

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 336**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2019** **PCT/EP2019/081291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2020** **WO20099542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2019** **E 19809391 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3880207**

54 Título: **Combinación de un inhibidor de Mcl-1 y midostaurina, usos y composiciones farmacéuticas de la misma**

30 Prioridad:

14.11.2018 US 201862767007 P
27.03.2019 US 201962824515 P
08.10.2019 US 201962912160 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2024

73 Titular/es:

LES LABORATOIRES SERVIER (50.0%)
35, rue de Verdun
92284 Suresnes Cedex, FR y
NOVARTIS AG (50.0%)

72 Inventor/es:

HALILOVIC, ENSAR;
WANG, YOUZHEN;
MORRIS, ERICK;
KONOPLEVA, MARINA y
SKWARSKA, ANNA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 978 336 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

Combinación de un inhibidor de Mcl-1 y midostaurina, usos y composiciones farmacéuticas de la misma

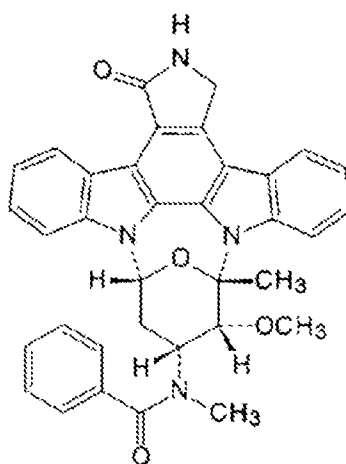
Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una combinación de Midostaurina, un inhibidor de tirosina quinasa con múltiples dianas como se define más adelante, y un inhibidor de Mcl-1, que es el Compuesto B o el Compuesto C como se definen a continuación.

La invención también se refiere a dicha combinación para uso en el tratamiento del cáncer, en particular leucemia mieloide aguda, y a una formulación farmacéutica adecuada para la administración de dicha combinación.

Antecedentes

10 La Midostaurina también se denomina 4'-N-benzoilestaurosporina o PKC412. La estructura química de la Midostaurina se muestra a continuación:



15 La Midostaurina, que también se refiere en la presente memoria como Compuesto A, su síntesis, su uso en el tratamiento del cáncer y las formulaciones farmacéuticas de la misma, se describen en la Patente de EE. UU. No. 5.093.330. La Midostaurina se describe específicamente en el Ejemplo 18 de la Patente de EE. UU. No. 5.093.330. Como un único agente frente a tumores sólidos en un ensayo de Fase I, la Midostaurina mostró una baja toxicidad, pero una eficacia limitada (Propper et al., *Journal of Clinical Oncology* 2001, 19, 1485-1492). Cuando se añadió a un tratamiento de cuidado estándar de inducción con citarabina y daunorrubicina y consolidación con citarabina, la Midostaurina mostró una eficacia estadísticamente significativa e incrementó la supervivencia global en pacientes con AML con mutación en FLT3 (Stone et al., *New England Journal of Medicine* 2017, 377, 454-464; Lusk et al., *Expert Review of Hematology* 2017, 10, 1033-1045).

La Midostaurina fue aprobada por la FDA de los EE. UU. en abril de 2017 como el ingrediente activo de RYDAPT™ para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) recién diagnosticada que portan una mutación en FLT3, en combinación con inducción con citarabina y daunorrubicina y consolidación con citarabina.

25 La inducción con citarabina y daunorrubicina seguida de la consolidación con citarabina es un cuidado estándar para AML. La citarabina y la daunorrubicina son fármacos quimioterapéuticos que actúan matando a las células proliferantes. La citarabina es un inhibidor de la ADN polimerasa y la daunorrubicina una antraciclina que bloquea la replicación. La administración de citarabina o daunorrubicina puede causar náuseas y vómitos, así como efectos secundarios más graves. Ambos fármacos deben proporcionarse por inyección y deberían proporcionarse en instalaciones especializadas de manera que los pacientes puedan monitorizarse de cerca después de la administración.

35 El inhibidor de Mcl-1 de la presente invención es un Compuesto B: ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico o Compuesto C: ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-5-il]metoxi}fenil)propanoico como se describe en la presente memoria. El Compuesto B y el Compuesto C, su síntesis, su uso en el tratamiento del cáncer y las formulaciones farmacéuticas de los mismos, se describen en WO 2015/097123, WO 2016/207216, WO 2016/207217, WO 2016/207225, WO 2016/207226, WO 2017/125224, WO 2018/126898 y WO 2018/078064.

En particular, el inhibidor de Mcl-1 es el Compuesto B:

ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se describe en el Ejemplo 30 de WO 2015/097123.

5 En otra realización, el inhibidor de Mcl-1 es el Compuesto C (S63845):

ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]metoxi]fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se describe en el Ejemplo 185 de WO 2015/097123.

10 La apoptosis es una ruta de muerte celular altamente regulada que se inicia por varios estímulos citotóxicos, incluyendo estrés oncogénico y agentes quimioterapéuticos. Se ha mostrado que la evasión de la apoptosis es una característica distintiva del cáncer y que la eficacia de muchos agentes quimioterapéuticos depende de la activación de la ruta mitocondrial intrínseca. Tres subgrupos distintos de las proteínas de la familia Bcl-2 controlan la ruta de apoptosis intrínseca:

15 (i) las proteínas sólo BH3 pro-apoptóticas (la homología Bcl-2 3); (ii) los miembros pro-supervivencia tales como Bcl-2 en sí mismo, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 y Bcl-2a1; y (iii) las proteínas efectoras pro-apoptóticas BAX y BAK (Czabotar et al, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, 15, 49-63). La sobreexpresión de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 se observa en muchos cánceres, particularmente en malignidades hematológicas tales como linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular/linfoma difuso de células B grandes (FL/DLBCL) y mieloma múltiple (Adams y Cory *Oncogene* 2007, 26, 1324-1337). La inhibición farmacológica de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w y Mcl-1 por los fármacos miméticos de BH3 recientemente desarrollados tales como ABT-199 (venetoclax). ABT-263 (navitoclax) y S63845 ha surgido como una estrategia terapéutica para inducir la apoptosis y causar la regresión tumoral en el cáncer (Zhang et al, *Drug Resist Updat* 2007, 10, 207-217; Kotschy et al., *Nature* 2016, 538, 477-482). No obstante, se han observado mecanismos de resistencia a los miméticos de BH3 (Choudhary et al., *Cell Death and Disease* 2015, 6, e1593) y el uso de terapias de combinación podría mejorar la eficacia y retrasar o incluso suprimir el desarrollo de resistencia.

La leucemia mieloide aguda (AML) es un cáncer de la sangre rápidamente mortal que surge de la transformación clonal de células madre hematopoyéticas dando lugar a la parálisis de la función normal de la médula ósea y a muertes debidas a complicaciones de pancitopenia profunda. La AML representa el 25 % de todas las leucemias de adultos, ocurriendo las tasas de incidencia más altas en los Estados Unidos, Australia y Europa (WHO. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer). Globalmente, hay aproximadamente 88.000 nuevos casos diagnosticados anualmente. La AML continúa teniendo la tasa de supervivencia más baja de todas las leucemias, con una supervivencia esperada a 5 años de sólo el 24 %. Aunque la terapia estándar para AML (citarabina en combinación con una antraciclina, tal como daunorrubicina) se concibió hace más de 4 décadas, la introducción de terapias dirigidas exitosas para esta enfermedad ha permanecido como un objetivo elusivo. El concepto de la terapia dirigida en AML se ha visto dificultado por el entendimiento de que esta enfermedad evoluciona como una jerarquía multi-clonal, con un crecimiento rápido de sub-clones leucémicos como una causa principal de la resistencia a fármacos y recidiva de la enfermedad (Ding et al., *Nature* 2012, 481, 506-510).

40 Las mutaciones activadoras de *FLT3* (mayoritariamente *FLT3-ITD*) están presentes en aproximadamente el 30 % de los pacientes con AML en el diagnóstico, lo que da lugar a la activación posterior de la cascada de señalización aguas abajo, incluyendo las rutas de señalización de *FLT3/JAK/STAT*, *MAPK* y *PI3K*. La activación de la señalización de *FLT3* suprime las rutas de apoptosis a través de la inducción de la fosforilación de la proteína pro-apoptótica BAD y la expresión de los miembros de la familia anti-apoptótica Bcl2. La inhibición de la actividad de la quinasa *FLT3-ITD* induce la apoptosis a través de la regulación a la baja de la fosforilación de BAD y la expresión de Bcl-xL en células *FLT3-ITD* (Minami et al., *Blood* 2003, 102, 2969-2975).

50 Permanece una necesidad de nuevos tratamientos y terapias para el tratamiento del cáncer. Se ha encontrado inesperadamente que la Midostaurina, en combinación con el Compuesto B o el Compuesto C como se describe en la presente memoria, interaccionan de una manera sinérgica para inhibir fuertemente la proliferación celular, en particular para AML, y más particularmente para AML con *FLT3 mutante*.

Resumen de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una nueva combinación de

- (a) Midostaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un complejo de la misma, o un co-cristal de la misma, o un solvato, incluyendo hidrato, de la misma, y
- 55 (b) un inhibidor de Mcl-1 que es el Compuesto B: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-

il)metoxi]fenil)propanoico, o el Compuesto C: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1-*H*-pirazol-5-il]metoxi]fenil)propanoico,

o sales de adición de los mismos con un ácido o base farmacéuticamente aceptable,

5 adecuados para uso simultáneo, secuencial o separado.

En otro aspecto, la invención proporciona una combinación como se describe en la presente memoria, para uso en el tratamiento del cáncer, en particular leucemia mieloide aguda.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la combinación como se describe en la presente memoria, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** muestra el efecto *in vitro* sobre la actividad de la caspasa3.7 cuando se combina el inhibidor de FLT3 Compuesto A (Midostaurina), con el inhibidor de Mcl-1 Compuesto B, en las líneas celulares de AML Molm13 y MV-4-11.

Figura 2: La toma como diana combinada de FLT3 y Mcl-1 es eficaz en muestras primarias de AML FLT3-ITD.

15 Perfilado de mutaciones de muestras de AML primarias y sensibilidad al tratamiento combinado de S63845/Midostaurina durante 24 horas. El crecimiento celular se midió por CellTiter-Glo. Se calculó el índice de combinación (IC) usando el software CalcuSyn y se promedia de IC a DE50, DE75, y DE90. IC <1 indica un efecto sinérgico y IC >1 antagonismo. Las muestras de AML primarias se trataron con las siguientes diluciones seriadas de dosis de la combinación: Midostaurina, de 3,1 nM a 800 nM; y S63845, de 0,31 nM a 80 nM. La relación de Midostaurina a S63845 fue 10:1. La presencia de mutaciones se indica por las cajas azules llenas para cada muestra.

20 **Figura 3: La Midostaurina induce la acumulación de BIM lo que contribuye a la letalidad de Midostaurina/S63845 (Compuesto C)**

A. La Midostaurina incrementó el nivel de Bim pro-apoptótica, que, a su vez, podría unirse a e invalidar la actividad residual de Mcl-1. La Bim elevada se sostiene después del co-tratamiento con S63845, lo que sugiere que Bim juega un papel funcional en la letalidad mediada por Midostaurina/S63845.

25 **B.** Análisis por transferencia Western de las rutas de señalización mediadas por FLT3 y la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células MV-4-11 tratadas durante 6 horas con Midostaurina, S63845 solo o en combinación. La desfosforilación de FLT3-ITD dio lugar a la inactivación de STAT5 y MAPK y estuvo acompañada de una regulación a la baja significativa de la fosforilación mediada por MAPK de Mcl-1 en Thr163, sitio requerido para la estabilidad de Mcl-1. Consecuentemente, la Midostaurina redujo el nivel de Mcl-1.

30 **Figuras 4 y 5: La toma como diana combinada de FLT3 y Mcl-1 facilita la apoptosis**

La activación de caspasas se midió usando el ensayo Caspasa-Glo® 3/7 después de 6 horas de tratamiento con el fármaco. El porcentaje de células apoptóticas se midió por citometría de flujo usando tinción con Anexina-V-APC/DAPI. Las células primarias de AML se trataron durante 16 horas.

Figura 6: Sinergia anti-leucémica de S63845 (Compuesto C) y TKi de FLT3

35 Sensibilidad de las líneas celulares de AML a S63845 (Compuesto C) e inhibidores seleccionados de FLT3 (TKi de FLT3) después de 24 horas de exposición. El crecimiento celular se midió por CellTiter-Glo. Se calcularon los valores del índice de combinación (IC) usando el software CalcuSyn y son promedios de IC a DE50, DE75, y DE90. Las relaciones a las que se combinaron los fármacos se muestran entre paréntesis.

Figuras 7 y 8: Sinergia anti-leucémica de S63845 y TKi de FLT3

40 Interacciones sinérgicas representativas entre S63845 combinado con Midostaurina en células MV4-11 FLT3-ITD determinadas por el modelo de independencia de BLISS de sinergia de fármacos a gran escala. Las células se trataron con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular se evaluó después de 24 horas (Figura 7). Las interacciones sinérgicas se evaluaron usando el modelo de independencia de BLISS. Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis >0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS <0 representan antagonismo (Figura 8).

Figura 9: Perfilado de BH3: la Midostaurina incrementa el cebado mitocondrial para la apoptosis en células FLT3-ITD expuestas a S63845

50 El ensayo de perfilado de BH3 muestra que la Midostaurina incrementó el cebado mitocondrial en MV4-11 FLT3-ITD para el inhibidor de Mcl-1 S63845 y particularmente el péptido Bim. Las células se sometieron al ensayo de perfilado de BH3 4 horas después del tratamiento con Midostaurina (100 nM). El incremento de la liberación de citocromo C es

una medición cuantitativa del inicio de la apoptosis mitocondrial.

Figuras 10, 11, 12 y 13: La combinación de S63845 y Midostaurina es efectiva en células de AML resistentes a Venetoclax con FLT3-ITD pero no en FLT3-WT

Modelo de independencia de BLISS para interacciones sinérgicas entre S63845 combinado con Midostaurina en células MOLM13 FLT3-ITD y la sublínea resistente a Venetoclax. Se generaron células resistentes a Venetoclax como se describe en Zhang et al. *Blood*, 2015, 126, 328 y se mantuvieron rutinariamente en medio que contenía Venetoclax 1 μ M. El Venetoclax se eliminó por lavado antes de los experimentos y las células se trataron con nueve diluciones seriadas de 2 veces de S63845 y Midostaurina, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. Después de 24 horas de tratamiento, el crecimiento celular se midió usando Cell TiterGlo. Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis >0 representan sinergia, mientras que los valores del índice BLISS <0 representan antagonismo.

Figura 14: Estudio preliminar *in vivo*: xenoinjerto de AML FLT3-ITD

Se trasplantaron ratones NSG con 10^6 células de AML derivadas de pacientes que portaban mutaciones FLT3-ITD. La carga tumoral se midió por el porcentaje de células hCD45+ en la sangre de los ratones usando FACS. Después del injerto, los ratones se trataron con (i) vehículo, (ii) 40 mg/kg de S63845 IV una vez a la semana, (iii) 75 mg/kg de Midostaurina por sonda oral diariamente, o (iv) combinación.

Figuras 15 y 16: Efecto sinérgico de Midostaurina y S63845 en células Ba/F3 FLT3-ITD murinas

Interacciones sinérgicas entre S63845 combinado con Midostaurina en células Ba/F3 FLT3-ITD murinas determinadas por el modelo de independencia de BLISS de sinergia de fármacos a gran escala. Las células se trataron con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular se evaluó después de 24 horas (Figura 15). Las interacciones sinérgicas se evaluaron usando el modelo de independencia de BLISS. Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis >0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS <0 representan antagonismo (Figura 16).

Figura 17 y 18: Efecto sinérgico de Midostaurina y S63845 en células Ba/F3 FLT3-D835Y murinas

Interacciones sinérgicas entre S63845 combinado con Midostaurina en células Ba/F3 FLT3-D835Y murinas determinadas por el modelo de independencia de BLISS de sinergia de fármacos a gran escala. Las células se trataron con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular se evaluó después de 24 horas (Figura 17). Las interacciones sinérgicas se evaluaron usando el modelo de independencia de BLISS. Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis >0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS <0 representan antagonismo (Figura 18).

Definiciones

“Combinación” se refiere bien a una combinación de dosis fija en forma de dosificación unitaria (p. ej., cápsula, comprimido, o sobre), combinación de dosis no fija, o un kit de partes para la administración combinada, donde un compuesto de la presente invención y uno o más compañeros de combinación (p. ej., otro fármaco, como se explica más adelante, también referido como “agente terapéutico” o “co-agente”) pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o separadamente en intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de la combinación muestren un efecto cooperativo, p. ej., sinérgico.

Los términos “co-administración” o “administración combinada” o similares como se utilizan en la presente memoria se pretende que engloben la administración del compañero de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesita (p. ej., un paciente), y se pretende que incluyan regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma ruta de administración o al mismo tiempo.

El término “combinación de dosis fija” significa que los ingredientes activos, p. ej., un compuesto de fórmula (I) y uno o más compañeros de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en la forma de una única entidad o dosificación.

El término “combinación de dosis no fija” significa que los ingredientes activos, p. ej., el Compuesto B o el Compuesto C y uno o más compañeros de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas bien simultáneamente o secuencialmente, sin límites de tiempo específicos, en donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Lo último también se aplica a la terapia de mezcla, p. ej., la administración de tres o más ingredientes activos.

“Cáncer” significa una clase de enfermedad en la que un grupo de células presenta un crecimiento incontrolado. Los tipos de cáncer incluyen cáncer hematológico (linfoma y leucemia). En particular “cáncer” se refiere a cáncer hematológico, en particular, leucemia mieloide aguda.

"AML" significa leucemia mieloide aguda. En una realización particular, la AML está presente en pacientes que portan una mutación en *FLT3*. En una realización adicional, la mutación es *FLT3-ITD*. En otra realización, la mutación es *FLT3-TKD*. En particular, dicha mutación FLT3-TKD comprende la mutación FLT3-D835Y o FLT3-F691 en el dominio tirosina quinasa (TKD) de FLT3. La AML que se va a tratar puede ser resistente a la terapia anticancerígena anterior. Dicha terapia anterior puede incluir uno o más compuestos usados para tratar la AML, por ejemplo, venetoclax, decitabina, daunorrubicina, y citarabina, en particular, venetoclax. En una realización, la AML que se va a tratar es AML resistente a venetoclax, especialmente, AML resistente a venetoclax con la mutación FLT3-ITD.

El término "conjuntamente terapéuticamente efectivo" significa que los agentes terapéuticos pueden proporcionarse separadamente (de una manera cronológicamente escalonada, especialmente una manera específica de secuencia) en intervalos de tiempo tales que prefieren, en el animal de sangre caliente, especialmente ser humano, que se va a tratar, todavía muestran una interacción (preferiblemente sinérgica) (efecto terapéutico conjunto). Si este es o no el caso puede determinarse, *inter alia*, por el seguimiento de los niveles sanguíneos, mostrando que ambos compuestos están presentes en la sangre del ser humano que se va a tratar al menos durante determinados intervalos de tiempo.

"Sinérgicamente efectivo" o "sinergia" significa que el efecto terapéutico observado después de la administración de dos o más agentes es mayor que la suma de los efectos terapéuticos observados después de la administración de cada agente único.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratar", "tratando" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o parar o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización más, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien físicamente, (p. ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (p. ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos.

Tal y como se usa en la presente memoria, un sujeto "necesita" un tratamiento si dicho sujeto se beneficiaría biológicamente, médicamente o en calidad de vida de dicho tratamiento.

"Medicamento" significa una composición farmacéutica, o una combinación de varias composiciones farmacéuticas, que contiene uno o más ingredientes activos en presencia de uno o más excipientes.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describen varias realizaciones de la invención, donde por conveniencia E1 es idéntica al primer aspecto de la invención en la presente memoria anteriormente. En la presente memoria se describen realizaciones (E) enumeradas de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención. La presente invención es definida por las reivindicaciones. Cualquier materia-objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

Como se describe a continuación, las realizaciones E2 a E6, E8, E9, E11, E13, E15 a E18, y E21 a E26 de la invención se reivindican y forman parte de la invención. Las realizaciones E7, E10, E12, E14, E19 y E20 representan aspectos adicionales según la invención.

E2. La combinación según E1, en donde el inhibidor de Mcl-1 es el Compuesto B: ácido (2*R*)-2-([(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi)-3-(2-[(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi)fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

E3. La combinación según E1, en donde el inhibidor de Mcl-1 es el Compuesto C: ácido (2*R*)-2-([(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi)-3-(2-[(1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]metoxi)fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

E4. La combinación según E2, en donde el Compuesto B se administra intravenosamente y la Midostaurina se administra oralmente.

E5. La combinación según cualquiera de E1 a E4, que comprende además al menos un agente anticancerígeno adicional, por ejemplo, citarabina y/o daunorrubicina.

E6. La combinación según cualquiera de E1 a E5, en la forma de una combinación de dosis no fija.

E7. La combinación según cualquiera de E1 a E5, en la forma de una combinación de dosis fija.

E8. La combinación según cualquiera de E1 a E7, para uso en medicina.

E9. La combinación según cualquiera de E1 a E7, para uso según E8, en donde dicho uso es en el tratamiento del cáncer.

E10. La combinación según cualquiera de E1 a E7, para uso según E9, en donde el cáncer es cáncer hematológico.

- E11. La combinación según cualquiera de E1 a E7, para uso según E9, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda. En particular, la leucemia mieloide aguda está presente en pacientes que portan una mutación en *FLT3*. Más particularmente, dicha mutación es *FLT3-ITD*.
- 5 E12. La combinación según cualquiera de E2 o E4 a E7, para uso según cualquiera de E8 a E11, en donde la Midostaurina y el Compuesto B se proporcionan en cantidades que son conjuntamente terapéuticamente efectivas para el tratamiento del cáncer.
- E13. La combinación según cualquiera de E2 o E4 a E7, para uso según cualquiera de E8 a E11, en donde la Midostaurina y el Compuesto B se proporcionan en cantidades que son sinérgicamente efectivas para el tratamiento del cáncer.
- 10 E14. La combinación según cualquiera de E2 o E4 a E7, para uso según cualquiera de E8 a E11, en donde la Midostaurina y el Compuesto B se proporcionan en cantidades sinérgicamente efectivas que permiten una reducción de la dosis requerida para cada compuesto en el tratamiento del cáncer, a la vez que proporcionan un tratamiento eficaz para el cáncer, con una reducción en los efectos secundarios.
- 15 E15. Una composición farmacéutica que comprende la combinación según cualquiera de E1 a E7, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- E16. El uso de una combinación según cualquiera de E1 a E7, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 20 E17. El uso según E16, de una combinación según cualquiera de E1 a E7, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda. En particular, la leucemia mieloide aguda está presente en pacientes que portan una mutación en *FLT3*. Más particularmente, dicha mutación es *FLT3-ITD* o *FLT3-TKD*.
- E18. Un medicamento que contiene, separadamente o conjuntamente,
- (a) Midostaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un complejo de la misma, o un co-cristal de la misma, o un solvato, incluyendo hidrato, de la misma, y
- 25 (b) Compuesto B: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*c*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- para la administración simultánea, secuencial o separada, y en donde la Midostaurina y el Compuesto B se proporcionan en cantidades efectivas para el tratamiento del cáncer, en particular, AML.
- 30 E19. Compuesto B para uso en una terapia de combinación con Midostaurina, para el tratamiento del cáncer, en particular AML.
- E20. Midostaurina para uso en una terapia de combinación con el Compuesto B, para el tratamiento del cáncer, en particular AML.
- E21. La combinación para uso, o uso como se describe en una cualquiera de las realizaciones en la presente memoria, para el tratamiento de AML resistente a terapia anterior.
- 35 E22. La combinación para uso, o uso como se describe en una cualquiera de las realizaciones en la presente memoria, para el tratamiento de AML resistente a uno o más compuestos seleccionados de venetoclax, decitabina, daunorrubicina, y citarabina, en particular venetoclax.
- E23. La combinación para uso, o uso como se describe en una cualquiera de las realizaciones en la presente memoria, para el tratamiento de AML resistente a venetoclax con la mutación *FLT3-ITD*.
- 40 E24. La combinación para uso, o uso como se describe en una cualquiera de las realizaciones en la presente memoria, para el tratamiento de AML con la mutación *FLT3-TKD*.
- E25. La combinación para uso, o uso como se describe en la realización E22, en donde dicha mutación *FLT3-TKD* comprende la mutación FLT3-D835Y o FLT3-F691 en el dominio tirosina quinasa (TKD) de FLT3.
- 45 E26. La combinación para uso, uso como se describe en la presente memoria, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación FLT3-ITD en presencia de una mutación FLT3-TKD.
- En otro aspecto, la invención proporciona una combinación, combinación para uso, método, composición, medicamento o uso, como se describe en la presente memoria, en particular que comprende el Compuesto B o el Compuesto C y la Midostaurina, en donde dicho cáncer, en particular AML, es resistente a terapia anticancerígena anterior. Dicha terapia anterior puede incluir uno o más compuestos usados para tratar el cáncer tal como AML, por ejemplo, venetoclax, decitabina, daunorrubicina, y citarabina, en particular venetoclax. En una realización, la AML que
- 50

se va a tratar es AML resistente a Venetoclax, especialmente AML resistente a Venetoclax con FLT3-ITD.

En otra realización, la AML que se va a tratar es AML con la mutación FLT3-TKD. En particular, dicha mutación FLT3-TKD comprende las mutaciones FLT3-D835Y o FLT3-F691 en el dominio tirosina quinasa (TKD) de FLT3. En una realización adicional, el cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación *FLT3-ITD* en presencia de una mutación FLT3-TKD.

Particularmente, la AML que se va a tratar como se describe en la presente memoria es resistente al tratamiento con inhibidores de FLT3.

En las composiciones farmacéuticas según la invención, la proporción de ingredientes activos en peso (peso de los ingredientes activos respecto al peso total de la composición) es del 5 al 50 %.

Entre las composiciones farmacéuticas según la invención se usarán más especialmente aquellas que son adecuadas para administración por la ruta oral, parenteral y especialmente intravenosa, per- o trans-cutánea, nasal, rectal, perlingual, ocular o respiratoria, más específicamente, comprimidos, grageas, comprimidos sublinguales, cápsulas de gelatina dura, pastillas sublinguales, cápsulas, comprimidos para chupar, preparaciones inyectables, aerosoles, gotas oculares o nasales, supositorios, cremas, pomadas, geles dérmicos etc.

En una realización, el Compuesto B, se administra intravenosamente, por ejemplo, usando la formulación como se describe en WO 2018/078064.

Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden uno o más excipientes o vehículos seleccionados de diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes de disgregación, estabilizantes, conservantes, absorbentes, colorantes, edulcorantes, saporíferos etc.

Como ejemplo no limitativo pueden mencionarse:

- *como diluyentes*: lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, glicerol,
- *como lubricantes*: sílice, talco, ácido esteárico y sus sales de magnesio y calcio, polietilen glicol,
- *como aglutinantes*: silicato de magnesio y aluminio, almidón, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona,
- *como disgregantes*: agar, ácido algínico y su sal de sodio, mezclas efervescentes.

Los compuestos de la combinación pueden administrarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente. Las composiciones farmacéuticas correspondientes pueden permitir la liberación instantánea o retardada de los ingredientes activos. Los compuestos de la combinación pueden administrarse además en la forma de dos composiciones farmacéuticas separadas, conteniendo cada una uno de los ingredientes activos, o en la forma de una única composición farmacéutica, en la que los ingredientes activos están mezclados.

El régimen de dosificación útil varía según el sexo, edad y peso del paciente, la ruta de administración, la naturaleza del cáncer y de cualesquiera tratamientos asociados y varía de 25 mg a 1.500 mg de inhibidor de Mcl-1 a la semana, más preferiblemente, de 50 mg a 1.400 mg a la semana.

La dosificación de Midostaurina para el tratamiento de AML que es positiva para una mutación en *FLT3* es 50 mg oralmente, dos veces diariamente con alimento. La Midostaurina se proporciona al paciente en combinación con inducción estándar con citarabina y daunorrubicina y consolidación con citarabina. Esta dosis puede adaptarse según sea necesario en el tratamiento de combinación con el Compuesto B.

En una realización, la administración oral de Midostaurina es por forma sólida. La forma de dosificación de Midostaurina es una cápsula de gelatina blanda con 25 mg de sustancia farmacéutica.

EJEMPLO 1: El efecto *in vitro* sobre la actividad de la caspasa3.7 cuando se combina el inhibidor de FLT3 Compuesto A (Midostaurina) con el inhibidor de Mcl-1 Compuesto B, en las líneas celulares de AML Molm13 y MV-4-11.

Evaluamos los inhibidores de Mcl-1 y FLT3 como agentes únicos y en combinación para determinar su capacidad de inducir apoptosis (es decir, activación de Caspasa3.7) en células leucémicas. Utilizamos dos líneas celulares de AML con mutación FLT3-ITD (Molm13 y MV-4-11). Ensayamos la capacidad de los Compuestos A y B para activar la caspasa3.7 en combinaciones y como agentes únicos. El Compuesto A como un agente único causó la inducción de la actividad caspasa con un incremento máximo del 33 % en Molm13 y del 24 % en MV-4-11. El Compuesto B también indujo la actividad caspasa con un incremento máximo del 87 % en Molm13 y del 89 % en MV-4-11. Cuando los dos compuestos se combinaron, se observó una inducción sinérgica de la actividad caspasa3.7. La sinergia se observó en ambas líneas celulares con una puntuación de sinergia de 3,1 en ambas. Fue evidente una sinergia fuerte particularmente a las dosis más bajas del Compuesto B. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Métodos

Ambos compuestos se disolvieron en DMSO al 100 % (Sigma, Número de catálogo D2650) a concentraciones de 10 mM y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5 La línea celular Molm13 usada en este estudio se adquirió en Leibniz-Institut DSMZ (ACC 554) y MV-4-11 en la American Type Cell Collection (ATCC® CRL-9591). Las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en un incubador con CO₂ al 5 %, Molm13 en medio RPMI (Lonza, 12-702F) y MV-4-11 en medio INMM (Hyclone, SH30228.01) complementados con suero fetal bovino al 10 % (Seradigm, 1500-500). Las células se subcultivaron dos veces a la semana y el medio se cambió cada 2 a 3 días.

10 La actividad caspasa3.7 se midió con el kit Caspasa-Glo® 3/7 de Promega (G8092). Se dispensaron 9.000 células/pocillo en placas negras de 384 pocillos con el fondo claro (Greiner, #781091) en triplicado con 30 µl/pocillo de medio de crecimiento. Se añadieron 10 µl/pocillo de mezcla de compuestos de 4X a cada pocillo de las placas de 384 pocillos para un tratamiento de 6 horas. Después, se añadieron 30 µl/pocillo de los reactivos de Caspasa-Glo® 3/7 a cada pocillo al final y la luminiscencia se registró en un lector de placas Envision (Perkin Elmer). La luminiscencia medida es proporcional a la cantidad de actividad caspasa presente.

15 Para evaluar la actividad caspasa3.7 de la combinación de una forma no sesgada, así como para identificar el efecto sinérgico en todas las posibles concentraciones, los estudios se llevaron a cabo con una "matriz de dosis". Esta utilizó todas las posibles permutaciones del Compuesto A y Compuesto B diluidos de forma seriada.

20 La "matriz de dosis" del Compuesto A y Compuesto B, consistió en lo siguiente: ambos compuestos se sometieron a una dilución seriada 1:3 de 11 dosis con la dosis más alta de 3 µM y hacia abajo hasta el control sin compuesto. En los ensayos de combinación, los agentes se aplicaron simultáneamente. Los valores de la señal luminiscente para cada agente único y para el tratamiento de combinación se compararon con los de los controles no tratados. El porcentaje de la actividad caspasa3.7 se calculó usando el siguiente cálculo: (1-control/tratado con compuesto) x 100. Los valores en porcentaje de la actividad caspasa3.7 de todos los pocillos se calcularon usando el software Chalice (CombinatoRx, Cambridge MA) y Chalice Analyser como se describe en Lehar et al. Nature Biotechnology 2009, 27(7), 659-66. En este estudio, se analizaron los datos de la actividad caspasa3.7 en lugar de los datos de inhibición del crecimiento celular con los mismos protocolos matemáticos. La actividad caspasa3.7 respecto al control se presenta en el panel marcado como "Porcentaje de Actividad Caspasa3.7", y la cantidad de actividad en exceso de la cantidad esperada en el panel marcado como "Actividad en Exceso de Loewe". Las concentraciones de Compuesto A se muestran a lo largo de la fila inferior de izquierda a derecha y las concentraciones crecientes de Compuesto B a lo largo de la columna más a la izquierda desde abajo hacia arriba. Todos los puntos remanentes en las cuadrículas presentan los resultados de una combinación de los dos inhibidores que corresponde a las concentraciones de agente único indicadas en los dos ejes. El análisis de los datos de la actividad caspasa3.7 se realizaron usando Chalice Analyser. La actividad en exceso se calculó usando el modelo de sinergia de Loewe que mide el efecto en la actividad caspasa3.7 sobre lo que se esperaría si los dos fármacos se comportaran de una manera aditiva de la dosis. Los números positivos representan áreas de sinergia creciente. Las interpretaciones de las puntuaciones de sinergia son las siguientes: SS ~ 0 = Aditiva de la Dosis, SS >1 = Sinergia Débil y SS >2 = Sinergia.

EJEMPLO 2: La combinación del inhibidor de Mcl-1 Compuesto C y Midostaurina es sinérgica en células de AML con mutación FLT3-ITD incluyendo aquellas resistentes al inhibidor de Bcl-2 Venetoclax y en células de AML primarias

40 Materiales y métodos

Figura 2: El tomar como diana de forma combinada a FLT3 y Mcl-1 es eficaz en muestras primarias de AML FLT3-ITD. Ensayo de viabilidad celular e índice de combinación (IC)

45 Las células de AML primarias se obtuvieron de extracciones de sangre periférica recogidas de pacientes en el M. D. Anderson Cancer Center con AML recién diagnosticada o recurrente y un alto recuento (> 40 %) de blastos. Después de la purificación por Ficoll, los blastos de AML (8 x 10⁵/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos en 100 µL de medio RPMI completo que contenía FBS al 10% (Sigma) y 1x Pen/Estrep (Sigma). La Midostaurina y S63845 se prepararon como preparaciones madre 10 mM en DMSO y se mantuvieron a -80 °C antes del análisis. Cada fármaco se diluyó en medio RPMI completo y se proporcionó como una disolución concentrada 4x preparada en 50 µL de medio. Las células control recibieron 100 µL de medio que contenía DMSO (el volumen de DMSO correspondió a la suma de volúmenes de las preparaciones madre de midostaurina y S63845 usados para preparar las disoluciones 4x).

50 Las células se incubaron con fármacos usados solos o en combinación durante 24 horas. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se mezclaron suavemente por pipeteo y se transfirieron 35 µL de la suspensión celular a placas de 96 pocillos blancas opacas. A continuación, se añadieron 80 µL de reactivo CellTiter-Glo diluido 1:3 en PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad en un agitador de placas. La luminiscencia se leyó usando un lector de placas Tekan (Infinite m200 pro). El análisis de los efectos combinados de los fármacos se hizo usando el índice de combinación (IC) calculado por el software CalcuSyn (BioSoft, Ferguson, MO, EE. UU.). Un IC de < 1, 1 y > 1 indica sinergismo, un efecto aditivo y antagonismo, respectivamente.

55

Figuras 3A/3B: La Midostaurina induce la acumulación de BIM que contribuye a la letalidad de la Midostaurina/S63845 (Compuesto C). Análisis por transferencia Western

Se sembraron células (3×10^6 /pocillo) en placas de 6 pocillos en 5 mL de medio RPMI completo y se expusieron a midostaurina y S63845 proporcionados solos o en combinación. Las células control recibieron DMSO. Las células se incubaron durante 6 horas y después se recogieron, se lavaron dos veces en PBS y se lisaron en tampón RIPA (ThermoFisher Scientific) suplementado con 1x mezcla de Inhibidores de Proteasas y de Fosfatasa (ThermoFisher Scientific). Los lisados se mantuvieron en hielo durante 20 minutos con agitación con vórtex cada 5 minutos, después se sonicaron brevemente y se centrifugaron a 13.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recogió y el contenido de proteínas se midió usando el ensayo BSA. Los lisados celulares (30–50 µg de proteína por pocillo) se resolvieron por electroforesis en geles preparados comercialmente de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico con un gradiente del 4 %–20 % (Bio-Rad, Hercules, CA) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad). Las membranas se incubaron en primer lugar en tampón de Bloqueo Odyssey (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EE. UU.) durante 1 hora para bloquear la unión no específica a proteínas, después con anticuerpo primario toda la noche a 4 °C, se lavaron con TBST tres veces, y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con IRDye (dilución 1:15.000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se escanearon usando el Sistema de Imagenología Odyssey (Li-Cor).

Figura 4: La toma como diana combinada de FLT3 y Mcl-1 facilita la apoptosis. Ensayo de la actividad caspasa 3/7 para la detección de la apoptosis

Se sembraron células de AML o blastos de AML primarios (3×10^6 /pocillo) en placas de 6 pocillos en 5 mL de medio RPMI completo y se expusieron a midostaurina y S63845 proporcionados solos o en combinación. Las células control recibieron DMSO. Las células se incubaron durante 6 horas y después se transfirieron 100 µL de la suspensión celular a una placa de 96 pocillos blanca opaca, se mezclaron con 100 µL de Reactivo de Caspasa-Glo3/7 (Promega) y se incubaron en oscuridad durante 30 minutos en un agitador de placas a temperatura ambiente. La luminiscencia se leyó usando un lector de placas Tekan (Infinite m200 pro). Los cambios en la actividad caspasa-3/7 después del tratamiento con los fármacos se normalizó respecto al DMSO solo. Las células remanentes se usaron para el análisis por transferencia western.

Figura 5: La toma como diana combinada de FLT3 y Mcl-1 facilita la apoptosis. Ensayo de Anexina-V/DAPI

Se sembraron blastos de AML (8×10^5 /pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo redondo en 100 µL de medio RPMI completo que contenía FBS al 10 % (Sigma) y 1x Pen/Estrep (Sigma). La Midostaurina y S63845 se diluyeron en medio RPMI completo y se proporcionaron como una disolución concentrada 4x preparada en 50 µL de medio. Las células control recibieron 100 µL de medio que contenía DMSO (el volumen de DMSO correspondió a la suma de los volúmenes de las preparaciones madre de midostaurina y S63845 usados para preparar las disoluciones 4x). Las células se incubaron con los fármacos proporcionados solos o en combinación durante 24 horas. Al día siguiente, las placas con células se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos. Después, las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en 100 µL de tampón de unión de Anexina-V que contenía 0,3 µL de Anexina-V-APC (BD Bioscience) y 5 µL de DAPI (2 µg/mL). Las células se tiñeron en oscuridad durante 20 minutos, suplementado con 100 µL adicionales de tampón de unión de Anexina-V y se analizaron con un citómetro de flujo BD LRSII (Becton Dickinson). Las células positivas para Anexina-V-APC se identificaron usando el software FlowJo (LLC, Ashland, Oregón, EE. UU.).

Figura 6: Sinergia anti-leucémica de S63845 (Compuesto C) y TKi de FLT3. Ensayo de viabilidad celular

Se sembraron células de AML MV4-11 FLT3-ITD^{+/+} y MOLM13 FLT3-ITD^{+/-} (8×10^5 /pocillo) en placas de 96 pocillos en 100 µL de medio RPMI completo que contenía FBS al 10 % (Sigma) y 1x Pen/Estrep (Sigma). La Midostaurina y S63845 se diluyeron en medio RPMI completo y se proporcionaron como una disolución concentrada 4x preparada en 50 µL de medio. Las células control recibieron 100 µL de medio que contenía DMSO (el volumen de DMSO correspondió a la suma de los volúmenes de las preparaciones madre de midostaurina y S63845 usados para preparar las disoluciones 4x). Las células se incubaron con los fármacos proporcionados solos o en combinación durante 24 horas. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se mezclaron suavemente por pipeteo y se transfirieron 35 µL de la suspensión celular a placas de 96 pocillos blancas opacas. A continuación, se añadieron 80 µL de reactivo CellTiter-Glo diluido 1:3 en PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad en un agitador de placas. La luminiscencia se leyó usando un lector de placas Tekan (Infinite m200 pro). El análisis de los efectos combinados de los fármacos se hizo usando el índice de combinación (IC) calculado por el software CalcuSyn (BioSoft, Ferguson, MO, EE. UU.). Un IC de < 1, 1 y > 1 indica sinergismo, un efecto aditivo y antagonismo, respectivamente.

Figuras 7 y 8: Sinergia anti-leucémica de S63845 y TKi de FLT3. Ensayo de viabilidad celular e índice de BLISS

Se sembraron células MV4-11 FLT3-ITD^{+/+} (8×10^5 /pocillo) en placas de 96 pocillos en 100 µL de medio RPMI completo que contenía FBS al 10 % (Sigma) y 1x Pen/Estrep (Sigma). La Midostaurina y S63845 se diluyeron en medio RPMI completo y se proporcionaron como una disolución concentrada 4x preparada en 50 µL de medio. Las

células se trataron durante 24 horas con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular fue la viabilidad medida que se midió usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se mezclaron suavemente por pipeteo y se transfirieron 35 μ L de la suspensión celular a placas de 96 pocillos blancas opacas. A continuación, se añadieron 80 μ L de reactivo CellTiter-Glo diluido 1:3 en PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad en un agitador de placas. La luminiscencia se leyó usando un lector de placas Tekan (Infinite m200 pro). El crecimiento celular se expresó como % de las células tratadas con DMSO. Las interacciones sinérgicas se evaluaron usando el modelo de independencia de BLISS. Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis > 0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS < 0 representan antagonismo.

Figura 9: La Midostaurina incrementa el cebado mitocondrial para apoptosis en células FLT3-ITD expuestas a S63845. Perfilado de BH3 dinámico

El perfilado de BH3 se realizó en placas de 384 pocillos negras según el método de A. Letai (<https://letailab.dana-farber.org/bh3-profiling.html>). Brevemente, las células (3×10^6 /pocillo) se sembraron en placas de 6 pocillos en 5 mL de medio RPMI completo y se expusieron a midostaurina y S63845 proporcionados solos o en combinación. Las células control recibieron DMSO. Las células se incubaron durante 6 horas, se recogieron, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en tampón MEB (manitol 150 mM, HEPES-KOH 10 mM pH 7,5, KCl 150 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,1 %, succinato 5 mM) hasta una densidad final de 1×10^6 /mL. Las células (15 μ L) se añadieron a una placa de 384 pocillos que contenía péptidos/miméticos de BH3 y 15 μ L de digitonina al 0,002 % en tampón MEB. Las células se incubaron durante 1 hora a 25 °C y posteriormente se fijaron en 10 μ L de formaldehído al 4 % en PBS durante 10 minutos. Para terminar la fijación, se añadieron 10 μ L de tampón N2 (Tris 1,7M, Glicina 1,25M pH 9,1) y las células se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células se mezclaron con 10 μ L de Tampón de Tinción CytoC 10x (BSA al 10 %, Tween20 al 2 % en PBS) que contenía anticuerpo anti-Citocromo C (Clon 6H2.B4 marcado con una etiqueta fluorescente, BioLegend) a una dilución 1:40 y se tiñeron toda la noche a 4 °C. La liberación de Citocromo C se midió por citometría de flujo.

Figuras 10, 11, 12 y 13: La combinación de S63845 y Midostaurina es efectiva en células de AML resistentes a Venetoclax con FLT3-ITD pero no en FLT3-WT. Ensayo de viabilidad celular e índice de BLISS en células de AML resistentes a venetoclax

Las líneas celulares resistentes a venetoclax (MOLM13 FLT3-ITD^{+/+} y OCI-AML3 FLT3-WT), se generaron mediante la exposición de las células a concentraciones gradualmente crecientes de venetoclax. Las células se mantuvieron rutinariamente en medio RPMI completo que contenía 1 μ M de venetoclax. 24 horas antes del ensayo del efecto de la combinación de midostaurina y S63845 en la viabilidad celular, las células se cultivaron en medio RPMI sin venetoclax. Las células resistentes a venetoclax y sus equivalentes parentales se sembraron posteriormente en placas de 96 pocillos en 100 μ L de medio RPMI completo que contenía FBS al 10 % (Sigma) y 1x Pen/Estrep (Sigma). La Midostaurina y S63845 se diluyeron en medio RPMI completo y se proporcionaron como una disolución concentrada 4x preparada en 50 μ L de medio. las células se trataron durante 24 horas con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular fue la viabilidad medida que se midió usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se mezclaron suavemente por pipeteo y se transfirieron 35 μ L de la suspensión celular a placas de 96 pocillos blancas opacas. A continuación, se añadieron 80 μ L de reactivo CellTiter-Glo diluido 1:3 en PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad en un agitador de placas. La luminiscencia se leyó usando un lector de placas Tekan (Infinite m200 pro). El crecimiento celular se expresó como % de las células tratadas con DMSO. Las interacciones sinérgicas se evaluaron usando el modelo de independencia de BLISS. Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis > 0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS < 0 representan antagonismo.

Figura 14: Estudio preliminar in vivo: xenoinjerto de AML FLT3-ITD. Modelo AML-PDX

Para el modelo AML-PDX, se irradiaron ratones NSG hembras (6 semanas de edad, The Jackson Laboratory) con 200 cGy y se les inyectó i.v. AML-PDX (1×10^6 células/100 μ L). Se recogió sangre periférica una vez a la semana a través de la ruta retro-orbital y se procesó para medir las células hCD45⁺ por citometría de flujo para confirmar el establecimiento de la leucemia. Cuando el injerto de leucemia alcanzó el 2-10 %, los ratones se agruparon para el tratamiento con vehículo, midostaurina (75 mg/kg, sonda oral diaria), S63845 (40 mg/kg i.v. una vez a la semana) o combinación. Una vez cada dos semanas, se recogió sangre periférica a través de la ruta retro-orbital y se procesó para medir la carga de leucemia (células hCD45⁺) por citometría de flujo.

Los experimentos de las Figuras 2-14 muestran que la combinación del inhibidor de Mcl-1 Compuesto C y Midostaurina es sinérgica en células de AML con mutación FLT3-ITD incluyendo aquellas resistentes al inhibidor de Bcl-2 Venetoclax y en células de AML primarias. Los niveles elevados de Bim y el cebado mitocondrial incrementado en respuesta al péptido hBIM después de la exposición a Midostaurina sugieren que Bim puede jugar un papel funcional en la letalidad mediada por Midostaurina/S63845.

EJEMPLO 3: Ensayo de viabilidad celular e índice de BLISS para células Ba/F3 FLT3-ITD y FLT3-D835Y

Se sembraron células Ba/F3 FLT3-ITD y FLT3-D835Y murinas (8×10^5 /pocillo) en placas de 96 pocillos en 100 μ L de medio RPMI completo que contenía FBS al 10 % (Sigma) y 1x Pen/Estrep (Sigma). La Midostaurina y S63845 se diluyeron en medio RPMI completo y se proporcionaron como una disolución concentrada 4x preparada en 50 μ L de medio. Las células control recibieron 100 μ L de medio que contenía DMSO (el volumen de DMSO correspondió a la suma de los volúmenes de las preparaciones madre de midostaurina y S63845 usados para preparar las disoluciones 4x). Las células se incubaron con los fármacos proporcionados solos o en combinación durante 24 horas. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se mezclaron suavemente por pipeteo y se transfirieron 35 μ L de la suspensión celular a placas de 96 pocillos blancas opacas. A continuación, se añadieron 80 μ L de reactivo CellTiter-Glo diluido 1:3 en PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad en un agitador de placas. La luminiscencia se leyó usando un lector de placas Tekan (Infinite m200 pro). El análisis de los efectos combinados de los fármacos se hizo usando el índice de combinación (IC) calculado por el software CalcuSyn (BioSoft, Ferguson, MO, EE.UU.). Un IC de < 1 , 1 y > 1 indica sinergismo, un efecto aditivo y antagonismo, respectivamente.

Resultados

Las Figuras 15 y 16 muestran interacciones sinérgicas entre S63845 y midostaurina en células Ba/F3 FLT3-ITD murinas determinadas por el modelo de independencia de BLISS de sinergia de fármacos a gran escala. Las células se trataron con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular se evaluó después de 24 horas (mapa de calor, panel izquierdo). Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis > 0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS < 0 representan antagonismo.

Las Figuras 17 y 18 muestran interacciones sinérgicas entre S63845 y midostaurina en células Ba/F3 FLT3-D835Y murinas determinadas por el modelo de independencia de BLISS de sinergia de fármacos a gran escala. Las células se trataron con nueve diluciones seriadas de 2 veces de cada compuesto, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de tablero de damas. El crecimiento celular se evaluó después de 24 horas (mapa de calor, panel izquierdo). Los valores del índice de BLISS para cada combinación de dosis > 0 representan sinergia, mientras que los valores del índice de BLISS < 0 representan antagonismo.

La combinación de S63845 y midostaurina incitó una sinergia marcada en células Ba/F3 murinas que expresaban las mutaciones puntuales FLT3-ITD o FLT3-D835Y en el dominio tirosina quinasa (TKD) de FLT3. La última observación sugiere que la combinación S63845/midostaurina puede proporcionar una eficacia sustancial en los mutantes FLT3-ITD incluso en presencia de las mutaciones FLT3 TKD que se ha mostrado clínicamente que confieren resistencia al tratamiento con inhibidores de FLT3.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de
 - (a) Midostaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un complejo de la misma, o un co-cristal de la misma, o un solvato, incluyendo hidrato, de la misma, y
 - (b) un inhibidor de Mcl-1 que es el Compuesto B: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil)propanoico, o el Compuesto C: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]metoxi]fenil)propanoico, o sales de adición de los mismos con un ácido o base farmacéuticamente aceptable, adecuado para uso simultáneo, secuencias o separado.
2. La combinación según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de Mcl-1 es el Compuesto B: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. La combinación según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de Mcl-1 es el Compuesto C: ácido (2*R*)-2-[[[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi]-3-(2-[[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]metoxi]fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. La combinación según la reivindicación 2, en donde el Compuesto B se va a administrar intravenosamente y la Midostaurina se va a administrar oralmente.
5. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos un agente anticancerígeno adicional, por ejemplo, citarabina y/o daunorrubicina.
6. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la forma de una combinación de dosis no fija.
7. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en medicina.
8. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento del cáncer.
9. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 8, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda.
10. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación en *FLT3*.
11. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 10, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación *FLT3-ITD*.
12. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 10, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación *FLT3-TKD*.
13. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 12, en donde dicha mutación en *FLT3-TKD* comprende las mutaciones *FLT3-D835Y* o *FLT3-F691* en el dominio tirosina quinasa (TKD) de *FLT3*.
14. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde el cáncer es resistente a terapia anterior.
15. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 14, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda resistente a uno o más compuestos seleccionados de venetoclax, decitabina, daunorrubicina, y citarabina.
16. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 15, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda resistente a venetoclax.
17. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 11, en donde dicho cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación *FLT3-ITD*, y dicho cáncer es resistente a venetoclax.
18. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 6, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en donde la Midostaurina y el Compuesto B se proporcionan en cantidades que son sinérgicamente efectivas para el tratamiento del cáncer.
19. Una composición farmacéutica que comprende la combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. El uso de una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

21. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso según la reivindicación 10, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda presente en pacientes que portan una mutación *FLT3-ITD* en presencia de una mutación en FLT3-TKD.

5

FIGURA 1

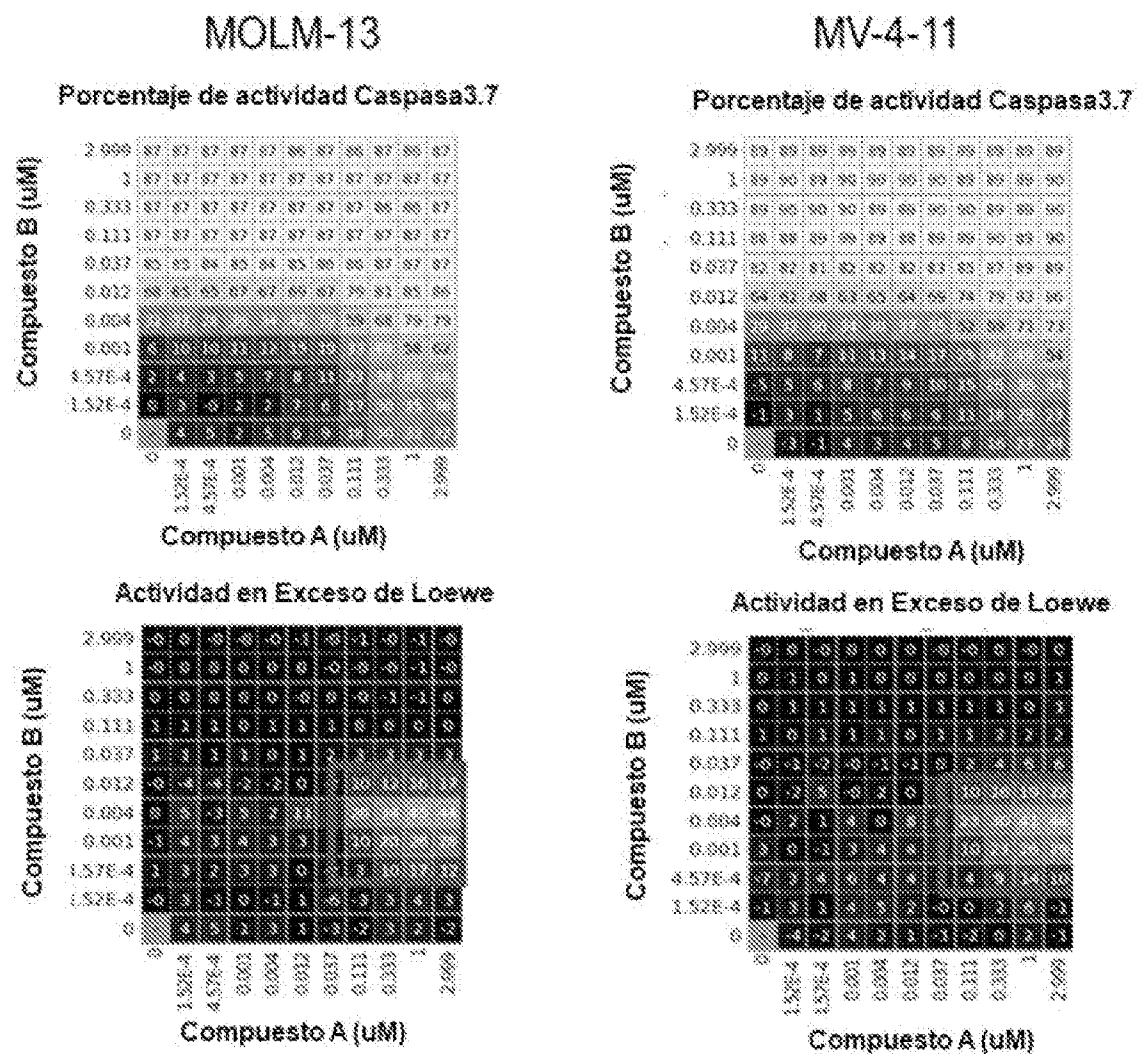


FIGURA 2

ID de la muestra del paciente	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18
Comp C Cl_{50} (nM)	2,0	13,7	148	14,2	0,3	34,5	72,2	5,3	61,5	6,3	40,6	218	36,1	11,0	59,8	75,7	70,5	22,5
Comp C + Midostaurina Cl_{50} (nM)	0,7	18,7	36,5	3,8	0,1	18,8	148,1	2,8	6,2	2,2	24,7	15,1	29,8	4,0	6,0	45,4	72,7	6,2
IC promediado	0,3	2,5	0,2	0,3	0,4	0,6	>1	0,4	0,1	0,2	0,9	0,6	4,1	0,7	0,1	0,8	1,3	0,3
FLT3 WT																		
FLT3 ITD																		
FLT3 p.A680V																		
FLT3 p.D835																		
BCOR																		
BCOR1																		
PTPN11																		
ASXL1																		
ASXL2																		
JAK2																		
MPL																		
ETNK1																		
DNMT3A																		
NMP1																		
RUNX1																		
SETBP1																		
WT1																		
NOTCH1																		
TET2																		
IDH1																		
IDH2																		
U2AF1																		
SF3B1																		
TP53																		
EVT6																		
NF1																		
IKZF1																		
NRAS																		
SRSF2																		
STAG2																		
CSF3R																		
SMC1A																		
EZH2																		
GATA2																		
CREBBP																		
CBLB																		

FIGURA 3A.

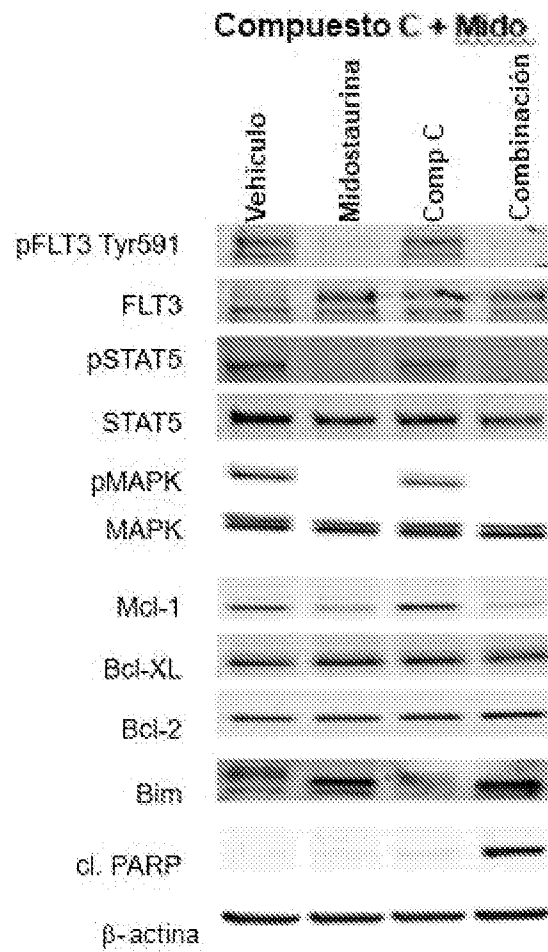


Figura 3B.

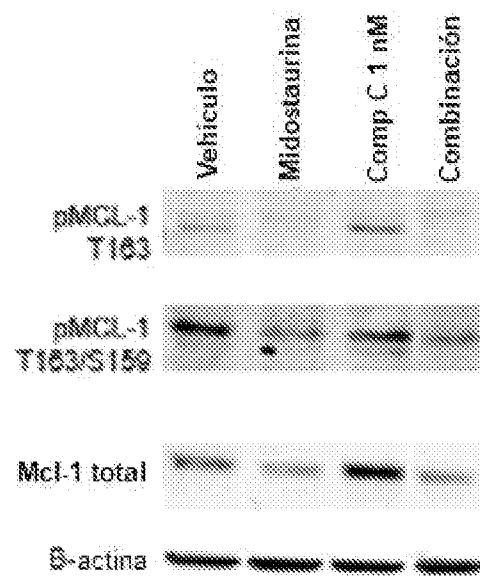


FIGURA 4

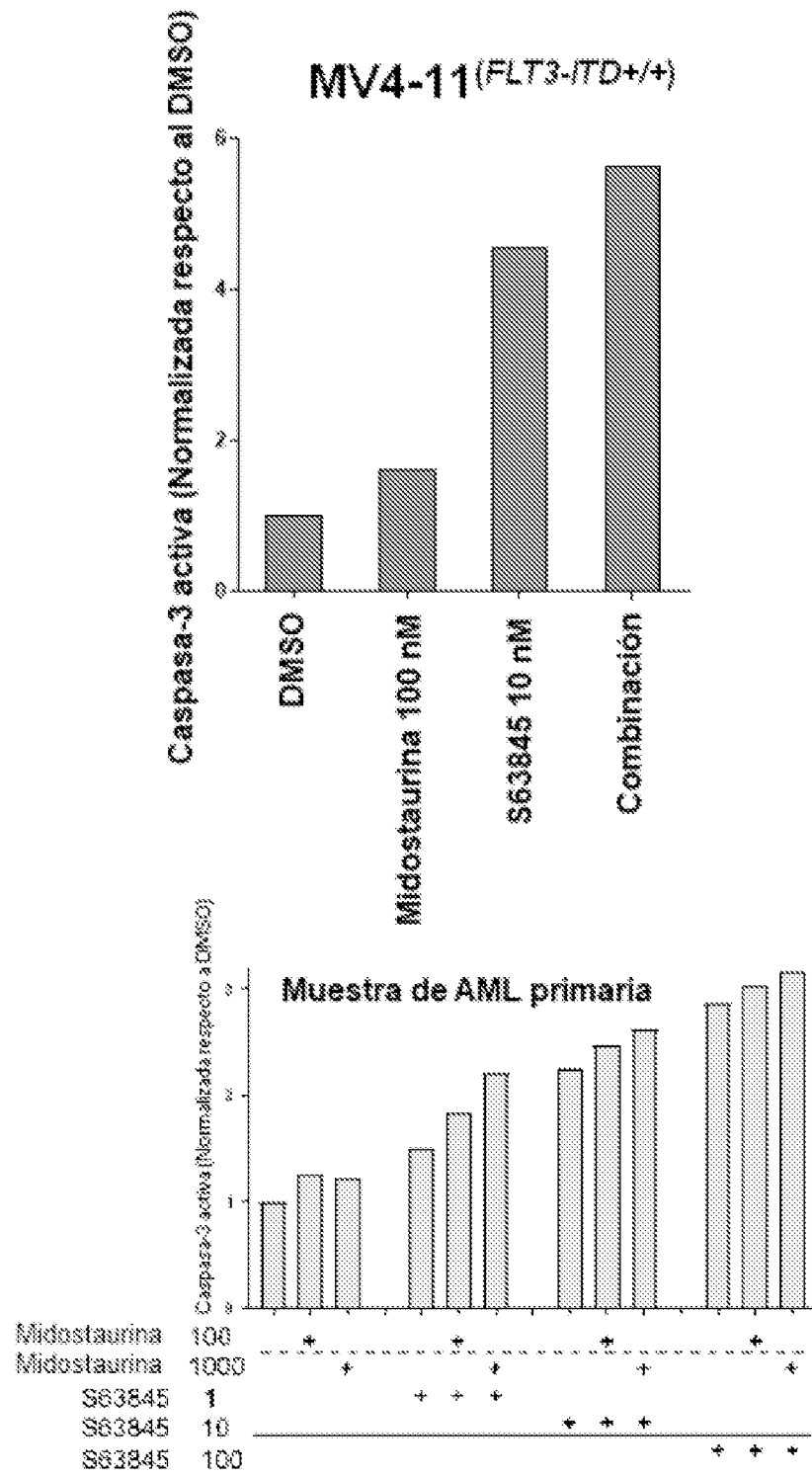


FIGURA 5

Células de AML primarias positivas para Anexina-V-APC

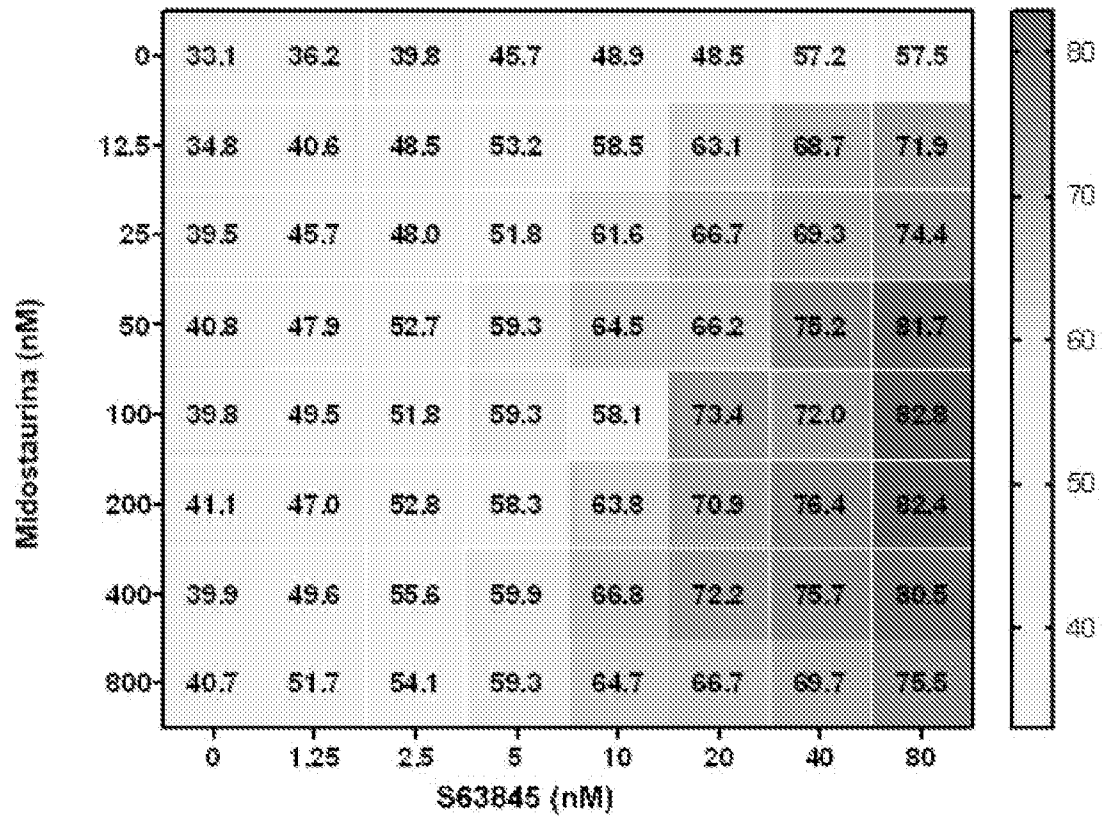
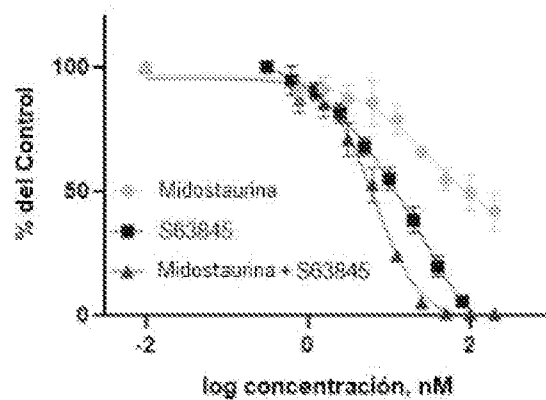


FIGURA 6

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	
	MV4-11 FLT3-ITD ^{+/+}	MOLM13 FLT3-ITD ^{+/+}
Compuesto C	8,1	21,3
Midostaurina	101,9	47,6



Combinación	IC promediado	
	MV4-11 FLT3-ITD ^{+/+}	MOLM13 FLT3-ITD ^{+/+}
Compuesto C + Midostaurina	0,41 (1:2,5)	0,35 (1:2,5)

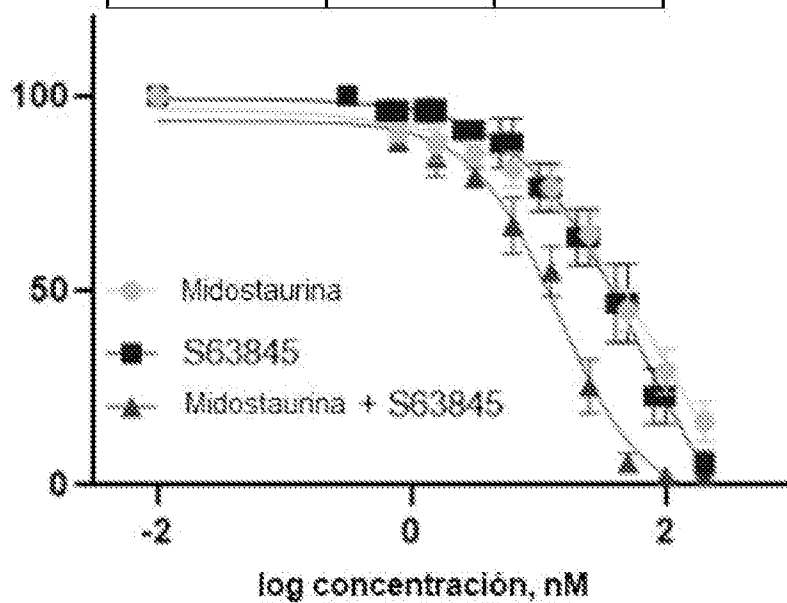


FIGURA 7

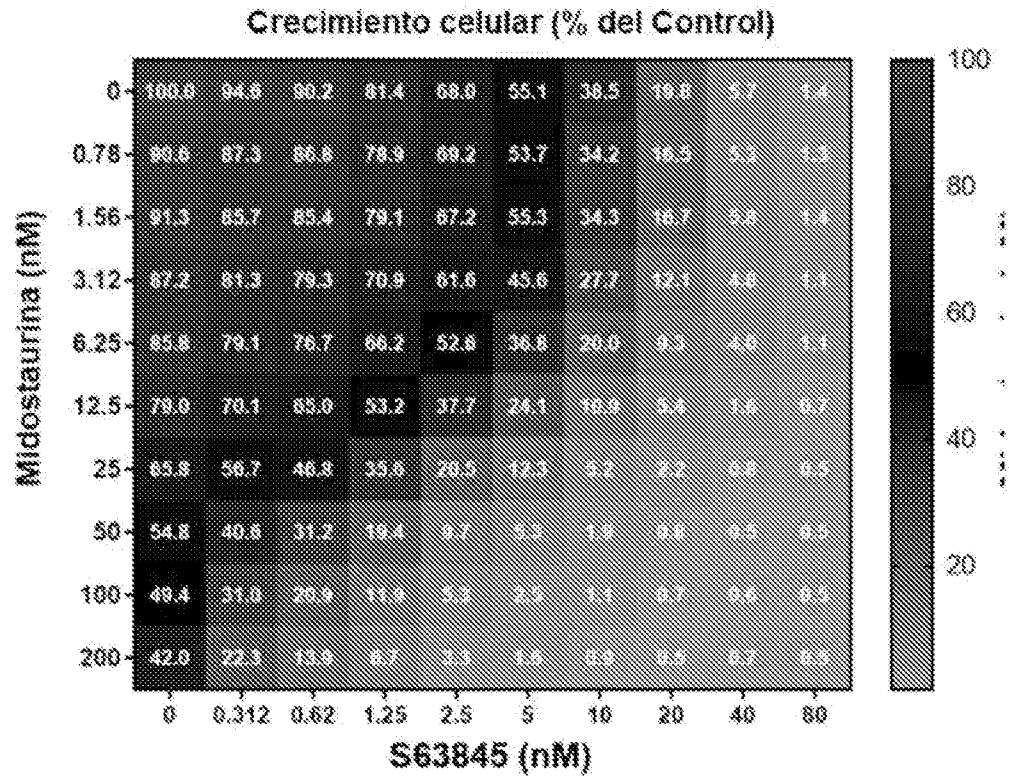


FIGURA 8

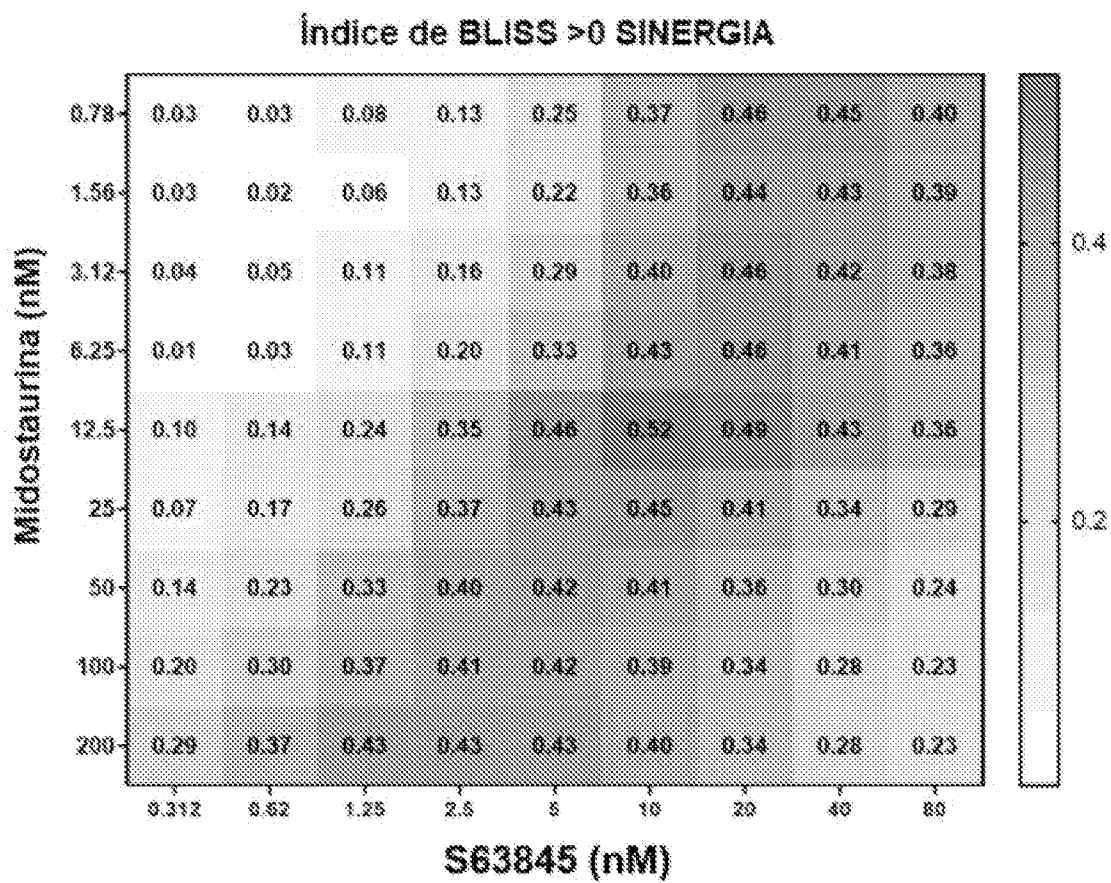


FIGURA 9

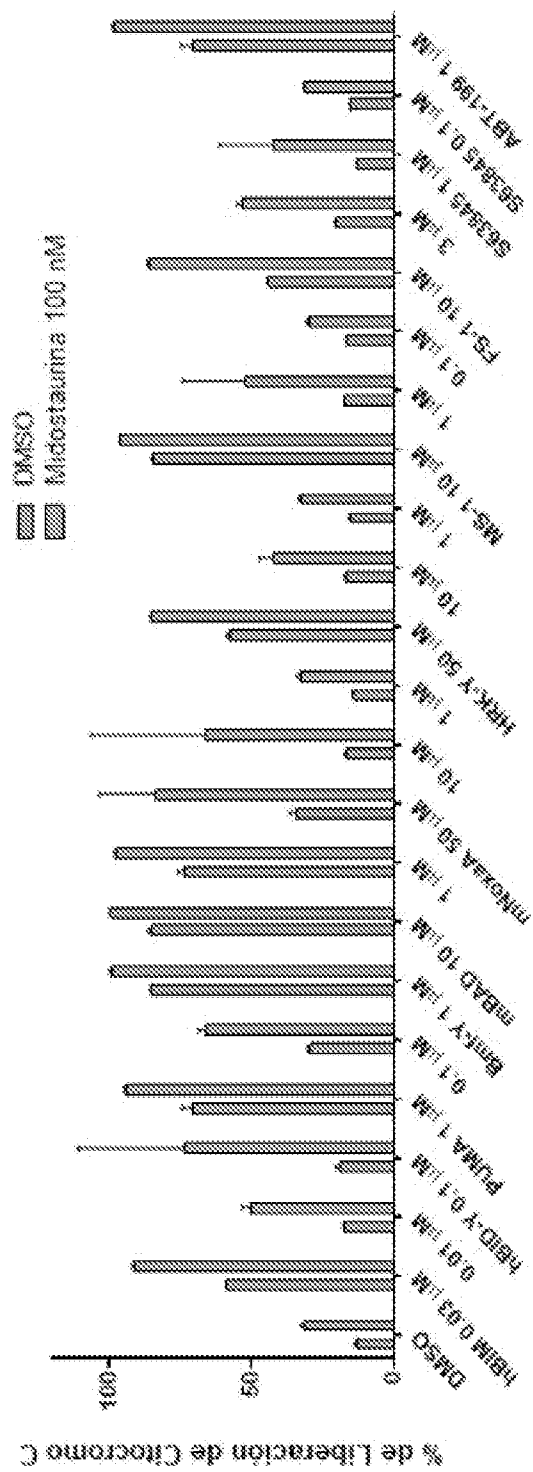


FIGURA 10

MOLM13(*FLT3-ITD*-/+)

parental

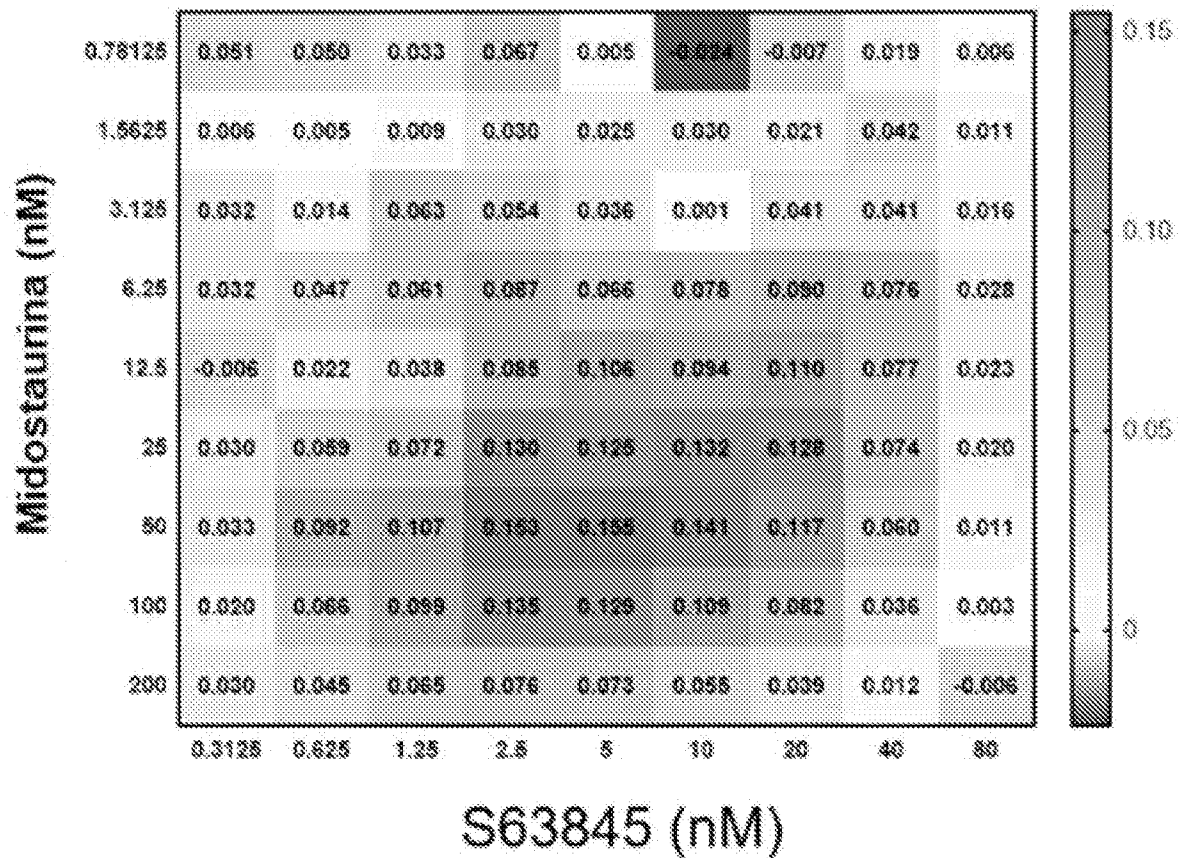
S63845 $CI_{50} = 17$ nM

FIGURA 11

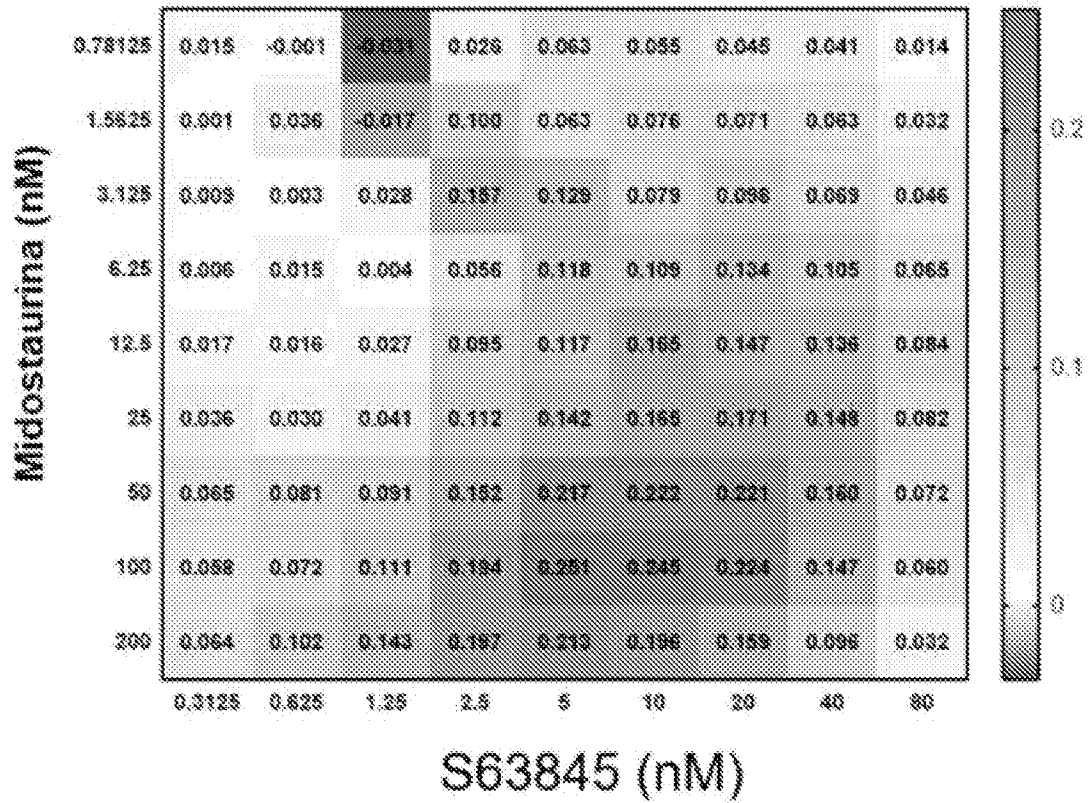
MOLM13(*FLT3-ITD*-/+)Resistente a Venetoclax S63845 $CI_{50} = 30$ nM

FIGURA 12

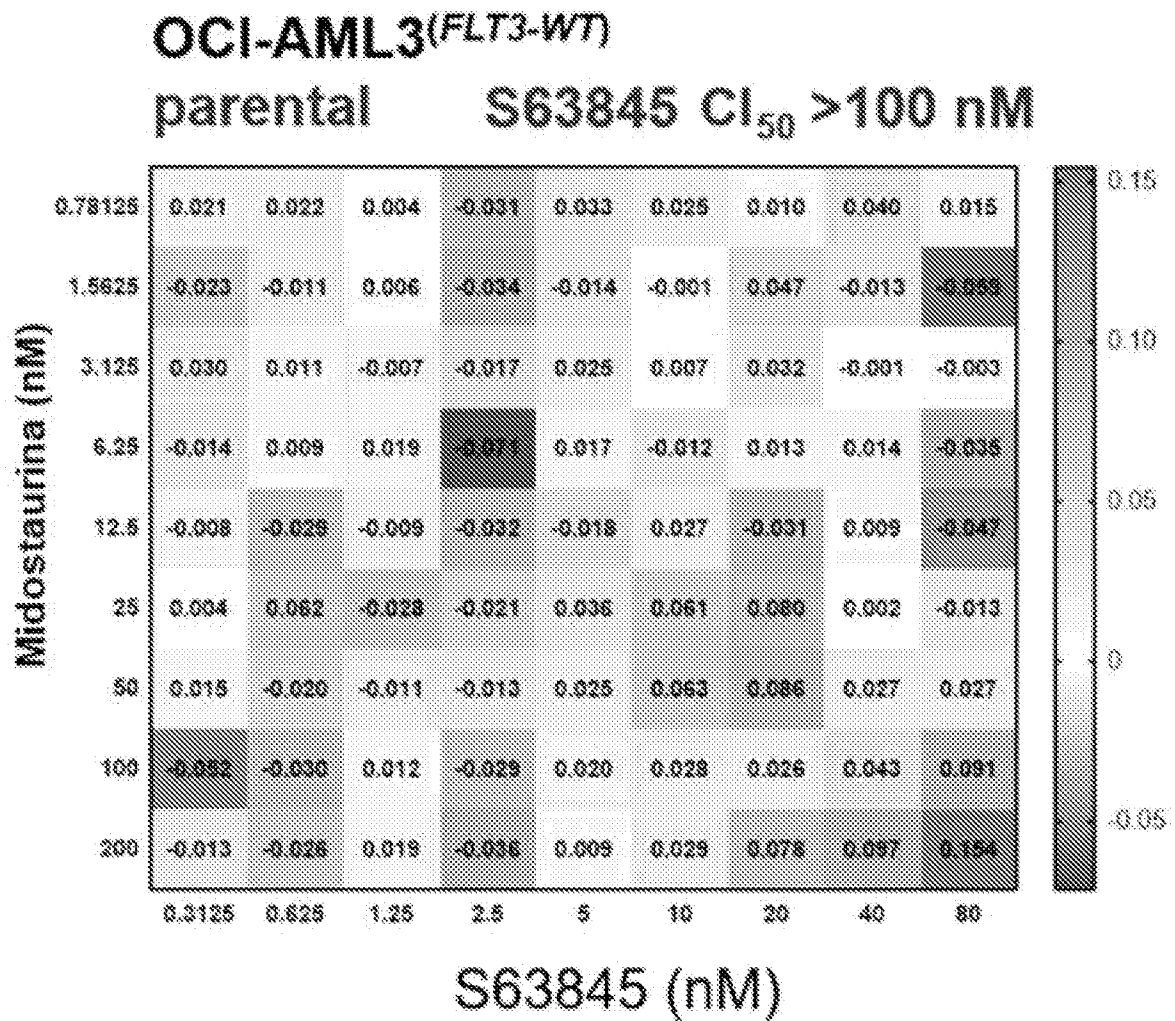


FIGURA 13

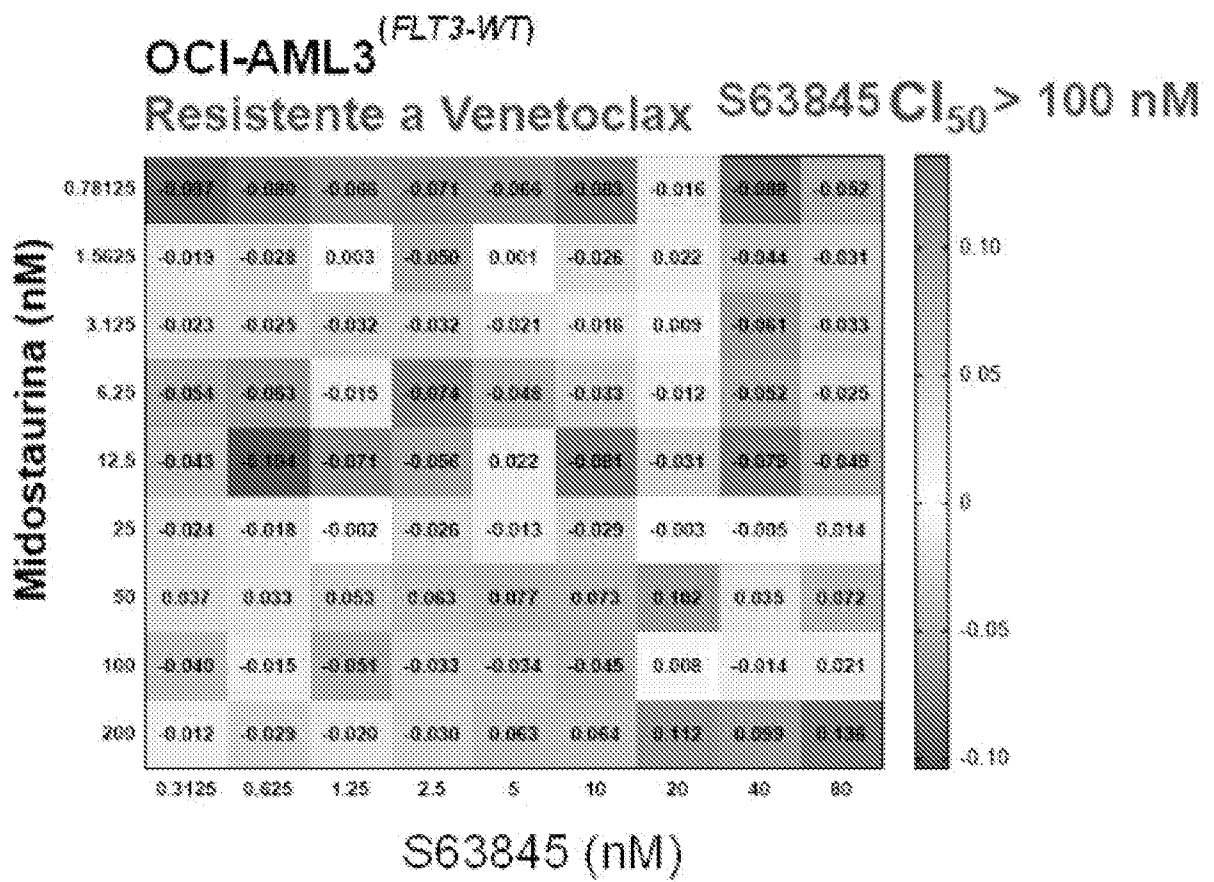


FIGURA 14

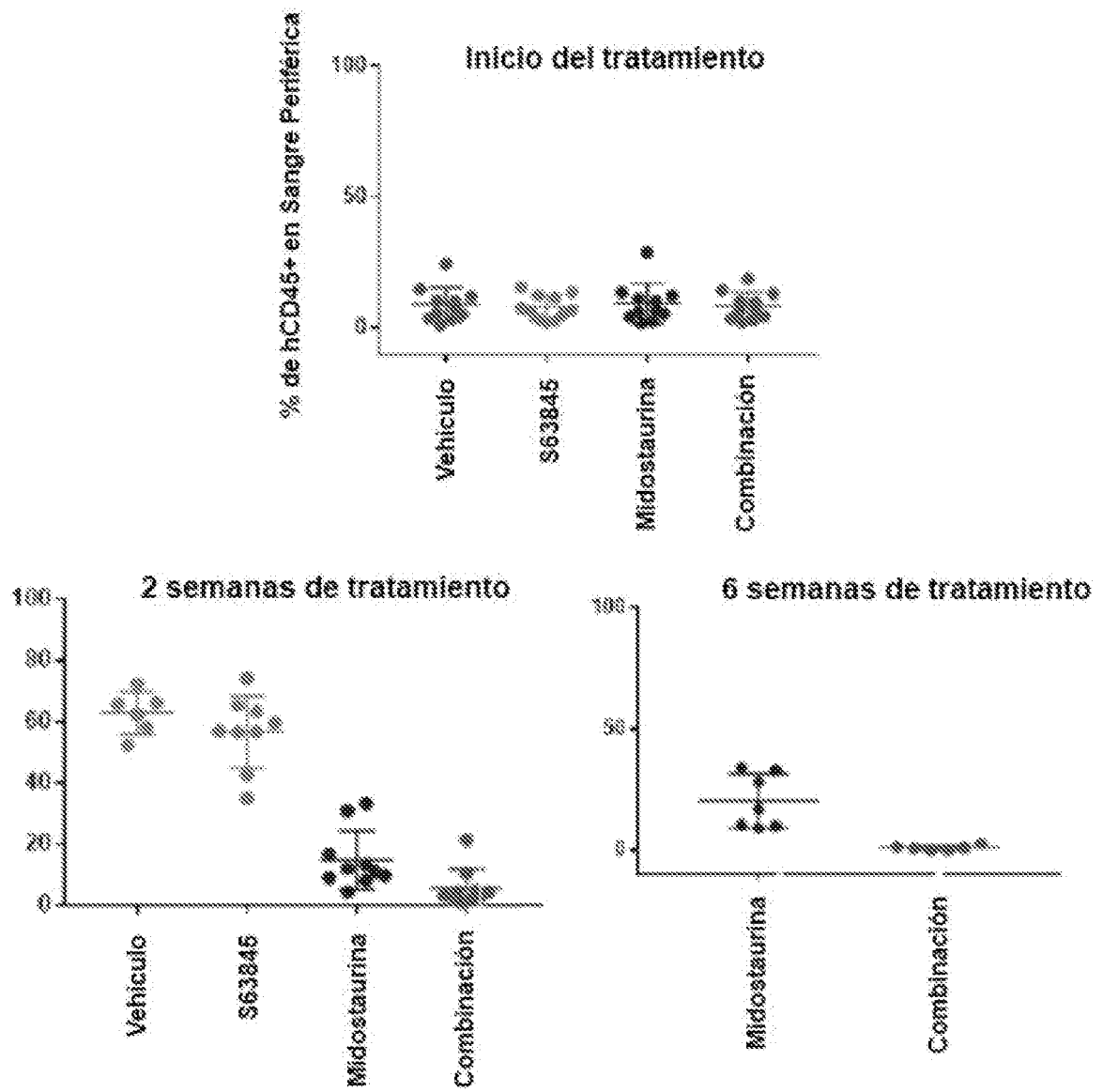


FIGURA 15

Efecto sinérgico de Midostaurina y S63845 en células Ba/F3 FLT3-ITD murinas

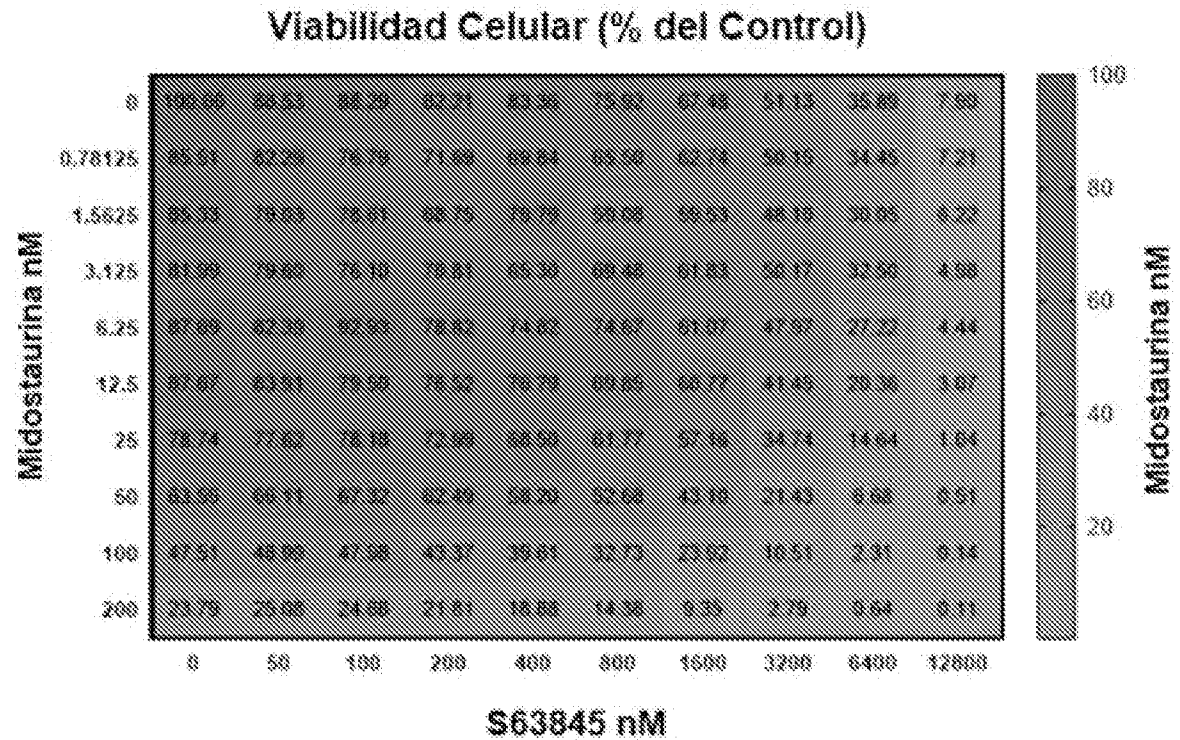


FIGURA 16

Efecto sinérgico de Midostaurina y S63845 en células Ba/F3 FLT3-ITD murinas

Índice de BLISS

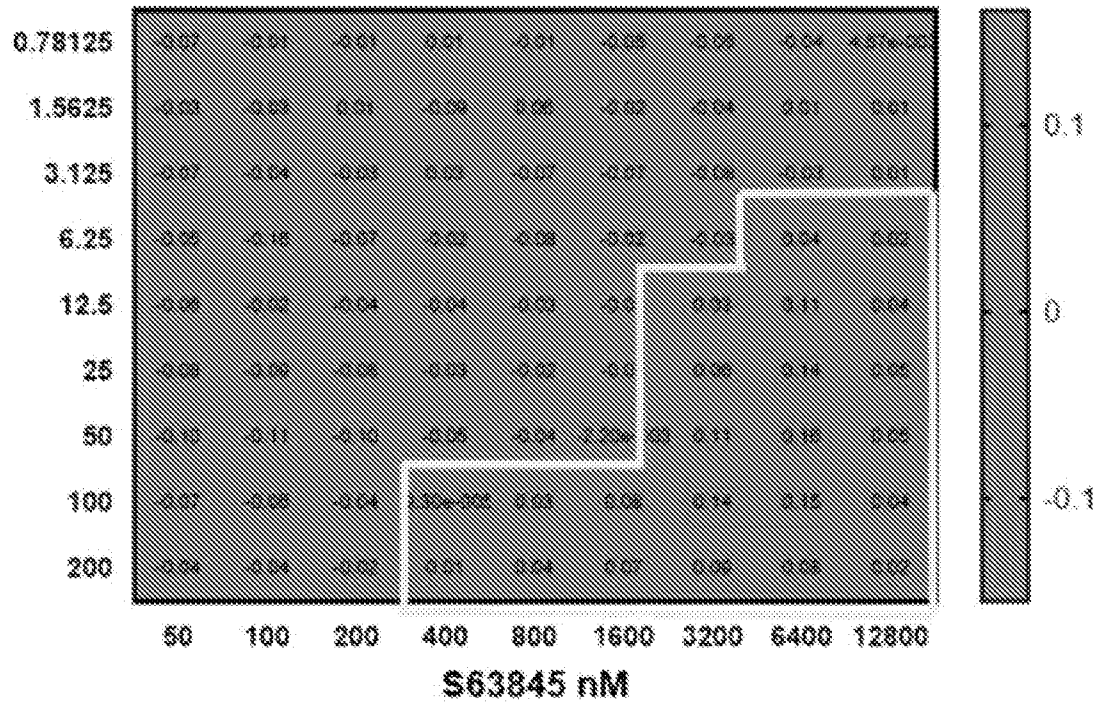


FIGURA 17

Efecto sinérgico de Midostaurina y S63845 en células Ba/F3 FLT3-D835Y murinas

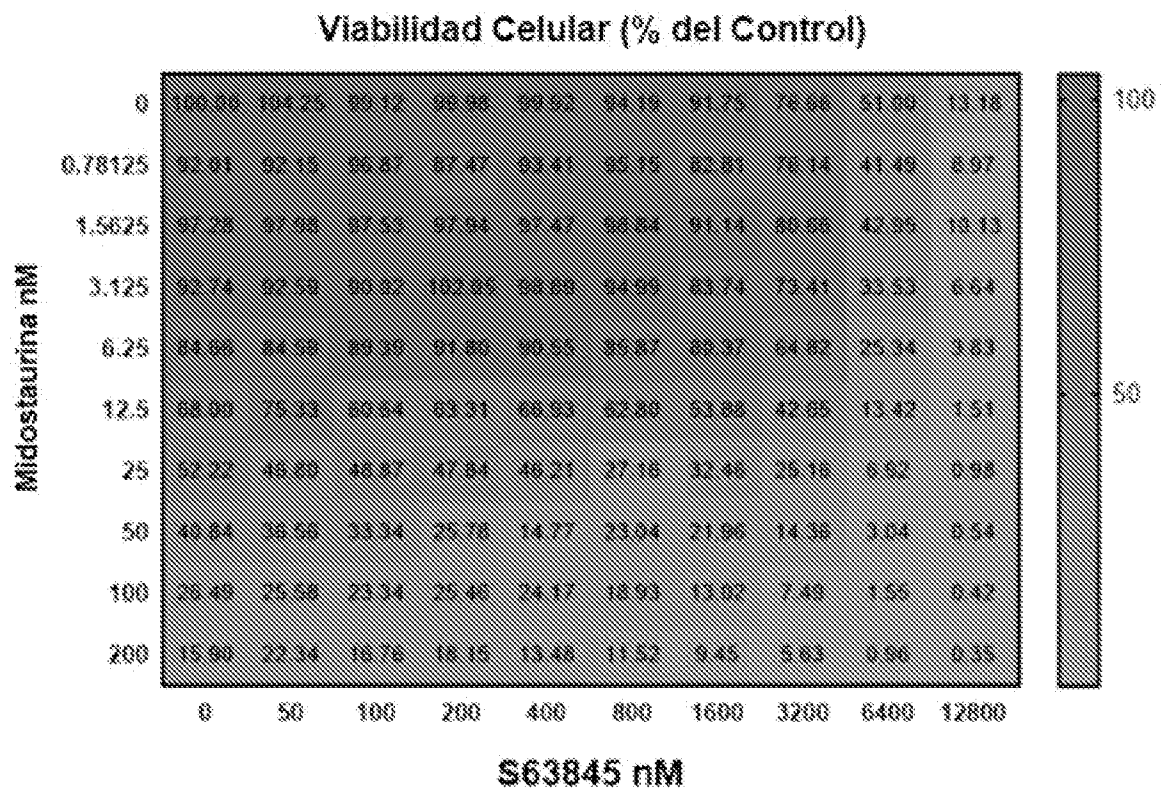


FIGURA 18

Efecto sinérgico de Midostaurina y S63845 en células Ba/F3 FLT3-D835Y murinas

