiştir. Aktivite, araç ile tedavi edilen farelere karşı ilaç ile tedavi edilen farelerde (ΔT) 1. günden 22. güne kadarki ortalama tümör hacmi değişim yüzdesi, tümör/kontrol
- 20 (TC) olarak veya 1. günden grup ortalama tümör hacminde azalma yüzdesi, bir T/T0 olarak hesaplanmıştır. Şekil 6'da gösterildiği üzere 90.95 mg/kg'de mono terapi, %18'lik bir T/C ($p < 0.05$) ile sonuçlanmıştır. 45.5 ve 22.7 mg/kg ile mono terapi, sırasıyla %52 ve %92 T/C ve önemli olmayan medyan inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. 90.95 ve 45.58 mg/kg'lik AEB071 dozları ile günlük iki kez dozlanan BİLEŞİK B ilavesi,
- 25 sırasıyla -%52 ve -%12 T-T0 ($p < 0.001$) sağlamıştır. BİLEŞİK B, %56'lık bir T/C ile bu *in vivo* modelde kendi içinde herhangi bir aktiviteye sahip değildir. Yüksek doz kombinasyonu dört kısmı regresyon sağlamıştır.

Sonuç

30

Dolayısıyla, kombine PKC ve MEK inhibisyonunun uveal melanomda sinerjik ve etkili olduğu deneysel kanıt sağlanmıştır. Bu kombinasyon bu nedenle GNAQ veya GNA11 mutasyonlarının aktive edilmesi durumunda faydalıdır, bunun nedeni her bir gende aktive edici mutasyonlar PKC sinyalleme üzerinde bir bağımlılığa yol açmasıdır. Bu

35 ajanların kombine edilmesi, *in vitro* anti-proliferatif ve *in vivo* etkilidir. Uveal melanom

hücre hatlarında PKC inhibisyonu, pMARCKS'yi azaltır ancak pERK1/2 seviyeleri üzerinde en ılımlı bir etkiye sahiptir. Tek ajan MEK inhibisyonu, pERK1/2'yi bloke edebilir ancak pERK1/2 seviyeleri, yeniden pERK1/2 aktivasyonuna yol açarak MEK inhibitörü ile zamanla indüklenir. Sadece MEK ve PKC inhibisyon kombinasyonu, MARCKS, ERK1/2 ve MEK1/2'nin sürekli azaltılmış fosforilasyonunu gerçekleştirebilir.

ÖRNEK 7

Bu, AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyonunun çok merkezli, çok uluslu, kör olmayan bir çalışmasıdır. Nitelikli hastalar, metastatik uveal melanom teşhisi konulan hastalardır. İki çalışma parçası bulunur. Faz Ib, bir doz arttırma çalışmasıdır ve Faz II, Faz Ib'den elde edilen MTD/RP2D'nin {MTD (maksimum tolere edilen doz)/RP2D (Önerilen faz iki dozu)} bir randomize, iki kollu, paralel grup değerlendirmesidir. Çalışma, tüm hastaların çalışmanın Faz Ib parçasında aynı doz topluluğu içerisinde bulunan diğer hatalar ile aynı dozu alması ve Faz II çalışmasında AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyon BID (günlük iki kez) için MTD/RP2D veya sadece 45mg BİLEŞİK B BID (günlük iki kez) alması nedeniyle açık etiketli (kör olmayan) olacak şekilde tasarlanır.

Faz Ib ve Faz II'de değerlendirme altında olan araştırma ile ilgili tedaviler, Faz II'de tek bir ajan olarak AEB071 ve BİLEŞİK B veya BİLEŞİK B'den oluşur. Araştırma ile ilgili tedaviler, düz-sabit bir dozda uygulanır ve vücut ağırlığı veya vücut yüzey alanı ile değil.

Tüm hastalar, döngüler arası müdahale olmaksızın 28 günlük bir programda (bir döngü) günlük olarak tedavi alır. Her bir hasta, artık fayda sağlamayana veya önemli olumsuz etkiler yaşamayana kadar tedaviye devam edebilir, geri çekilmeyi gerektiğinde araştırmacının takdir yetkisinde devam etmeyebilir veya rıza ile geri çekilebilir.

Faz Ib, kombinasyon terapisine ait MTD'yi (maksimum tolere edilen doz) ve RP2D (Önerilen faz iki dozu) belirlemek üzere tasarlanan bir doz arttırma çalışmasıdır.

AEB071 ve BİLEŞİK B, Faz Ib çalışmasında tüm hastalara uygulanır ve kombinasyon dozu, BİLEŞİK B'nin 30 mg'lik bir dozu ile kombinasyon halinde AEB071 dozunun artırılması ile güvenlik için değerlendirilecektir.

Bu çalışmanın Faz II parçasının amacı, tümör boyutunun objektif ölçümleri kullanılarak hastalık yanıtının değerlendirilmesi ve ayrıca güvenlik ve tolere edilebilirliğin karakterize edilmesidir. Bu değerlendirmeye yardım etmek üzere hastalar, AEB071 ve BİLEŞİK B kombinasyon BID için MTD/RP2D veya sadece 45mg BİLEŞİK B BID (günlük iki kez) almak üzere 1:1 olan bir şekilde merkezi olarak randomize edilmiştir.

AEB071 ve BİLEŞİK B'nin her ikisi, her biri 28 günlük döngüde günlük bir bazda aşağıdaki Tabloda belirtilen dozlarda oral olarak BID (günlük iki kez) uygulanır.

10

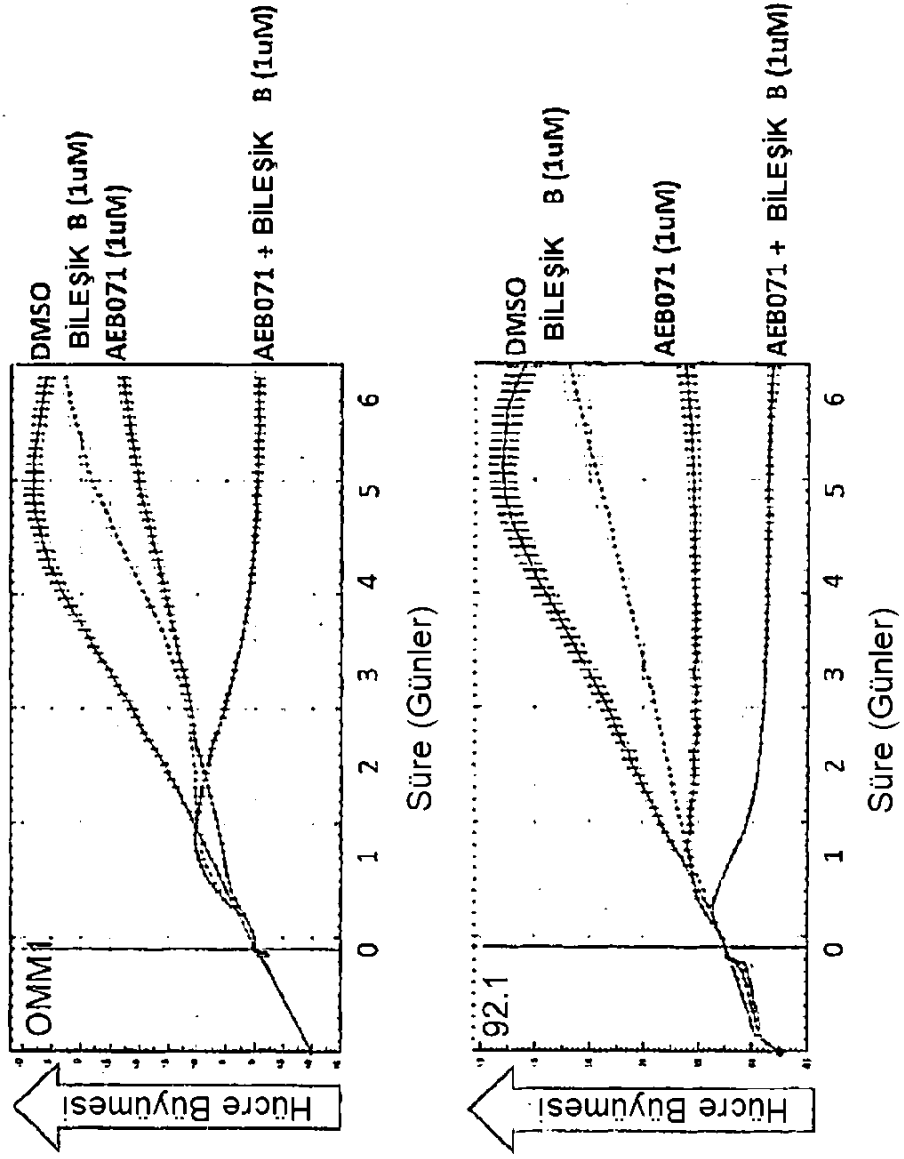
Tablo: Doz ve tedavi programı

Çalışma tedavileri	Farmasötik uygulama yolu	form	ve Doz (toplam doz) mg	günlük Sıklığı		ve/veya Rejimi
				Faz I	Faz II	
AEB071	Oral	kullanıma tablet	yönelik 400 (800)	RP2D (2xRP2D)	Günlük (28 günlük döngü)	
BİLEŞİK B	Oral	kullanıma tablet	yönelik 30 (60)	45(90)	Günlük (28 günlük döngü)	

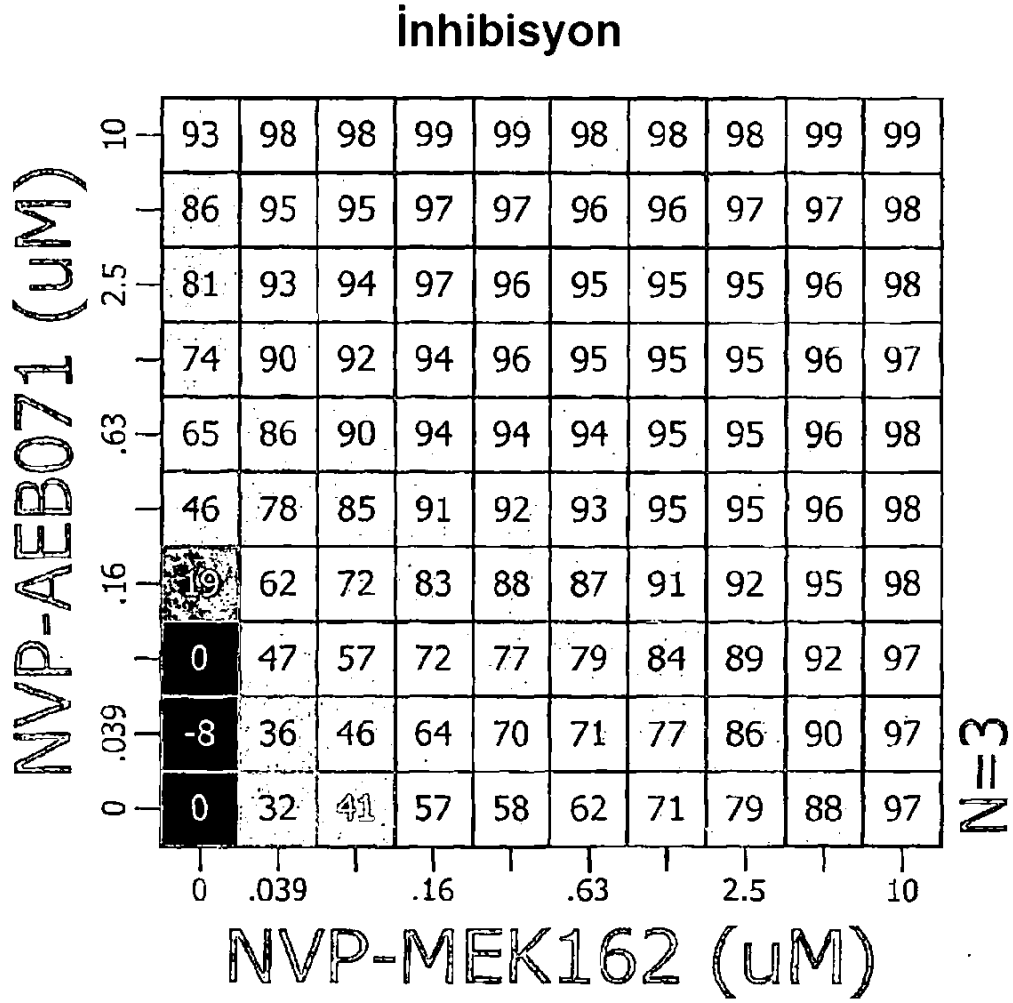
Tümör değerlendirmeleri, alan personeli tarafından incelenirken uygulanır. Hastanın gelişim gösterdiğinin bulunması halinde tedavi hemen durdurulur.

15

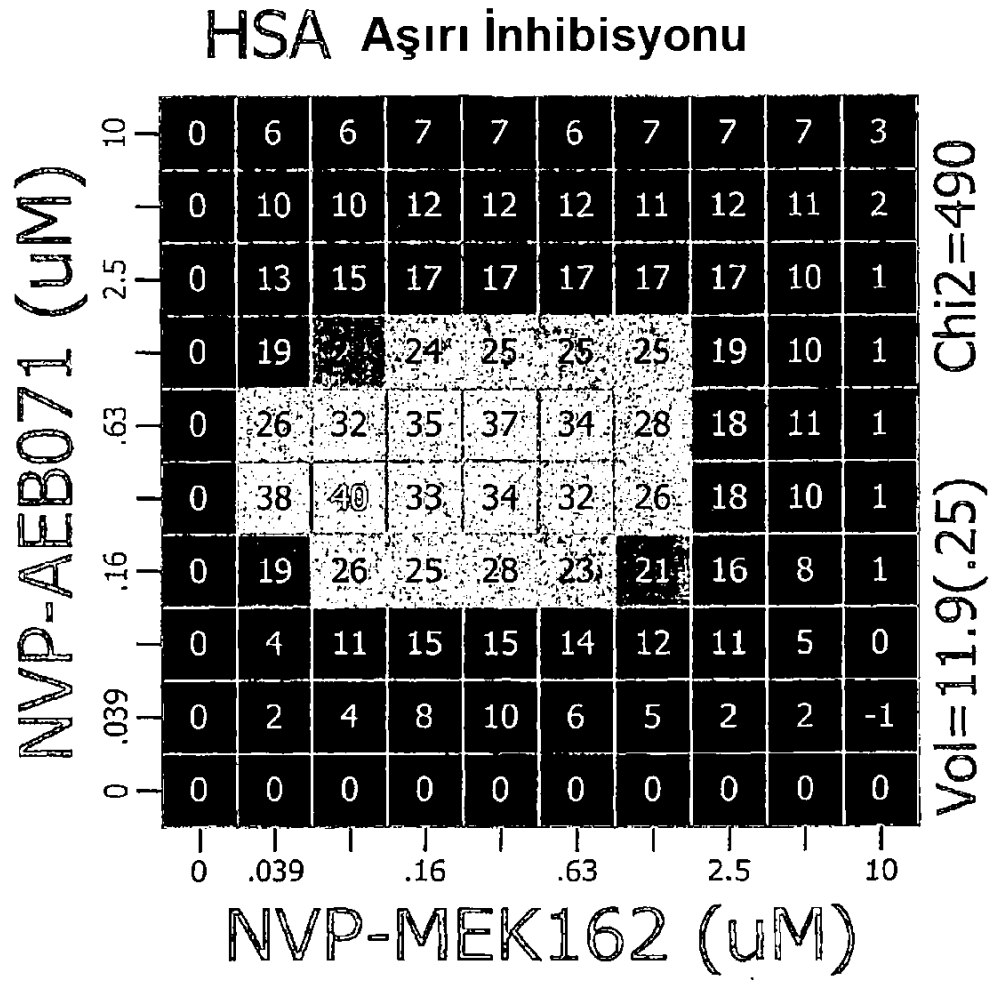
Şekil 1



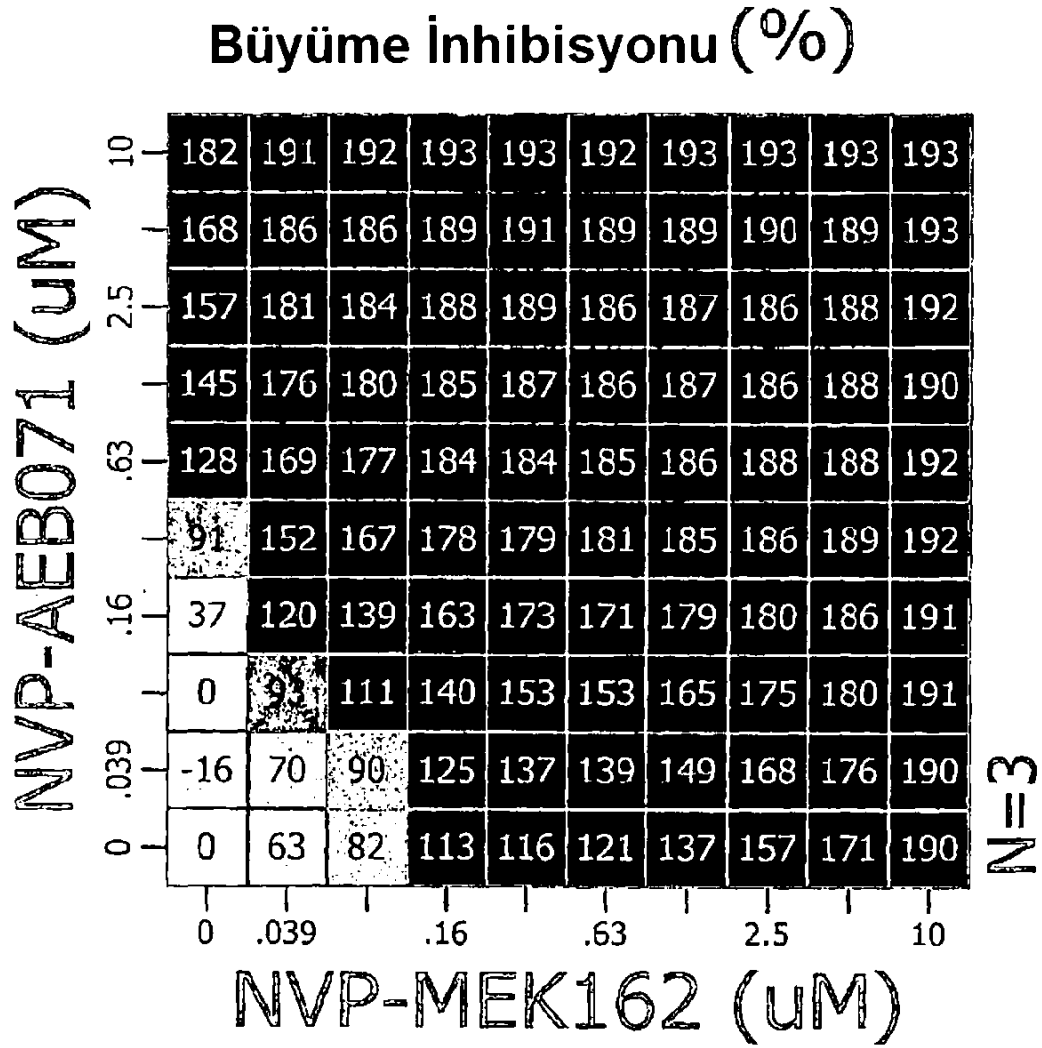
Şekil 2A



Şekil 2B



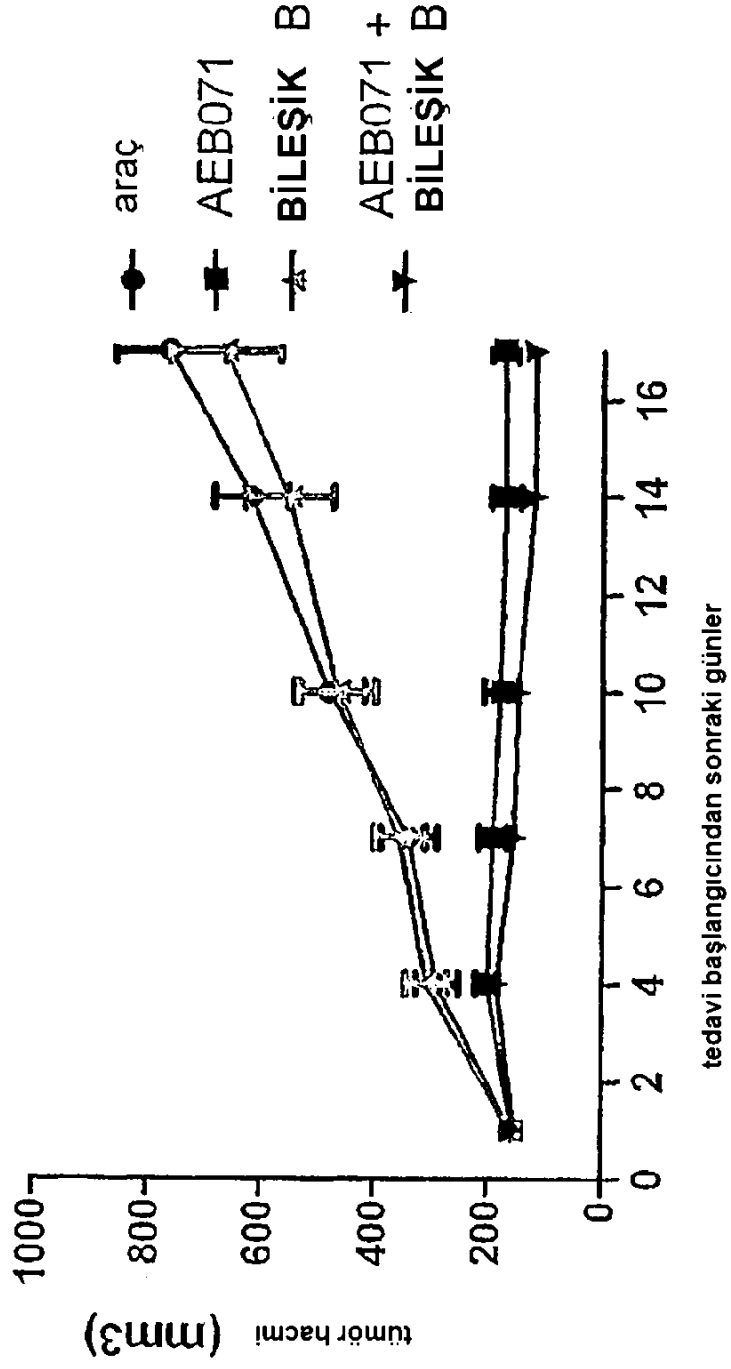
Şekil 2C



Şekil 3

	2 saat	4 saat	8 saat	24 saat	48 saat	0.5uM AEB071 0.5uM BİLEŞİK B DMSO	pMARCKS (Ser152/156)	pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	pMEK1/2 (Ser172/21)	β-Aktin
Hücre Hattı	AEB +BİLEŞİK B BİLEŞİK B AEB071 DMSO	AEB +BİLEŞİK B BİLEŞİK B AEB071 DMSO	AEB +BİLEŞİK B BİLEŞİK B AEB071 DMSO	AEB +BİLEŞİK B BİLEŞİK B AEB071 DMSO	AEB +BİLEŞİK B BİLEŞİK B AEB071 DMSO		92.1 OMIM-1	92.1 OMIM-1	92.1 OMIM-1	92.1 OMIM-1

Şekil 4



Şekil 5

