

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 974 991**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2017 PCT/IB2017/055641**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018 WO18051306**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2017 E 17778357 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023 EP 3515446**

(54) Título: **Combinaciones terapéuticas que comprenden un inhibidor de RAF y un inhibidor de ERK**

(30) Prioridad:

19.09.2016 US 201662396504 P

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

02.07.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**CAPONIGRO, GIORDANO;
MEYER, MATTHEW JOHN;
COOKE, VESSELINA y
STUART, DARRIN**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 974 991 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinaciones terapéuticas que comprenden un inhibidor de RAF y un inhibidor de ERK

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a combinaciones de Compuesto A y Compuesto B y a la combinación de Compuesto A y Compuesto B para su uso como se describe en las reivindicaciones.

En particular, se proporciona una combinación farmacéutica que comprende el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Esta combinación farmacéutica puede ser particularmente útil en el tratamiento del CPNM con mutación de KRAS o BRAF, incluido el CPNM con mutación de KRAS o BRAF avanzado o metastásico.

10 **Antecedentes**

La vía RAS/RAF/MEK/ERK o MAPK es una cascada de señalización clave que impulsa la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. La desregulación de esta vía subyace a muchos casos de tumorigénesis. La señalización aberrante o la activación inapropiada de la vía MAPK se ha demostrado en múltiples tipos de tumores, incluidos el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de páncreas, y puede ocurrir a través de varios mecanismos distintos, incluidas las mutaciones activadoras en RAS y BRAF. RAS, que es una superfamilia de GTPasas, incluye KRAS (homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirstenv-Ki-ras2), que es una proteína de señalización regulada que puede encenderse (activarse) por diversas mutaciones de un solo punto, que se conocen como mutaciones de ganancia de función. La vía MAPK está frecuentemente mutada en el cáncer humano, siendo las mutaciones de KRAS y BRAF unas de las más frecuentes (aproximadamente el 30%). Las mutaciones RAS, en particular las mutaciones de ganancia de función, se han detectado en el 9-30% de todos los cánceres, siendo las mutaciones KRAS las de mayor prevalencia (86 %), seguidas de NRAS (11 %) y, con poca frecuencia, HRAS (3 %) (Cox AD, et al, Nat Rev Drug Discov 2014;13 (2014):828-51.). Aunque los inhibidores selectivos de BRAF (BRAFi) y, en menor medida, los inhibidores de MEK (MEKi) han demostrado una buena actividad en los tumores con mutación de BRAF, actualmente no existen terapias eficaces para los tumores con mutación de KRAS (Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM (2011) Mol Cancer Ther. Mar;10(3):385-94.).

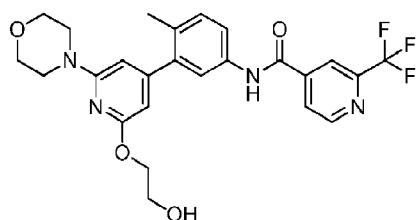
S. R. Whittaker et al, (2015) Mol Cancer Ther. vol. 14, no. 12, 2700 - 2711 discuten ejemplos en los que la inhibición combinada pan-RAF y MEK superó los mecanismos de resistencia a ciertos inhibidores de RAF. Las nuevas pruebas sobre el papel de CRAF en la mediación de la señalización de KRAS y en el desarrollo del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) con mutación de KRAS lo convierten en una diana adecuada para la intervención terapéutica (Blasco RB, Francoz S, Santamaria D, et al (2011) c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell. 2011 May 17;19(5):652-63.). Se ha demostrado que CRAF promueve la reactivación de la vía mediada por retroalimentación tras el tratamiento con MEKi en cánceres mutantes de KRAS (Lito P, Saborowski A, Yue J, et al (2014) Disruption of CRAF Mediated MEKActivation Is Required for Effective MEK Inhibition in KRAS Mutant Tumors. Cancer Cell 25, 697-710., Lamba et al 2014). Además, CRAF desempeña un papel esencial en la mediación de la activación paradójica tras el tratamiento con BRAFi (Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, et al. (2010), Nature. 18 mar; 464(7287):427-30., Hatzivassiliou et al 2010, Heidom et al 2010). Por lo tanto, los inhibidores selectivos pan-RAF que inhiben potentemente la actividad de CRAF y BRAF pueden ser eficaces para bloquear los tumores con mutación BRAF y la tumorigénesis impulsada por mutación RAS, y también pueden aliviar la activación por retroalimentación. El compuesto A descrito en la presente memoria es un potente inhibidor tanto de CRAF como de BRAF.

El cáncer de pulmón es un tipo común de cáncer que afecta a hombres y mujeres de todo el mundo. NSCLC es el tipo más frecuente (más o menos el 85 %) de cáncer de pulmón y aproximadamente el 70 % de estos pacientes presentan una enfermedad avanzada (estadio IIIB o estadio IV) en el momento del diagnóstico. Aproximadamente el 30 % de los tumores de NSCLC contienen mutaciones activadoras de KRAS, y estas mutaciones están asociadas a la resistencia a los inhibidores de la tirosina cinasa EGFR (TKI) (Pao W, et al, PLoS Med 2005;2(1):e17). Las mutaciones activadoras de KRAS también se encuentran en el melanoma (British J. Cancer 112, 217-26 (2015)), el cáncer de páncreas (Gastroenterology vol. 144(6), 1220-29 (2013)) y el cáncer de ovario (British J. Cancer 99 (12), 2020-28 (2008)). Las mutaciones de BRAF se han observado en hasta el 3 % de los CPNM y también se han descrito como mecanismo de resistencia en los CPNM con mutación EGFR positiva.

50 La inhibición directa de KRAS ha demostrado ser un reto. Hasta la fecha, no se dispone de terapias dirigidas aprobadas para pacientes con cánceres con mutación de KRAS, como el CPNM. Por lo tanto, existe una gran necesidad médica no cubierta para los pacientes que padecen CPNM con mutación de KRAS y para los pacientes que padecen CPNM con mutación de BRAF. Se requiere una terapia dirigida que es segura y/o bien tolerada. También se requiere una terapia que produzca respuestas duraderas y sostenidas en un entorno clínico.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

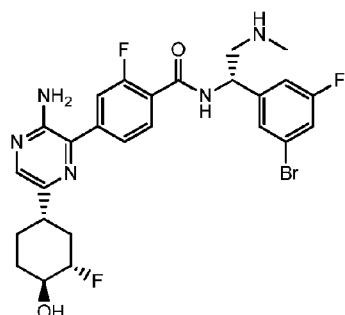
La presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende: (a) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A,



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

(b) un inhibidor de ERK que es el compuesto B,



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Esta combinación se denomina en la presente memoria "combinación de la invención".

La presente invención proporciona además una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de quinasa c-Raf, que es un Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y trametinib, y un inhibidor ERK, que es un Compuesto B, o una sal o disolvente farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente memoria, para administración simultánea, separada o secuencial (en cualquier orden), para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. La presente invención está particularmente relacionada con la combinación de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa caracterizado por mutaciones activadoras en la vía MAPK, y en particular por una o más mutaciones en KRAS o BRAF. La presente invención está particularmente relacionada con el tratamiento del CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) con mutación de KRAS, el CPNM mutante para BRAF, el cáncer de páncreas mutante para KRAS, el cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y el cáncer de ovario con mutación de KRAS.

La presente invención también proporciona un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que se selecciona del grupo que consiste en CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) mutante para KRAS, CPNM con mutación de BRAF, cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS, en combinación con un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en el que la enfermedad proliferativa es un cáncer que expresa al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones RAF V600E, V600D y G464E, y las mutaciones RAS A146T, Q61L, Q61K, G12D, G12C, G13D, G12V y G12R.

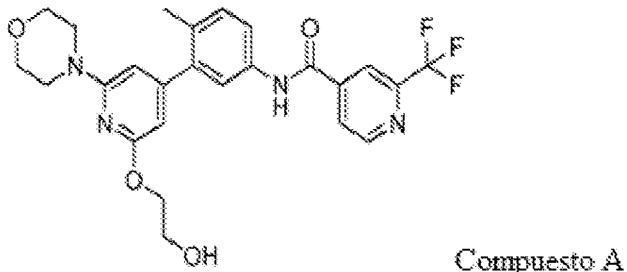
La presente invención también proporciona un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que se selecciona del grupo que consiste en CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) con mutación de KRAS, CPNM con mutación de BRAF, cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS, en combinación con un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en el que la enfermedad proliferativa es un cáncer que expresa al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones RAF V600E, V600D y G464E, y las mutaciones RAS A146T, Q61L, Q61K, G12D, G12C, G13D, G12V y G12R.

El compuesto A es un inhibidor adenosín trifosfato (ATP) competitivo de las proteínas quinasas BRAF (también denominada en la presente memoria b-RAF o b-Raf) y CRAF (también denominada en la presente memoria c-RAF o

c-Raf). A lo largo de la presente divulgación, el compuesto A también se denomina inhibidor de c-RAF (o CRAF) o inhibidor de la cinasa C-RAF/c-Raf.

El compuesto A es N-(3-(2-(2-hidroxietoxi)-6-morfolinopiridin-4-il)-4-metilfenil)-2-(trifluorometil)isonicotinamida y es el compuesto de la siguiente estructura:

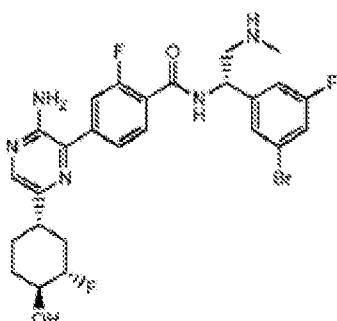
5



Compuesto A

En ensayos basados en células, el Compuesto A ha demostrado actividad antiproliferativa en líneas celulares que contienen una variedad de mutaciones que activan la señalización MAPK. In vivo, el tratamiento con el Compuesto A genera una regresión tumoral en varios modelos humanos mutantes de KRAS, incluidos Calu-6 (KRAS Q61K) y NCI-H358 (KRAS G12C) derivados de NSCLC. En conjunto, la supresión *in vitro* e *in vivo* de la vía MAPK y la actividad antiproliferativa observadas para el Compuesto A en dosis bien toleradas sugieren que el Compuesto A puede tener actividad antitumoral en pacientes con tumores que albergan lesiones activadoras de la vía MAPK. Además, el Compuesto A es un inhibidor competitivo ATP de Tipo 2 tanto de B-Raf como de C-Raf que mantiene el bolsillo de la cinasa en una conformación inactiva, reduciendo así la activación paradójica observada con muchos inhibidores de B-Raf, y bloqueando la señalización impulsada por Ras mutante y la proliferación celular. El Compuesto A mostraron eficacia en numerosas líneas celulares de cáncer humano impulsadas por MAPK y en tumores xenoinjertados que representan tumores modelo que albergan lesiones humanas en los oncogenes KRAS, NRAS y BRAF.

El Compuesto B es un inhibidor de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2). El Compuesto B se conoce con el nombre de 4-(3-amino-6-((1S,3S,4S)-3-fluoro-4-hidroxiciclohexil)pirazin-2-il)-N-((S)-1-(3-bromo-5-fluorofenil)-2-(metilamino)ethyl)-2-fluorobenzamida y es el compuesto de la siguiente estructura.



Compuesto B

El Compuesto B ha demostrado ser activo como terapia de agente único en modelos de varios tumores sólidos, y fue especialmente eficaz cuando se utilizó en combinación con un segundo agente terapéutico anticáncer. Por ejemplo, en modelos de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), un cáncer especialmente difícil de tratar (la tasa de supervivencia a 5 años del PDAC es del 7% de acuerdo con Cancers (Basilea), vol. 8(4), 45 (abril de 2016)), el compuesto B en combinación con varios agentes anticáncer diferentes mostró una reducción significativa del tumor y fue más eficaz de lo esperado en función de la actividad como agente único de los componentes de determinadas combinaciones. En particular, las combinaciones del compuesto B con el compuesto A demostraron una mayor profundidad y durabilidad de la respuesta tumoral en comparación con el tratamiento con un solo agente en un modelo de xenoinjerto de CPNM humano, Calu-6.

Por lo tanto, se espera que la inhibición vertical de MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) combinando un inhibidor pan-RAF como el Compuesto A con un inhibidor de la cinasa ERK1/2 como el Compuesto B optimice la

supresión de la señalización MAPK en NSCLC mutante KRAS y BRAF. Esta combinación también puede ayudar a prevenir la aparición de resistencia a la combinación de inhibidores de BRAF y MEK (proteína cinasa activada por mitógenos) en el CPNM con mutación BRAFV600E.

Por consiguiente, la invención proporciona composiciones del Compuesto B en combinación con el Compuesto A, y dichas composiciones y combinaciones para su uso en procedimientos para tratar tumores sólidos, particularmente tumores que expresan mutaciones KRAS, incluyendo NSCLC y especialmente NSCLC mutante KRAS, y también NSCLC mutante BRAF, incluyendo NSCLC mutante BRAFV600E.

En la presente memoria se proporcionan combinaciones farmacéuticas que comprenden (a) un inhibidor de c-RAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para administración simultánea, separada o secuencial para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular un tumor sólido que alberga alteraciones de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), como tumores con mutación de KRAS y ciertos tumores con mutación de BRAF. Entre ellos figuran el CPNM (cáncer de pulmón no microcítico) con mutación de KRAS, el CPNM (cáncer de pulmón no microcítico) con mutación de BRAF, el CPNM (cáncer de pulmón no microcítico) mutante para KRAS y BRAF, el cáncer de páncreas con mutación de KRAS, el cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y el cáncer de ovario mutante para KRAS. La presente invención también proporciona la combinación farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento del melanoma mutante BRAF V600, incluido el melanoma mutante BRAF V600 recidivante o refractario. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende dicha combinación.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la eficacia del Compuesto A y del Compuesto B por separado y utilizados conjuntamente en modelos tumorales de xenoinjerto de CPNM Calu-6 en ratones. Los compuestos se administraron por vía oral diariamente (qd) o en días alternos (q2d), según se indica

La Figura 1B muestra la durabilidad de la respuesta de los tratamientos mostrados en la Figura 1A, demostrando que los tratamientos combinados fueron superiores a los tratamientos con un único agente.

La Figura 1C muestra la tolerabilidad de los tratamientos de la Figura 1A, indicada por el cambio de peso corporal a lo largo del tiempo.

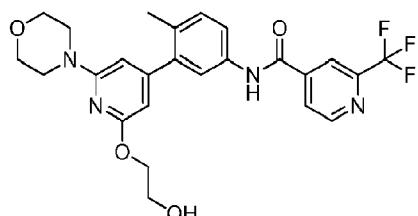
DESCRIPCIÓN DETALLADA

La combinación farmacéutica de la invención es una combinación farmacéutica del Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización preferente, se proporciona la combinación farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada entre CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) con mutación de KRAS, CPNM con mutación de BRAF (incluido CPNM con mutación de BRAF BRAFV600E), cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS. Entre los pacientes susceptibles de beneficiarse de la combinación farmacéutica se incluyen pacientes con enfermedad avanzada o metastásica, por ejemplo, pacientes con CPNM, con diagnóstico de CPNM mutante KRAS o BRAF avanzado o metastásico, que pueden haber progresado tras recibir el tratamiento estándar.

Inhibidor de la cinasa CRAF

El inhibidor de la cinasa CRAF utilizado en las combinaciones de la presente invención es el compuesto A. El compuesto A se desvela como ejemplo 1156 en el documento WO2014/151616. El documento WO2014/151616 también describe su preparación y composiciones farmacéuticas que comprenden el Compuesto A.

El Compuesto A tiene la siguiente estructura:



El Compuesto A (Compuesto A) también se conoce con el nombre de N-(3-(2-(2-hidroxietoxi)-6-morfolinopiridin-4-il)-4-metilfenil)-2-(trifluorometil)isonicotinamida.

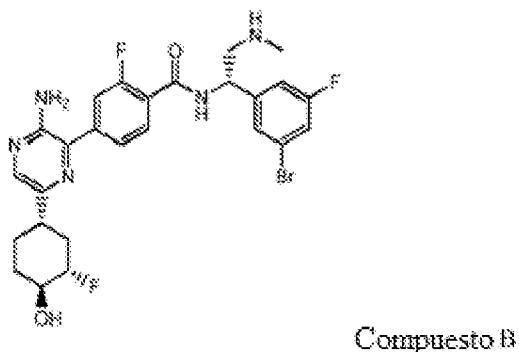
En ensayos basados en células, el Compuesto A ha demostrado actividad antiproliferativa en líneas celulares que contienen una variedad de mutaciones que activan la señalización MAPK. *In vivo*, el tratamiento con el Compuesto A generó regresión tumoral en varios modelos mutantes de KRAS, incluidos los derivados de NSCLC Calu-6 (KRAS Q61K) y NCI-H358 (KRAS G12C). En conjunto, la supresión *in vitro* e *in vivo* de la vía MAPK y la actividad antiproliferativa observadas para el Compuesto A en dosis bien toleradas sugieren que el Compuesto A puede tener actividad antitumoral en pacientes con tumores que albergan lesiones activadoras de la vía MAPK. Además, el Compuesto A es un inhibidor competitivo ATP de Tipo 2 tanto de B-Raf como de C-Raf que mantiene el bolsillo de la cinasa en una conformación inactiva, reduciendo así la activación paradójica observada con muchos inhibidores de B-Raf, y bloqueando la señalización impulsada por Ras mutante y la proliferación celular. El Compuesto A mostraron eficacia en numerosas líneas celulares de cáncer humano impulsadas por MAPK y en tumores xenoinjertados que representan tumores modelo que albergan lesiones humanas en los oncogenes KRAS, NRAS y BRAF.

Con base en el mecanismo de acción del Compuesto A, los datos preclínicos y la bibliografía publicada sobre la importancia de CRAF en la regulación de la vía MAPK, el Compuesto A, en combinación con el Compuesto B, puede ser útil en el tratamiento de pacientes con tumores sólidos avanzados que albergan alteraciones de la vía MAPK. El Compuesto A puede utilizarse para tratar (p. ej., una o más de reducir, inhibir o retrasar la progresión) una enfermedad proliferativa que es un tumor sólido avanzado que alberga alteraciones de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), como tumores con *mutación de KRAS* y, en particular, tumores que expresan al menos una mutación de ganancia de función de RAS o RAF, incluyendo cáncer de pulmón, CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal o melanoma, en un individuo que necesita dicho tratamiento.

20 ***Inhibidores de ERK***

El compuesto ERKi utilizado en las combinaciones de la invención es el compuesto B, ya sea en forma libre o como sal farmacéuticamente aceptable.

El Compuesto B es un inhibidor de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2). Este compuesto se desvela y su preparación y composiciones farmacéuticas que comprenden este compuesto se describen en la publicada Solicitud de Patente PCT WO 2015/066188. El Compuesto B tiene la siguiente estructura:



En algunas realizaciones, se utiliza la sal clorhidrato del Compuesto B.

30 ***Usos terapéuticos***

En una realización, la invención presenta una combinación de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento (p. ej., inhibición, reducción, mejora o prevención) de un trastorno, p. ej., una afección o trastorno hiperproliferativo (p. ej., un cáncer) en un individuo. En la presente memoria se describen dosificaciones y pautas de administración adecuadas para utilizar el compuesto A y el compuesto B en las combinaciones de la invención.

35 En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo es un tumor KRAS-mutante tal como un tumor que expresa al menos una mutación KRAS de ganancia de función como se describe en la presente memoria, y en particular, cánceres KRAS-mutantes tales como NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas). Se incluyen los tumores que tienen mutaciones BRAF, incluyendo V600E y otras, por ejemplo, CPNM que tienen al menos una mutación V600E u otra mutación BRAF, ya sea típica o atípica. El compuesto A es un potente inhibidor de al menos CRAF, y opcionalmente también de BRAF. En algunas realizaciones, el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra por vía oral.

40 Cuando se describe una dosificación en la presente memoria como "aproximadamente" una cantidad especificada, la dosificación real puede variar hasta un 10%, por ej., 5%, de la cantidad indicada: este uso de "aproximadamente" reconoce que la cantidad precisa en una forma de dosificación dada puede diferir ligeramente de una cantidad prevista por diversas razones sin afectar materialmente al efecto *in vivo* del compuesto administrado. El experto entenderá que

cuando en la presente memoria se cite una dosis o dosificación de un compuesto terapéutico, dicha cantidad se refiere a la cantidad del compuesto terapéutico en su forma libre.

La dosis unitaria del inhibidor de CRAF puede administrarse una vez al día, o dos veces al día, o tres veces al día, o cuatro veces al día, con la dosis real y el momento de la administración determinados por criterios tales como la edad, el peso y el sexo del paciente; la extensión y gravedad del cáncer a tratar; y el juicio de un médico tratante.

En una realización, el compuesto A se prepara para administración oral y se administra por vía oral a una dosis de 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg o 400 mg administrados hasta cuatro veces al día; se prevé que una dosis de 100 mg una o dos veces al día proporcione una concentración plasmática en individuos humanos que podría ser eficaz en seres humanos basándose en el escalado alométrico de los niveles plasmáticos correspondientes en animales, y puede administrarse una dosis de 200 mg hasta cuatro veces al día para lograr una mayor eficacia sin dejar de proporcionar un índice terapéutico satisfactorio. En algunas realizaciones, el Compuesto A se administra una vez al día a una dosis de 100 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg o 400 mg. El escalado alométrico de modelos preclínicos indica que una dosis diaria de 300 mg o superior del Compuesto A, que puede administrarse una vez al día o en dos, tres o cuatro dosis separadas a lo largo de un día, como agente único debe proporcionar un efecto terapéutico en muchas indicaciones, incluidos los tumores sólidos que contienen o expresan mutaciones de KRAS.

En las combinaciones de la invención, se espera que la dosis terapéutica del Compuesto A en estos individuos sea menor, por lo que los tratamientos combinados utilizan típicamente 100 mg, 200 mg, 250 mg o 300 mg de dosis diaria del Compuesto A para dichos individuos. Convenientemente, en las combinaciones y procedimientos de la invención, se administra una dosis de 100 mg, o 200 mg, o 250 mg, o 300 mg del Compuesto A una vez al día.

En una realización, el Compuesto B se prepara para su administración por vía oral, y puede usarse como su sal de clorhidrato. En algunas realizaciones, el compuesto o su sal HCl se encapsula simplemente en un recipiente farmacéuticamente aceptable, como una cápsula de gel dura o blanda para administración oral. Las cápsulas de gel pueden producirse en una variedad de dosis para una administración flexible; por ejemplo, pueden prepararse cápsulas de gel que contienen aproximadamente 5 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 50 mg o aproximadamente 100 mg del compuesto B o su sal HCl.

En las combinaciones de la invención y en los usos terapéuticos descrito en la presente memorias, el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse a una dosis diaria de aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 150 mg, o aproximadamente 200 mg, o aproximadamente 250 mg en combinación con el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que puede administrarse a una dosis diaria de aproximadamente 50 mg, o aproximadamente 75 mg, o aproximadamente 100 mg o aproximadamente 150 mg o aproximadamente 200 mg. Por ejemplo, el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse a una dosis total de aproximadamente 100 mg de Compuesto A al día y una dosis total de aproximadamente 100 mg de Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al día, administrándose preferentemente las dosis una vez al día. Los pacientes que lo necesiten también pueden recibir una dosis total de aproximadamente 200 mg de Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al día y una dosis total de aproximadamente 100 mg de Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al día, siendo las dosis administradas preferentemente una vez al día.

El Compuesto A y el Compuesto B pueden usarse juntos de acuerdo con los procedimientos desvelados en la presente memoria. Los dos compuestos pueden administrarse juntos o por separado en cualquier orden, dependiendo de la cantidad de dosificación prevista y de la frecuencia de administración, ya que se contempla que los tratamientos de la invención puedan continuarse durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más de 4 semanas según considere apropiado el médico tratante, y además según se guíe usando los procedimientos descritos en la presente memoria para determinar una dosificación y una frecuencia de administración apropiadas. En los procedimientos y usos desvelados en la presente memoria, el Compuesto A y/o el Compuesto B pueden administrarse diariamente durante al menos cinco días consecutivos.

La invención también proporciona un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un tumor sólido que expresa una mutación de ganancia de función en la vía MAPK, como NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) mutante de KRAS, NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) mutante de BRAF, CPNM (cáncer de pulmón no microcítico) con mutación de KRAS y BRAF, cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) mutante para KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS y melanoma con mutación de BRAF V600, en los que el inhibidor de CRAF se administra, o se prepara para su administración, por separado, simultánea o secuencialmente con un Compuesto B. Típicamente, el Compuesto B se administra por vía oral, y se administra por separado, simultánea o secuencialmente con el Compuesto A, que también suele administrarse por vía oral. En la presente memoria se describen procedimientos, vías de administración, dosis y frecuencia de administración adecuados del Compuesto A y del Compuesto B para su uso en estos procedimientos y composiciones.

En otro aspecto, la invención proporciona un inhibidor de ERK 1/2 que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de NSCLC mutante de KRAS (cáncer de pulmón de células no pequeñas) y para su uso en el tratamiento de NSCLC mutante de BRAF, en el que el inhibidor

de ERK 1/2 se administra, o se prepara para su administración, por separado, simultáneamente o secuencialmente con el Compuesto A. También proporciona un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de NSCLC mutante de KRAS (cáncer de pulmón de células no pequeñas) y para su uso en el tratamiento de NSCLC mutante de BRAF, en el que el inhibidor de CRAF se administra, o se prepara para su administración, por separado, simultánea o secuencialmente con un inhibidor de ERK 1/2 que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Típicamente, el Compuesto B se administra por vía oral, y puede administrarse por separado o secuencialmente con el Compuesto A, que también se administra por vía oral. En la presente memoria se describen procedimientos, vías, dosis y frecuencia de administración adecuados del compuesto A y del compuesto B.

- 10 Las combinaciones desveladas en la presente memoria pueden administrarse juntas en una única composición o administrarse por separado en dos o más composiciones diferentes, por ejemplo, composiciones o formas de dosificación como las descritas en la presente memoria. Las combinaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, en particular la combinación farmacéutica de la invención, pueden ser un producto de combinación libre, es decir, una combinación de dos o más principios activos, por ejemplo, el compuesto A y el compuesto B, que se administra simultáneamente, por separado o secuencialmente como dos o más formas farmacéuticas distintas. La administración de los agentes terapéuticos puede ser en cualquier orden. El primer agente y los agentes adicionales (por ejemplo, segundo, tercer agentes) pueden administrarse por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.
- 15 En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende el Compuesto A y el Compuesto B, que opcionalmente también contiene al menos uno, y opcionalmente más de uno, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición se utiliza para tratar un tumor sólido, típicamente un tumor sólido que expresa una mutación de KRAS o una mutación de RAF, a menudo para el tratamiento de NSCLC, y particularmente para tratar a un paciente con NSCLC que presenta al menos una mutación de KRAS, especialmente una mutación de ganancia de función como las descritas en la presente memoria.

25 **Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)**

El cáncer de pulmón es un tipo común de cáncer que afecta a hombres y mujeres de todo el mundo. El carcinoma de células no pequeñas (NSCLC) es el tipo más frecuente (aproximadamente el 85 %) de cáncer de pulmón y aproximadamente el 70 % de estos pacientes presentan una enfermedad avanzada (estadio IIIB o estadio IV) en el momento del diagnóstico. Aunque el cáncer de pulmón se asocia habitualmente con el tabaquismo, los no fumadores 30 también están expuestos a padecer cáncer de pulmón, en particular CPNM: el diagnóstico en no fumadores suele retrasarse porque la asociación con el tabaquismo es alta, pero el 10-15% de los pacientes con cáncer de pulmón nunca han fumado. Alrededor del 30% de los CPNM contienen mutaciones activadoras de KRAS, y estas mutaciones están asociadas a la resistencia a los TKI del EGFR (Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al (2005) PLoS Med; 2(1): e17).

35 Las inmunoterapias actualmente en desarrollo han comenzado a ofrecer un beneficio significativo a los pacientes con cáncer de pulmón, incluidos aquellos para los que los tratamientos convencionales son ineficaces. Recientemente, pembrolizumab (Keytruda®) y nivolumab (Opdivo®), dos inhibidores de la interacción PD-1/PD-L1, han sido aprobados para su uso en el CPNM. Sin embargo, los resultados indican que muchos pacientes tratados con inhibidores de PD-1 de agente único no se benefician adecuadamente del tratamiento.

40 La inhibición directa de KRAS ha demostrado ser un reto y el NSCLC con mutación de KRAS sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar para la terapia del cáncer. Hasta la fecha, no se dispone de terapias dirigidas aprobadas para pacientes con CPNM mutante para KRAS o BRAF.

45 Se han observado mutaciones deBRAF en hasta el 3 % de los CPNM y también se han descrito como mecanismo de resistencia en los CPNM con mutación EGFR positiva (Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al (2011). J Clin Oncol. May 20; 29(15):2046-51).

45 Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es el cáncer ginecológico más letal y es una enfermedad heterogénea compuesta por una colección de diferentes subtipos histológicos y moleculares con pronóstico variable. El subtipo epitelial comprende el 90% de los cánceres de ovario.

50 El subtipo histológico más común de cáncer epitelial de ovario es el carcinoma seroso, que representa entre el 60 y el 70% de los cánceres epiteliales de ovario. Un sistema de clasificación de dos niveles separa el carcinoma seroso en seroso de bajo grado (LGS) y seroso de alto grado (HGS) que tienen diferentes características moleculares, perfil inmunohistoquímico, características epidemiológicas y comportamiento clínico. El carcinoma LGS representa hasta el 10% de los cánceres epiteliales serosos de ovario y los carcinomas ováricos con mutaciones KRAS (hasta el 40%) o BRAF (2-6%) son predominantemente carcinomas LGS. El carcinoma LGS es quimiorresistente, no sólo a los agentes de primera línea, sino también en el contexto de la enfermedad recurrente.

Cáncer de páncreas

El término "cáncer de páncreas", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). El PDAC es el tipo más común de cáncer de páncreas.

Cáncer con mutación de KRAS y CPNM con mutación de BRAF

La presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de NSCLC con mutación de KRAS.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer de ovario con mutación de KRAS.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas con mutación de KRAS.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de NSCLC con mutación de BRAF.

25 El término tumor o cáncer "con mutación de BRAF" incluye cualquier tumor que presente una proteína BRAF mutada. Los ejemplos de mutaciones de B-Raf incluyen, pero no se limitan a V600E y V600K. La mayoría de las mutaciones de B-Raf se agrupan en dos regiones: el bucle P rico en glicina del lóbulo N y el segmento de activación y las regiones flanqueantes. La mutación V600E se ha detectado en diversos tipos de cáncer, y se debe a una sustitución de timina por adenina en el nucleótido 1799. Esto provoca la sustitución de la valina (V) por el glutamato (E) en el codón 600 (ahora denominado V600E).

30 El término tumor o cáncer "con mutación de KRAS" incluye cualquier tumor que presente una proteína KRAS mutada, en particular una mutación KRAS de ganancia de función; especialmente cualquier con mutación de KRAS G12X, G13X, Q61X o A146X, donde X es cualquier aminoácido distinto del que se encuentra de forma natural en esa posición. Por ejemplo, una mutación G12V significa que se sustituye una Glicina por Valina en el codón 12. Los ejemplos de mutaciones de KRAS en tumores incluyen Q61K, G12V, G12C y A146T. Por lo tanto, el CPNM, el CCR, el cáncer de ovario y el cáncer de páncreas mutantes para KRAS incluyen, entre otros, el CPNM Q61K, G12V, G12C y A146T, el CCR Q61K, G12V, G12C y A146T, el cáncer de ovario o el cáncer de páncreas. Por ejemplo, los cánceres a tratar mediante las terapias combinadas desveladas en la presente memoria incluyen el cáncer de pulmón KRAS^{Q61K}, el cáncer de ovario KRAS^{G12D}, el cáncer de páncreas KRAS^{G12D} y el cáncer de páncreas KRAS^{G12R}.

40 El término tumor o cáncer "con mutación de BRAF" incluye cualquier tumor que presente una proteína BRAF mutada. Los ejemplos de mutaciones de B-Raf incluyen, pero no se limitan a V600E y V600K. La mayoría de las mutaciones de B-Raf se agrupan en dos regiones: el bucle P rico en glicina del lóbulo N y el segmento de activación y las regiones flanqueantes. La mutación V600E se ha detectado en diversos tipos de cáncer, y se debe a una sustitución de timina por adenina en el nucleótido 1799. Esto provoca la sustitución de la valina (V) por el glutamato (E) en el codón 600 (ahora denominado V600E). Los cánceres tratados mediante las combinaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden encontrarse en un estado temprano, intermedio o avanzado.

45 **Terapias combinadas**

Las combinaciones descritas en la presente memoria pueden administrarse al individuo por vía sistémica (*p. ej.*, por vía oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, rectal, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, o por inhalación o instalación intracavitaria), por vía tópica, o por aplicación en las membranas mucosas, como la nariz, la garganta y los bronquios. Tanto el Compuesto A como el Compuesto B pueden administrarse por vía oral, y pueden administrarse juntos (al mismo tiempo) o por separado en cualquier orden, siguiendo esquemas de dosificación determinados por un médico tratante; en la presente memoria se describen dosis y esquemas de dosificación adecuados.

Otras terapias combinadas

55 En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en combinación con una o más modalidades de terapia contra el cáncer, como moléculas de anticuerpos, quimioterapia, otros agentes

terapéuticos anticancerosos (p. ej., terapias anticancerosas dirigidas, terapia génica, terapia vírica, terapia de ARN, trasplante de médula ósea, nanoterapia o fármacos oncolíticos), agentes citotóxicos, terapias inmunológicas (p. ej., citoquinas, inmunoestimulantes o terapias inmunológicas celulares), procedimientos quirúrgicos (p. ej., tumorectomía o mastectomía) o procedimientos de radiación, o una combinación de cualquiera de los anteriores. La terapia adicional puede ser en forma de terapia adyuvante o neoadyuvante. En algunas realizaciones, la terapia adicional es un inhibidor enzimático (por ejemplo, un inhibidor enzimático de molécula pequeña) o un inhibidor metastásico. Los agentes citotóxicos ejemplares que pueden administrarse en combinación con la combinación de la invención incluyen agentes antimicrotúbulos, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antraciclinas, alcaloides de la vinca, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con una vía de transducción de señales, agentes que promueven la apoptosis, inhibidores del proteosoma y radiación (por ejemplo, irradiación local o de todo el cuerpo (por ejemplo, irradiación gamma). En otras realizaciones, la terapia adicional es cirugía o radiación, o una combinación de las mismas. En otras realizaciones, la terapia adicional es una terapia dirigida a una o más de las vías PI3K/AKT/mTOR, un inhibidor de HSP90 o un inhibidor de tubulina.

Alternativamente, o en combinación con las combinaciones antes mencionadas, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse en combinación con una o más de las siguientes: un inmunomodulador (por ejemplo, un activador de una molécula coestimuladora o un inhibidor de una molécula inhibidora, por ejemplo, una molécula de punto de control inmunitario); una vacuna, por ejemplo, una vacuna terapéutica contra el cáncer; u otras formas de inmunoterapia celular.

Cualquier combinación y secuencia de otros agentes terapéuticos, procedimientos o modalidades (por ejemplo, como se describe en la presente memoria) se puede utilizar en combinación con los tratamientos de la invención. Las composiciones y combinaciones de la invención pueden administrarse antes de otros procedimientos de tratamiento, simultáneamente con otros procedimientos de tratamiento, entre ciclos de esos otros tratamientos o durante la remisión del trastorno.

Los términos seleccionados se definen a continuación y a lo largo de la solicitud.

Tal y como se utilizan en la presente memoria, los artículos "un" y "una" se refieren a uno o a más de uno (por ejemplo, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

El término "o" se usa en la presente memoria para significar, y se usa indistintamente con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

"Alrededor de" y "aproximadamente" generalmente significará un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Los grados de error ejemplares están dentro del 20 por ciento (%), por lo general, dentro del 10 %, y más por lo general, dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado. En particular, cuando se menciona una dosificación como "aproximadamente" de un valor particular, se pretende incluir un intervalo en torno al valor especificado de más o menos un 10%. Como es habitual en la técnica, las dosis se refieren a la cantidad del agente terapéutico en su forma libre. Por ejemplo, cuando se hace referencia a una dosis de 100 mg del compuesto B, y el compuesto B se utiliza como su sal clorhidrato, la cantidad de agente terapéutico utilizada equivale a 100 mg de la forma libre del compuesto B.

Por "una combinación" o "en combinación con" no se pretende implicar que la terapia o los agentes terapéuticos deban mezclarse físicamente o administrarse al mismo tiempo y/o formularse para la administración conjunta, aunque estos procedimientos de administración están dentro de los alcance descrito en la presente memoria. Un agente terapéutico en estas combinaciones se puede administrar simultáneamente con, antes o después de una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos o protocolos terapéuticos pueden administrarse en cualquier orden. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. Se apreciará además que el agente terapéutico adicional usado en esta combinación puede administrarse en conjunto en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se prevé que los agentes farmacéuticos adicionales usados en combinación se usarán a niveles que no excedan los niveles en los que se usan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles usados en combinación serán más bajos que aquellos usados como agentes terapéuticos individuales.

El término "sinérgico", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la acción de dos agentes terapéuticos como, por ejemplo, el compuesto inhibidor de c-RAF del Compuesto A, y un compuesto inhibidor de ERK 1/2 del Compuesto B, produciendo un efecto, por ejemplo, ralentizando la progresión sintomática de una enfermedad proliferativa, particularmente cáncer, o síntomas de la misma, que es mayor que la simple suma de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. El efecto sinérgico puede calcularse, por ejemplo, utilizando procedimientos adecuados como los descritos en (Lehar et al 2009).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional (por ejemplo, el inhibidor de CRAF) se administra a una dosis terapéutica o inferior a la terapéutica en relación con un nivel de dosis de agente único. En ciertas realizaciones, la concentración del segundo agente terapéutico que se requiere para lograr la inhibición, por ejemplo, la inhibición del crecimiento o la reducción del tumor, es menor cuando el segundo agente terapéutico se usa o administra en combinación con el primer agente terapéutico que cuando cada agente terapéutico se administra individualmente. En

certas realizaciones, la concentración o dosificación del primer agente terapéutico que se requiere para lograr la inhibición, por ejemplo, la inhibición del crecimiento o la reducción del tumor, es menor cuando el primer agente terapéutico se administra en combinación con el segundo agente terapéutico que cuando el primer agente terapéutico se administra individualmente. En ciertas realizaciones, en una terapia combinada, la concentración o dosificación del segundo agente terapéutico que se requiere para lograr la inhibición, por ejemplo, la inhibición del crecimiento, es menor que la dosis terapéutica del segundo agente terapéutico como una monoterapia, por ejemplo, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 % u 80-90 % menor. En ciertas realizaciones, en una terapia combinada, la concentración o dosificación del primer agente terapéutico que se requiere para lograr la inhibición, por ejemplo, la inhibición del crecimiento, es menor que la dosis terapéutica del primer agente terapéutico como monoterapia, por ejemplo, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 % u 80-90 % menor.

El término "inhibición", "inhibidor" o "antagonista" incluye una reducción de un determinado parámetro, por ejemplo, una actividad, de una molécula o vía determinada. Por ejemplo, este término incluye la inhibición de la actividad de una cinasa diana (CRAF o ERK) en un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o más. De este modo, la inhibición puede ser, aunque no necesariamente, del 100%.

El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento no deseado y descontrolado de células aberrantes. Las células de cáncer se pueden extender localmente o por medio del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" o "tumor" incluyen cánceres y tumores premalignos y malignos.

Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, la gravedad y/o la duración de un trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo, o la mejora de uno o más síntomas (preferentemente, uno o más síntomas discernibles) del trastorno resultante de la administración de una o más terapias. En determinadas realizaciones, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la mejora de al menos un parámetro físico medible de un trastorno proliferativo, tal como el crecimiento de un tumor, no necesariamente perceptible por el paciente. En otras realizaciones, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la inhibición de la progresión de un trastorno proliferativo, ya sea físicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico, o ambos. En otras realizaciones los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la reducción o estabilización del tamaño del tumor o del recuento de células cancerosas.

Composiciones y kits farmacéuticos

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

La forma de unidad de dosificación, como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los individuos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por y directamente dependiente en (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular para ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de componer tal un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según los factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del inhibidor CRAF y/o ERK 1/2 se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "dosis terapéuticamente eficaz" modula preferentemente un parámetro medible de la manera deseada, por ejemplo, la tasa de crecimiento tumoral, en al menos un 20%, más preferentemente en al menos un 40%, aún más preferentemente en al menos un 60%, y aún más preferentemente en al menos un 80% en relación con los individuos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular de manera deseable un parámetro mensurable, por ejemplo, un cáncer, puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos para ayudar a establecer niveles y esquemas de dosificación apropiados. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para modular un parámetro no deseado mediante ensayos *in vitro* conocidos por el profesional experto.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en individuos antes o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden estar comprendidos en un kit. El kit también puede incluir uno o varios elementos más: instrucciones de uso; otros reactivos para su uso con el compuesto o compuestos; dispositivos u otros materiales para preparar el compuesto para su administración, como un recipiente de mezcla; portadores farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para su administración a un individuo, como una jeringa.

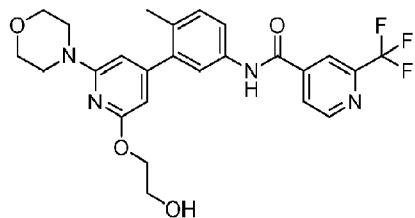
Las combinaciones de la invención tienen funciones terapéuticas, protectoras o ambas, y pueden usarse *in vivo* o *ex vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o un individuo humano, para tratar, prevenir, y/o diagnosticar una variedad de trastornos, tal como los cánceres descritos en la presente memoria.

10 El Compuesto A junto con el Compuesto B proporcionan una eficacia mejorada que no puede alcanzarse con seguridad administrando dosis similares de cualquiera de los compuestos como agente único. Estas combinaciones son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres que expresan una o más mutaciones de ganancia de función en la vía MAPK, en particular mutaciones en los genes RAS y/o Raf.

Ejemplos

15 **Ejemplo de Referencia 1:** N-(3-(2-(2-hidroxietoxi)-6-morfolinopiridin-4-il)-4-metilfenil)-2-(trifluorometil)isonicotinamida

El Compuesto A es un compuesto biarílico sustituido con morfolina de la siguiente estructura



20 El Compuesto A es el Ejemplo 1156 de la solicitud PCT publicada WO2014/151616. La preparación del compuesto A, las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto A y las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto A también se describen en la solicitud PCT, por ejemplo, en las páginas 739-741.

Ejemplo 1A:

25 **Determinación *in vitro* de la actividad Raf**

Las enzimas RAF y el sustrato proteico MEK1 catalíticamente inactivo se fabricaron internamente utilizando procedimientos convencionales. El ADNc de CRAF se subclonó como proteína de longitud completa, con las mutaciones activadoras Y340E e Y341E, en un vector de expresión de baculovirus para la expresión en células de insecto Sf9. El ADNc de h14-3-3 zeta se subclonó en un vector de expresión de baculovirus para la expresión en células de insecto SF9. Las células Sf9 que co-expresan ambas proteínas fueron lisadas y sometidas a cromatografía de níquel inmovilizado y eluidas con Imidazol. Se utilizó una segunda columna (columna de unión a StreptII) y se eluyó con destiobiotina. Las etiquetas de la proteína se eliminaron utilizando la enzima Prescission y la proteína se purificó aún más utilizando un paso de flujo para eliminar las etiquetas.

C-Raf FL se refiere a la proteína C-Raf de longitud completa.

35 La MEK1 completa con una mutación inactivadora del sitio de unión al ATP K97R se utiliza como sustrato de RAF. El ADNc de MEK1 se subclonó con una etiqueta N-terminal (his)₆ en un vector para la expresión en *E. Coli*. El sustrato MEK1 se purificó a partir de lisado de *E. Coli* mediante cromatografía de afinidad con níquel seguida de intercambio aniónico. La preparación final de MEK1 se biotiniló (Pierce EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin) y se concentró.

Materiales de ensayo

40 Tampón de ensayo: Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 15 mM, Albúmina de suero bovino (BSA) 0,01%, ditioltreitol 1 mM (DTT)

Tampón de parada: 60 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,01% de Tween® 20

b-Raf (V600E), activo

Mek biotinilado, cinasa muerta

Kit de detección Alpha Screen (disponible en PerkinElmer™, Núm. 6760617R)

Anti fosfo-MEK1/2 (disponible en Cell Signalling Technology, Inc. #9121)

Placas de ensayo de bajo volumen de 384 pocillos (placas blancas Greiner®)

Condiciones de ensayo

- 5 b-Raf (V600E) aproximadamente 4 pM
 c-Raf aproximadamente 4 nM
 Mek biotinilado, cinasa muerta aproximadamente 10 nM
 ATP 10 µM para BRAF (V600E) y 1 µM para CRAF
 Tiempo de preincubación con compuestos 60 minutos a temperatura ambiente
 10 Tiempo de reacción 1 o 3 horas a temperatura ambiente

Protocolo de ensayo

- Raf y Mek biotinilado, cinasa muerta, se combinaron a concentraciones finales 2X en tampón de ensayo (Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 15 mM, 0,01% BSA y 1 mM DTT) y se dispensaron 5 ml por pocillo en placas de ensayo (placas de ensayo Greiner blancas de 384 pocillos #781207) que contenían 0,25 ml de 40X de un compuesto de ensayo inhibidor de cinasa Raf diluido en 100% DMSO. La placa se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.
 15
 La reacción de la actividad cinasa Raf se inició mediante la adición de 5 ml por pocillo de ATP 2X diluido en tampón de ensayo. Después de 3 horas (b-Raf(V600E)) o 1 hora (c-Raf). Se detuvieron las reacciones y se midió el producto fosforilado utilizando un anticuerpo de conejo anti-p-MEK (Cell Signaling, #9121) y el kit de detección Alpha Screen IgG (ProteinA) (PerkinElmer #6760617R), mediante la adición de 10 µl al pocillo de una mezcla del anticuerpo (dilución 1:2000) y perlas de detección (dilución 1:2000 de ambas perlas) en tampón Stop/bead (EDTA 25 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, Tween20 0,01%). Las adiciones se realizaron en condiciones de oscuridad para proteger las perlas de detección de la luz. Se colocó una tapa encima de la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después se leyó la luminiscencia en un instrumento PerkinElmer Envision. La concentración de cada compuesto para una inhibición del 50% (IC₅₀) se calculó mediante regresión no lineal utilizando el software de análisis de datos XL Fit.
 20
 25 Usando los ensayos descritos anteriormente, el Compuesto A exhibió eficacia inhibitoria como se informa a continuación.

El Compuesto A es un inhibidor de tipo II tanto de b-Raf y c-Raf.

Compuesto	b-Raf IC-50 (µM)	c-Raf FL IC-50 (µM)
Compuesto A	0,00073	0,00020

Ejemplo 1B

- 30 El Compuesto A muestra actividad en numerosas líneas celulares de cáncer humano que expresan mutaciones en la vía MAPK como se muestra en la siguiente Tabla. Cabe destacar que la actividad es especialmente intensa en líneas celulares que albergan al menos una mutación en BRAF o RAS.

Tabla 1. Efecto del Compuesto A sobre la proliferación en un panel de líneas celulares de cáncer humano.

Línea celular	IC ₅₀ [µM]	Tipo de tumor	BRAF	RAS
A375	0,24	Melanoma	V600E	WT
VM2664	0,45	Melanoma	V600D	WT
IPC298	0,25	Melanoma	WT	NRAS Q61L
HeyA8	0,21	Ovarios	G464E	KRAS G12D

Línea celular	IC ₅₀ [μM]	Tipo de tumor	BRAF	RAS
HCT116	0,47	Colorrectal	WT	KRAS G13D
Calu-6	1,5	NSCLC	WT	KRAS Q61K
HuP-T4	0,65	Páncreas	WT	KRAS G12V
PSN1	0,68	Páncreas	WT	KRAS G12R
TCC-PAN2	0,42	Páncreas	WT	KRAS G12R
NCI-H2073	18,2	NSCLC	WT	WT
HCC827	>20	NSCLC	WT	WT
PC3	>20	Próstata	WT	WT

Se trataron diferentes líneas celulares tumorales con titulaciones de dosis del Compuesto A durante 72 h, y se determinó la proliferación celular mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscenteCellTiter-Glo™ .

Ejemplo 1C

Para investigar la actividad del Compuesto A en células de melanoma mutantes B-Raf V600 refractarias a inhibidores BRAF y/o MEK, se evaluó la actividad antiproliferativa del Compuesto A en los modelos mecanísticos derivados de la línea celular de melanoma BRAF V600 A375 que expresa mutaciones de *MEK1/2*, *NRAS* o una variante de empalme de *BRAF*. Se ha demostrado tanto en estudios preclínicos como en muestras clínicas que estas mutaciones confieren resistencia a los inhibidores de BRAF y/o MEK. A continuación se resumen los efectos inhibidores del crecimiento del Compuesto A en la línea celular parental A375 y sus derivados que expresan los diversos alelos mutantes, en comparación con la eficacia del inhibidor de BRAF vemurafenib y el inhibidor de MEK selumetinib. Las mutaciones confirieron resistencia tanto a los inhibidores de BRAF como a los de MEK, dando lugar a incrementos superiores a 50 veces en los valores de IC₅₀. Por el contrario, los modelos resistentes seguían siendo sensibles al Compuesto A, con sólo un aumento de 2-3 veces en la IC₅₀. Estos datos respaldan el uso del Compuesto A en pacientes con melanoma BRAF V600 que se han vuelto refractarios a los inhibidores de BRAF y/o MEK.

Efecto antiproliferativo del Compuesto A en modelos mecanísticos A375 resistentes a inhibidores de BRAF y MEK

Línea celular	Compuesto A IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ de Vemurafenib [μM]	IC ₅₀ de Selumetinib [μM]
A375	0,42	0,066	0,036
A375, BRAFp61V600E.	0,72	8,51	>10
A375, MEK1 Q56P.	1,15	9,62	5,35
A375, MEK1 C121S.	1,14	8,7	2,33
A375, MEK1 E203K.	1,05	5,58	1,81
A375, MEK2 Q60P.	1,12	5,28	4,84
A375/NRAS - Q61K	0,95	9,38	5,5

Se modificaron las líneas celulares A375 para que expresaran de manera inducible modelos de resistencia tras el tratamiento con doxiciclina. A continuación, las células se trataron con diluciones seriadas del Compuesto A, Vemurafenib o Selumetinib durante 72 horas para evaluar la actividad antiproliferativa. La proliferación celular se

Línea celular	Compuesto A IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ de Vemurafenib [μM]	IC ₅₀ de Selumetinib [μM]
determinó mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™ y se calculó como porcentaje del control DMSO.			

Ejemplo 1D

El Compuesto A se formuló con hidroxipropilmethylcelulosa/hipromelosa, dióxido de silicio coloidal, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona/povidona y estearato de magnesio, y se formaron comprimidos que contenían aproximadamente 50 mg de compuesto A. Se administró una vez al día a individuos en ayunas un número de comprimidos suficiente para proporcionar la dosis deseada. Los sujetos fueron tratados a dosis de 100 mg una vez al día, o 200 mg una vez al día. Se recogieron muestras de sangre seriadas para evaluaciones PK hasta 48 horas después de la primera dosis del Compuesto A (Ciclo 1 Día 1), y hasta 24 horas después de dosis múltiples (Ciclo 1 Día 15). Se alcanzaron concentraciones plasmáticas máximas (Cmáx) de 447 ng/ml y 889 ng/ml en las 4 horas siguientes a la administración de una dosis única de 100 mg y una dosis única de 200 mg, respectivamente. La media de exposición plasmática en el intervalo de dosis de 24 horas (AUCltau) el día 1 de la dosificación fue de 5679 h.ng/ml y 10019 h.ng/ml tras las dosis de 100 mg y 200 mg del Compuesto A, respectivamente. Se calcula que la semivida es de unas 23-24 horas en los pacientes. La dosificación una vez al día de 100 mg dio lugar a una ligera acumulación del Compuesto A en plasma, con una proporción de acumulación de 1,8. En base a estos datos, se estableció una pauta posológica de una vez al día. Dado que este estudio está en curso, todos los datos presentados se consideran preliminares.

Ejemplo de Referencia 2: Actividad antitumoral del compuesto A en modelos de CPNM con mutación de KRAS Modelo H358:

Ratones SCID, color beige, hembra, portadores de tumores NCI-H358, n=8 por grupo, fueron distribuidos de forma aleatoria en 3 grupos 14 días después de la inoculación de células tumorales con un intervalo de volumen tumoral promedio de 262,47mm³.

Se administró a los animales una dosis oral de vehículo, Compuesto A a 30 mg/kg o a 200 mg/kg diariamente durante 14 días consecutivos a un volumen de dosificación de 10ml/kg de peso corporal animal durante el curso del tratamiento. Se midieron los volúmenes tumorales con un calibrador digital 3 veces por semana y se registraron los pesos corporales de todos los animales a lo largo del tratamiento.

Modelo Calu6:

Ratones desnudos hembra portadores de tumores Calu6, n=6 por grupo, fueron distribuidos de manera aleatoria en grupos de tratamiento cuando el volumen tumoral promedio fue de 180 mm³. Los tratamientos con el compuesto A se iniciaron el día 17 y continuaron durante 16 días. El volumen de dosificación fue de 10 ml/kg. Los volúmenes tumorales se recogieron en el momento de la aleatorización y, a partir de entonces, dos veces por semana durante el estudio.

Modelo H727:

Ratones hembra desnudos Foxn1 portadores del tumor NCI-H358, n=8 por grupo, fueron distribuidos de manera aleatoria en 2 grupos con un volumen tumoral promedio de 275,74 mm³. A los animales se les administró una dosis oral del vehículo o del Compuesto A a 100 mg/kg diarios durante 14 días consecutivos a un volumen de dosificación de 10ml/kg de peso corporal del animal durante el curso del tratamiento. Se midieron los volúmenes tumorales con un calibrador digital 3 veces por semana y se registraron los pesos corporales de todos los animales a lo largo del tratamiento. Como se muestra en las Figuras 1A, 1B y 1C, el compuesto A mostró actividad como agente único en modelos de CPNM KRASmt.

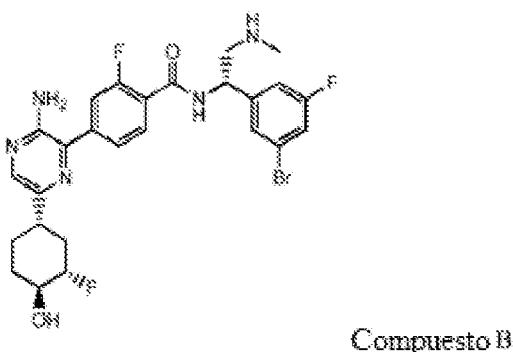
En ensayos basados en células, el Compuesto A ha demostrado actividad antiproliferativa en líneas celulares que contienen una variedad de mutaciones que activan la señalización MAPK. Por ejemplo, el compuesto A inhibió la proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico Calu-6 (KRAS Q61K) y de la línea celular colorrectal HCT116 (KRAS G13D) con valores de IC₅₀ que oscilaban entre 0,2 y 1,2 μM. In vivo, el tratamiento con el compuesto A generó regresiones tumorales en varios modelos humanos mutantes de KRAS, incluidos los xenoinjertos derivados de NSCLC Calu-6 (KRAS Q61K) y NCI-H358 (KRAS G12C). En todos los casos, los efectos antitumorales fueron dependientes de la dosis y bien tolerados, a juzgar por la ausencia de pérdida significativa de peso corporal. El modelo Calu-6 fue sensible al Compuesto A cuando se implantó en ratones y ratas desnudas, observándose regresiones a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg una vez al día (QD) en ratones y 75 y 150 mg/kg QD en ratas. En este modelo se observó estasis tumoral con 30 mg/kg de QD y 35mg/kg de QD en ratones y ratas, respectivamente. También se lograron regresiones en un segundo modelo humano de CPNM, el NCI-H358, a la dosis de 200 mg/kg de QD en ratones y en el xenoinjerto humano de ovario Hey-A8 a dosis tan bajas como 30 mg/kg de QD en ratones. Adicionalmente, los datos de un estudio de eficacia de fraccionamiento de dosis en xenoinjertos de Calu-6 demostraron que a través de diferentes niveles de dosificación, el Compuesto A dosificado QD y fraccionado dos veces al día (BID) mostró niveles similares de actividad antitumoral. Estos resultados apoyan la exploración del régimen de dosis QD o

BID en la clínica. Colectivamente, la supresión in vitro e in vivo de la vía MAPK y la actividad antiproliferativa observadas para el Compuesto A a dosis bien toleradas sugieren que el Compuesto A puede tener actividad antitumoral en pacientes con tumores que albergan lesiones activadoras de la vía MAPK y, en particular, puede por tanto ser útil como agente único o en combinación con un segundo agente, tal como un inhibidor que afecte a una etapa diferente de la vía MAPK, para el tratamiento de pacientes con NSCLC que alberguen mutaciones de KRAS.

5 Se ha demostrado que el Compuesto A tiene actividad como agente único contra varios otros cánceres que expresan mutaciones de ganancia de función en la vía MAPK, por ejemplo en RAS o RAF, incluidos el cáncer de ovario, el cáncer de páncreas y el melanoma, y en sistemas modelo se ha demostrado que es más eficaz contra estas afecciones cuando se usa en combinación con un inhibidor de ERK como el compuesto B.

Ejemplo de Referencia 3:

El Compuesto B es un inhibidor de ERK 1/2. El compuesto se desvela y su preparación se describe en la Solicitud de Patente PCT WO2015/066188 publicada.



15 En algunas realizaciones, este compuesto se utiliza como su sal de clorhidrato.

En un ensayo de proliferación de 3 días, el Compuesto B mostró una inhibición robusta del crecimiento celular, con valores del C_{50} de menos de 1 μ M en un subconjunto de líneas celulares que albergaban mutaciones KRAS, incluyendo la línea celular de cáncer de pulmón Calu6 (KRAS^{Q61K}), la línea celular de cáncer de ovario HeyA8 (KRAS^{G12D}), las líneas celulares de cáncer de páncreas AsPC-1 (KRAS^{G12D}) y PSON1 (KRAS^{V12R}).

20 **Ejemplo 4: Efecto de una combinación de Compuesto A y Compuesto B en líneas celulares con mutación KRAS**

El efecto sobre la proliferación de la combinación del Compuesto A y el Compuesto B se evaluó in vitro en un panel de catorce (14) líneas celulares mutantes de KRAS derivadas de CPNM (4), cáncer colorrectal (CCR) (4) y adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) (6).

25 El kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (CTG) (Promega, Madison, WI, EE.UU.) mide la cantidad de ATP presente en un pocillo tras la lisis de las células. El ATP liberado en la lisis se mide en una reacción enzimática que incluye la luciferasa y su sustrato, la luciferina. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP, que a su vez es proporcional al número de células vivas en el pocillo. Este ensayo se usa para determinar la proporción de células viables tras el tratamiento farmacológico.

30 Los reactivos utilizados para el ensayo CTG, incluidas las 14 líneas celulares, los medios y las densidades celulares, se describen en las Tablas siguientes.

Las células se sembraron en conjuntos duplicados de acuerdo con la información de la Tabla siguiente a 50ul/pocillo en placas blancas de cultivo tisular de 384 pocillos (#3707, Coming, NY, EE. UU.). Al día siguiente, los compuestos se diluyeron en DMSO en una placa de compuestos (#788876, Greiner, Monroe, NC, EE. UU.) creando una serie de dilución de 7 puntos 1:3 (1000 veces las concentraciones finales requeridas). Los compuestos se dosificaron en las placas celulares hasta alcanzar una dilución de 1:1000 utilizando un dosificador acústico (ATS100, EDC Biosystems, California, EE. UU.). Por ejemplo, un pocillo de la placa de compuesto contenía 10 mM de Compuesto A y la transferencia de 50 nL de compuesto a 50 uL de células logró una concentración final de 10uM para ese compuesto en ese pocillo dado. En la sección 2.3 se describen la disposición y las concentraciones de la rejilla de combinaciones que se creó en nuestras placas de ensayo utilizando el ATS100. Después, las placas de ensayo se volvieron a colocar en una incubadora deCO₂ humidificado a 37°C.

Tras 5 días de incubación de los compuestos, se añadieron 25uL/pocillo de reactivo de viabilidad CTG a cada pocillo (75ul de volumen total) y, tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se leyeron en un lector de

microplacas utilizando un protocolo de luminiscencia ultrasensible de 0,1 segundos (Envision, Perkin Elmer, Hopkinton, MA, EE. UU.).

- 5 Los datos se normalizaron al promedio de los pocillos no tratados (tratados sólo con DMSO) para esa línea celular dada. A continuación, los valores se restaron de 1 y se multiplicaron por 100 para representar el % de inhibición. A continuación, los datos normalizados se ajustaron a curvas utilizando el modelo de ajuste de curvas de regresión logística de cuatro parámetros (4PL) mediante un software propio (HELIOS). Se comunicaron las IC₅₀ (concentración inhibitoria semimáxima) para las curvas de agente único en las que el compuesto inhibía el crecimiento celular en un 50%.

Tabla: Reactivos y materiales de ensayo

Reactivos
Placas de cultivo de tejidos de poliestireno blanco (384)
Placa de compuesto COC negra (384)
Roswell Park Memorial Institute (medio): (RPMI):
Medio de Ham's F12
Medio de McCoy's 5A
Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM)
Tripsina-EDTA 0,05%
Suero fetal bovino (FBS) 100%
Solución salina tamponada con fosfato
DMSO
Reactivos de viabilidadCellTiter-Glo®

10

Tabla: Medios para líneas celulares y densidades de siembra

Línea celular	Mutación	Medios	Tipo de cáncer	Densidad de siembra (384 pocillos, 50 uL/pocillo)
HCT-15	KRAS ^{G13D}	RPMI+10 % de FBS	CRC	400
SK-CO-1	KRAS ^{G12V}	EMEM+10 % de FBS	CRC	1500
HCC-56	KRAS ^{G12V}	RPMI+10 % de FBS	CRC	3000
HCT116	KRAS ^{G12D}	McCoy's+FBS 10%	CRC	200
Calu-6	KRAS ^{Q61K}	EMEM+10 % de FBS	NSCLC	1000
A549	KRAS ^{G12S}	F12+10 % de FBS	NSCLC	200
HCC-2108	KRAS ^{Q61H}	RPMI+10 % de FBS	NSCLC	600
NCI-H2122	KRAS ^{G12C}	RPMI+10 % de FBS	NSCLC	800
HUP-T4	KRAS ^{G12V}	EMEM+10 % de FBS	PDAC	700

Línea celular	Mutación	Medios	Tipo de cáncer	Densidad de siembra (384 pocillos, 50 uL/pocillo)
HPAF-II	KRAS ^{G12D}	EMEM+10 % de FBS	PDAC	1000
SU.86.86	KRAS ^{G12D}	RPMI+10 % de FBS	PDAC	500
CFPAC-1	KRAS ^{G12V}	DMEM+FBS 10%	PDAC	900
TCC-PAN2	KRAS ^{G12R}	RPMI+10 % de FBS	PDAC	1000
PSN1	KRAS ^{G12R}	RPMI+10 % de FBS	PDAC	200

En todos los casos, las combinaciones se evaluaron en una matriz de cuadrícula completa usando concentraciones del Compuesto A que oscilaban entre 0,014 y 10 uM y concentraciones del Compuesto B que oscilaban entre 0,011 y 8,0 uM. Se determinó si la combinación era sinérgica o no en una línea celular particular usando dos mediciones de sinergia; la puntuación de sinergia y el índice de combinación (CI) en el nivel de inhibición de 50 o 75% (Lehar et al., 2009).

La combinación del Compuesto A y el Compuesto B fue de moderada a fuertemente sinérgica en 7/14 líneas celulares probadas. En la siguiente tabla se muestra un resumen de estos valores para cada línea celular.

Tabla: Sumario de Puntuaciones de Sinergia de Compuesto A x Compuesto B y valores de CI₅₀

Línea celular	Tipo de cáncer	Mutación KRAS	Puntuación de Sinergia Loewe	Error de puntuación de Sinergia Loewe	CI ₅₀	Error CI ₅₀	Determinación de sinergias
HCT-15	CRC	KRAS ^{G13D}	2,89	0,201	0,50	0,04	Aditivo/Sinergia
SK-CO-1	CRC	KRAS ^{G12V}	2,67	0,135	0,70	0,14	Aditivo/Sinergia
HCC-56	CRC	KRAS ^{G12V}	2,18	0,29	0,48	0,12	Sinergia
HCT 116	CRC	KRAS ^{G12D}	2,08	0,15	0,88	0,09	Aditivo/Sinergia
Calu-6	NSCLC	KRAS ^{Q61K}	3,43	0,228	0,58	0,13	Sinergia
A549	NSCLC	KRAS ^{G12S}	3,05	0,212	0,60	0,09	Sinergia
HCC-2108	NSCLC	KRAS ^{Q61H}	2,62	0,167	0,59	0,05	Aditivo/Sinergia
NCI-H2122	NSCLC	KRAS ^{G12C}	1,62	1,49	0,83	2,20	Aditivo
HUP-T4	PDAC	KRAS ^{G12V}	5,94	0,19	0,37	0,03	Sinergia
HPAF-II	PDAC	KRAS ^{G12D}	4,4	0,202	0,76	0,07	Sinergia
SU.86.86	PDAC	KRAS ^{G12D}	3,3	0,35	0,22	0,04	Sinergia
CFPAC-1	PDAC	KRAS ^{G12V}	2,14	0,144	0,36	0,03	Sinergia
TCC-PAN2	PDAC	KRAS ^{G12R}	1,54	0,252	0,45	0,20	Aditivo/Sinergia
PSN1	PDAC	KRAS ^{G12R}	0,872	0,0995	ND	ND	Aditivo

En la siguiente tabla se proporciona una pauta general para la interpretación de las puntuaciones/valores.

Tabla: Interpretación de la actividad combinada

Parámetros de combinación	Descripción del efecto
SS > 3,0 y Mejor C.I. > 0,5	Sinergia
SS > 2,0 y Mejor C.I. < 0,5	Sinergia
SS > 2,0 y Mejor C.I. > 0,5	Aditivo/Sinergia
SS > 1,0 pero < 2,0 y Mejor C.I. < 0,5	Aditivo/Sinergia
SS < 1,0 y Mejor C.I. < 0,5	Aditivo

- 5 Dentro del conjunto de líneas celulares probadas, la sinergia se observó predominantemente en modelos derivados de linajes NSCLC y PDAC, siendo los modelos Calu-6 (KRAS^{Q61K}) y HUPT4 (KRAS^{G12V}) los más sensibles para los dos linajes, respectivamente.

Ejemplo 5: El Compuesto A en combinación con el Compuesto B en un modelo de xenoinjerto de la enfermedad.

- 10 Se establecieron tumores de NSCLC Calu-6 en ratones hembra atípicos mediante inyección subcutánea de 10 millones de células en Matrigel™ al 50% en el flanco de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 250 mm³, los ratones fueron distribuidos de manera aleatoria en grupos de tratamiento (n= 7) de acuerdo con el volumen tumoral. Los agentes de prueba se administraron por vía oral una vez al día (qd) o una vez cada dos días (q2d) a las dosis indicadas. A-B) Volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento frente a los días posteriores a la aleatorización. C) Media de porcentaje de cambio en el peso corporal desde el inicial. Los datos de estos tratamientos se muestran en las Figuras 1A, 1B y 1C.

- 20 El tratamiento combinado con el Compuesto A y el Compuesto B condujo a una mayor profundidad y durabilidad de la respuesta tumoral en comparación con cualquiera de los dos agentes por separado en el xenoinjerto humano de NSCLC Calu-6. El Compuesto A dosificado a 30 mg/kg qd logró 26 % de T/C, mientras que el Compuesto B dosificado a 75 mg/kg qd2 o 50 mg/kg qd logró 4 % de T/C, y 22 % de regresiones, respectivamente, 17 días después de la dosificación. Por la combinación del Compuesto A dosificado a 30 mg/kg qd con el Compuesto B dosificado a 50 mg/kg qd o 75 mg/kg q2d se consiguieron 66 % y 51% de regresiones, respectivamente, 17 días después de la dosificación. Además de la mayor profundidad de la respuesta, la combinación del Compuesto A y el Compuesto B también condujo a una mayor durabilidad de la respuesta. Mientras que los tumores en ratones dosificados con agentes únicos Compuesto A y Compuesto B progresaron bajo tratamiento, la combinación de Compuesto A y Compuesto B juntos (independientemente de la dosis de Compuesto B) mantuvo regresiones tumorales 42 días después de la dosificación. En conjunto, estos datos sugieren que el tratamiento combinado con el Compuesto A y el Compuesto B consigue respuestas mayores y más duraderas en pacientes con la vía MAPK activada debido a mutaciones de ganancia de función en la vía MAPK. Además, estos resultados apoyan la exploración potencial de la dosificación intermitente del Compuesto B cuando se combina con el Compuesto A. Las combinaciones probadas fueron bien toleradas a juzgar por la falta de pérdida de peso corporal.

Ejemplo 6: Un estudio de fase I de búsqueda de dosis del Compuesto A en pacientes adultos con tumores sólidos avanzados que albergan alteraciones de la vía MAPK solo o con el Compuesto B.

Compuesto A como agente único

- 35 La dosis inicial y el régimen recomendados del Compuesto A como agente único en este estudio es de 100 mg QD por vía oral, con base en los datos preclínicos de seguridad, tolerabilidad, PK/PD obtenidos en estudios preclínicos, así como en la proyección exploratoria del rango de dosis eficaz en seres humanos. Pueden utilizarse dosis iniciales de 100 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg o 400 mg; los datos preliminares sugieren que una dosis inicial de 250 mg una vez al día puede ser eficaz en tumores sólidos. Para una máxima flexibilidad de dosificación, el Compuesto A puede prepararse como comprimidos de 50 mg y/o 100 mg para administración oral. Una formulación propuesta para uso clínico del Compuesto A incluye el Compuesto A combinado con uno o más excipientes seleccionados entre hidroxipropilmetilcelulosa (Hipromelosa), dióxido de silicio coloidal, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona (Povidona) y estearato de magnesio, y puede prepararse en forma de comprimidos para administración oral, conteniendo adecuadamente 50 mg o 100 mg de Compuesto A.

Las dosis provisionales para la escalada de dosis se pueden encontrar en la Tabla siguiente.

Tabla: Niveles de dosis provisorios para el Compuesto A

Nivel de dosis (DL)	Dosis diaria propuesta	Incremento de la dosis anterior
-1**	50 mg	-50%
1 (dosis inicial)	100 mg	(dosis inicial)
2	200 mg	100%
3	400 mg	100%
4	800 mg	100%
5	1200 mg	50%

*Es posible que se añadan niveles de dosis adicionales y/o intermedios durante el transcurso del estudio, incluyendo dosis fuera del rango de dosis provisionales que se muestran en esta tabla.

"Nivel de dosis -1" representa las dosis de tratamiento para pacientes que requieren una reducción de la dosis a partir del nivel de dosis inicial.

En la parte de expansión de dosis, los pacientes en el brazo de agente único del Compuesto A son tratados con el Compuesto A a la dosis recomendada y régimen seleccionado basado en los datos de escalado de dosis. Se espera que esta dosis sea segura y tolerada en pacientes adultos en todas las indicaciones incluidas en el ensayo.

5

El régimen clínico para este primer ensayo en humanos es un esquema de dosificación continua una vez al día para el Compuesto A. El régimen QD ha demostrado ser eficaz y tolerado en estudios preclínicos. En xenoinjertos de Calu6, se alcanzaron niveles similares de eficacia con regímenes fraccionados QD o BID, lo que sugiere que la eficacia está relacionada con la exposición global. La PK humana prevista y la semivida prevista (~9h), también sugieren que puede lograrse una exposición eficaz con la dosificación QD.

10

Además, puede determinarse una dosis eficaz mediante la monitorización de biomarcadores indicativos de la inhibición de la vía de la MAP cinasa. En particular, la DUSP6 (fosfatasa de doble especificidad 6) es un biomarcador conocido para esta vía, y se ha demostrado que los niveles in vivo de DUSP6 descenden en un individuo que recibe una dosis del Compuesto A que se asocia con niveles plasmáticos eficaces del Compuesto A. Así, la DUSP6 puede utilizarse como biomarcador farmacodinámico en individuos tratados con el Compuesto A, ya sea como agente único o en combinación con otro agente terapéutico.

15

Compuesto A en combinación con Compuesto B

El Compuesto B puede utilizarse como su sal clorhidrato. Para fines de ensayo, puede administrarse por vía oral, ya sea formulado con uno o más excipientes o como el compuesto solo, contenido en una cápsula farmacéuticamente aceptable, como un tapón de gel blando o duro, o mezclado con un medio conveniente para la administración por sonda.

20

El escalado de dosis del Compuesto A en combinación con el Compuesto B comienza con un régimen de dosificación identificado para el Compuesto A como agente único: la dosis inicial del Compuesto A puede ser inferior a la dosis del agente único. De este modo, la selección de esta dosis debe minimizar la exposición a niveles potencialmente tóxicos del fármaco, limitando al mismo tiempo el número de pacientes que podrían recibir dosis demasiado bajas para proporcionar una buena eficacia.

25

El régimen para el Compuesto A fue el mismo que el seleccionado para el agente único Compuesto A. En caso de que ambos regímenes para el agente único Compuesto A sean explorados durante la parte de expansión del agente único, entonces un régimen preferente será elegido para la combinación basado en todos los datos disponibles incluyendo seguridad y exposición. El cambio de régimen de dosis del compuesto A en el brazo de combinación en una fase posterior puede decidirse en función de los datos que vayan surgiendo.

30

El Compuesto B se administró a un nivel de dosificación proyectado para proporcionar una exposición suficiente para proporcionar una supresión tumoral eficaz basada en la actividad en modelos preclínicos. Con base en ensayos preclínicos, la eficacia parece estar determinada por el tiempo por encima de un nivel plasmático eficaz, por lo que la dosificación puede determinarse en una realización mediante la monitorización de los niveles plasmáticos del compuesto B. Se prevé que el nivel plasmático deseado para la eficacia sea de aproximadamente 600 nM, o aproximadamente 350 ng/ml; en consecuencia, la dosificación y el programa de administración (frecuencia) pueden

guiarse por el objetivo de mantener una concentración plasmática del compuesto B por encima de este nivel plasmático valle durante al menos un día, o al menos una semana, o durante un ciclo de tratamiento como 1, 2, 3 o 4 semanas, según considere apropiado el médico tratante.

5 El régimen clínico para este ensayo fue un programa de dosificación continua una vez al día para el Compuesto A y el Compuesto B.

Esto fue confirmado por los resultados preliminares obtenidos en el ensayo clínico. Un individuo con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) tratado con 1200 mg QD del Compuesto A mostró una respuesta parcial del -35% de acuerdo con los criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST).

10 En la parte de expansión de dosis, los pacientes en la rama de combinación son tratados a la dosis y régimen recomendados para la combinación de fármacos basada en los datos de escalada de dosis. Para proporcionar una flexibilidad de dosificación adecuada, el compuesto B puede prepararse en forma de cápsulas de gel que contienen diversas cantidades de compuesto B (opcionalmente como su clorhidrato), como dosis de aproximadamente 5 mg, 20 mg, 50 mg o 100 mg por cápsula de gel.

15 Los pacientes en la rama de combinación pueden ser tratados con el Compuesto A a una dosis diaria de aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 150 mg, o aproximadamente 200 mg, o aproximadamente 250 mg y con el Compuesto B a una dosis diaria de aproximadamente 50 mg, o aproximadamente 75 mg, o aproximadamente 100 mg. Por ejemplo, puede administrarse a los pacientes una dosis total de aproximadamente 100 mg de compuesto A al día y una dosis total de aproximadamente 100 mg de compuesto B al día, siendo preferente administrar las dosis una vez al día. Los pacientes también pueden recibir una dosis total de aproximadamente 200 mg de compuesto A al día y una dosis total de aproximadamente 100 mg de compuesto B al día, administrándose las dosis preferentemente una vez al día.

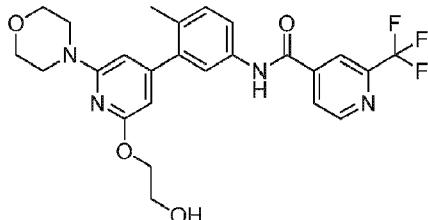
20 Los pacientes que reciben la terapia combinada incluyen pacientes con CPNM, por ejemplo pacientes adultos, con CPNM avanzado o metastásico con mutación de KRAS o con mutación de BRAF (por ejemplo con mutación de BRAF V600E). Estos pacientes pueden haber progresado tras el tratamiento estándar o para los que no existe un tratamiento estándar eficaz.

25 La eficacia del ensayo puede evaluarse midiendo la tasa de respuesta global (ORR), la tasa de control de la enfermedad (DCR), la duración de la respuesta (DOR), la supervivencia libre de progresión (PFS) de acuerdo con RECIST versión 1.1 y la supervivencia global (OS).

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende

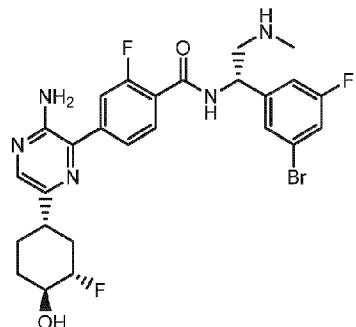
(i) un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A,



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) un inhibidor de ERK que es el Compuesto B,



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de CRAF, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor de ERK, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran por separado, simultánea o secuencialmente.

15 3. Una composición farmacéutica que comprende la combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

4. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

20 5. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que es un tumor sólido que alberga una o más alteraciones de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK).

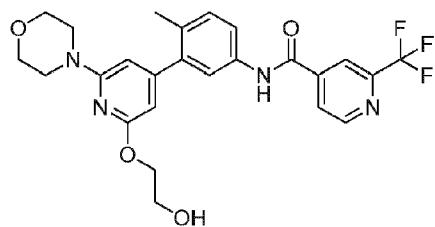
25 6. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enfermedad proliferativa se selecciona del grupo que consiste en CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) con mutación KRAS, CPNM con mutación de BRAF, cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS.

30 7. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la que el tumor o cáncer expresa al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones RAF V600E, V600D y G464E, y las mutaciones RAS A146T, Q61L, Q61K, G12D, G12C, G13D, G12V y G12R.

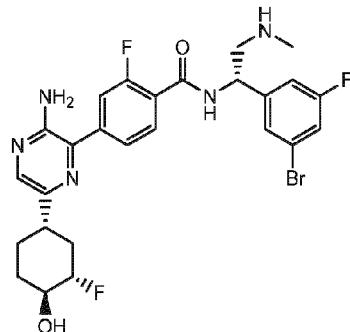
35 8. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en la que el inhibidor de CRAF, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis diaria de aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 150 mg, o aproximadamente 200 mg, o aproximadamente 250 mg.

9. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que el inhibidor de ERK, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de aproximadamente 50 mg al día, o aproximadamente 75 mg al día, o aproximadamente 100 mg al día.

- 5 10. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que (i) el Compuesto A se administra a una dosis diaria de 100 mg (por ejemplo, una vez al día) y el Compuesto B se administra a una dosis de 100 mg (por ejemplo, una vez al día), o (ii) en la que el Compuesto A se administra a una dosis diaria de 200 mg (por ejemplo, una vez al día) y el Compuesto B se administra a una dosis de 100 mg (por ejemplo, una vez al día).
- 10 11. Un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A,



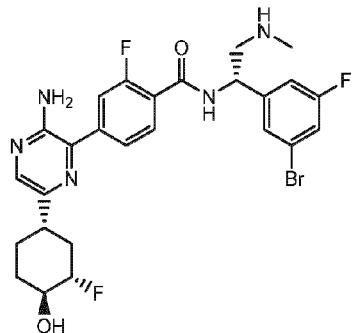
- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que se selecciona del grupo que consiste en CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) con mutación de KRAS, CPNM con mutación de BRAF, cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS, en combinación con un inhibidor de ERK que es el Compuesto B,



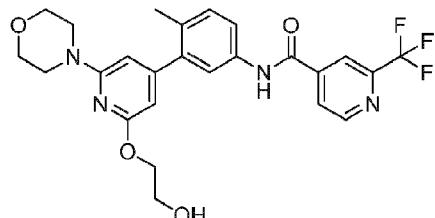
- 20 ,
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. El inhibidor de CRAF para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la enfermedad proliferativa es un cáncer que expresa al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones de RAF V600E, V600D y G464E, y las mutaciones de RAS A146T, Q61L, Q61K, G12D, G12C, G13D, G12V y G12R.

- 25 13. Un inhibidor de ERK que es el Compuesto B,



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que se selecciona del grupo que consiste en CPNM (cáncer de pulmón de células no pequeñas) con mutación de KRAS, CPNM con mutación de BRAF, cáncer de páncreas con mutación de KRAS, cáncer colorrectal (CCR) con mutación de KRAS y cáncer de ovario con mutación de KRAS, en combinación con un inhibidor de CRAF que es el Compuesto A,



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. El inhibidor de ERK para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la enfermedad proliferativa es un cáncer que expresa al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones de RAF V600E, V600D y G464E, y las mutaciones de RAS A146T, Q61L, Q61K, G12D, G12C, G13D, G12V y G12R.

15. Una preparación combinada que comprende (a) una o más unidades de dosificación de un inhibidor de CRAF de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) una o más unidades de dosificación de un inhibidor de ERK de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1A. Eficacia antitumoral del Compuesto A más Compuesto B en el modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo NSCLC humano Calu-6 en ratones

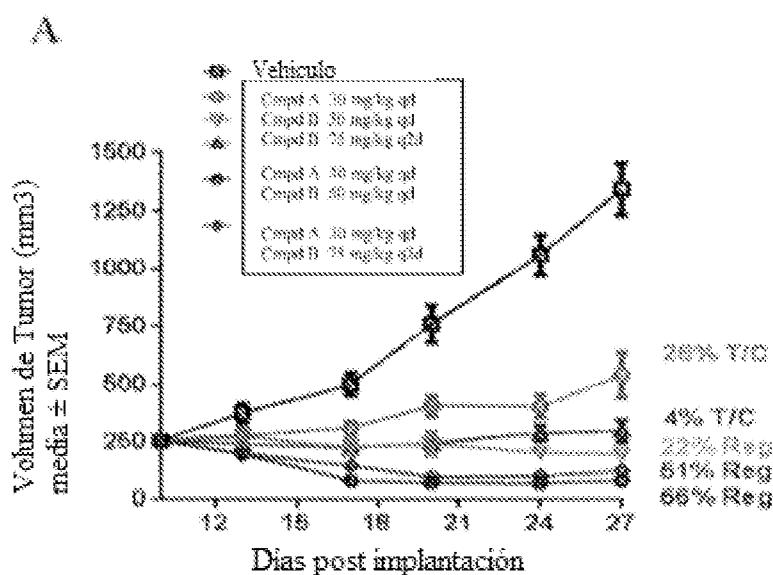


Figura 1B. Duración de Respuesta para Compuesto A más Compuesto B en el modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo NSCLC humano Calu-6 en ratones

B

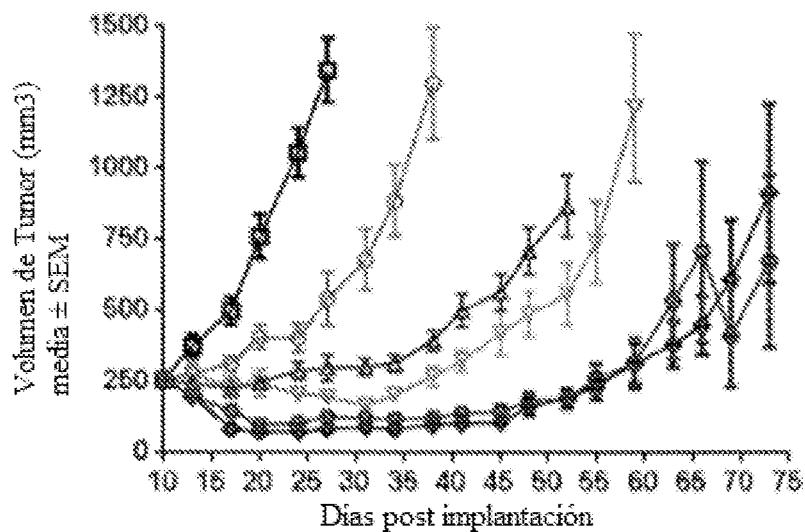


Figura 1C. Tolerabilidad de Compuesto A más Compuesto B en el modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo NSCLC humano Calu-6 en ratones

C

