

# DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

## SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

### 1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

USO DE UNA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MEK Y UN INHIBIDOR DE ERK PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS

### 2 Datos del Solicitante / Titular

|                |                          |                               |                                           |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>Nombre:</b> | F. HOFFMANN- LA ROCHE AG | <b>Dirección Electrónica:</b> | notificacionespatentes@lloredacamacho.com |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|

|                   |                                                   |                                        |                       |
|-------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| <b>Dirección:</b> | GRENZACHERSTRASSE<br>124, CH-4070 BASEL,<br>SUIZA | <b>Domicilio/País de constitución:</b> | SUIZA - BASEL - BASEL |
|-------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|

#### Identificación:

|                                                        |                                                |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA          | <input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA |
| <input checked="" type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA | <input type="checkbox"/> NIT                   |
| <input type="checkbox"/> PASAPORTE                     |                                                |

**Número:** 58834-

### 3 Solicitantes

| Apellidos - Nombres o Razón Social | Tipo | Identificación |
|------------------------------------|------|----------------|
| 1. F. HOFFMANN- LA ROCHE AG        | EE   | 58834          |

### 4 Datos del Inventor

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                |                                            |                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nombre:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Marcia<br>BELVIN                                                                               | <b>Dirección<br/>Electrónica:</b>          | notificacionespatentes@lloredacamacho.com                                                                       |
| <b>Dirección:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1 DNA Way,<br>South San<br>Francisco,<br>California<br>94080, Estados<br>Unidos de<br>América. | <b>Domicilio/País<br/>de constitución:</b> | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA -<br>CALIFORNIA - SOUTH SAN<br>FRANCISCO                                              |
| <b>Identificación:</b><br><br><input type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA <input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA<br><input type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA <input type="checkbox"/> NIT<br><input type="checkbox"/> PASAPORTE <input checked="" type="checkbox"/> No Aplica<br><br><b>Número:</b> - |                                                                                                |                                            |                                                                                                                 |
| 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Inventor(es)                                                                                   |                                            |                                                                                                                 |
| <b>Apellidos - Nombres</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                | <b>Domicilio</b>                           |                                                                                                                 |
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | BELVIN Marcia                                                                                  | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                  |                                                                                                                 |
| 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | MOFFAT John                                                                                    | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                  |                                                                                                                 |
| 3.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | MERCHANT Mark                                                                                  | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                  |                                                                                                                 |
| 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Datos Inventor(es)                                                                             |                                            |                                                                                                                 |
| <b>País de Residencia</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                | <b>Departamento/Estado</b>                 | <b>Ciudad</b>                                                                                                   |
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                                                                      | CALIFORNIA                                 | <b>Dirección</b><br>1 DNA Way,<br>South San<br>Francisco,<br>California 94080,<br>Estados Unidos<br>de América. |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                  |                          |                                                                    |                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                         | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                        | CALIFORNIA               | SOUTH SAN FRANCISCO                                                | 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América. |
| 3.                                                                                                                                                                                                                                                                                         | ESTADOS UNIDOS DE AMERICA                        | CALIFORNIA               | SOUTH SAN FRANCISCO                                                | 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América. |
| 7                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Datos del Representante Legal / Apoderado</b> |                          |                                                                    |                                                                              |
| <b>Nombre:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                  | ALICIA LLOREDA RICAURTE  | <b>Dirección Electrónica:</b>                                      | notificacionespatentes@lloredacamacho.com                                    |
| <b>Dirección:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                  | Calle 72 No 5-83, piso 5 | <b>Domicilio/País de constitución:</b>                             | COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.                                         |
| <b>Identificación:</b><br><br><input checked="" type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA<br><input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA<br><input type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA<br><input type="checkbox"/> NIT<br><input type="checkbox"/> PASAPORTE<br><br><b>Número:</b> 53215- |                                                  |                          |                                                                    |                                                                              |
| <b>Presentación de Poder</b>                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                  |                          |                                                                    |                                                                              |
| Año de Radicación                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                  |                          |                                                                    |                                                                              |
| Número de Radicación                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                  |                          |                                                                    |                                                                              |
| 8                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Datos Solicitud: PCT / WO</b>                 |                          |                                                                    |                                                                              |
| <b>Número Solicitud:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                  | PCT/EP2014/068776        | <b>Fecha Solicitud:</b>                                            | 04/09/2014                                                                   |
| <b>Número Publicacion:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                  | WO 2015/032840 A1        | <b>Fecha Publicacion:</b>                                          | 12/03/2015                                                                   |
| 9                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Declaraciones de prioridad</b>                |                          | <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO |                                                                              |
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                         | (33) País de origen<br>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA | Codigo del país<br>US    | (31) No. Solicitud<br>61/874,206                                   | (32) Fecha<br>05/09/2013                                                     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                     |    |                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----|---------------------------|
| 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Reivindicaciones    |    |                           |
| Número reivindicaciones:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                     | 75 | Pago Reivindicaciones: No |
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Reducción de tasas. |    |                           |
| <p><i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i></p> <p><input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO</p> <p><b>Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                     |    |                           |
| <p><input type="checkbox"/> Micro, pequeñas y medianas empresas</p> <p><input type="checkbox"/> Universidades públicas o privadas</p> <p><input type="checkbox"/> Entidades sin ánimo de lucro</p> <p><b>Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                     |    |                           |
| 12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Documentos Anexos   |    |                           |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Descripción</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Dibujos y/o Figuras</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Resumen</p> <p><input type="checkbox"/> Certificado Depósito Material Biológico</p> <p><input type="checkbox"/> Uso de Conocimiento tradicional</p> <p><input type="checkbox"/> Listado de secuencias</p> <p><input type="checkbox"/> Artes finales 12 x 12 cm</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Poderes, si fuere el caso</p> <p><input type="checkbox"/> Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad</p> <p><input type="checkbox"/> Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Otros Anexos</p> |                     |    |                           |

## USO DE UNA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MEK Y UN INHIBIDOR DE ERK PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere de manera general a combinaciones farmacéuticas de inhibidores de MEK (MEKi) y un inhibidor de ERK (ERKi) con actividad frente a los trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer. La invención se refiere también a métodos para usar los compuestos para el tratamiento de mamíferos.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La ruta RAS/RAF/MEK/ERK se activa en más de un 30 % de cánceres humanos, de forma más común mediante mutación en el oncogén *K-ras* y también mediante mutaciones en BRAF. La ruta ha atraído, por tanto, un interés significativo como diana terapéutica del cáncer (P. J. Roberts y C.J. Der, *Oncogene* **2007** 26:3291-310)). Los esfuerzos para hacer diana en RAS directamente no han sido satisfactorios hasta la fecha, pero recientes ensayos químicos con BRAF e inhibidores de la quinasa regulados por la señal extracelular activada por mitógeno (MEK) han sugerido que el direccionamiento de estos efectores RAS de forma descendente se considera prometedor en el tratamiento de cánceres que incluyen mutaciones oncogénicas en la ruta (K. T. Flaherty y col., *Curr. Opin. Oncol.* **2010** 22:178-83). Aunque las respuestas clínicas y la actividad antitumoral pueden ser impresionantes, particularmente para los inhibidores de BRAF en el melanoma de BRAF mutante, la mayoría de pacientes desarrollan en última instancia resistencia clínica y enfermedad progresiva (Flaherty *más arriba*; D.B. Solit y N. Rosen, *N. Engl. J. Med.* **2011** 364:772-4). Los estudios preclínicos han identificado múltiples mecanismos de resistencia adquirida a los inhibidores de BRAF, incluyendo, el cambio entre las isoformas de RAF (J. Villaneuva y col., *Cancer Cell* **2010** 18:683-95), la regulación en exceso de la señalización de RTK o NRAS (R. Nazarian y col., *Nature* **2010** 468:973-7), y la reactivación de la señalización de quinasa activada por mitógeno (MAPK) mediante la activación de COT (C.M. Johannessen y col., *Nature* **2010** 468:968-72) o una mutación de activación de la quinasa MEK (N. Wagle y col., *J. Clin. Oncol.* **2011** 29:3085-96). De forma similar, los estudios preclínicos han identificado distintos mecanismos por los cuales la célula adquiere resistencia a la inhibición de MEK, que incluyen la amplificación de BRAF mutante (R.B. Corcorran y col., *Sci. Signal* **2011** 3:ra84), la regulación en exceso de STAT3 (B. Dai y col., *Cancer Res.* **2011** 71:3658-68), o mutaciones en el bolsillo alostérico de MEK que pueden relacionar directamente los inhibidores con la actividad de la quinasa MEK (H. Wang y col., *Cancer Res.*

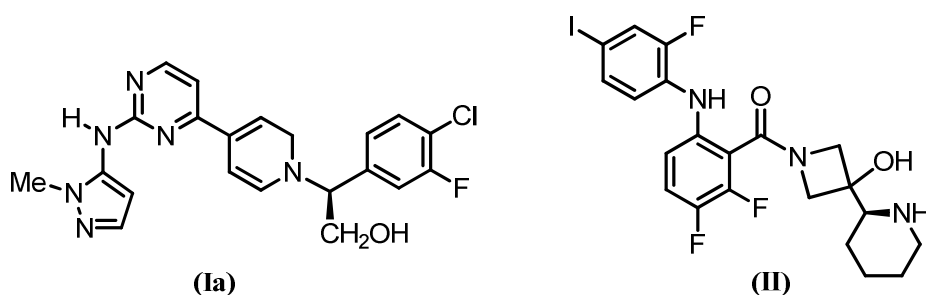
**2011** 71:5535-45; C.M. Emery y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2009** 106:20411-6). Se han descrito mutaciones de MEK en muestras tumorales de pacientes tratados con inhibidores de MEK (Emera, *más arriba*) o inhibidores de BRAF (Wagle *más arriba*), que muestran relevancia clínica.

Aunque se han notificado inhibidores de ERK1/2 y se encuentran actualmente en desarrollo clínico, en comparación con los inhibidores de RAF y MEK, la identificación y el desarrollo de inhibidores de moléculas pequeñas frente a ERK1/2 que actúan directamente corriente abajo de MEK, ha quedado rezagada.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere de forma general a combinaciones sinérgicas de inhibidores de MEK e inhibidores de ERK con actividad anticancerosa que, administrados en combinación, inhiben el crecimiento de células cancerosas. Las combinaciones y métodos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer. Las composiciones pueden inhibir el crecimiento tumoral en mamíferos y pueden ser útiles para tratar pacientes humanos con cáncer.

En un aspecto, la invención incluye un método para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que comprende administrar una combinación terapéutica como una formulación combinada o alternativa a un mamífero, donde la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto MEKi y una cantidad terapéuticamente eficaz de un ERKi. En un aspecto de la presente invención, el inhibidor de ERK se selecciona entre (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona (**Ia**, GDC-0994), 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (**Ib**), (S)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (**Ic**) o (S)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina (**Id**) y el inhibidor de MEK es cobimetinib (**II**, GDC-0973) o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida (**Ila**, GDC-0623). En otro aspecto de la invención, El inhibidor de MEK es (**II**) y el inhibidor de ERK es GDC-0994 (**Ia**).



Otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa o un trastorno modulado por las quinasas RAS/RAF/MEK/ERK que comprende administrar a un mamífero que lo necesita cantidades eficaces de un compuesto de Fórmula **Ia-IId** y un compuesto de Fórmula **II** o **Ila**. Los compuestos de Fórmula **Ia-IId** y **II** o **Ila** se pueden formular simultáneamente para la administración en una combinación como una composición farmacéutica o se pueden administrar por separado de forma alternante (secuencialmente) como una combinación terapéutica.

Otro aspecto de la invención proporciona métodos para tratar un trastorno hiperproliferativo, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita cantidades eficaces de un compuesto de Fórmula **Ia-IId**, un compuesto de Fórmula **II** (GDC-0973) o **Ila** y otro agente quimioterapéutico.

Otro aspecto de la invención incluye artículos de fabricación o kits que comprenden un compuesto de Fórmula **Ia-IId** y un compuesto de fórmula (GDC-0973) o **Ila**, un envase, y opcionalmente un prospecto o etiqueta que indica un tratamiento.

Otro aspecto de la invención incluye un método para determinar los compuestos que se van a usar combinados para el tratamiento del cáncer que comprende: a) administrar una combinación terapéutica de MEKi y un ERKi a una línea de células tumorales in vitro con una mutación Kras, y b) medir un efecto sinérgico o no sinérgico.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra la proliferación celular de células A549 del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) cuando se dosifican con GDC-0994, **Ib**, **Ic** o **Id** y GDC-0973 individualmente o dosificado con GDC-0994, **Ib**, **Ic** o **Id** combinado con GDC-0973 usando el protocolo en el Ejemplo 6. Se incubaron las células con la concentración máxima indicada de fármaco con diluciones en serie 3 veces. Se determinó la viabilidad celular utilizando un ensayo CellTiter-Glo® (CTG)

La FIG. 2 muestra la proliferación celular de células A549 del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) cuando se dosifican con GDC-0994, **Ib**, **Ic** o **Id** y GDC-0973 individualmente o dosificado con dosis de GDC-0994, **Ib**, **Ic** o **Id** combinado con GDC-0973. Se determinó la proliferación celular utilizando un ensayo BrdU. Se midió la apoptosis utilizando un ensayo nucELISA.

La FIG. 3 muestra las consecuencias farmacodinámicas de tratamiento con una combinación de inhibidores de MEK e inhibidores de ERK solos o combinados. Se inhibió la fosforilación de RSK mediante ERK. La progresión del ciclo celular disminuyó significativamente tal como se evidenció por una disminución en la ciclina D1 y un aumento en p27. Se evidenció una muerte celular elevada

(apoptosis) por los niveles aumentados de PARP escindido.

La FIG. 4 muestra un exceso superficial de Bliss que representa gráficamente la inhibición de la síntesis de ADN en células A549 que crecen exponencialmente de manera asíncrona determinado por las células en tratamiento en placas de 384 pocillos con las concentraciones indicadas de cada fármaco durante 48 h. Para las 2 h finales de tratamiento se trató 1uM de células con 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) para marcar el ADN sintetizado recientemente. A continuación se fijaron y permeabilizaron las células mediante la adición de paraformaldehído al 2 % y Triton X-100 al 0,02 % al medio de crecimiento durante treinta minutos, seguido por marcado fluorescente del EdU incorporado con azida de Alexa-Fluor 635 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Eugene, OR) y la contratinción del ADN con Hoechst 33342. Se adquirieron imágenes mediante el microscopio de fluorescencia con un sistema de formación de imágenes de alto contenido Opera de Perkin Elmer. Se determinó la fracción de células marcadas con EdU con respecto al número total de células utilizando el software de análisis de imágenes Acapella.

Para determinar posibles interacciones entre los tratamientos farmacológicos, se comparó la respuesta observada para cada par de concentraciones con la respuesta esperada para dos agentes no interactuantes basándose en la aditividad de Bliss ( $F_{a+b}=F_a+F_b-F_a \cdot F_b$  donde  $F_a$  y  $F_b$  son los efectos fraccionales de los agentes a y b). La diferencia entre el efecto fraccional observado y previsto se denomina exceso de Bliss.

FIG 5 Tratamiento de células NSCLC con combinaciones de inhibidores de MEKi (GDC-0973) y ERKi (GDC-0994). Las líneas celulares 19/29 ensayadas muestran algún efecto combinado con ERK+MEK. Todas las líneas mutantes no del tipo Q61H Kras muestran alguna sensibilidad a la combinación. No se observaron efectos combinados en las dos líneas mutantes Braf en el panel.

La FIG. 6 muestra la gráfica de un cambio promedio de volumen tumoral en el tiempo en ratones Taconic hembra nu/nu (lampiños) con xenoinjertos tumorales de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H2122 (NSCLC) dosificado diariamente con: Vehículo MCT (metilcelulosa al 0,5 %/Tween 80 al 0,2 %), 60 mg/kg de Fórmula **Ia** (GDC-0994) y 5 mg/kg de Fórmula **II** (GDC-0973) (Figura 5a) o dosificado diariamente con 60 mg/kg de Fórmula **Ia** (GDC-0994) y 15 mg/kg cada tres días (Q3D, es decir, dosificación intermitente) con Fórmula **II** (GDC-0973) (Figura 5b). Se dosificaron los ratones mediante sonda nasogástrica oral. Los marcadores farmacodinámicos respaldan un crecimiento celular disminuido (FIG 6c y 6d) tal como se ha evidenciado por la disminución en los niveles de D1 y Ki67 cíclicos y una apoptosis elevada (FIG 6e) evidenciada por un aumento en

la caspasa 3 escindida en el ensayo 6 del xenoinjerto H2122 KRAS NSCLC

La FIG. 7 muestra la gráfica de un cambio promedio de volumen tumoral en el tiempo en ratones Taconic hembra nu/nu (lampiños) con xenoinjertos tumorales de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H2122 (NSCLC) dosificado diariamente con: Vehículo MCT (metilcelulosa al 0,5 %/Tween 80 al 0,2 %), 100 mg/kg de GDC-0994 y 5 mg/kg de GDC-0973 (Figura 7a), dosificados diariamente con 100 mg/kg de GDC-0994 y 4 mg/kg de GDC-0973 (Figura 7b), o dosificados diariamente con 100 mg/kg de GDC-0994 y 15 mg/kg cada tres días (Q3D, es decir, dosificación intermitente) con (GDC-0973) (Figura 7c). Se dosificaron los ratones mediante sonda nasogástrica oral.

La FIG. 8 muestra la gráfica de un cambio promedio de volumen tumoral en el tiempo en ratones Taconic hembra nu/nu (lampiños) con xenoinjertos de cáncer de pulmón no microcítico A549 (NSCLC) dosificado diariamente con: Vehículo MCT (metilcelulosa al 0,5 %/Tween 80 al 0,2 %), 60 mg/kg de Fórmula GDC-0994 y 5 mg/kg de GDC-0973 (Figura 5a) o dosificado diariamente con 60 mg/kg de Fórmula GDC-0994 y 15 mg/kg cada tres días (Q3D, es decir, dosificación intermitente) con GDC-0973 (Figura 5b). Se dosificaron los ratones mediante sonda nasogástrica oral.

La FIG 9 muestra un resumen de la eficacia de GDC-0994 y GDC-0973 en un estudio de eficacia de una combinación que varía la dosis de la línea de células HCT 116 de cáncer colorrectal expresada según la inhibición del crecimiento tumoral. Las celdillas en gris indican la mejor eficacia para un régimen tolerado. Las celdillas en negro no se toleraron. La dosificación fue mediante sonda nasogástrica oral (PO) diariamente (QD).

La FIG 10 representa gráficamente una sólida actividad antitumoral de cobimetinib y GDC-0994 en modelos GEM del mutante *KRAS* de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) MJ

Los modelos GEM del mutante *Kras* que incluyen el tumor se trataron con vehículo, GDC-0973 (5 mg/kg, PO, QD), GDC-0994 (60 mg/kg, PO, QD) o una combinación de GDC-0973 y GDC-0994. La FIG 10a muestra gráficos en cascada que representan gráficamente el porcentaje de cambio en el volumen tumoral desde un valor inicial basándose en diagnóstico de imágenes por ultrasonidos (día 0, día 7) en el modelo PDAC tras un tratamiento de 7 días con el vehículo (negro, n=8), cobimetinib (verde, n=8), GDC-0994 (azul, n=8) y una combinación (rojo, n=9) FIG 10b Gráfica de Kaplan-Meier de supervivencia global a partir del modelo PDAC de las cohortes de tratamiento Vehículo (negro, n=13), gemcitabina (naranja, n=10), **IIb** (verde, n=9), GDC-0994 (azul, n=8) y una combinación de GDC-0994 y GDC-0973 (rojo, n=13). El tratamiento

combinado es significativo con respecto al Vehículo,  $**p < 0,0001$  y gemcitabina,  $p < 0,0159$ , rango logarítmico.

FIG. 11a Viabilidad de líneas celulares  $KRAS^{G12D}$ , derivadas de  $p16/19^{FL/FL}$  PDX-CRE en presencia de GDC-0973, GDC-0994 y combinaciones de GDC-0994 y GDC-0973 debido a la supresión creciente de la ruta MAPK. FIG. 11b Marcadores PD en líneas celulares  $KRAS^{G12D}$ , derivadas de  $p16/19^{FL/FL}$  PDX-CRE en presencia de GDC-0973, y combinaciones de GDC-0994 y GDC-0973.

FIG 12. Actividad de crecimiento celular observada con combinaciones de GDC-0994 e inhibidores múltiples de MEK durante el desarrollo.

FIG 13. Evaluación de la inhibición sinérgica de la síntesis de ADN. Se trataron células HCT116 (A, B) y A549 (C, D) en crecimiento exponencial con las concentraciones indicadas de GDC-0994 y GDC-0973 durante 47 horas antes de la adición de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) durante 60 minutos, seguido por fijación mediante paraformaldehído y marcado del ADN que contiene EdU con azida de Alexa Fluor 647 (Life Technologies, Madison WI). Se determinaron el número total de núcleos marcados con Hoechst 33542 y la fracción de núcleos marcados con EdU mediante un microscopio de fluorescencia automatizado y análisis de imágenes usando el instrumento Opera de Perkin Elmer y el software Acapella.

A, C, Gráficas de isobologramas. Las líneas unen puntos de igual inhibición de la síntesis de ADN alcanzadas por diferentes combinaciones de dos fármacos. La línea diagonal punteada gruesa muestra el isobolo con la inhibición del 50 % si las combinaciones del compuesto mostraron una aditividad simple de acuerdo con el modelo de Loewe (N. Geary, Understanding synergy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**. doi:10.1152/ajpendo.00308.2012).

B, D, Análisis de la sinergia de la matriz de dosis que muestra 1: Cambio del porcentaje observado en la fracción de células EdU-positivas con respecto a los controles tratados con DMSO, 2; Efecto previsto de las combinaciones de fármacos basadas en el modelo de aditividad de Loewe aplicado a las curvas de dosis respuesta de un agente individual, 3; Diferencia entre los datos observados y los efectos aditivos previstos. Los números menores que cero indicaron una inhibición mayor de la síntesis de ADN que la esperada para los fármacos aditivos.

Se analizaron los datos utilizando el módulo de extensión de la sinergia del compuesto del seleccionador de Genedata (Genedata AG, Basel)

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### DEFINICIONES

Las palabras "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye" e

"incluyen" cuando se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones se pretende que especifiquen la presencia de las características indicadas, números enteros, componentes, o etapas citados, pero no impiden la presencia o la adición de uno o más características, números enteros, componentes, etapas, o grupos adicionales de los mismos.

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a un tratamiento terapéutico, cuyo objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el crecimiento, desarrollo o diseminación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los beneficios o resultados clínicos deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución de la extensión de una enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización en la evolución de la enfermedad, mejora o alivio de la patología, y remisión (tanto total o parcial), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también significa prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibiera tratamiento. Los necesitados de tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la dolencia o trastorno, por ejemplo, un paciente con cáncer.

"Inhibir" es disminuir o reducir una actividad, función, y/o cantidad en comparación con la de referencia.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que (i) trata la enfermedad concreta, dolencia, o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora, o elimina uno o más síntomas, en concreto, de la enfermedad, dolencia, o trastorno particular, o (iii) previene o retrasar el inicio de uno o más síntomas, en concreto, de la enfermedad, dolencia, o trastorno descrito en el presente documento. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (por ejemplo, retrasar en alguna extensión y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (por ejemplo, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer se puede medir la eficacia, por ejemplo, por evaluación del tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o mediante la determinación de la tasa de respuesta (RR).

Además de proporcionar un tratamiento mejorado para un trastorno hiperproliferativo dado, la administración de determinadas combinaciones de la invención puede mejorar la calidad de vida de un paciente en comparación con

la calidad de vida experimentada por el mismo paciente que recibe un tratamiento diferente. Por ejemplo, la administración de una combinación a un paciente puede proporcionar una calidad de vida mejorada en comparación con la calidad de vida que experimentaría el mismo paciente si recibiera solo uno de los agentes individuales como tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento combinado con una combinación descrita en el presente documento puede disminuir la dosis de agentes terapéuticos necesarios. El tratamiento combinado puede disminuir o eliminar también la necesidad del uso de los agentes quimioterapéuticos y los efectos secundarios asociados con las dosis elevadas de agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, náuseas, vómito, pérdida de cabello, prurito, pérdida de apetito, pérdida de peso, etc.). La combinación puede producir también carga tumoral reducida y los acontecimientos adversos asociados, tales como dolor, disfunción orgánica, pérdida de peso, etc. De acuerdo con ello, un aspecto de la invención proporciona una combinación para el uso terapéutico para mejorar la calidad de vida de un paciente tratado por un trastorno hiperproliferativo con un agente descrito en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la dolencia fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y neoplasias leucémicas o linfoides. Los ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen el cáncer espinocelular (*por ejemplo*, cáncer espinocelular epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC"), adenocarcinoma del pulmón y cáncer espinocelular del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello. Cáncer gástrico, tal como se usa en el presente documento, incluyendo el cáncer de estómago, que se puede desarrollar en cualquier parte del estómago y puede diseminarse por el estómago y a otros órganos; particularmente el esófago, pulmones, los ganglios linfáticos, y el hígado.

El término "mamífero" incluye, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, cobayas, monos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, y aves de corral.

El término paciente se refiere a un mamífero, y en una realización, el paciente es un varón humano o una mujer humana.

El término "sinérgico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una combinación terapéutica que es más eficaz que los efectos aditivos de los dos o más agentes individuales. Una determinación de la interacción sinérgica puede estar basada en los resultados obtenidos a partir de los ensayos conocidos en la materia. Los resultados de estos ensayos se pueden analizar utilizando el método combinado de Chou y Talalay y el Análisis de dosis-efecto con el software CalcuSyn a fin de obtener un Índice combinado (Chou y Talalay, *Adv. Enzyme Regul.* **1984** 22:27-55). Las combinaciones proporcionadas en el presente documento se pueden analizar utilizando un programa normalizado para cuantificar la sinergia, el aditivismo, y el antagonismo entre agentes anticancerosos. Un programa de ejemplo es el que describen Chou y Talalay, en "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy," Academic Press, 1987, Capítulo 2. Valores del Índice combinado menores que 0,8 indican sinergia, valores mayores que 1,2 indican antagonismo y valores entre 0,8 y 1,2 indican efectos aditivos. El tratamiento combinado puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgico", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se utilizan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los principios activos se: (1) formulan y administran simultáneamente o se administran simultáneamente en una formulación combinada, de dosificación unitaria; (2) administran de forma alternativa o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en tratamiento alternado, se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los compuestos se administrar o liberan secuencialmente, por ejemplo, mediante inyecciones diferentes en jeringuillas separadas. En general, durante el tratamiento alternativo, una dosificación eficaz de cada principio activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en un tratamiento combinado, las dosificaciones eficaces de dos o más principios activos se administran juntas. Se evaluaron los efectos combinados utilizando el modelo de independencia BLISS y el modelo del agente individual más alto (HSA) (Lehár y col. 2007, *Molecular Systems Biology* 3:80). La puntuación BLISS cuantifica el grado de potenciación de agentes individuales y una puntuación de BLISS positiva (mayor que 0) sugiere más que una simple aditividad. Una puntuación de BLISS positiva acumulada mayor de 250 se considera una fuerte sinergia en los intervalos de concentración ensayados. Una puntuación de HSA (mayor de 09 sugiere un efecto combinado mayor que las respuestas máximas del agente individual a las

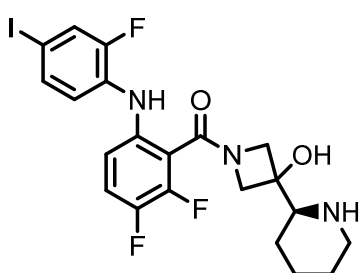
correspondientes concentraciones.

Se conocen en la materia métodos para medir TGI. En un método ilustrativo, se determinaron los volúmenes tumorales promedio y se compararon con los del paciente antes y después del tratamiento. Se pueden medir los volúmenes tumorales en dos dimensiones (longitud y anchura) utilizando cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, calibres UltraCal IV (Fred V. Fowler Company) o mediante PET (tomografía de emisión de positrones), o mediante algún otro método. Se puede usar la fórmula del volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) = (longitud x anchura<sup>2</sup>) x 0,5. Se puede llevar a cabo la medida de los volúmenes tumorales en múltiples periodos de tiempo utilizando una solución de modelación mixta *Linear Mixed Effects* (LME) (Pinheiro y col. **2009**). Esta solución puede resolver mediciones repetidas (y múltiples pacientes). Se pueden usar curvas de regresión polinómicas cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los cursos temporales de los volúmenes tumorales para cada nivel de dosis. A continuación se pueden relacionar estos perfiles no lineales con la dosis usada en el modelo mixto. La inhibición del crecimiento tumoral como porcentaje del vehículo se puede calcular como porcentaje del área bajo la curva ajustada (ABC) por día en relación con el vehículo, utilizando la siguiente fórmula:

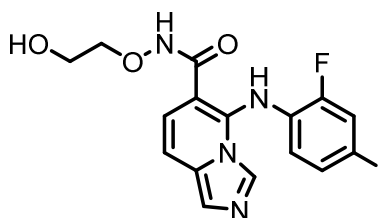
$$\% \text{ TGI} = 100 \left[ 1 - \left( \frac{\text{ABC}_{\text{tratamiento/día}}}{\text{ABC}_{\text{vehículo/día}}} \right) \right]$$

Utilizando esta fórmula, un valor de TGI del 100 % indica la estasia del tumor, más de aproximadamente un 1 % pero menos de aproximadamente un 100 % indica la inhibición del crecimiento tumoral, y más de aproximadamente un 100 % indica la regresión del tumor.

Inhibidores de MEK



(II)



(IIa)

La presente invención se refiere a inhibidores de MEK y a su uso en un tratamiento combinado con inhibidores de HER3 y EGFR. Se han revisado extensamente los inhibidores de MAK (S. Price, Putative Allosteric MEK1 and MEK 2 inhibitors, *Expert Opin. Ther. Patents*, **2008** 18(6):603; J.I. Trujillo, MEK Inhibitors: a patent review 2008-2010 *Expert Opin. Ther. Patents* **2011** 21(7):1045. Preferentemente, el inhibidor de MEK podría seleccionarse de GDC-0973 (cobimetinib), GDC-0623, AZD6244 (selumetinib), AZD8330, BAY 86-9766

(refametinib), GSK-1120212 (trametinib), ARRY-162, MSC1936369, MK162, TAK733 y PD-325901. De forma más preferente, el inhibidor de MEK es GDC-0973 (cobimetinib) o GDC-0623.

Cobimetinib (GDC-0973, denominado también en el presente documento “Compuesto II”) es un inhibidor de MEK1 y MEK2, potente y muy selectivo, oralmente disponible, y los componentes centrales de la ruta RAS/RAF tienen una actividad antitumoral del agente individual en múltiples modelos de cánceres humanos. GDC-0973 tiene el nombre químico [3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]fenil][3-hidroxi-3-[(2S)-2-piperidinil]-1-azetidini]metanona.

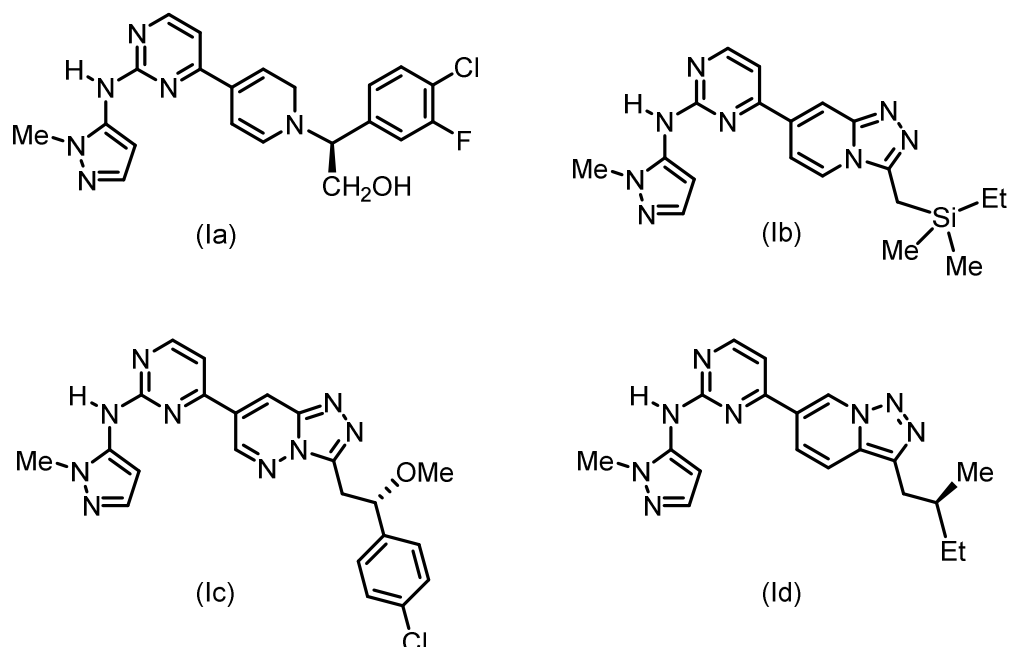
Cobimetinib tiene el siguiente Número de Registro CAS: 934660:-93-2.

GDC-0623 (denominado también en el presente documento “Compuesto IIa”) es un inhibidor de MEK1 y MEK2, potente y muy selectivo, oralmente disponible, y los componentes centrales de la ruta RAS/RAF tienen una actividad antitumoral del agente individual en múltiples modelos de cánceres humanos. GDC-0623 tiene el nombre químico 5-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-N-(2-hidroxietoxi)-imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida y tiene el siguiente Número de Registro CAS 1168091-68-6.

#### INHIBIDORES DE ERK

Inhibidores de Erk utilizados para tratar cánceres y enfermedades hiperproliferativas. Los compuestos **Ia-Ic** inhiben la fosforilación de ERK1 y ERK2 y tienen una actividad antitumoral del agente individual en múltiples modelos de cánceres humanos. ERK es el único sustrato conocido de MEK1 y MEK2. La fosforilación de ERK da como resultado la translocación al núcleo en el que fosforila las dianas nucleares y regula diversos procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, y la progresión del ciclo celular (J. L. Yap y col., *Chem. Med. Chem.* **2011** 6:38).

Se han revisado los inhibidores de ERK (K. Burkhard y col., *Curr. Top. Med. Chem.* **2009** 9(8):678-689) Se han descrito también los inhibidores de ERK pirazol e indazol (D. Fairfax y col., documento WO2012094313; G.W. Shipps, Jr. y col., documento WO2012087772; G.W. Shipps, Jr. y col., documento WO2012036997 e Y. Deng y col., documento WO2012030685; A. M. Aronov y col., *J. Med. Chem.* **2009** 52:6362-68)



A pesar de los recientes avances en el perfilado de tumores humanos y del diseño de fármacos de molécula grande que condujeron al descubrimiento de agentes terapéuticos dirigidos que han cambiado la historia de las enfermedades para las cuales se desarrollaron inicialmente, la tasa de éxito global de los agentes dirigidos en oncología, sin embargo, sigue siendo bastante baja, lo que se puede explicar parcialmente por la heterogeneidad de muchos cánceres así como las rutas complejas en las que actúan las dianas, lo que implica múltiples rutas redundantes e interacciones entre muchas rutas moleculares.

Una manera de solucionar este problema es tratar los tumores con una combinación de agentes dirigidos, o combinaciones de agentes dirigidos y agentes quimioterapéuticos. Existen intentos de soluciones para dirigir múltiples rutas que independientemente y juntas impulsan la proliferación en muchos tumores,—y se activan usualmente en tumores mediante numerosos acontecimientos genómicos. Esta solución tiene un beneficio doble: tiene el potencial de aumentar el índice de respuesta inicial al tumor en tumores impulsados por múltiples acontecimientos oncogénicos, así como disminuir los índices de resistencia adquirida que se producirían con cualquier agente solo. Esto es debido a la inhibición de la activación de las rutas compensatorias, que podría prolongar a continuación la actividad de la combinación sobre la actividad observada para cualquier agente solo.

El tratamiento combinado de células mutantes *K-ras* no expuestas anteriormente al tratamiento con inhibidores de MEK y ERK inhibió el crecimiento externo de las células resistentes, mientras que el tratamiento inhibitor de ERK de las células con el inhibidor de MEK adquirido bloqueó eficazmente la resistencia a la proliferación (G Hatzivassiliou y col., *Mol. Cancer Ther.* **2012** 11:1143-1154). En el presente documento, los inventores han demostrado que la inhibición

simultánea de dos quinasas en la misma ruta dio como resultado la mejora de la inhibición de la célula.

La combinación de GDC-0994 y GDC-0973 dio como resultado la supresión sinérgica del crecimiento de las células A549 KRAS NSCLC (Figura 5). La combinación de MEKi y ERKi dio como resultado la atenuación del ciclo celular (niveles disminuidos en la ciclina D1 y aumentados en p27) y un aumento en la apoptosis (aumento del PARP escindido y ensayos nucELISA) (Figuras 2 y 3). La administración simultánea de los dos agentes dio como resultado resultados sinérgicos en la proliferación celular tal como se midió por la disminución en la síntesis de ADN (Figura 4). Se observó también un resultado inhibitor en xenoinjertos *in vivo* con H2122 NSCLC (que mostró también una disminución significativa en la proliferación celular y un aumento en la apoptosis (Figura 6c-6e) y células A549 NSCLC (Figuras 6a y 6b y 7a, 7b y 7c). Se demostró también la sinergia en el modelo GEMM con el adenocarcinoma ductal pancreático del mutante KRAS (Figura 10a y 10b) donde fueron evidentes los mismos marcadores farmacodinámicos (Figuras 11a y 11b).

Se observó la sinergia con todos los inhibidores de MEKi administrados simultáneamente con GDC-0994 (Figura 12) y con todos los de ERKi administrados simultáneamente con GDC-0973 (Figura 1)

Un aspecto de la invención proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesita utilizando un tratamiento combinado que comprende la administración de un inhibidor de MEK, y un inhibidor de ERK o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera.

En una realización, el inhibidor de MEK del tratamiento combinado es cualquiera de GDC-0973 o GDC-0623. GDC-0973 y GDC-0623 son inhibidores alostéricos de molécula pequeña potentes y muy selectivos de MEK 1/2, las quinasas que activan ERK 1/2. La inhibición de MEK 1/2 es una estrategia para controlar el crecimiento de tumores que son dependientes de la señalización anómala de la ruta de MEK/ERK. Los estudios preclínicos han demostrado que ambos inhibidores son eficaces en la inhibición del crecimiento de las células tumorales que soportan mutaciones activadoras de B-RAF que se asocian con muchos tipos de tumores, mostrando GDC-0973 más actividad en este modelo. Los estudios preclínicos han demostrado que ambos inhibidores son eficaces en la inhibición del crecimiento de las células tumorales que soportan mutaciones de Ras que se asocian con muchos tipos de tumores, mostrando GDC-0623 más actividad en este modelo. La administración del inhibidor de MEK se combina con un inhibidor de ERK. En una realización específica, el inhibidor de ERK se selecciona entre **la, lb, lc o ld**.

El tratamiento combinado podría servir también para evitar o retrasar la resistencia inherente o adquirida atribuible a la activación de la ruta RAS/RAF/MEK/ERK observada con la inhibición de MEK y para evitar o retrasar la resistencia inherente o adquirida mediada por la activación de la ruta RAS.

Se puede emplear la combinación junto con agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hiperproliferativo, incluyendo tumores, cánceres, y tejido neoplásico, junto con trastornos hiperproliferativos premalignos y no neoplásicos o no malignos.

En determinadas realizaciones, una combinación se combina en un régimen de dosificación como un tratamiento combinado, junto con otro compuesto que tiene propiedades antihiperproliferativas o que es útil para tratar el trastorno hiperproliferativo. El compuesto adicional del régimen de dosificación tiene preferentemente actividades complementarias a la combinación, y de tal manera que no se afectan adversamente entre sí. Dichos compuestos se pueden administrar en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

En una realización, la combinación terapéutica se administra mediante un régimen de dosificación donde la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de MEK (tal como GDC-0973 o GDC-0623), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en un intervalo desde una vez al día durante tres semanas o cada tres días (Q3D) durante tres semanas y la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula **Ia-Ic** una vez al día durante tres semanas.

El tratamiento combinado se puede administrar como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la administración simultánea, utilizando una formulación separada, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferentemente existe un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

En una realización de la invención, el trastorno hiperproliferativo es cáncer.

En otra realización de la invención, el cáncer expresa el KRAS mutante.

En otra realización de la presente invención el MEKi es GDC-0973 (**II**).

en otra realización de la presente invención el MEKi es GDC-0623 (**Ila**).

En otra realización de la presente invención el MEKi es GSK-1120212 (trametinib).

En otra realización de la presente invención el MEKi es AZD-6244 (selumetinib).

En otra realización de la presente invención el MEKi es BAY 86-9766 (refametinib).

En otra realización de la presente invención el ERKi es un compuesto de fórmula **la**.

En otra realización de la presente invención el ERKi es un compuesto de fórmula **lb**.

En otra realización de la presente invención el ERKi es un compuesto de fórmula **lc**.

En otra realización de la presente invención el ERKi es un compuesto de fórmula **ld**.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de un MEKi y un ERKi donde dicho cáncer o trastorno hiperproliferativo se selecciona entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes, leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón, trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de un MEKi y un ERKi donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de MEKi **II** y de ERKi **la** donde dicho cáncer o trastorno proliferativo se selecciona entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes, leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón, trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal,

sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de MEKi **II** y de ERKi **Ia** donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de MEKi **II** y de ERKi **Ia** donde dicho cáncer o trastorno proliferativo se selecciona entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes, leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón, trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de MEKi **Ila** y de ERKi **Ia** donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.

En otra realización se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de **II** o **Ila** y **Ia** que se administran concurrentemente.

En otra realización se proporciona un método para tratar el cáncer con una combinación de **II** o **Ila** y **Ia** que se administran secuencialmente.

En otra realización de la presente invención se proporciona una composición para el tratamiento del cáncer que contiene GDC-0973 (**II**) o GDC-0623 (**Ila**), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK seleccionado entre **Ia**, **Ib**, **Id**, o **Id** o un derivado farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del cáncer.

En otra realización de la presente invención se proporciona una composición para el tratamiento del cáncer que contiene GDC-0973 (**II**) o una de sus sales

farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK seleccionado entre **Ia**, **Ib**, **Id**, o **Id** o un derivado farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del cáncer.

En otra realización de la presente invención se proporciona una composición para el tratamiento del cáncer que contiene GDC-0973 (**II**) o GDC-0623 (**Ila**), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK seleccionado entre **Ia**, **Ib**, **Id**, o **Id** o un derivado farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del cáncer donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.

En otra realización de la presente invención se proporciona una composición para el tratamiento del cáncer que contiene GDC-0973 (**II**), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK seleccionado entre **Ia**, **Ib**, **Id**, o **Id** o un derivado farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del cáncer donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.

En otra realización de la presente invención se proporciona el uso de un MEKi de fórmula **II** y un inhibidor de ERK de fórmula **Ia** para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad hiperproliferativa.

En otra realización de la presente invención se proporciona el uso de un MEKi de fórmula **II** y un inhibidor de ERK de fórmula **Ia** para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En otra realización de la presente invención se proporciona un kit que comprende GDC-0973 o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, GDC-0994, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un envase, y un prospecto o marca que indica la administración de GDC-0973 o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y GDC-0994, para el tratamiento del cáncer.

En otra realización de la presente invención se proporciona un producto que comprende GDC-0973 o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y GDC-0994, o una sal farmacéuticamente aceptable, como una preparación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento del cáncer.

En otra realización de la presente invención se proporciona una combinación de GDC-0973 o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un

inhibidor de ERK para el tratamiento terapéutico del cáncer.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad hiperproliferativa donde GDC-0973, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y GDC-0994 se administran cada uno en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad hiperproliferativa donde GDC-0973, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra a una dosis de 60 mg, en los días 1-21 de un ciclo de 28 días, y GDC-0994, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.

En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad hiperproliferativa donde con una combinación de GDC-0973 y GDC-0994 en la que GDC-0973 se administra una vez o dos veces diarias durante tres semanas de un ciclo de cuatro semanas a una dosis entre 3 mg/kg y 7,5 mg/kg y GDC-0994 se administra una vez o dos veces al día durante tres semanas de un ciclo de cuatro semanas a una dosis entre 25 mg/kg y 75 mg/kg.

#### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen combinaciones tal como se describe en el presente documento.

El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables puede existir también en diferentes formas tautómeras, y todas las mencionadas formas están incluidas en el alcance de la invención. El término "tautómero" o "forma tautómera" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protón (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante migración de un protón, tal como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos de los electrones de enlace.

Las composiciones farmacéuticas abarcan la composición a granel y las unidades de dosificación individuales comprendidas por más de uno (por ejemplo, dos) agentes farmacéuticamente activos, junto con cualquier excipiente farmacéuticamente inactivo, diluyentes, portadores, o abrillantadores. La composición a granel y cada unidad de dosificación individual puede contener

cantidades fijas de los principios farmacéuticamente activos anteriormente mencionados. La composición a granel es material que no se ha conformado todavía en unidades de dosificación individuales. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares. Análogamente, se pretende que el método descrito en el presente documento para tratar un paciente administrando una composición farmacéutica de la presente invención abarque la administración de la composición a granel y las unidades de dosificación individuales.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos se formulan de acuerdo con la práctica farmacéutica habitual para uso en una combinación terapéutica para el tratamiento terapéutico de trastornos hiperproliferativos (tales como el cáncer, tales como el cáncer de mama triple negativo) que mamíferos que incluyen seres humanos (tales como varones o mujeres humanas). La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación tal como se describe en el presente documento en asociación con uno o más portadores, abrillantadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los portadores, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen materiales tales como hidratos de carbono, ceras, polímeros solubles y/o hinchables en agua, materiales hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El portador, diluyente o excipiente concreto utilizado dependerá de los medios y fines para los cuales el compuesto de la presente invención se está aplicando. Por lo general, los disolventes se seleccionan basándose en los disolventes reconocidos por las personas expertas en la materia como seguros (GRAS) para su administración a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tal como agua y otros disolventes no tóxicos que sean solubles o miscibles con agua. Los disolventes acuosos adecuados incluyen agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 300), etc. y sus mezclas. Las formulaciones también pueden incluir uno o más tampones, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes suspensores, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, abrillantadores, auxiliares de procesamiento, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes aromatizantes y otros aditivos conocidos para proporcionar al fármaco una presentación elegante (es decir, un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo) o ayudar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, el medicamento). La composición (o formulación) farmacéutica para la administración se puede

envasar de una variedad de maneras dependiendo del método utilizado para administrar el fármaco. En general, un artículo para la distribución incluye un envase que tiene depositado en su interior la anterior formulación farmacéutica en una forma adecuada. Los envases adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen materiales tales como botellas (plástico y vidrio), sobrecillos, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos, y similares. El envase puede incluir también un precinto para evitar el acceso indiscreto al contenido del paquete. Además, se ha depositado sobre el envase anterior una etiqueta que describe el contenido del envase. La etiqueta puede incluir también advertencias adecuadas.

Las formulaciones farmacéuticas se dosificarán y administrarán de una manera, por ejemplo, cantidades, concentraciones, calendarios, ciclos, vehículos y ruta de administración, consistente con una buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el calendario de administración, y el resto de factores conocidos de los profesionales sanitarios. La "cantidad terapéuticamente eficaz" que se va a administrar se regulará mediante dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para evitar, mejorar, o tratar el trastorno mediado por el factor de coagulación. dicha cantidad está preferentemente por debajo de la cantidad que es tóxica para el hospedador o que vuelve al hospedador significativamente más susceptible al sangrado.

Las composiciones de combinaciones adecuadas para la administración oral se pueden preparar como unidades discretas tales como píldoras, por ejemplo cápsulas de gelatina duras o blandas, sellos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, jarabes o elixires que contienen una cantidad predeterminada de GDC-0973 y GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y un inhibidor de ERK de fórmula **la-Id**. La cantidad de GDC-0973 o GDC-0623 e **la-Id**, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se puede formular en una píldora, cápsula, disolución o suspensión como una formulación combinada. Como alternativa, la combinación se puede formular por separado en una píldora, cápsula, disolución o suspensión para la administración alternada.

Se pueden preparar las formulaciones de acuerdo con cualquier método conocido en la materia para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes

conservantes, con el fin de proporcionar una preparación sabrosa. Se pueden preparar comprimidos comprimidos por compresión del principio activo en una forma de flujo libre tal como polvo o gránulos en una máquina adecuada, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o dispersante. Se pueden preparar comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden revestirse o marcarse opcionalmente y se formulan opcionalmente una liberación lenta o controlada del principio activo del anterior. Los excipientes del comprimido de una formulación farmacéutica pueden incluir: Una carga (o diluyente) para aumentare el volumen a granel del fármaco en polvo al preparar el comprimido; Desintegrantes para estimular la rotura del comprimido en fragmentos pequeños, idealmente partículas de fármacos individuales, cuando se ingieren y promover la disolución y absorción rápidas del fármaco; Aglutinante para asegurar que se puedan formar los gránulos y comprimidos con la resistencia mecánica requerida y mantener un comprimido junto después que se ha comprimido, evitando que este se disgregue en sus componentes pulverulentos durante el envasado, envío y manipulación rutinarios; agente deslizante para mejorar la capacidad de flujo del polvo al preparar el comprimido durante la producción; lubricante para asegurar que el polvo comprimido no se adhiere al equipo utilizado para presionar el comprimido durante la fabricación. Mejoran el flujo de las mezclas de polvo a través de las prensas y minimizan la fricción y la rotura a medida que los comprimidos acabados se eyectan del equipo; antiadherente con función similar a la del agente deslizante, que reduce la adhesión entre el polvo al preparar el comprimido y la máquina que se usa para troquelar la forma del comprimido durante la fabricación; aroma incorporado a los comprimidos para dotarles de un sabor más agradable o para enmascarar uno desagradable, y colorante para ayudar a la identificación y al cumplimiento terapéutico del paciente.

Los comprimidos que incluyen el principio activo en premezcla con el excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico que son adecuados para la fabricación de comprimidos son aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o de sodio, lactosa, fosfato de calcio o sodio; agentes de granulación y desintegrantes, tales como almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin revestir o pueden estar revestidos mediante técnicas conocidas que incluyen la microencapsulación para

retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar por tanto una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material con retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo o con una cera,

La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida, incluyendo una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite, o con una grasa y un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. Juntos, el(los) emulsionante(s) con o sin estabilizante(s) constituyen una cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa comprenden una base de pomada emulsionante que constituye la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema. Los emulsionante y estabilizantes de la emulsión adecuados para el uso en la formulación incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetoestearílico, alcohol bencílico, alcohol mirístico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.

Las suspensiones acuosas de las formulaciones farmacéuticas contienen el material activo en premezcla con los excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como fosfátidos que se producen naturalmente (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilnoxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol anhidro (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa puede contener también uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes endulzantes, tales como sacarosa o sacarina.

La(s) cantidad(es) de principio(s) activo(s) que se pueden combinar con el material portador para producir una forma de dosificación única variarán dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración concreto. Por ejemplo, la formulación de liberación temporal prevista para la administración oral a seres humanos puede contener aproximadamente 1 a 1000 mg de material activo compuesto con una cantidad adecuada y conveniente de material

portador que puede variar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 95 % de las composiciones totales (peso:peso) La composición farmacéutica se puede preparar para proporcionar cantidades fácilmente mensurables para administración. Por ejemplo, una disolución acuosa prevista para la infusión intravenosa puede contener entre aproximadamente 3 a 500 µg del principio activo por mililitro de disolución a fin de que se pueda producir la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.

#### ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene una combinación útil para el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente. En una realización, el kit comprende un envase y una combinación descrita en el presente documento.

El kit puede comprender además una etiqueta o prospecto, en o asociado con el recipiente. El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos. Los envases adecuados incluyen por ejemplo, frascos, viales, jeringas, paquetes blíster, etc. El envase puede estar formado a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase puede mantener una combinación, o una formulación de liberación de la misma, que es eficaz para tratar la dolencia y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un detenedor perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección, tal como el cáncer. En una realización, las etiquetas o los prospectos indican que la composición que comprende la combinación se puede usar para tratar un trastorno resultante de un crecimiento celular anómalo. La etiqueta o el prospecto pueden indicar también que la composición se puede usar para tratar otros trastornos. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWFI), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

El kit puede comprender además instrucciones para administrar la combinación, y, si está presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit

comprende una primera composición que comprende GDC-0973 o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y una segunda formulación farmacéutica que comprende un inhibidor de ERK. o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el kit puede comprender además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente que lo necesita.

En otra realización, los kits son adecuados para la administración de formas orales sólidas de una combinación, tales como comprimidos o cápsulas, Dicho kit incluye preferentemente numerosas dosificaciones unitarias. Dichos kits pueden incluir una ficha que tiene las dosificaciones orientadas en el orden de su uso previsto. Un ejemplo de dicho kit es un "envase de tipo blíster". Los envases de tipo blíster son bien conocidos en la industria del envasado y se usan ampliamente para el envasado de formas farmacéuticas unitarias. Si se desea, se puede proporcionar un recordatorio, por ejemplo, en la forma de números, letras, u otras marcas o con un calendario inserto, que designa los días en el calendario de tratamiento en los que se han de administrar las dosis.

De acuerdo con una realización, un kit puede comprender (a) un primer envase con GDC-0973 o GDC-0623, (b) un segundo recipiente con un inhibidor de ERK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables contenido en el anterior, y (c) un tercer recipiente con una tercera formulación farmacéutica contenida en el anterior, donde la tercera formulación farmacéutica comprende otro compuesto con actividad antihiperproliferativa Como alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWI), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

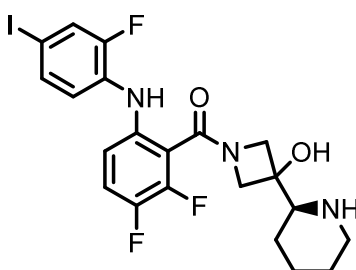
En el que el kit comprende una primera composición GDC-0973 o GDC-0623, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o una sal farmacéuticamente aceptable del kit puede comprender un recipiente para contener las composiciones separadas tales como una botella dividida o un envase de hojas dividido, sin embargo, las composiciones separadas pueden estar contenidas en un único, recipiente sin dividir. Típicamente, El kit comprende instrucciones para administrar los componentes separados. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando se administran preferentemente los componentes separados en formas farmacéuticas diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se

administran en diferentes intervalos de dosificación, o cuando se desea la valoración de los componentes individuales de la combinación por el médico a cargo del tratamiento.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. las sales ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato" etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, y pamoato (es decir, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga del compuesto progenitor. Adicionalmente, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. De este modo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/ uno o más contraiones.

#### Ejemplo de referencia 1

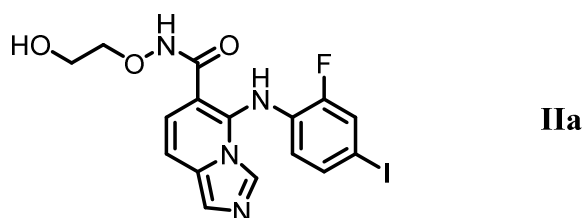
(S)-(3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)fenil)(3-hidroxi-3-(piperidin-2-il)azetidin-1-il)metanona (GDC-0973)



El compuesto del título se puede preparar tal como se describe por K. D. Rice, y *col.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012** 3:416-421 en El Ejemplo 22 del documento WO2007044515 o, como alternativa, como se describe por K. D. Rice y *col.*, Novel Carboxamide-Based Allosteric MEK inhibitors: Discovery and Optimization Efforts toward XL518 (GDC-0973), *Med. Chem. Lett.* **2012** 3:416.

#### Ejemplo de referencia 2

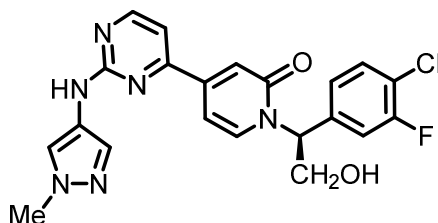
5-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-N-(2-hidroxiethoxi)-imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida



El compuesto del título se puede preparar tal como se describe en el Ejemplo 5 del documento WO2009085983.

### Ejemplo de referencia 3

(S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxiethyl)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-4-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona



#### 4-(2-(metiltio)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona

etapa 1: Una suspensión de 4-bromo-2-(metiltio)pirimidina (7,00 g, 34,1 mmol), ácido 2-fluoropiridin-4-ilborónico (5,05 g, 35,8 mmol),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10,9 g, 102 mmol) y  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,40 g, 1,71 mmol) en dioxano/ $\text{H}_2\text{O}$  (100 ml; 1:1) se calentó a 85 °C con globo de Ar durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a TA y se concentró. Se diluyó el residuo con acetato de etilo (200 ml) y agua (100 ml). Se separaron las capas, y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (1X). Se secaron los extractos orgánicos, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto bruto *mediante* cromatografía en columna, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (3:1) para dar la 4-(2-fluoropiridin-4-il)-2-(metiltio)pirimidina (6,83 g, 90 %) en forma de un sólido. RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8,85 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,46 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,11 (m, 1H), 7,96 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,92 (s, 1H), 2,62 (s, 3H);  $m/z$  (APCI-pos)  $M+1 = 222,1$ .

etapa 2: Una suspensión de 4-(2-fluoropiridin-4-il)-2-(metiltio)pirimidina (6,83 g, 30,9 mmol) en HCl 2N (100 ml) se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se colocó en un baño de hielo. Se ajustó el pH a aproximadamente 7 con NaOH 2N (aproximadamente 100 ml). Los sólidos resultantes se recogieron mediante filtración, se lavaron con agua y se secaron para dar 4-(2-(metiltio)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona (5,07 g) como un sólido. Este material se colocó en el cartucho de un aparato Soxhlet y se unió a un matraz de 1 l lleno de acetato de etilo (500 ml). El material se extrajo de manera continua durante 3 días. El precipitado blanco resultante procedente de la capa de acetato de etilo se recogió mediante filtración (3,3 gramos, rendimiento del 49 %). RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  11,85 (br, s, 1H), 8,75 (d,

$J = 5,0$  Hz, 1H), 7,79 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,54 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,86 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 2,58 (s, 3H);  $m/z$  (APCI-pos)  $M+1 = 220,0$ .

metanosulfonato de (R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etilo

etapa 1: hidruro de sodio (8,549 g, 213,7 mmol, suspensión al 60 % en aceite mineral) se añadió por partes a una disolución fría (0 °C) de 4-cloro-3-fluorobenzaldehído (26,07 g, 164,4 mmol) y bromuro de metiltrifenilfosfonio (70,48 g, 197,3 mmol) en THF (400 ml). La mezcla de reacción se dejó a TA durante la noche. Los sólidos se eliminaron mediante filtración, y la torta del filtro se lavó con éter. Se concentró el filtrado (baño de agua a aproximadamente 20 °C), y el residuo se suspendió en hexanos y se agitó durante 30 minutos. Los sólidos (en su mayor parte  $PPh_3O$ ) se retiraron mediante filtración, y la torta del filtro se lavó con hexanos. El filtrado se concentró, y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (25:1) para dar 1-cloro-2-fluoro-4-vinilbenceno (12,1 g, 47 %) como un aceite. RMN  $^1H$ (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,33 (m, 1H), 7,18 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 6,63 (m, 1H), 5,74 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1H), 5,32 (d,  $J = 10,8$  Hz, 1H).

etapa 2: 1-Cloro-2-fluoro-4-vinilbenceno (12,1 g, 77,3 mmol) se añadió a una disolución fría (0 °C) de AD-mezcla-  $\beta$  (108 g, 139 mmol) en *t*-BuOH/ $H_2O$  (600 ml; 1(1), y la mezcla se dejó calentar a TA durante la noche. Al día siguiente, la reacción se colocó en un baño de hielo y se inactivó rápidamente con  $Na_2SO_3$  sólido (114 g). La mezcla se agitó durante 1 h y a continuación se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron, se filtraron y se concentraron para dar (R)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etano-1,2-diol como un aceite. El producto se usó para la siguiente etapa sin purificación.

etapa 3: Se añadió imidazol (13,1 g, 193 mmol) a una disolución fría (0 °C) de (R)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etano-1,2-diol (14,7 g, 77,1 mmol) en DCM (100 ml), seguido por TBSCl (12,8 g, 84,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora y a continuación se inactivó rápidamente con agua (50 ml). Se separaron las capas, y se secaron los extractos orgánicos, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto bruto *mediante* cromatografía en columna, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (100:1) para dar (R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etanol (11,0 g, 47 % en dos etapas). RMN  $^1H$ (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,36 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,08 (m, 1H), 4,71 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 2,96 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H), 0,90 (s, 9H), 0,07 (s, 3H), 0,06 (s, 3H).

etapa 4: Se añadió trietilamina (2,09 ml, 15,0 mmol) a una disolución fría (0 °C) de (R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etanol (3,05 g, 10,0 mmol) en DCM (100 ml), seguido por cloruro de metanosulfonilo (0,929 ml, 12,0

mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 minutos y a continuación se inactivó rápidamente con agua (50 ml). Se separaron las capas, y se lavó la capa orgánica con NaHCO<sub>3</sub> saturado, se secó, se filtró y se concentró para dar el producto bruto. Se purificó el producto bruto *mediante* cromatografía en columna, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (25:1) para dar metanosulfonato de (R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etilo (3,80 g, 99 %) como un aceite. RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,12 (m, 1H), 5,50 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 2,98 (s, 3H), 0,88 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), 0,04 (s, 3H).

(S)-1-(2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etil)-4-(2-(metilsulfonil)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona

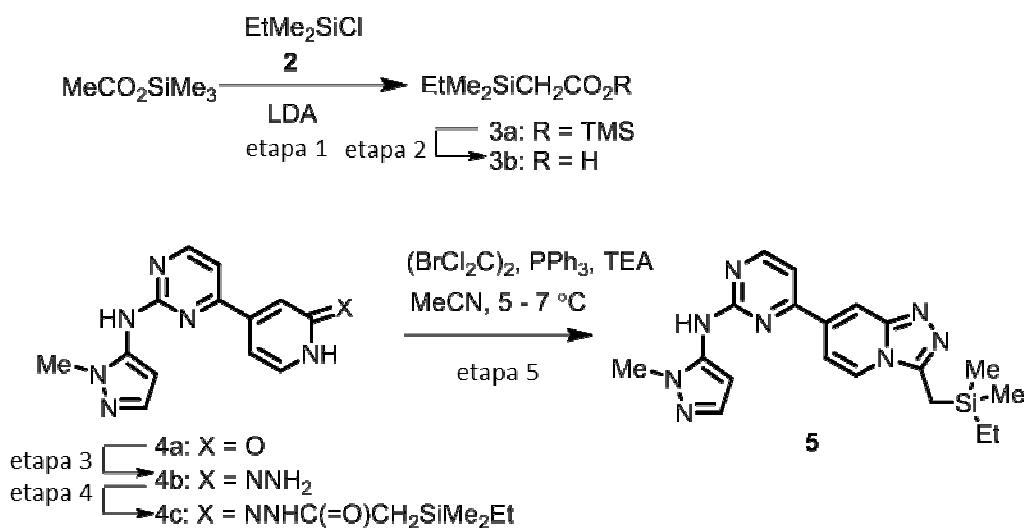
etapa 1: KHMDs 1,0 M (5,09 ml, 5,09 mmol) como disolución en THF se añadió a una suspensión (0 °C) de 4-(2-(metiltio)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona (0,93 g, 4,24 mmol) en THF (400 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 minutos antes de añadir metanosulfonato de (R)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etil (2,44 g, 6,36 mmol) como una disolución en THF (5 ml). La reacción se calentó a reflujo durante 30 h y a continuación se enfrió a TA y se concentró. El residuo se capturó en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua. Se secaron los extractos orgánicos, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto bruto *mediante* cromatografía en columna, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (4:1) para dar (S)-1-(2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etil)-4-(2-(metiltio)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona (1,35 g, 63 %) en forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,66 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,43 (m, 2H), 7,34 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,32-7,28 (m, 2H), 7,16 (m, 1H), 6,85 (m, 1H), 6,24 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 2,65 (s, 3H), 0,88 (s, 9H), 0,03 (s, 3H), -0,03 (s, 3H); *m/z* (APCI-pos) M+1 = 506,1. 508,1.

etapa 2: *m*CPBA (7,1 g, 29 mmol) se añadió a una disolución fría (0 °C) de (S)-1-(2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etil)-4-(2-(metiltio)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona (5,8 g, 11 mmol) en DCM (100 ml), y la mezcla se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se lavó con una disolución saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1X), NaHCO<sub>3</sub> (1X), se secó, se filtró, y se evaporó. Se purificó el producto bruto *mediante* cromatografía en columna, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (1:1) para dar (S)-1-(2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-(4-cloro-3-fluorofenil)etil)-4-(2-(metilsulfonil)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona (5,5 g, 89 %) en forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,06 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,43 (m, 1H), 7,32 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,27 (m, 1H), 7,15 (m, 1H), 6,93 (m, 1H), 6,22 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,45 (s, 3H), 0,88 (s, 9H), 0,03 (s, 3H), -0,03 (s, 3H); *m/z* (APCI-

pos) M+1 = 538,1. 540,0.

#### Ejemplo de referencia 4

Ácido 4-[3-[[etil(dimetil)silil]metil]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il]-N-(2-metilpirazol-3-il)pirimidin-2-amina 2-(etildimetilsilil)acético (4)



A una disolución de THF (40 ml) y LDA (8,8 ml, 17.5 mmol) enfriada a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . se añadió lentamente acetato de trimetilsililo (2,0 g, 15,1 mmol). La mezcla se agitó a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h. Se añadió cloro(etil)dimetilsilano (2,1 g, 17,5 mmol) se añadió y la disolución resultante se agitó durante 2 h. La mezcla se inactivó rápidamente con salmuera (10 ml) y a continuación HCl (10 ml, 1N) se añadió lentamente y la disolución resultante se extrajo con MTBE (3 x 20 ml). Los extractos combinados se secaron, se concentraron y el residuo cromatografía de  $\text{SiO}_2$  eluyendo con EtOAc/hexano (1:10) para dar como resultado 1,0 g (45 %) de ácido 2-(etildimetilsilil)acético como un aceite incoloro. RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) = 1,80 (s, 1 H), 0,84 (t,  $J = 8,0\text{ Hz}$ , 3H), 0,50 (c,  $J = 8,0\text{ Hz}$ , 2H), 0,00 (s, 6H).

#### (Z)-2-(etildimetilsilil)-N'-(4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ilideno)acetohidrazida (7)

A 2-cloro-1-metilpiridin-1-ilo (1,36 g, 5,3 mmol) en DCM (10 ml) se añadió (Z)-4-(2-hidrazono-1,2-dihidropiridin-4-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (1,3 g, 4.6 mmol) y se añadieron ácido 2-(etildimetilsilil)acético (0,67 g, 4.6 mmol) seguido por tributilamina (1,96 g, 10,6 mmol). la mezcla se agitó a  $60\text{--}80\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h. La mezcla se concentró, se purificó en una columna de  $\text{SiO}_2$  eluyendo con EtOAc y a continuación DCM/MeOH (10:1) para dar como resultado (Z)-2-(etildimetilsilil)-N'-(4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ilideno)acetohidrazida (1,1 g, 44 %) en forma de un sólido de color amarillo.

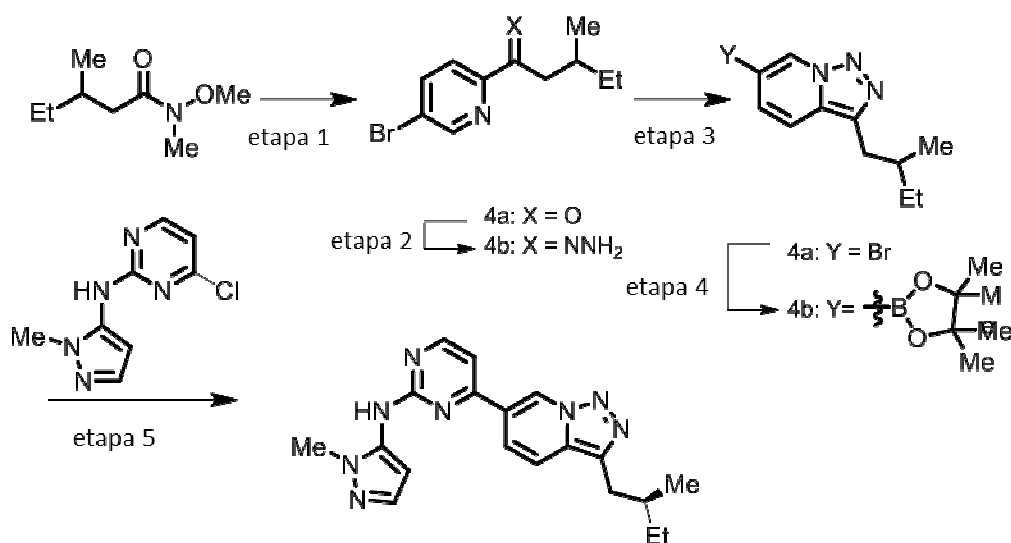
#### 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (GNT\_D379\_285-1)

Un matraz se cargó con (Z)-2-(etildimetilsilil)-N'-(4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ilideno)acetohidrazida (7) (500 mg, 1,22 mmol) y 1,2-dibromotetracloroetano (793 mg, 2,44 mmol) a continuación se añadió CH<sub>3</sub>CN (20 ml), seguido por una adición por partes de PPh<sub>3</sub> (798 mg, 3,0 mmol). La mezcla se agitó a 5-7 °C durante 1 h y a continuación se añadió TEA (1,0 ml) y la mezcla resultante se agitó a 5-7 °C durante 2 h. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró, se purificó mediante cromatografía de SiO<sub>2</sub> eluyendo con EtOAc y a continuación MeOH/DCM (1:20) para dar como resultado el producto bruto (200 mg) que se lavó con EtOAc y MeOH (tres veces) para dar como resultado la 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (GNT\_D379\_285-1) (73 mg, 15 %) en forma de un sólido de color blanco.

RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 9,58 (s, 1H), 8,60 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,56 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,68 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 6,31 (s, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,60 (s, 2H), 0,88 (t, *J* = 8,0 Hz, 3H), 0,58 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 0,05 (s, 6H); MS [M+H]<sup>+</sup> = 392,19.

#### Ejemplo de referencia 4

4-[3-(2-metilbutil)triazolo[1,5-a]piridin-6-il]-N-(2-metilpirazol-3-il)pirimidin-2-amina



#### 1-(5-bromopiridin-2-il)-3-metilpentan-1-ona:

Una disolución de 2,5-dibromopiridina (3,72 g, 15,8 mmol) en tolueno (30 ml) se enfrió a -40 °C, y *n*-BuLi (6,32 ml, 15,8 mmol) se añadió gota a gota. La mezcla se agitó a -40 °C durante 1 h y a continuación se añadió gota a gota una disolución de *N*-metoxi-*N*, 3-dimetilpentanamida (2,1 g, 13,2 mmol, CASRN 1051483-44-3) y tolueno (5 ml) añadido gota a gota. La mezcla se agitó durante 2 h más, a continuación se inactivó con una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl (aq) y se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). Se secó la fase orgánica, se concentró y se purificó en una columna de SiO<sub>2</sub> eluyendo con EtOAc/hexano (1:10) para dar como resultado el compuesto del título (2 g, 59 %) en forma de un aceite de

color amarillo.

RMN  $^1\text{H}$ (400MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 8,75 (d,  $J$  = 2,0 Hz, 1H), 8,13 (dd,  $J$  = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 7,92 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 3,17-3,12 (m, 1H), 2,98-2,92 (m, 1H), 2,02-2,00 (m, 1H), 1,41-1,21 (m, 2H), 0,93-0,89 (m, 6H).

(Z)-5-bromo-2-(1-hidrazono-3-metilpentil)piridina

1-(5-bromopiridin-2-il)-3-metilpentan-1-ona (2,0 g, 6,2 mmol) se disolvieron en MeOH (50 ml) y se añadió  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  (5 ml). La mezcla se agitó a reflujo durante 4 h. Se añadieron NaOH 2N (5 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml) y se extrajo la mezcla resultante con EtOAc (3 x 50 ml). Se secó la fase orgánica ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtró y se concentró. Se utilizó el residuo directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 269,7$ .

6-bromo-3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina

A una disolución de (Z)-5-bromo-2-(1-hidrazono-3-metilpentil)piridina bruto (1,9 g, 7,1 mmol) en  $\text{CHCl}_3$  (30 ml) se añadió  $\text{MnO}_2$  activo (3 g, 35,3 mmol). Se calentó la mezcla a reflujo y se agitó durante 16 h. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró y purificó mediante cromatografía de  $\text{SiO}_2$  para dar como resultado 1,6 g del compuesto del título: MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 267,7$ .

3-(2-metilbutil)-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina:

Una disolución de 6-bromo-3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina (0,8 g, 3 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (838 mg, 3,3 mmol), KOAc (294 mg, 9 mmol) y  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (329 mg, 0,45 mmol) en dioxano (30 ml) se calentó a 100 °C con agitación con  $\text{N}_2$  durante 3 h. A continuación el producto bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional: MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 233,7$ .

N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina (GNT D379 260):

Al producto bruto del éster borónico se añadió 4-cloro-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (755 mg, 3,6 mmol),  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (329 mg, 0,45 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2,9 g, 9 mmol) y agua  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml). La mezcla se agitó a 100 °C durante 4 h. La mezcla se filtró. El filtrado se concentró y purificó en una columna de  $\text{SiO}_2$  mediante una columna en gel de sílice y seguido por Pre-HPLC para dar como resultado el compuesto del título (250 mg). RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 9,58 (s, 1H), 8,54 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 8,00-7,90 (m, 2H), 7,50-7,47 (m, 2H), 6,36 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,03-2,99 (m, 1H), 2,87-2,81 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,46-1,42 (m, 1H), 1,28-1,24 (m, 1H), 0,98-0,91 (m, 6H); MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 362,9$ .

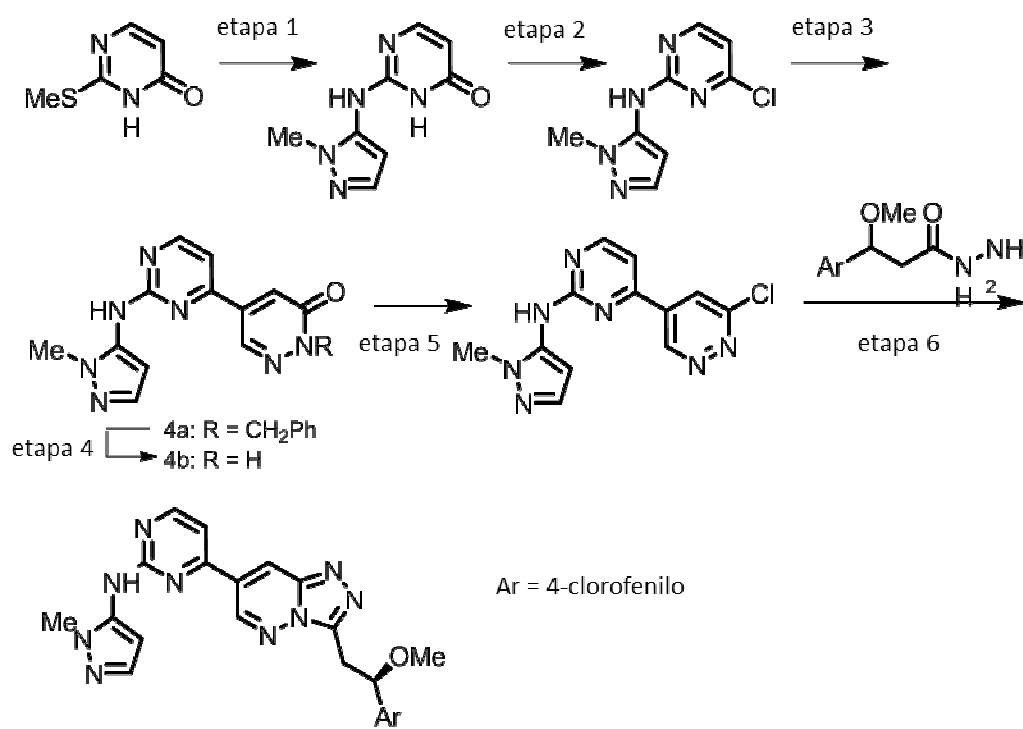
Se obtuvo el enantiómero (S) mediante cromatografía SFC en un soporte quiral.

RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 9,58 (s, 1H), 8,53 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 8,00-7,90

(m, 2H), 7,50-7,46 (m, 2H), 6,36 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,05-2,99 (m, 1H), 2,87-2,81 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,46-1,27 (m, 1H), 1,26-1,24 (m, 1H), 0,98-0,91 (m, 6H).

### Ejemplo de referencia 5

4-[3-[2-(4-clorofenil)-2-metoxi-etil]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il]-N-(2-metilpirazol-3-il)pirimidin-2-amina



#### etapa 1: 2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4(3H)-ona (6)

una mezcla de 2-(metiltio)pirimidin-4(3H)-ona (10 g, 70 mmol, CASRN 5751-20-2) y 1-metil-1H-pirazol-5-amina (10 g, 103 mmol) en Me<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H (50 g) se calentó a 160 °C durante 48 h. La mezcla se dejó enfriar a 40-50 °C y se añadió DCM (30 ml). Tras agitar durante 10 min, la disolución se diluyó con n-hexano (200 ml) que formó una suspensión roja. La mezcla se dejó reposar durante 0,5 h tras lo cual se decantó la fase orgánica transparente de la parte superior. La suspensión roja se disolvió en DCM (50 ml) y se concentró a presión reducida para dar el producto bruto 2 (16,5 g) que se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación.

#### etapa 2: 4-cloro-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (7)

A una disolución de 2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4(3H)-ona (16,5 g, bruto) en MeCN (200 ml) se añadió POCl<sub>3</sub> (30 ml, 0,33 mol). La mezcla se calentó a reflujo durante 15 min, La mezcla se inactivo rápidamente mediante agua con hielo (100 g), y se ajustó el pH a 10 mediante polvo de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x100 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró a presión reducida para dar el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de SiO<sub>2</sub> eluyendo con éter de petróleo/EtOAc

(1:1) para dar como resultado 7,5 g (51 % en 2 etapas) del compuesto del título. RMN<sup>1</sup>H (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 8,30 (d, *J* = 5,2, 1H), 7,42 (d, *J* = 1,6, 1H), 6,90 (d, *J* = 5,2, 1H), 6,28 (d, *J* = 1,6, 1H), 3,72 (s, 3H)

Etapas 3: 2-bencil-5-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridazin-3(2H)-ona (9).

A una disolución de 4-cloro-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (25,0 g, 119 mmol) en dioxano (300 ml) se añadió Me<sub>3</sub>SnSnMe<sub>3</sub> (46,9 g, 143,11 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (13,8 g, 11,93 mmol), la mezcla se calentó a 125 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 h. A la anterior disolución se añadió 2-bencil-5-yodopiridazin-3(2H)-ona **3** (44,7 g, 143,1 mmol, CASRN 825633-93-0), LiCl (10,1 g, 238,5 mmol), CuI (11,4 g, 59,6 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (13,8 g, 11,93 mmol). La mezcla se calentó a 125 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 16 h. La mezcla se enfrió a TA y se filtró a través de Celite<sup>®</sup>. La torta del filtro se lavó con DCM (3 x 200 ml). Se concentraron los extractos combinados con las disoluciones de DCM, se purificaron mediante cromatografía de SiO<sub>2</sub> eluyendo con un gradiente de MeOH/DCM (1-5 % MeOH) para dar el compuesto **d** (34 g, 84 %) en forma de un sólido de color amarillo.

Etapas 4: 5-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridazin-3(2H)-ona (10).

A una disolución de tolueno anhidro (500 ml) y 2-bencil-5-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridazin-3(2H)-ona (34 g, 94,6 mmol) se añadió AlCl<sub>3</sub> (63 g, 473 mmol). La mezcla se calentó a 120 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 1 h. la mezcla se enfrió a TA y se decantó la capa transparente superior. El sólido restante se añadió a agua con hielo (200 g), y se agitó a TA hasta que el sólido inicial se descompuso y apareció un sólido amarillo. El sólido se filtró y se lavó con agua con hielo (3 x 100 ml) Tras secar se obtuvieron ca. de 35 g de producto sólido amarillo bruto.

etapas 5: 4-(6-cloropiridazin-4-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina.

A POCl<sub>3</sub> agitado (200 ml) se añadió 5-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridazin-3(2H)-ona (**10**) (35 g de producto bruto, 0,13 mol) a TA. La mezcla se calentó a 80 °C durante 2 h. La mezcla se concentró hasta sequedad, se disolvió con CHCl<sub>3</sub> (200 ml) y a continuación se vertió en agua con hielo (500 g) con agitación. La mezcla resultante se ajustó a pH ca. 8. La mezcla se extrajo con DMC (5 x 300 ml), La capa orgánica combinada se concentró y purificó mediante cromatografía de SiO<sub>2</sub> eluyendo con un gradiente de éter de petróleo/EtOAc (1 a 50 % de EtOAc) para dar como resultado 13g (47 % en 2 etapas) del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo. RMN<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 9,80 (s, 1H), 9,74 (s, 1H), 8,70 (d, *J* = 4,8, 1H), 8,44 (s,

1H), 7,72 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 7,38 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 3,68 (s, 3H).

etapa 6: 4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina.

A la disolución agitada de 4-(6-cloropiridazin-4-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina (200 mg, 0.758 mmol) en IPA (3 ml) se añadió 3-(4-clorofenil)-3-metoxipropanohidrazida (200 mg, 0,834 mmol), y ácido metanosulfónico (1,2 mg, 1,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 3 h. el disolvente se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC preparativa HPLC (FA) para dar como resultado 40 mg (7 %) del producto deseado. RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ : 9,24 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,63 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 7,63 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 7,51 (d,  $J = 2,0$ , 1H), 7,36 (s, 4H), 6,39 (s, 1H), 4,63 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,81-3,74 (m, 1H), 3,59-3,54 (m, 1H), 3,20 (s, 3H); MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 461,9$ .

El enantiómero de la (R)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina se resolvió mediante SFC para dar como resultado el producto deseado (13,8 mg). RMN  $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,70 (s, 1H), 9,19 (s, 1H), 9,00 (d,  $J = 2$ , 1H), 8,67 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 7,23 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 7,42-7,35 (m, 4H), 6,33 (s, 1H), 4,93-4,89 (m, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,72-3,64 (m, 1H), 3,50-3,44 (m, 1H), 3,10 (s, 3H); MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 461,9$ .

### Ejemplo biológico 1

Ensayos de cultivo y viabilidad celular.

Para CellTiterGlo (Promega): Células A549 se sembraron en placas en medio de crecimiento normal (Roswell Park Memorial Institute, medio 1640 (RPMI 1640) con suero de feto bovino al 10 %, 2 mM/l de glutamina y 100 unidades/ml de penicilina y estreptomicina) a 1500 células por pocillo en una placa de fondo negro transparente de 384 pocillos. Al día siguiente los compuestos se diluyeron en serie 1:2 comenzando a las concentraciones indicadas, a continuación se añadieron a las células por cuadruplicado. 96 horas después de la adición del compuesto, se añadió el reactivo CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability según el protocolo del fabricante.

Para BrdU ELISA (Roche): Células A549 se sembraron en placas en medio de crecimiento normal a 3000 células por pocillo en una placa de fondo negro transparente de 96 pocillos. Al día siguiente se añadieron los compuestos por triplicado a las concentraciones indicadas basándose en los resultados de CTG. 48 y 72 horas después de la adición del compuesto, se llevó a cabo el ensayo ELISA Quimioluminiscente de Proliferación de Células BrdU de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para el Cell Death nucELISA (Roche): Células A549 se sembraron en placas en

medio de crecimiento normal a 3000 células por pocillo en una placa de fondo negro transparente de 96 pocillos. Al día siguiente se añadieron los compuestos por triplicado a las concentraciones indicadas basándose en los resultados de CTG. 48 y 72 horas después de la adición del compuesto, Se llevó a cabo el Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> de acuerdo con el protocolo del fabricante.

## Ejemplo biológico 2

### Modelos de xenoinjertos tumorales

Células NCI-H520.X1 y EBC1 cultivadas se retiraron del cultivo, se suspendieron en disolución salina tamponada de Hank (HBSS), se mezclaron 1:1 con Matrigel (BD Biosciences, EE.UU.), y se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NCR lampiños hembra que no se habían tratado anteriormente (Taconic Farms, Hudson, NY). Los ratones con tumores de un volumen medio de aproximadamente 250 mm<sup>3</sup> se agruparon en cohortes de tratamiento de 10 ratones cada una. Los ratones recibieron 5 % de sacarosa sola o 5 % de sacarosa más 1 mg/ml de doxíciclina (Clontech, Mountain View, CA) para las cohortes de control y de inactivación, respectivamente. Todas las botellas de agua se cambiaron 3 veces por semana. Se tomaron medidas de los pesos corporales y de los volúmenes tumorales (tal como las obtenidas mediante las medidas de longitud y anchura con calibres) dos veces por semana durante el estudio. Todos los procedimientos experimentales estuvieron conformes con los principios directrices de la American Physiology Society y fueron homologados por el Comité Institucional para el Cuidado y Utilización de Animales de Genentech. Se calcularon los volúmenes tumorales mediante la siguiente fórmula: Volumen del Tumor =  $0.5 * (a * b^2)$ , donde 'a' es el diámetro del tumor más grande y 'b' es el diámetro perpendicular del tumor. Se presentan los resultados de los volúmenes tumorales como volúmenes tumorales medios  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (% de INH) al término del estudio (EOS) como % de INH =  $100 [(EOS \text{ del vehículo}) / (-EOS \text{ del Tratamiento}) / (EOS \text{ del Vehículo})]$ . Se llevó a cabo el análisis y la generación de datos de los valores p utilizando el test de Dunnett usando el software JMP (SAS Institute, Cary, NC).

**Ia** se preparó como una disolución a diversas concentraciones (expresadas como equivalentes de bases libres) en PEG400 al 40 % (polietilenglicol 400)/60 % [HP al 10 % - $\beta$ -CD (hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina)]. El vehículo del control fue 40 % PEG400/60 % (10 % HP- $\beta$ -CD) o MCT. **II** se preparó como una suspensión a diversas concentraciones en metil celulosa tween (MCT). **Ia**, **II**, y se prepararon disoluciones de dosificación del vehículo del control una vez por semana durante tres semanas. Las formulaciones se mezclaron bien

sometiéndolas a vortización antes de la dosificación. Los artículos de ensayo se almacenaron en un refrigerador configurado para mantener un intervalo de temperatura de 4°C–7°C.

### Ejemplo biológico 3

#### Modelo de ratón genéticamente modificado

Los inventores obtuvieron ratones de las siguientes instituciones: Se obtuvieron ratones Kras<sup>LSL-G12D</sup> de Tyler Jacks (Massachusetts Institute of Technology), se obtuvieron ratones p16/p19<sup>fl/fl</sup> de Anton Berns (NKI, Países Bajos. se obtuvieron ratones p53<sup>frt/frt</sup> de Exelixis, Inc. y se obtuvieron ratones Pdx1-Cre de Andy Lowy (University of Ohio). se utilizaron el mismo número de animales machos y hembras para las cohortes experimentales, la dosificación comenzó tras la confirmación de la carga tumoral mediante diagnóstico por imágenes de ultrasonido de PDAC o microCT para el modelo de NSCLC. Los animales se dosificaron y vigilaron de acuerdo con las directrices del Comité Institucional para el Cuidado y la utilización de Animales (IACUC) en Genentech, Inc. Todos los regímenes de dosificación seleccionados fueron bien tolerados en los GEMM. Se llevó a cabo el diagnóstico y la evaluación de imágenes no invasivas de la supervivencia global tal como se ha descrito anteriormente en {Singh:2010hv} En los modelos GEM, cobimetinib e **la** se dosificaron a 5 mg/kg y 60mg/kg mediante sonda nasogástrica oral (PO), diariamente (QD),

Los análisis estadísticos de los datos muestran como las estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier y los conjuntos de datos del diagnóstico por imágenes se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente (M. Singh y *col.*, *Nature Biotechnol.*, **2010**, 28(6):585-593). Se recogieron muestras tumorales del modelo GEM y se almacenaron en RNALater (Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo el ARN total con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad de ARN utilizando Naondrop (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Las características descritas en la anterior descripción, o en las reivindicaciones siguientes, expresadas en sus formas o en los términos específicos de unos medios para llevar a cabo la reacción descrita, o un método o procedimiento para conseguir el resultado descrito, según sea apropiado, pueden, independientemente, o en cualquier combinación de dichas características, utilizarse para realizar la invención en sus formas diversas.

La invención anterior se ha descrito en cierto detalle por medio de ilustración y ejemplo, a fines de claridad y comprensión. Será evidente para un experto en la materia que se pueden realizar cambios y modificaciones comprendidos en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, se debe entender está

previsto que la anterior descripción sea ilustrativa y no restrictiva. El alcance de la invención debe, por lo tanto, determinarse no con referencia a la anterior descripción, sino que debe determinarse en su lugar en referencia a las siguientes reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes para los cuales se han solicitado dichas reivindicaciones.

Las patentes, solicitudes publicadas, y bibliografía científica referida al presente documento establecen el conocimiento de las personas expertas en la materia y se incorporan por tanto por referencia en su totalidad en la misma extensión que si se indicaran específica e individualmente para incorporarse por referencia. cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en el presente documento y las enseñanzas específicas de esta memoria descriptiva deberán resolverse en favor de la última. Del mismo modo, cualquier conflicto en una definición comprendida en la materia de una palabra o frase y una definición de la palabra o frase que se cita específicamente en esta memoria descriptiva deberá resolverse en favor de la última.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéutica eficaz de una combinación de un inhibidor de MEK, o una sal farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de ERK, o una sal farmacéuticamente aceptable, tanto como una formulación combinada o como mediante una forma alternada.
2. El método de la reivindicación 1 en el que el trastorno hiperproliferativo es cáncer y el mamífero es un ser humano.
3. El método de la reivindicación 2 en el que el cáncer está asociado con una mutación de KRAS.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en el que el inhibidor de MEK es cobimetinib.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en el que el inhibidor de MEK es GDC-0623.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en el que el inhibidor de MEK es GSK-1120212 (trametinib).
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en el que el inhibidor de MEK es AZD-6244 (selumetinib).
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en el que el inhibidor de MEK es BAY 86-9766 (refametinib).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 en el que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona, 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina, (S)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina o (S)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-9 en el que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
11. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cáncer o trastorno hiperproliferativo se selecciona entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes,

leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón, trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en el que dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas o melanoma.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que cobimetinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en combinación con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en combinación con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra simultáneamente con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, se administra secuencialmente con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 10 en el que cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-

carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra con un inhibidor de ERK seleccionado entre 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina, (S)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina o (S)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina para el tratamiento del cáncer.

19. El uso de una combinación de cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un mamífero.
20. Un kit que comprende cobimetinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un envase, y un prospecto o etiqueta indicando el prospecto la administración de cobimetinib y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona para el tratamiento del cáncer.
21. El método de la reivindicación 1 en el que el inhibidor de MEK es cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona para el tratamiento terapéutico del cáncer.
22. El método de reivindicación 1 en el que cobimetib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona se administran cada uno en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.
23. El método de reivindicación 22 en el que cobimetib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra a una dosis de 60 mg, en los días 1-21 de un ciclo de 28 días, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administran cada una

en una cantidad de aproximadamente 1 mg a 1000 mg por forma de dosificación unitaria.

24. Uso de un inhibidor de MEK o una sal farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que comprende un inhibidor de ERK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
25. El uso de la reivindicación 24 en el que el trastorno hiperproliferativo es cáncer y el mamífero es un ser humano.
26. El uso de la reivindicación 25 en el que el cáncer está asociado con una mutación de KRAS.
27. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 en el que el inhibidor de MEK es cobimetinib.
28. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que el inhibidor de MEK es GDC-0623.
29. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que el inhibidor de MEK es GSK-1120212 (trametinib).
30. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 en el que el inhibidor de MEK es AZD-6244 (selumetinib).
31. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 en el que el inhibidor de MEK es BAY 86-9766 (refametinib).
32. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 31, en el que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona, 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina, (S)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina o (S)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina.
33. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 24-32, en el que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
34. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, en el que trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes, leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón,

trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.

35. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 34, en el que dicho trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.
36. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 35, en el que el trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas o melanoma.
37. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 36, en el que cobimetinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en combinación con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
38. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 36, en el que 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra en combinación con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
39. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 36, en el que cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra simultáneamente con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
40. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 36, en el que cobimetinib o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, se administra secuencialmente con (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
41. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 40, en el que cobimetinib, o

una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona se administran cada uno en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.

42. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 41, en el que cobimetinib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra a una dosis de 60 mg, en los días 1-21 de un ciclo de 28 días, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administran cada una en una cantidad de aproximadamente 1 mg a 1000 mg por forma de dosificación unitaria.
43. Un inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que comprende un inhibidor de ERK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
44. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de la reivindicación 43 en el que el trastorno hiperproliferativo es cáncer y el mamífero es un ser humano.
45. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de la reivindicación 44 en el que el cáncer está asociado con una mutación de KRAS.
46. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45 en el que el inhibidor de MEK es cobimetinib.
47. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45, en el que el inhibidor de MEK es GDC-0623.
48. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45, en el que el inhibidor de MEK es GSK-1120212 (trametinib).
49. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45 en el que el inhibidor de MEK es AZD-6244 (selumetinib).

50. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45 en el que el inhibidor de MEK es BAY 86-9766 (refametinib).
51. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45 en el que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona, 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina, (S)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina o (S)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina.
52. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de una cualquiera de las reivindicaciones 43-45, en el que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
53. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 52, en el que trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes, leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón, trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.
54. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 53, en el que dicho trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de

endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.

55. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 54, en el que el trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas o melanoma,
56. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 55, en el que cobimetinib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona se administran cada uno en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.
57. El inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 52, en el que cobimetinib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra a una dosis de 60 mg, en los días 1-21 de un ciclo de 28 días, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administran cada una en una cantidad de aproximadamente 1 mg a 1000 mg por forma de dosificación unitaria.
58. La combinación de un inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables con un inhibidor de ERK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.
59. La combinación de la reivindicación 58 en la que el trastorno hiperproliferativo es cáncer y el mamífero es un ser humano.
60. La combinación de la reivindicación 58 en la que el cáncer está asociado con una mutación de KRAS.
61. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 60, en la que el inhibidor de MEK es cobimetinib.
62. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, en la que el inhibidor de MEK es GDC-0623.
63. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, en la que el inhibidor de MEK es GSK-1120212 (trametinib).

64. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, en la que el inhibidor de MEK es AZD-6244 (selumetinib).
65. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, en la que el inhibidor de MEK es BAY 86-9766 (refametinib).
66. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 65, en la que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona, 4-(3-((etildimetilsilil)metil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina, (S)-4-(3-(2-(4-clorofenil)-2-metoxietil)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-7-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)pirimidin-2-amina o (S)-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-4-(3-(2-metilbutil)-[1,2,3]triazolo[1,5-a]piridin-6-il)pirimidin-2-amina.
67. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 66, en la que el inhibidor de ERK es (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
68. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 67, en la que trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en adenoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma epidérmico, carcinoma folicular, cáncer del tracto genitourinario, glioblastoma, enfermedad de Hodgkin, cánceres de cabeza y cuello, heptoma, queratoacantoma, cáncer de riñón, carcinoma de células grandes, leucemias, adenocarcinoma del pulmón, cáncer de pulmón, trastornos linfoides, cáncer de piel con melanoma y sin melanoma, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovario, carcinoma papilar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, carcinoma microcítico, cáncer de testículo, tetracarcinomas, cáncer de tiroides, y carcinoma indiferenciado.
69. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 68, en la que dicho trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, glioma, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga y cáncer de cabeza y de cuello.
70. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 68, en la que el trastorno hiperproliferativo es cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas o melanoma,

71. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 70, en la que cobimetinib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o 5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-N-(2-hidroxietoxi)imidazo[1,5-a]piridina-6-carboxamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona se administran cada uno en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.
72. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 58 a 71, en la que cobimetinib, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se administra a una dosis de 60 mg, en los días 1-21 de un ciclo de 28 días, y (S)-1-(1-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-hidroxietil)-4-(2-((1-metil-1H-pirazol-5-il)amino)pirimidin-4-il)piridin-2(1H)-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administran cada una en una cantidad de aproximadamente 1 mg a 1000 mg por forma de dosificación unitaria.
73. La administración simultánea de un inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables con un inhibidor de ERK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, en la que en forma más específica, el inhibidor de MEK se define de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 65, se define un inhibidor de ERK de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 66 a 67 y en la que el trastorno hiperproliferativo se define de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 68 a 70.
74. El uso de una combinación de un inhibidor de MEK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables con un inhibidor de ERK o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, en el que en forma más específica, el inhibidor de MEK se define de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 65, se define un inhibidor de ERK de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 66 a 67 y en el que el trastorno hiperproliferativo se define de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 68 a 70.
75. La invención que se ha descrito en el presente documento anteriormente.

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

# PCT

## WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

|                                                    |                                                          |                                              |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| International application No.<br>PCT/EP2014/068776 | International filing date (day/month/year)<br>04.09.2014 | Priority date (day/month/year)<br>05.09.2013 |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. A61K31/435 A61K31/437 A61K31/5025 A61K31/506 A61P35/00

Applicant  
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

## 2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

|                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                           |                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Name and mailing address of the ISA:</p>  <p>European Patent Office<br/>D-80298 Munich<br/>Tel. +49 89 2399 - 0<br/>Fax: +49 89 2399 - 4465</p> | <p>Date of completion of this opinion</p> <p>see form<br/>PCT/ISA/210</p> | <p>Authorized Officer</p> <p>Telephone No. +49 89 2399-0</p>  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

**Box No. I Basis of the opinion**

---

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - ☐ on paper
    - ☐ in electronic form
  - b. (time)
    - ☐ in the international application as filed
    - ☐ together with the international application in electronic form
    - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

---

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

---

1. Statement

|                               |             |                                                                |
|-------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | <u>2-6, 8-23, 25-29, 31-42, 44-48, 50-57, 59-63, 65-72, 74</u> |
|                               | No: Claims  | <u>1, 7, 24, 30, 43, 49, 58, 64, 73, 75</u>                    |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | <u>2-6, 8-23, 25-29, 31-42, 44-48, 50-57, 59-63, 65-72, 74</u> |
|                               | No: Claims  | <u>1, 7, 24, 30, 43, 49, 58, 64, 73, 75</u>                    |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-75</u>                                                    |
|                               | No: Claims  |                                                                |

2. Citations and explanations

**see separate sheet**

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/EP2014/068776

---

---

**Box No. VIII    Certain observations on the international application**

---

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**see separate sheet**

## **Section V**

### **1 Prior Art**

The following prior art is cited from the International Search Report:

- D1** HATZIVASSILIOU G ET AL: "ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK Inhibitors", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 2012 AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. USA, vol. 11, no. 5, 2012, pages 1143-1154, XP002730627, ISSN: 1535-7163
- D2** WO 2012/145503 A1 (NOVARTIS AG [CH]; KRIETER OLIVER [DE]; SUSA PERERA MIRA [CH]; CAPONIGR) 26 October 2012 (2012-10-26)
- D3** HUYNH H ET AL: "AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC)", JOURNAL OF HEPATOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 52, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 79-87, XP027246446, ISSN: 0168-8278 [retrieved on 2009-10-28]
- D4** E. W. JOSEPH ET AL: "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 33, 17 August 2010 (2010-08-17), pages 14903-14908, XP055098494, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1008990107
- D5** BOGATCHEVA N V ET AL: "Mechanism of fluoride-induced MAP kinase activation in pulmonary artery endothelial cells", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 200606 US, vol. 290, no. 6, June 2006 (2006-06), pages L1139-L1145, ISSN: 1040-0605
- D6** LI LIU ET AL: "Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 24, 18 December 2006 (2006-12-18), pages 11851-11858, XP008136574, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377

**D1** shows that dual inhibition of MEK and ERK by small molecule inhibitors, such as PD0325901 and G-573 (MEK inhibitors) with the ERK-inhibitor depicted in Fig. 1D, is synergistic and overcomes resistance to MEK inhibitors.

**D2** discloses pharmaceutical combinations comprising (a) a MEK inhibitor selected from 6-(4-bromo-2- fluorophenylamino)-7-fluoro-3-methyl-3H-benzimidazole-5-carboxylic acid (2- hydroxyethoxy)-amide or (S)-5 -fluoro-2-(2-fluoro-4-(methylthio) phenylamino)- N-(2-hydroxypropoxy)-1-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3 -carbox-

amide (salts), and (b) a RAF kinase inhibitor selected from sorafenib, RAF265, SB590885, SL281, PLX4720 (see page 13, line 1), PLX4032, GDC0879 and ZM336372 for simultaneous, separate or sequential administration in the treatment of a proliferative disease.

**D3** teaches that the MEK inhibitor AZD-6244 enhances the anti-tumour activity of sorafenib.

**D4, D5** (paragraph bridging pages L1141 and L1142) and **D6** show that PLX4032, ZM336372 and sorafenib, respectively, inhibit ERK.

## **2 Novelty**

The MEK inhibitor / ERK inhibitor combinations known from **D1, D2** and **D3** are considered to anticipate the novelty of present claims 1, 7, 24, 30, 43, 49, 58, 64, 73 and 75. Novelty (Article 33 (2) PCT) cannot therefore be acknowledged for the present claimed subject-matter.

## **3 Inventive Step**

The subjective underlying problem appears to be the provision of a composition for treating hyperproliferative diseases. The claimed solution appears to be the combination of a MEK inhibitor with an ERK inhibitor. Since the combination of a MEK inhibitor with an ERK inhibitor has already been disclosed in the prior art and presented as exhibiting synergy, the usefulness of a combination of a MEK inhibitor with an ERK inhibitor in treating hyperproliferative diseases was to be expected for the skilled person. The objective underlying problem must therefore be seen as being the provision of a composition of a MEK inhibitor with an ERK inhibitor which has an unexpected effect in the treatment of a hyperproliferative disease. Since no such unexpected effect has been shown, inventive step (Article 33 (3) PCT) cannot be acknowledged for that claimed subject-matter that is novel.

## **4 Industrial Applicability**

Industrial application (Article 33 (4) PCT) in the pharmaceutical field. Claims 1-23 might be found inadmissible because they are directed to methods of therapeutic treatment.

### **Section VIII**

The expressions "MEK inhibitor" and "ERK inhibitor" without further definition are considered to fail to define the claimed subject-matter, because they do not provide information as to the identity of the envisaged compounds, and are therefore considered inadmissible. -- Claim 75 to "*the invention as described herein above*" does not define the subject-matter for which protection is sought and is therefore completely unclear. The claims are thus considered to contravene Article 6 PCT.



(43) International Publication Date  
12 March 2015 (12.03.2015)

(10) International Publication Number  
**WO 2015/032840 A1**

(51) International Patent Classification:

A61K 31/435 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)  
A61K 31/437 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/5025 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2014/068776

(22) International Filing Date:

4 September 2014 (04.09.2014)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/874,206 5 September 2013 (05.09.2013) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **F. HOFF-MANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(71) Applicant (for US only): **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors: **BELVIN, Marcia**; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **MOFFAT, John**; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **MERCHANT, Mark**; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(74) Agent: **SCHIRLIN, Julien**; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: COMBINATION OF A MEK INHIBITOR AND AN ERK INHIBITOR FOR USE IN TREATMENT OF HYPERPROLIFERATIVE DISEASES

(57) Abstract: The invention provides combinations comprising a MEK inhibitor (such as GDC-0973 or GDC-0623), or a pharmaceutically acceptable salt thereof and an ERK inhibitor (such as GDC-0994). The combinations are particularly useful for treating hyperproliferative disorders, such as cancer.



WO 2015/032840 A1

# PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                        |                                                                                                                                                   |                                                                                         |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><br>P05700 WO | <b>FOR FURTHER ACTION</b> <div style="float: right; font-size: small;">see Form PCT/ISA/220<br/>as well as, where applicable, item 5 below.</div> |                                                                                         |
| International application No.<br><br>PCT/EP2014/068776 | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br><br>4 September 2014 (04-09-2014)                                                          | (Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> )<br><br>5 September 2013 (05-09-2013) |
| Applicant<br><br>F. HOFFMANN-LA ROCHE AG               |                                                                                                                                                   |                                                                                         |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

COMBINATION OF A MEK INHIBITOR AND AN ERK INHIBITOR FOR USE IN TREATMENT OF HYPERPROLIFERATIVE DISEASES

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/068776

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. A61K31/435 A61K31/437 A61K31/5025 A61K31/506 A61P35/00<br>ADD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A61K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | HATZIVASSILIOU G ET AL: "ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK Inhibitors",<br>MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 2012<br>AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. USA,<br>vol. 11, no. 5, 2012, pages 1143-1154,<br>XP002730627,<br>ISSN: 1535-7163<br>the whole document | 1,24,43,<br>58,73,75                                                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | WO 2012/145503 A1 (NOVARTIS AG [CH];<br>KRIETER OLIVER [DE]; SUSA PERERA MIRA<br>[CH]; CAPONIGR)<br>26 October 2012 (2012-10-26)<br>claim 3<br><br>-----<br>-/--                                                                                                                         | 1,24,43,<br>58,73,75                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>6 October 2014                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Date of mailing of the international search report<br><br>21/10/2014 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Authorized officer<br><br>Engl, Brigitte                             |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/068776

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.          |
| X                                                    | HUYNH H ET AL: "AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC)", JOURNAL OF HEPATOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 52, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 79-87, XP027246446, ISSN: 0168-8278 [retrieved on 2009-10-28] the whole document                                                                | 1,7,24, 30,43, 49,58, 64,73,75 |
| A                                                    | -----<br>E. W. JOSEPH ET AL: "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 33, 17 August 2010 (2010-08-17), pages 14903-14908, XP055098494, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1008990107 the whole document                                                     | 1,24,43, 58,73,75              |
| A                                                    | -----<br>BOGATCHEVA N V ET AL: "Mechanism of fluoride-induced MAP kinase activation in pulmonary artery endothelial cells", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 200606 US, vol. 290, no. 6, June 2006 (2006-06), pages L1139-L1145, XP002730646, ISSN: 1040-0605 page L1141, right-hand column, line 11 - page L1142, line 5                                    | 1,24,43, 58,73,75              |
| A                                                    | -----<br>LI LIU ET AL: "Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 24, 18 December 2006 (2006-12-18), pages 11851-11858, XP008136574, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377 the whole document | 1,24,43, 58,73,75              |
|                                                      | -----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/068776

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2012145503                             | A1                  | 26-10-2012                 | NONE                |
| -----                                     |                     |                            |                     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                         |                                                                                                                            |                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                   |                                         | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO</b> |                        |
| PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____                                                                                                                                                                                                                             |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-12-15                                                                                                                                                                                                                                                          |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (51) Clasificación Internacional: A61K 31/435                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (71) Solicitante(s): <b>F. HOFFMANN-LA ROCHE AG</b>                                                                                                                                                                                                                                                               |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (72) Inventor(es): BELVIN, Marcia; MOFFAT, John y MERCHANT, Mark.                                                                                                                                                                                                                                                 |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (74) Apoderado: <b>ALICIA LLOREDA RICAURTE</b>                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (30) Prioridad                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | (31) <b>No. Prioridad</b><br>61/874,206 | (32) <b>Fecha</b><br>05-09-13                                                                                              | (33) <b>País</b><br>US |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional: 05-04-16                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                         | (87) Publicación internacional                                                                                             |                        |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: 04-09-14<br>No. de solicitud: <b>PCT/EP2014/068776</b>                                                                                                                                                          |                                         | Fecha: <b>12-03-15</b><br>No. Publicación: <b>WO 2015/032840 A1</b>                                                        |                        |
| (54) Título: <b>USO DE UNA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MEK Y UN INHIBIDOR DE ERK PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS</b>                                                                                                                                                                   |                                         |                                                                                                                            |                        |
| (57) Resumen:                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                         |                                                                                                                            |                        |
| <b>Resumen.-</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                         |                                                                                                                            |                        |
| La invención proporciona combinaciones que comprenden un inhibidor de MEK (tal como GDC-0973 o GDC-0623), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK (tal como GDC-0994). Las combinaciones son particularmente útiles para tratar trastornos hiperproliferativos, tal como el cáncer. |                                         |                                                                                                                            |                        |
| <b>Sector:</b> Preparaciones médicas, química, compuestos heterocíclicos.                                                                                                                                                                                                                                         |                                         |                                                                                                                            |                        |

|                                                                                                                                                             |                                         |                                                                                                                                |                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|                                                                           |                                         | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS</b> |                        |
| PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____                                                                       |                                         |                                                                                                                                |                        |
| (21) No. de solicitud:                                                                                                                                      |                                         | (22) Fecha de solicitud: 28-12-15                                                                                              |                        |
| (51) Clasificación Internacional: A61K 31/435                                                                                                               |                                         |                                                                                                                                |                        |
| (71) Solicitante(s): <b>F. HOFFMANN-LA ROCHE AG</b>                                                                                                         |                                         |                                                                                                                                |                        |
| (72) Inventor(es): BELVIN, Marcia; MOFFAT, John y MERCHANT, Mark.                                                                                           |                                         |                                                                                                                                |                        |
| (74) Apoderado: <b>ALICIA LLOREDA RICAURTE</b>                                                                                                              |                                         |                                                                                                                                |                        |
| (30) Prioridad                                                                                                                                              | (31) <b>No. Prioridad</b><br>61/874,206 | (32) <b>Fecha</b><br>05-09-13                                                                                                  | (33) <b>País</b><br>US |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional: 05-04-16                                                                                                            |                                         | (87) Publicación internacional                                                                                                 |                        |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: 04-09-14<br>No. de solicitud: <b>PCT/EP2014/068776</b> |                                         | Fecha: <b>12-03-15</b><br>No. publicación: <b>WO 2015/032840 A1</b>                                                            |                        |
| (54) Título: <b>USO DE UNA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MEK Y UN INHIBIDOR DE ERK PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS</b>             |                                         |                                                                                                                                |                        |

|                                                                                                                                              |                                                       |            |           |                                                                      |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|-----------|----------------------------------------------------------------------|--|
| (21) No. de solicitud:                                                                                                                       |                                                       |            |           | (51) Int Cl: A61K 31/435                                             |  |
| (22) Fecha de solicitud: 28-12-15                                                                                                            |                                                       |            |           | (71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG                         |  |
| (30) Prioridad                                                                                                                               | (31) No. Prioridad                                    | (32) Fecha | (33) País | (72) Inventor(es): BELVIN, Marcia; MOFFAT, John y<br>MERCHANT, Mark. |  |
|                                                                                                                                              | 61/874,206                                            | 05-09-13   | US        |                                                                      |  |
|                                                                                                                                              |                                                       |            |           | (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE                              |  |
| (85)                                                                                                                                         | Fecha límite inicio fase nacional: 05-04-16           |            |           | (87) Publicación internacional                                       |  |
| (86)                                                                                                                                         | Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT |            |           | Fecha: 12-03-15                                                      |  |
|                                                                                                                                              | Fecha de presentación de la solicitud: 04-09-14       |            |           | No. publicación: WO 2015/032840 A1                                   |  |
|                                                                                                                                              | No. de solicitud: PCT/EP2014/068776                   |            |           |                                                                      |  |
| 54) Título:<br>"USO DE UNA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MEK Y UN INHIBIDOR DE ERK PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS" |                                                       |            |           |                                                                      |  |

Resumen - Sector(es):

**Resumen.-**

La invención proporciona combinaciones que comprenden un inhibidor de MEK (tal como GDC-0973 o GDC-0623), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK (tal como GDC-0994). Las combinaciones son particularmente útiles para tratar trastornos hiperproliferativos, tal como el cáncer.

**Sector:** Preparaciones médicas, química, compuestos heterocíclicos.

## ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

  
ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

# TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLORED A y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

## AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

*Maria Mercedes Uricoechea T.*  
**Maria Mercedes Uricoechea T.**  
 Traductora Juramentada  
 Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258651

2004 SET - 3 P 12:12

*Pana Urcochea*

*UCS*

CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPEÑA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES  
BOGOTÁ D.C.

Los abajo firmados, **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

The undersigned, **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

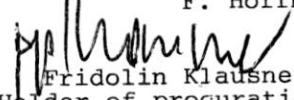
Dado y firmado

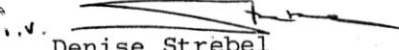
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this *17<sup>th</sup> day of August 2009.*  
**F. Hoffmann-La Roche AG**

  
**Fridolin Klausner**  
Holder of procuration

  
**Denise Strébel**  
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Suiza  
Basilea

{ss

El día 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Stöbel a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland  
Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally, Fridolin Klausner and Denise Stöbel came both, Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

*Dr. P. Kuster*  
Notar



Allg. Pro.

Dr. Peter Kuster  
Advokat und Notar  
Peterskirchplatz 12  
Postfach  
CH-4001 Basel

OFFICIAL AUTHENTICATION  
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. R. Kuch

3. in his/her function as Att. Noller

4. and certified by the seal of the Gemeinde

Certified

**18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

6. on .....

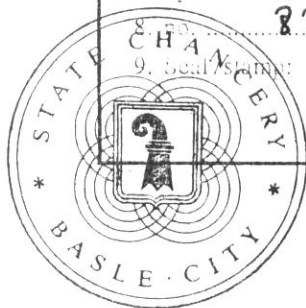
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....

8. No. **8835 / 10 376**

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

[Signature]



USO DE UNA COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MEK Y UN INHIBIDOR  
DE ERK PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES  
HIPERPROLIFERATIVAS

RESUMEN – OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención proporciona combinaciones que comprenden un inhibidor de MEK (tal como GDC-0973 o GDC-0623), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un inhibidor de ERK (tal como GDC-0994). Las combinaciones son particularmente útiles para tratar trastornos hiperproliferativos, tal como el cáncer.

SECTOR: Preparaciones médicas, química, compuestos heterocíclicos.

Combinaciones de CTG: ERK1 + MEK1 (GDC-0973) en el día 4 en A549 (KRASNSCLC)

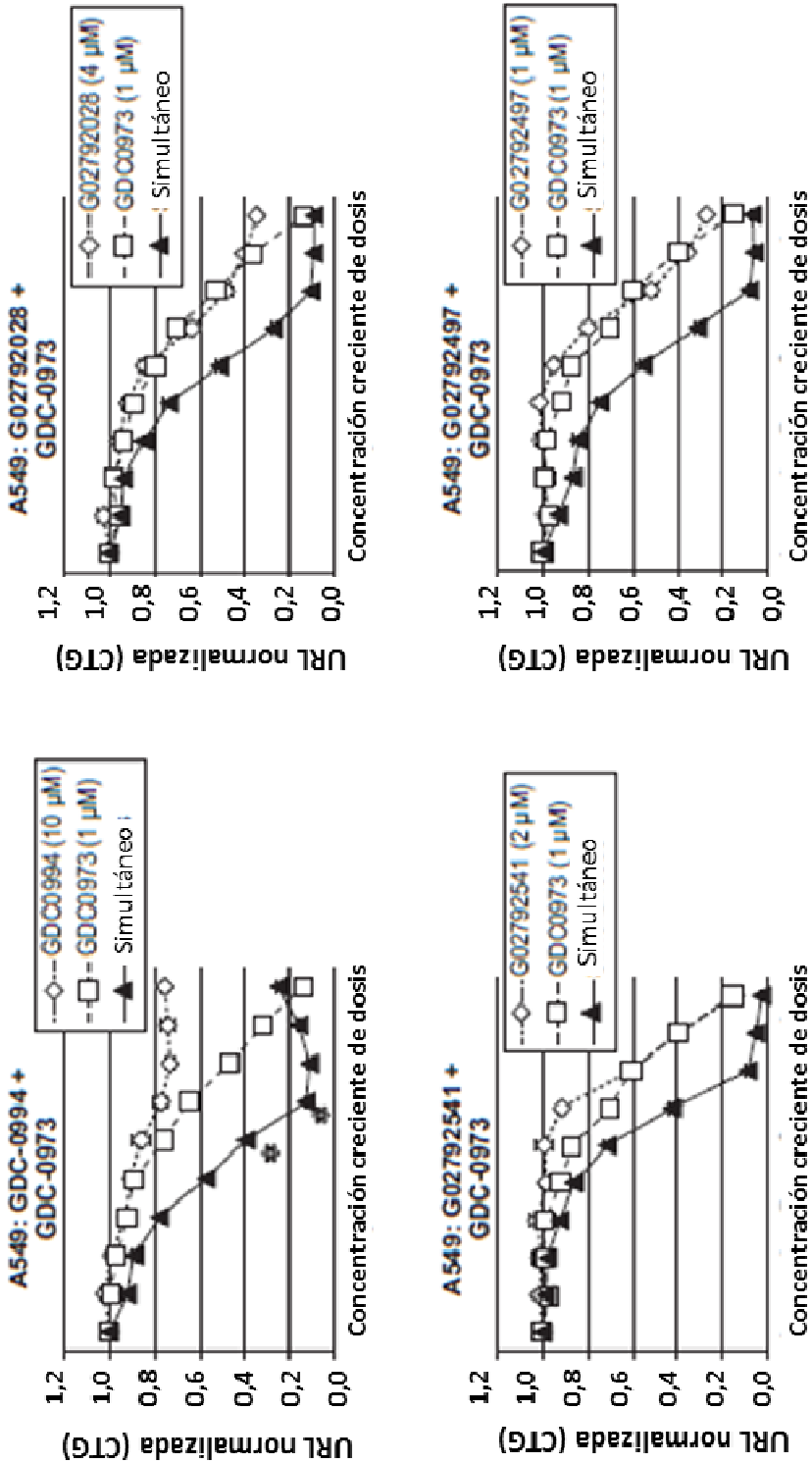


FIG. 1

Proliferación y muerte celular: Combinaciones de MEKi  
(GDC-0973) + ERKi en A459

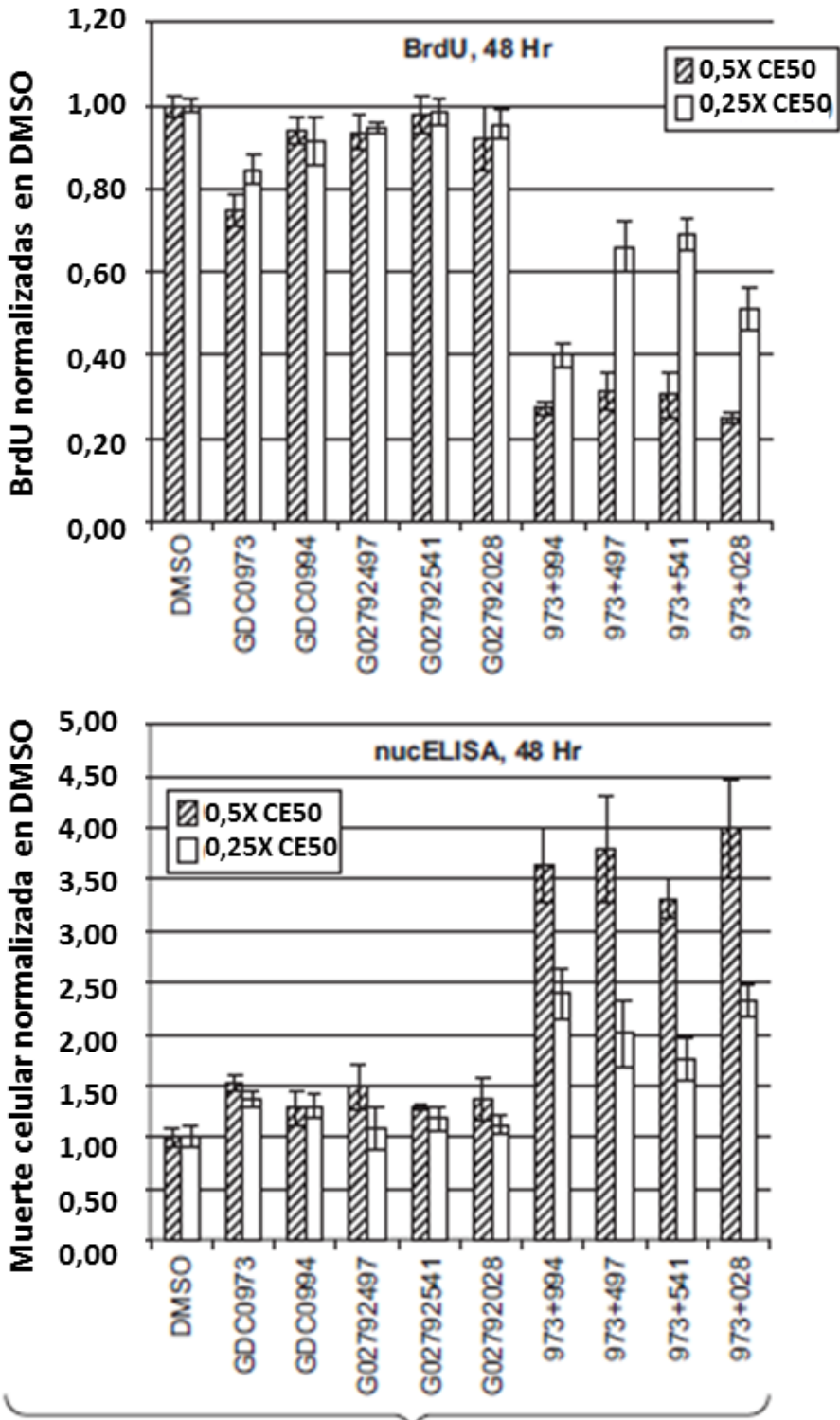


FIG. 2A

Proliferación y muerte celular: Combinaciones  
MEKi (GDC-0973) + ERKi en A549

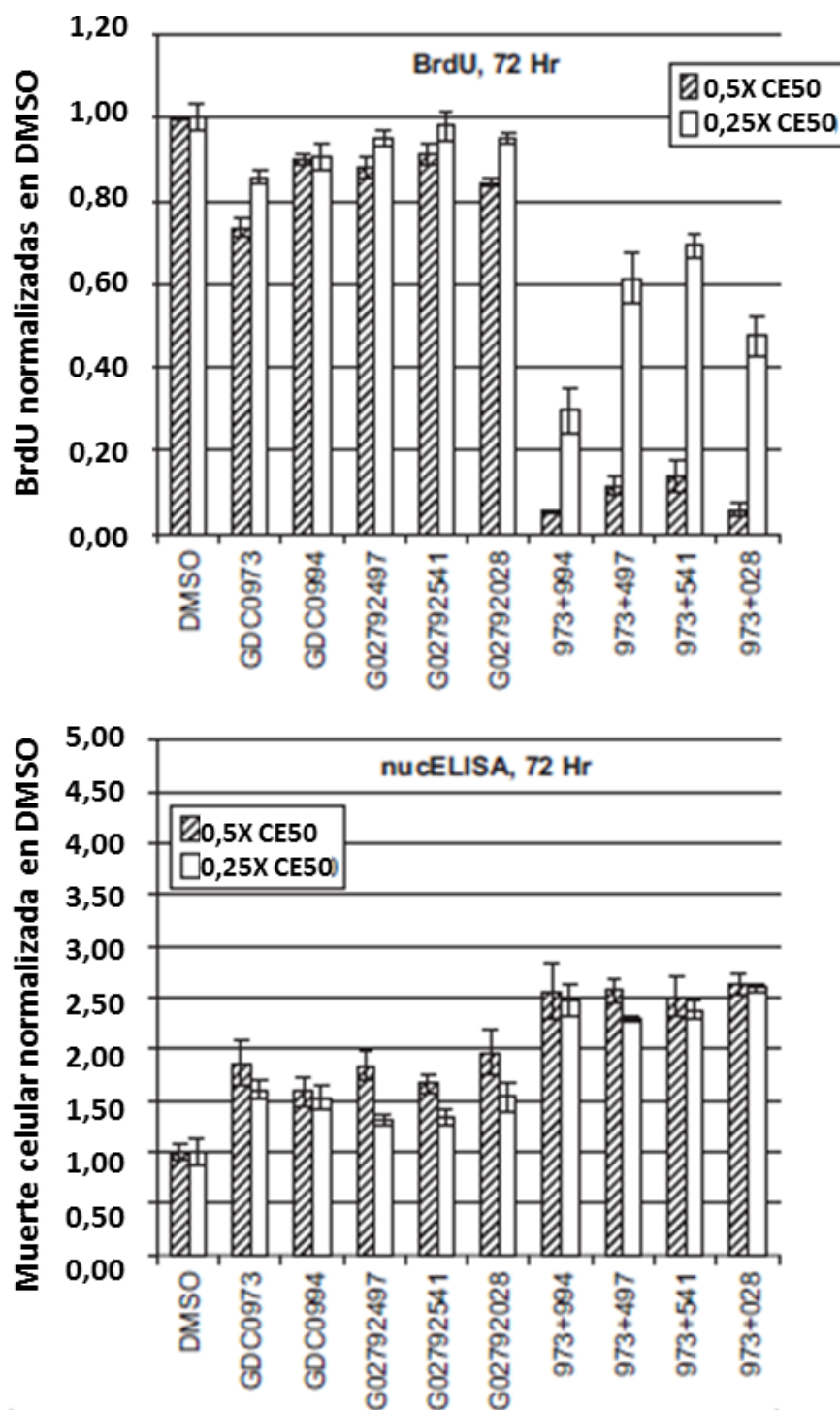


**FIG. 2B**

Análisis PD: Combinaciones de MEKi  
(GDC-0973) + ERKi en A549, 24 h

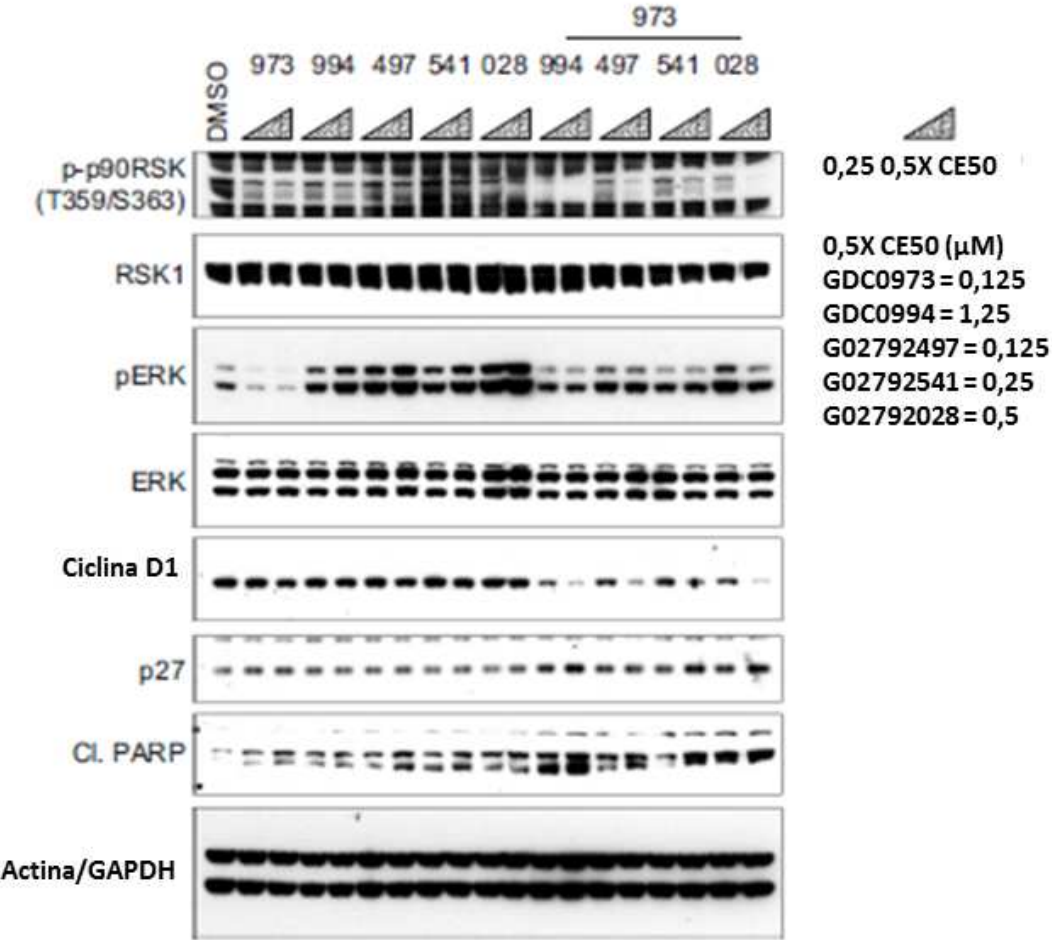


FIG. 3

Inhibición sinérgica de la síntesis de ADN

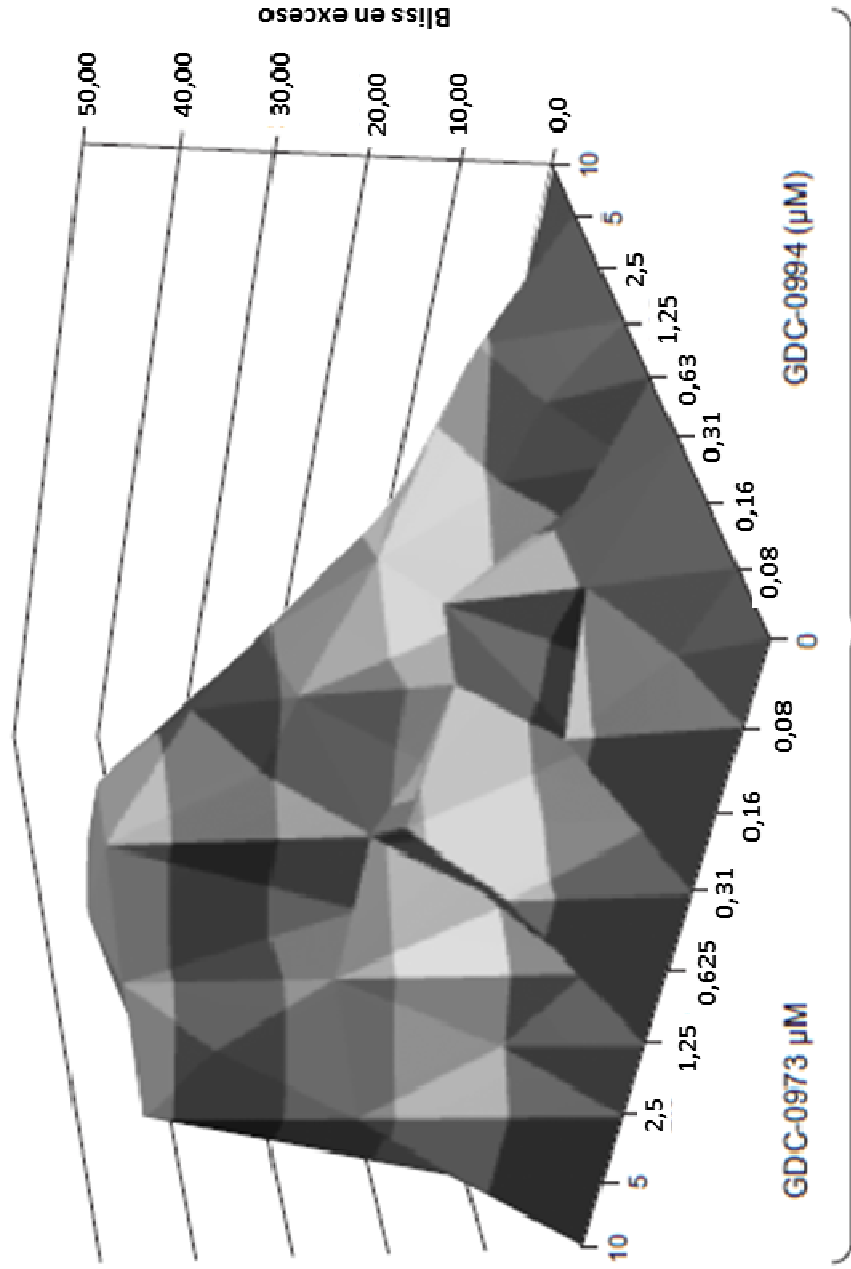
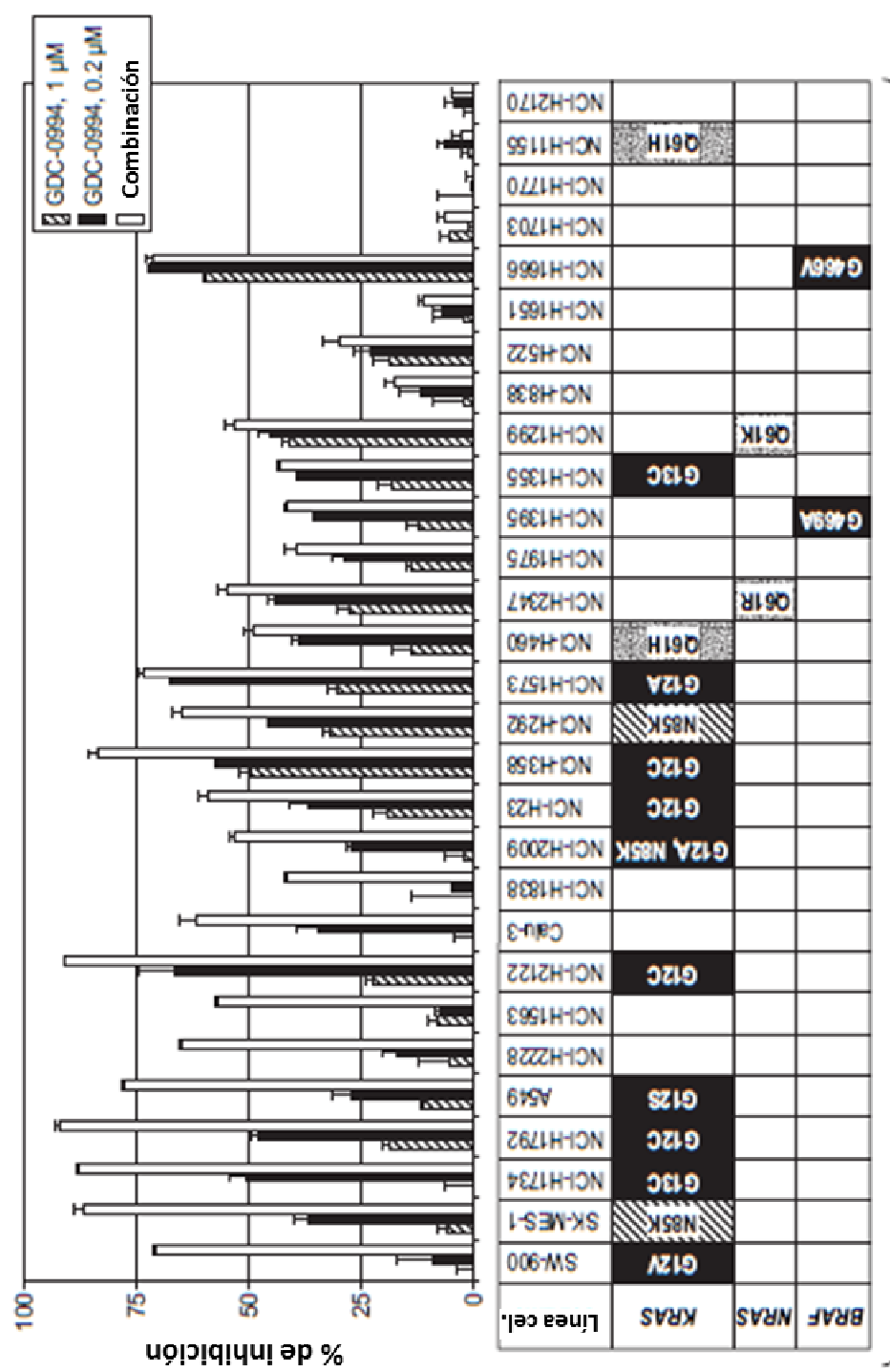


FIG. 4



NCI-H2122 NSCLC  
MEKi diario +  
ERKi diario

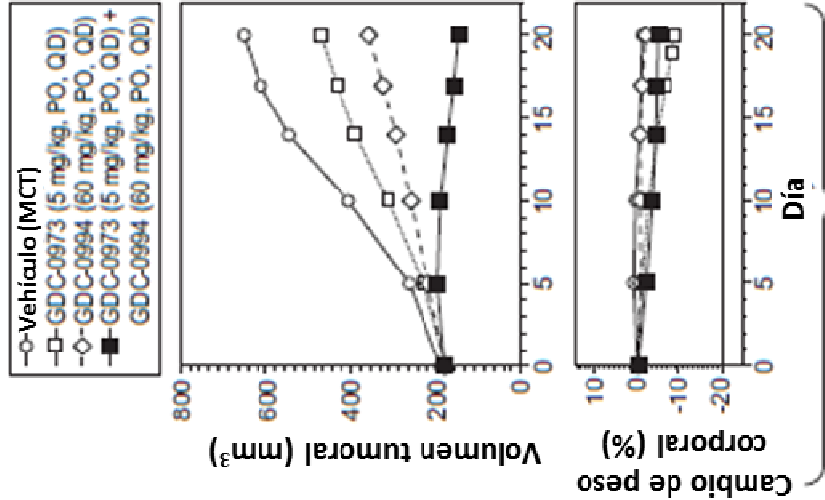


FIG. 6A

NCI-H2122 NSCLC  
MEKi intermitente +  
ERKi diario

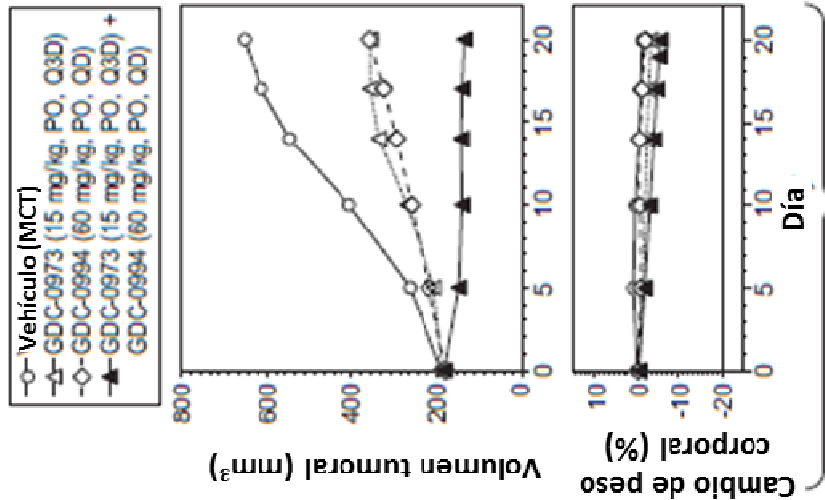


FIG. 6B

IHC muestra efectos combinados sobre los marcadores tumorales de la proliferación y la apoptosis

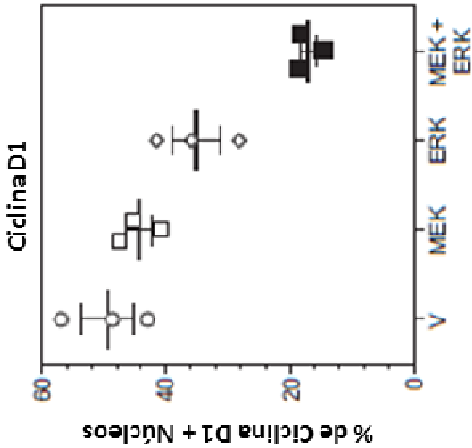


FIG. 6C

IHC muestra efectos combinados sobre los marcadores tumorales de la proliferación y la apoptosis

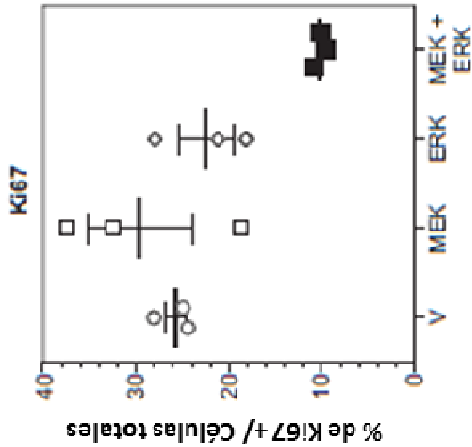


FIG. 6D

IHC muestra efectos combinados sobre los marcadores tumorales de la proliferación y la apoptosis

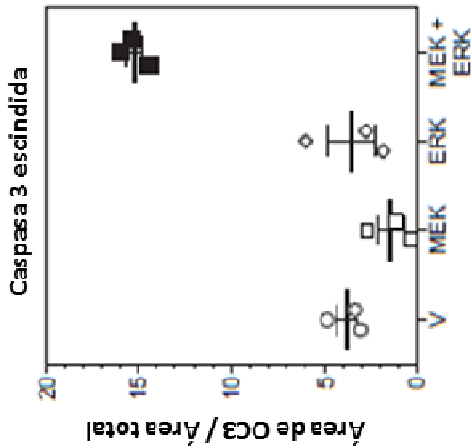


FIG. 6E

NCI-H2122

MEK1 (GDC-0973) diaria +  
ERK1 (GDC-0994) diaria

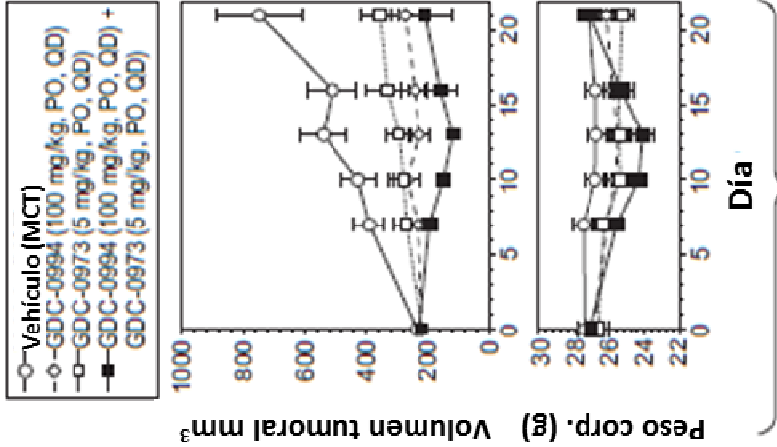


FIG. 7A

NCI-H2122

MEK1 (GDC-0623) diaria +  
ERK1 (GDC-0994) diaria

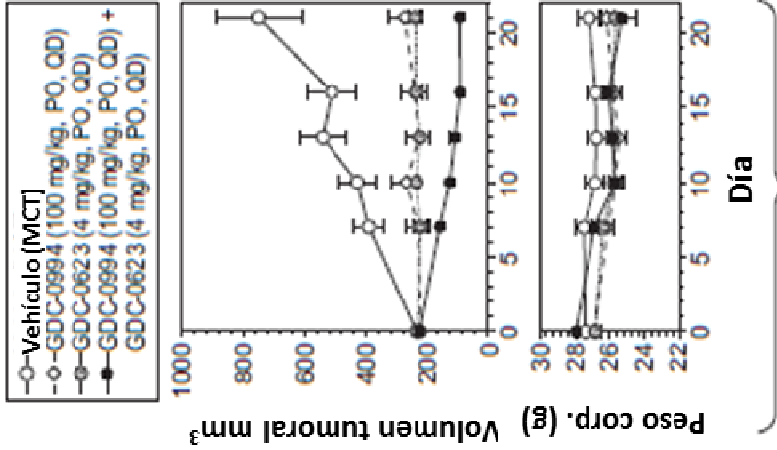


FIG. 7B

NCI-H2122

MEK1 (GDC-0973) intermitente +  
ERK1 (GDC-0994) diaria

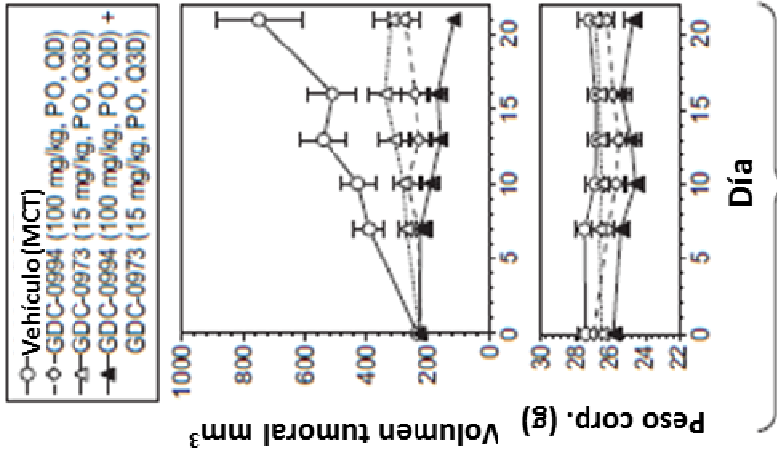
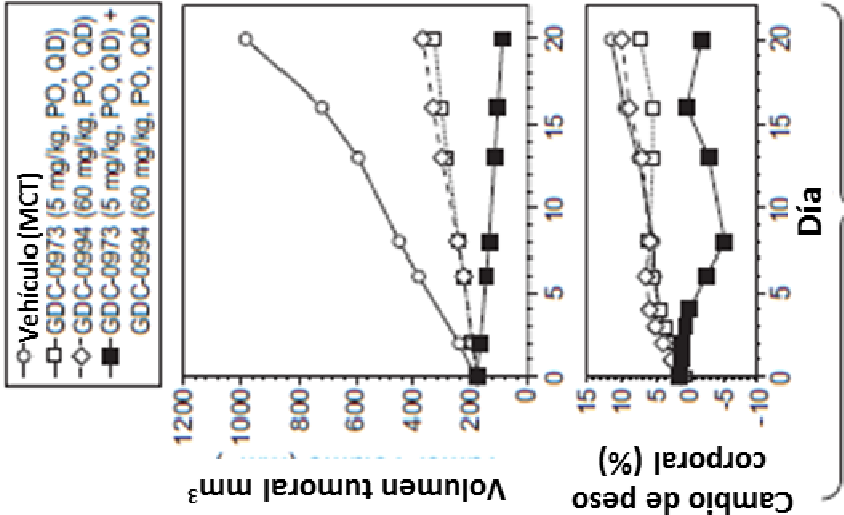
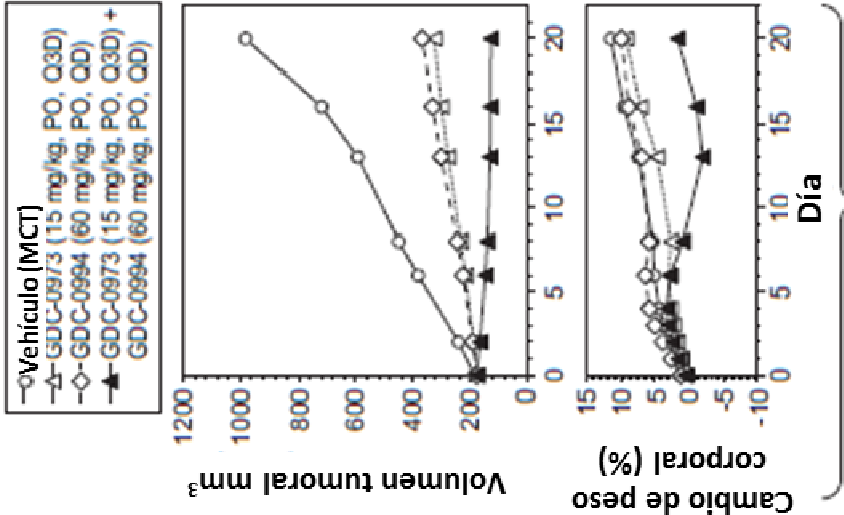


FIG. 7C

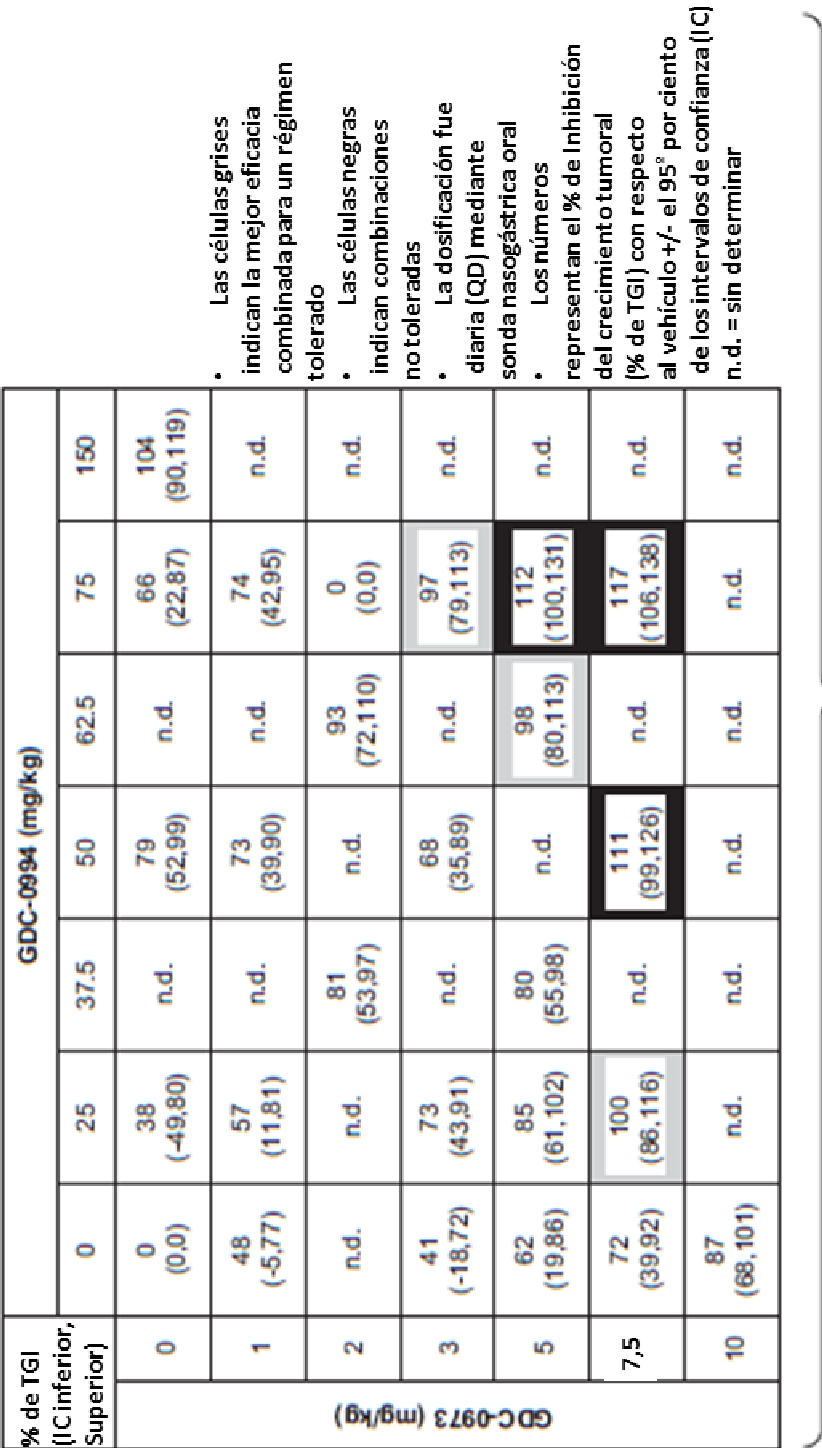
**A549 NSCLC**  
GDC-0973 diario +  
GDC-0994 diario



**A549 NSCLC**  
GDC-0973 intermitente +  
GDC-0994 diario



Se observó eficacia combinada a dosis toleradas con combinaciones de GDC-0973 y GDC-0994 en células HCT116.



Tratamiento con Cobimetinib + ERKí del Mutante KRAS del Modelo PDAC GEM

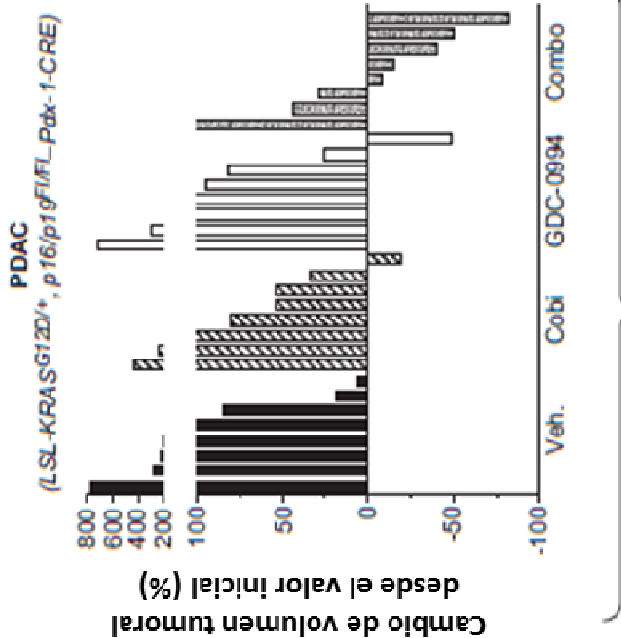


FIG. 10A

Tratamiento con cobimetinib + ERKí del mutante KRAS del model PDAC GEM

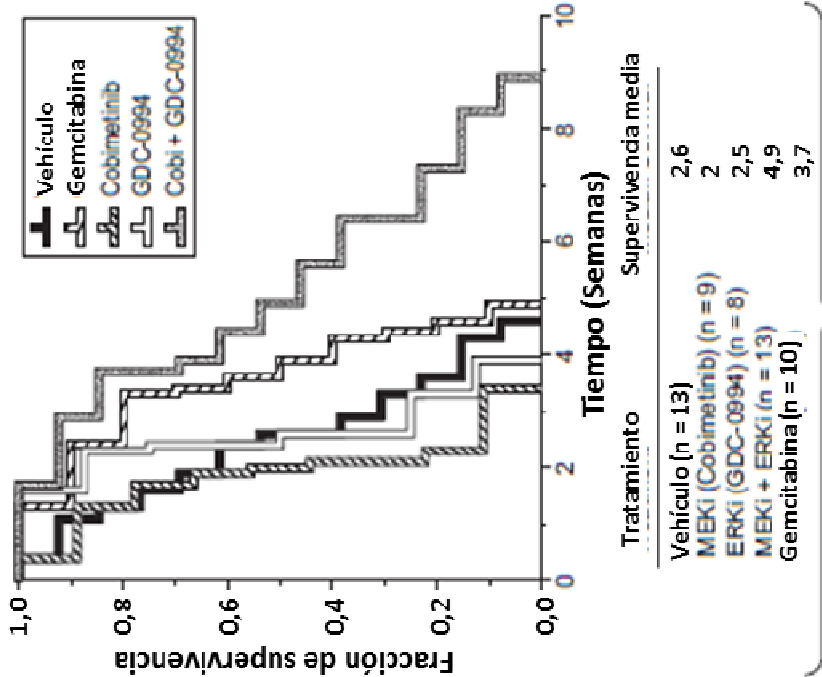


FIG. 10B

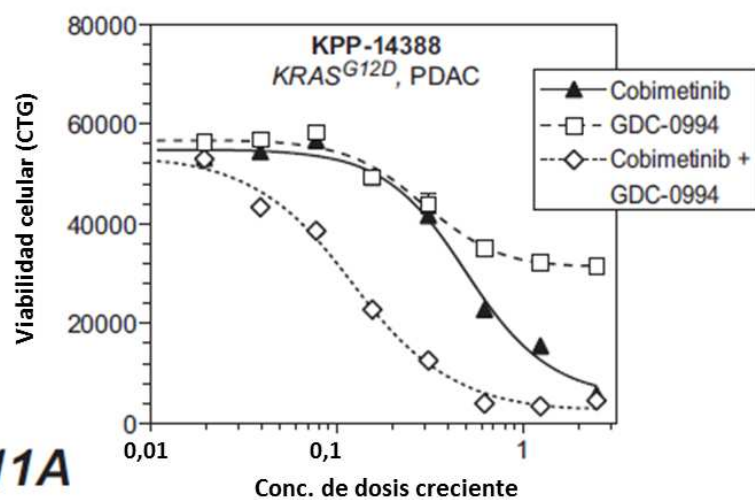
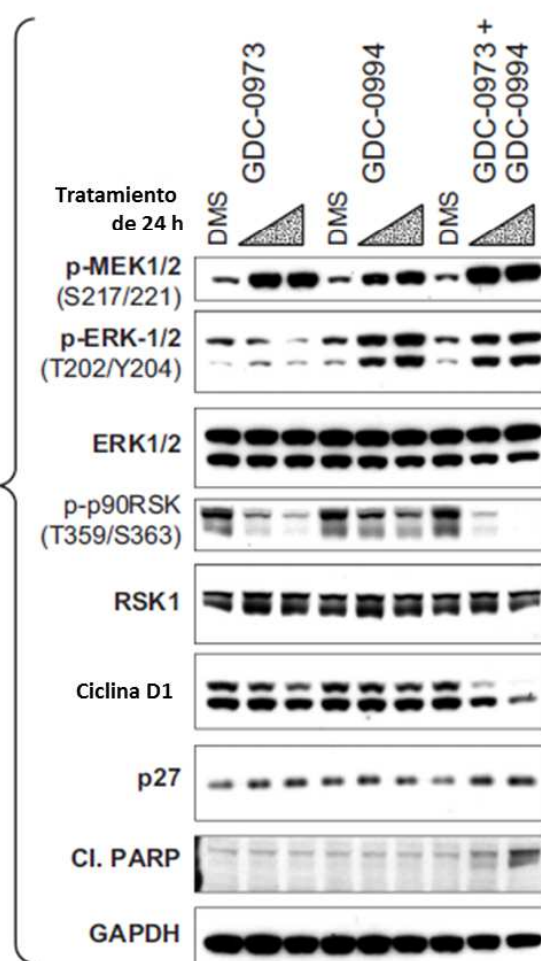


**FIG. 11A**

**FIG. 11B**



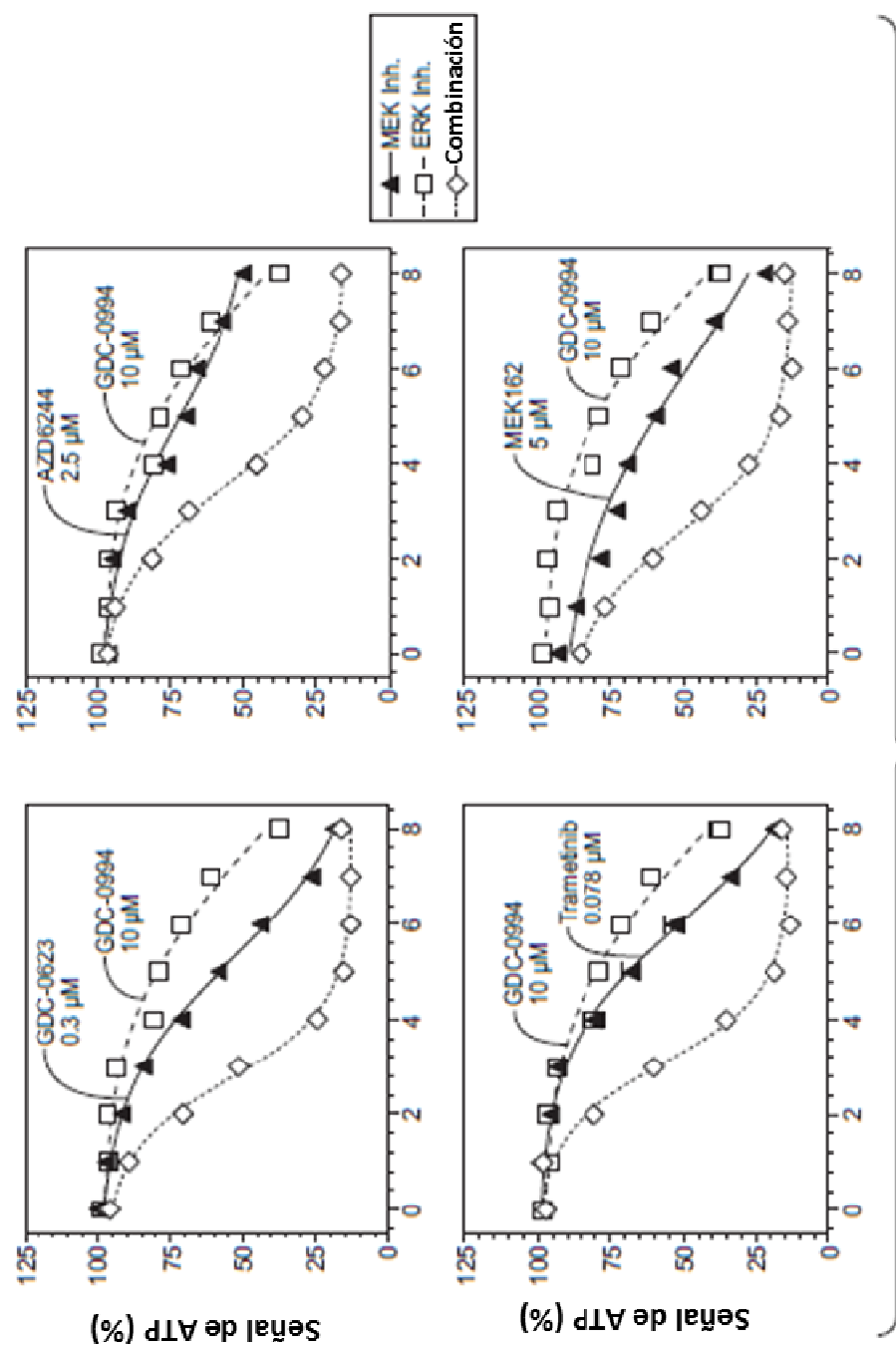


**FIG. 12**

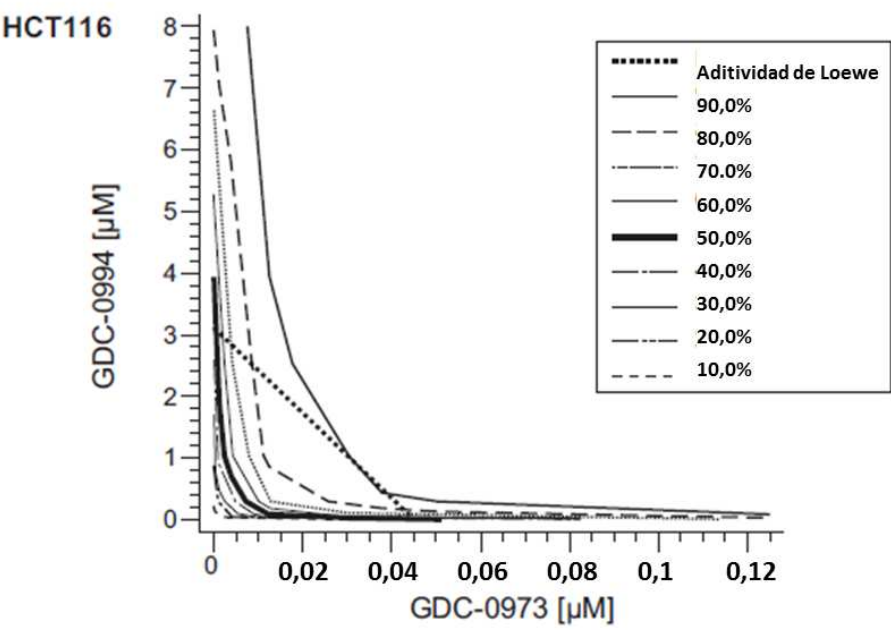


FIG. 13A

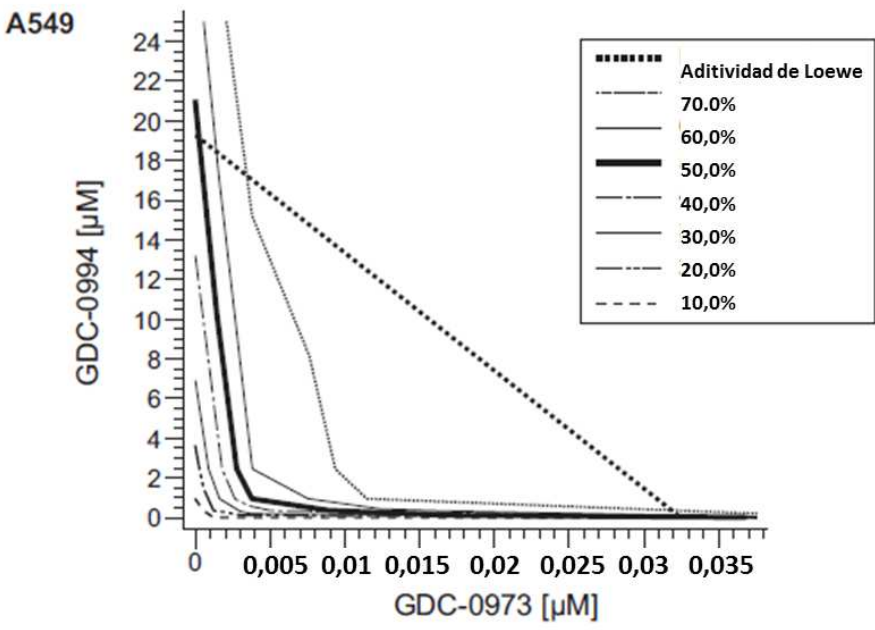


FIG. 13C

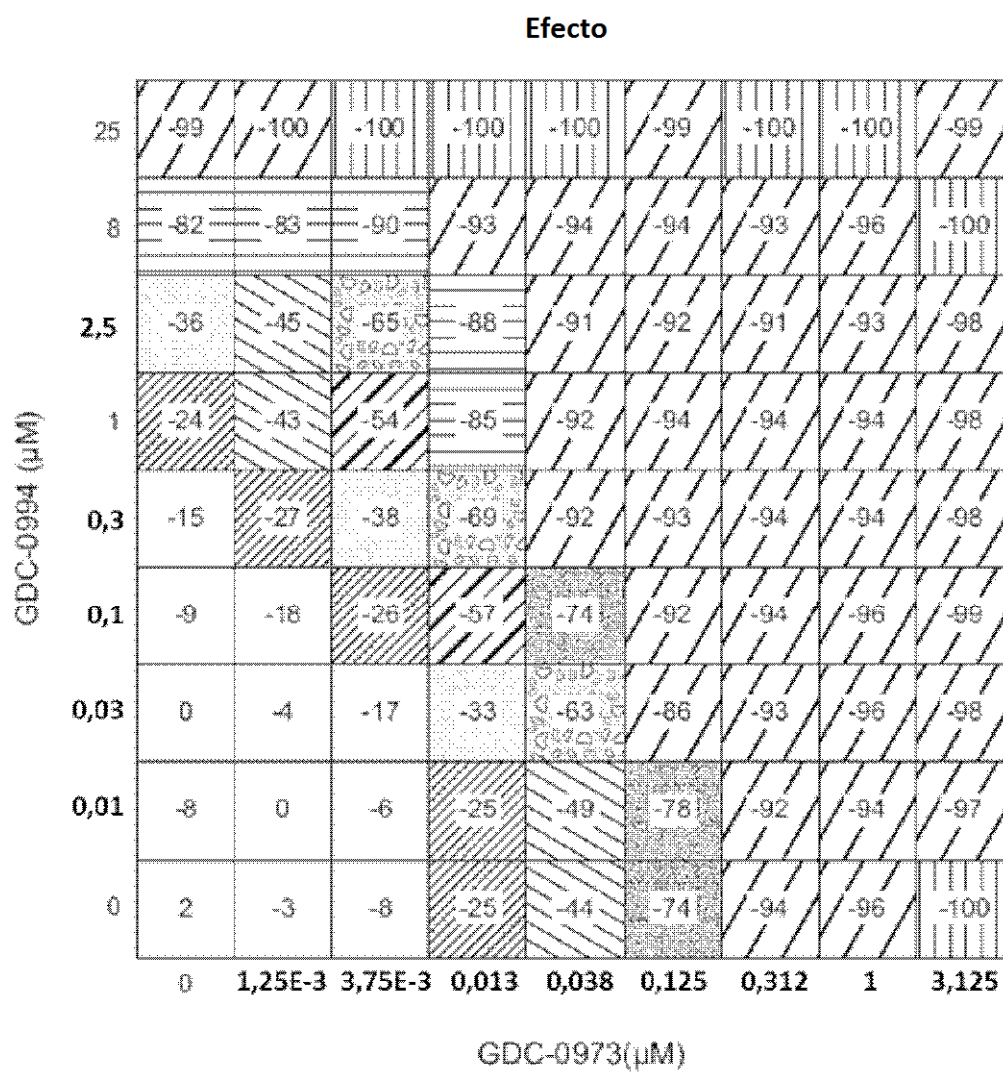


**FIG. 13B-1**

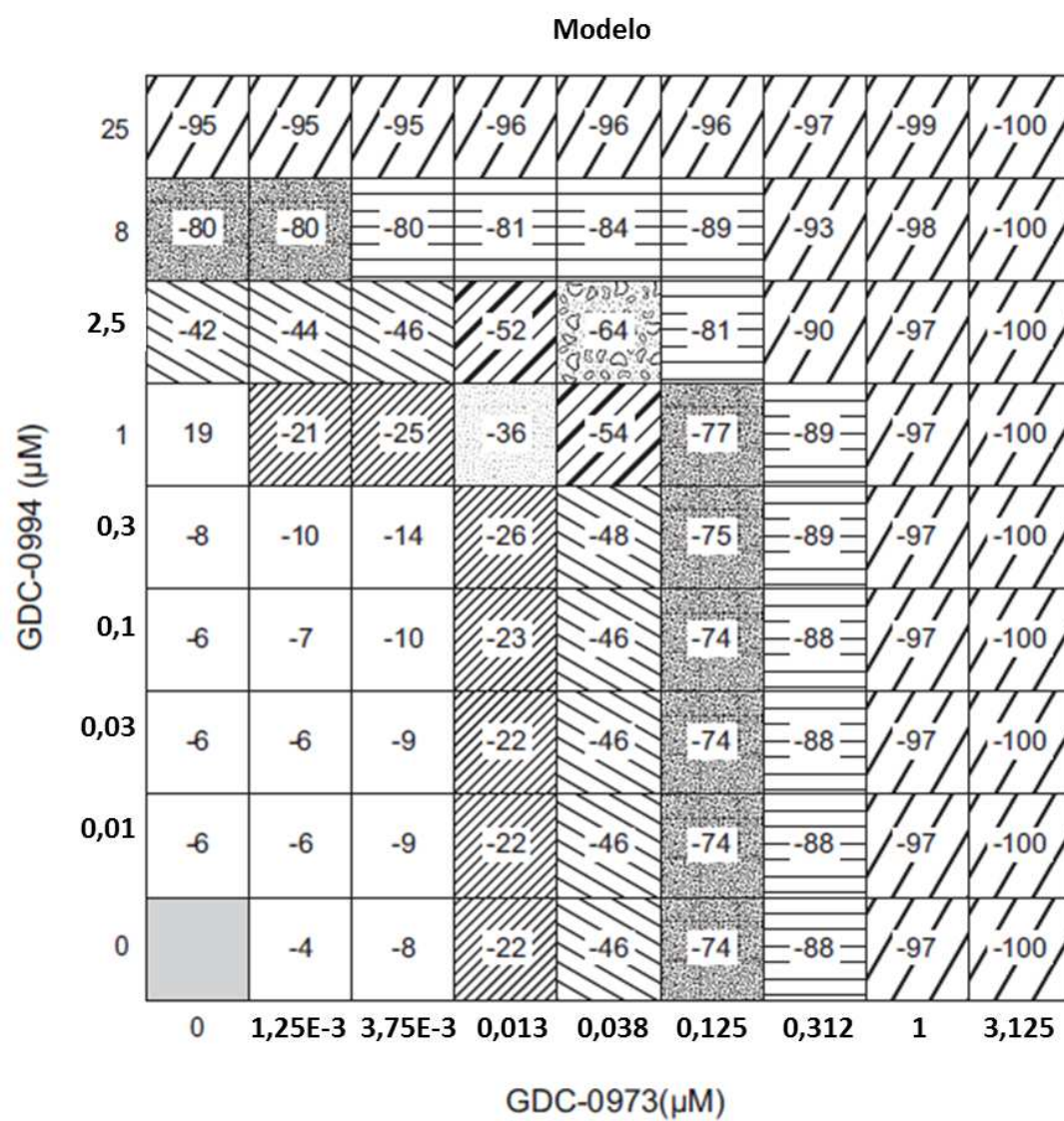


**FIG. 13B-2**

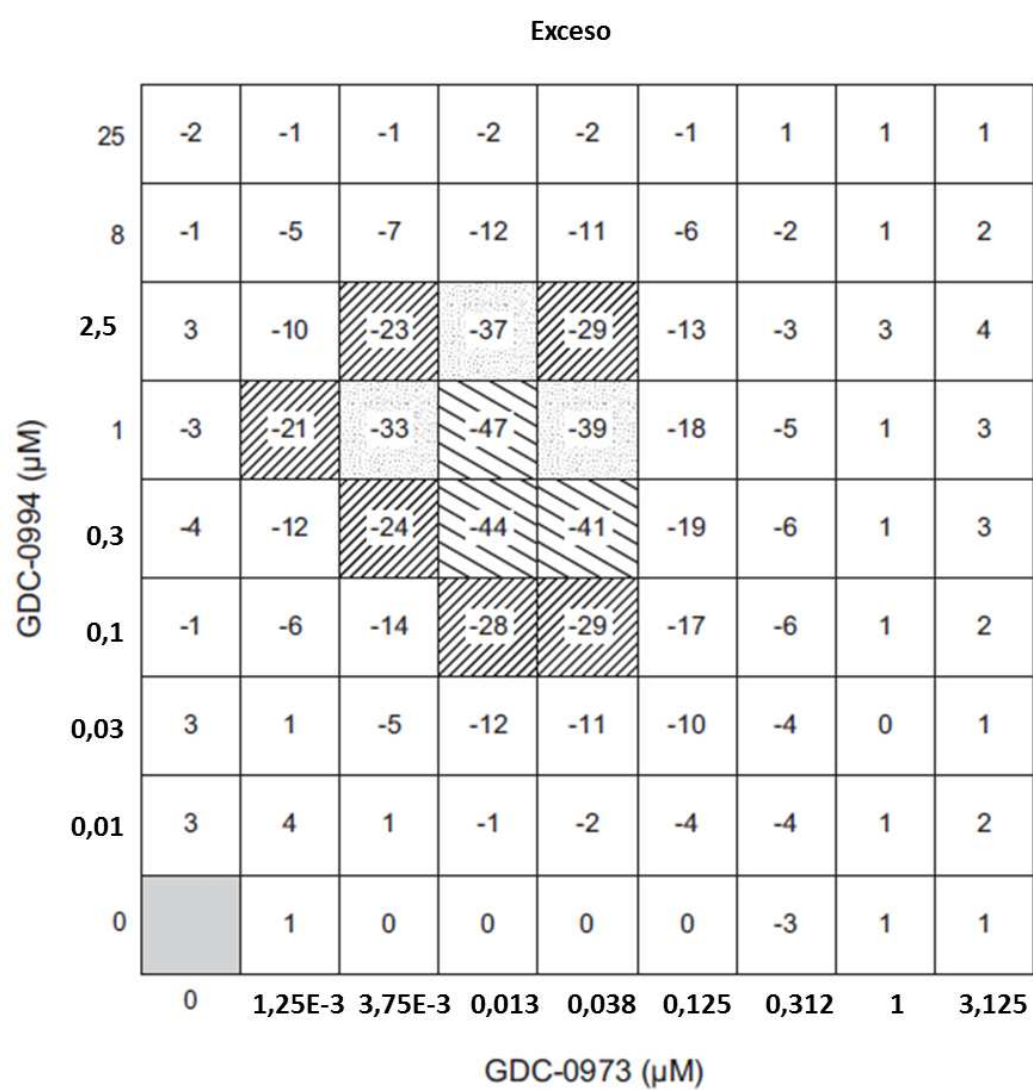


**FIG. 13B-3**

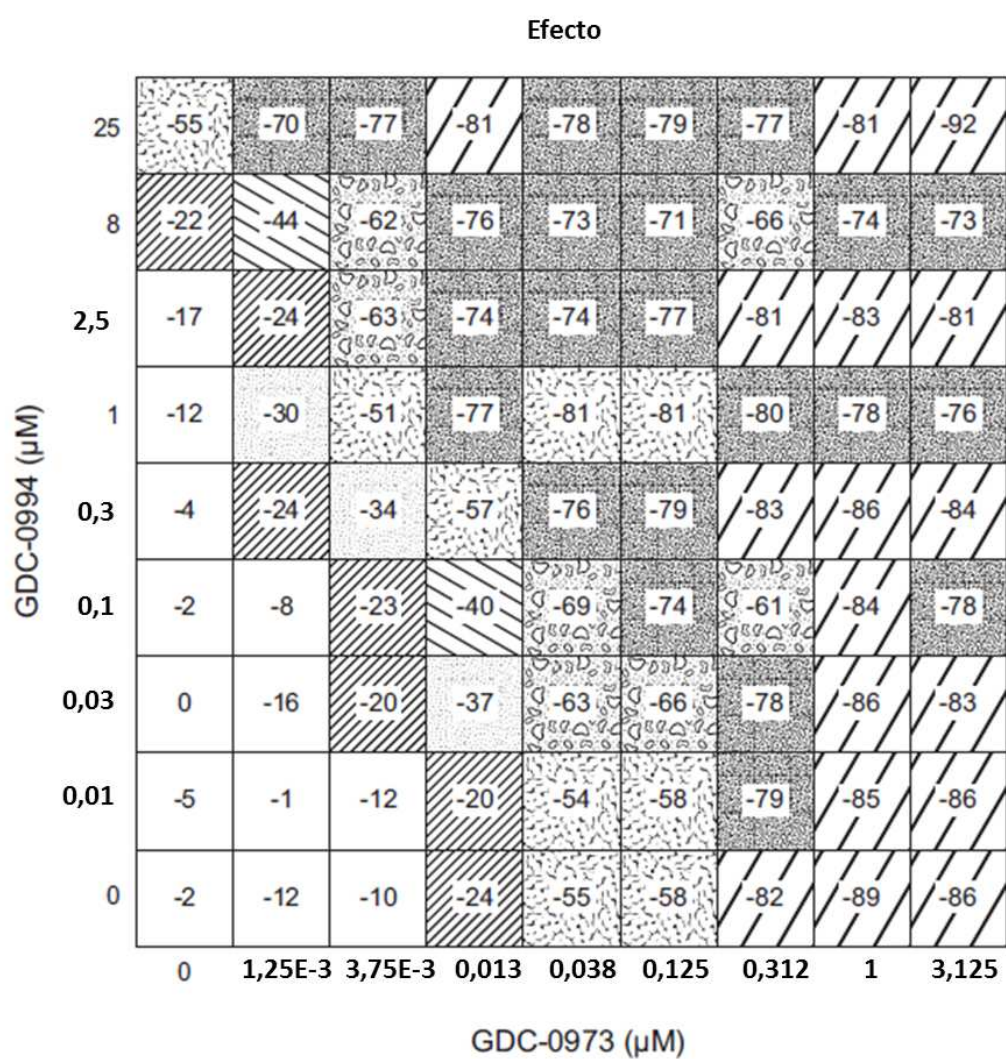


**FIG. 13D-1**

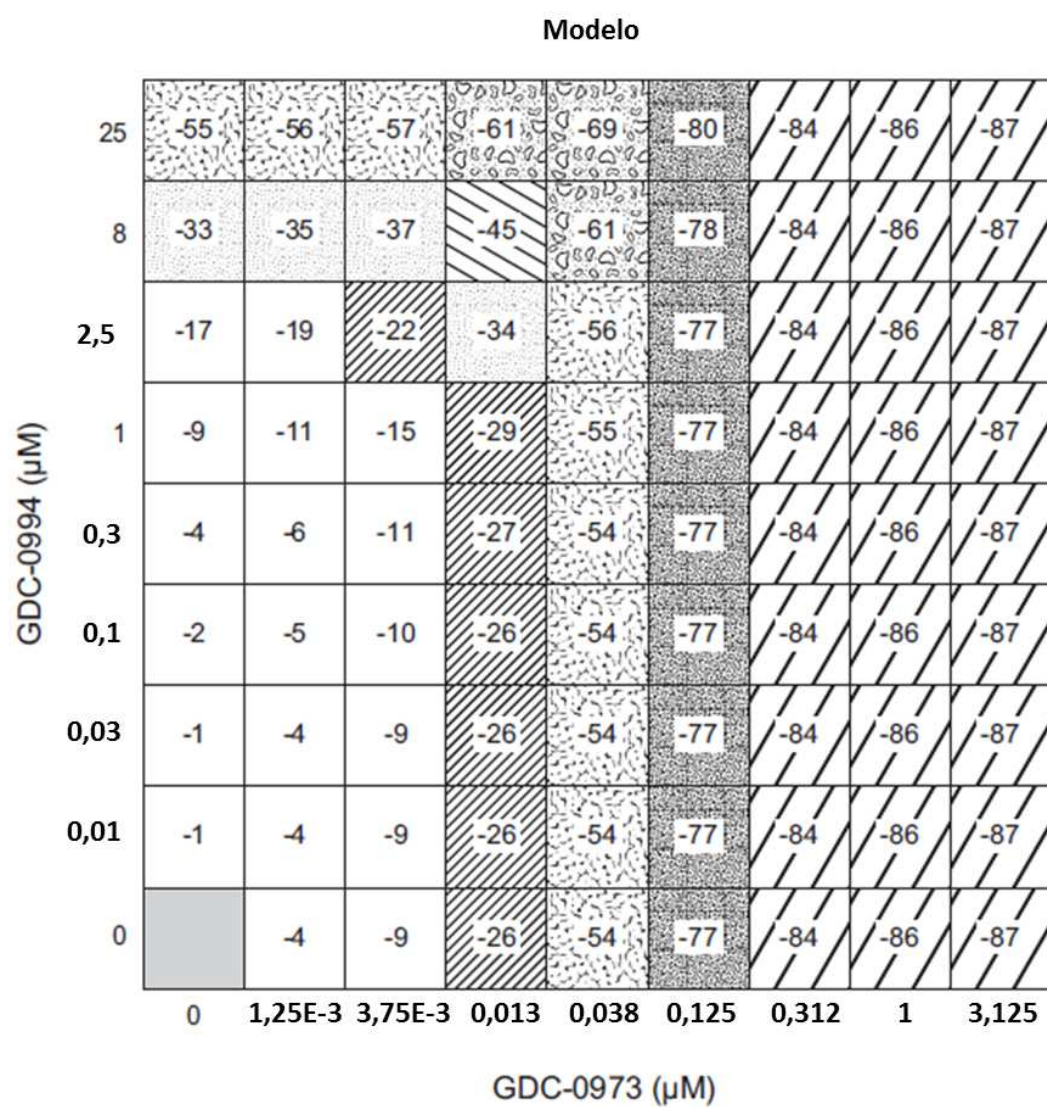


**FIG. 13D-2**

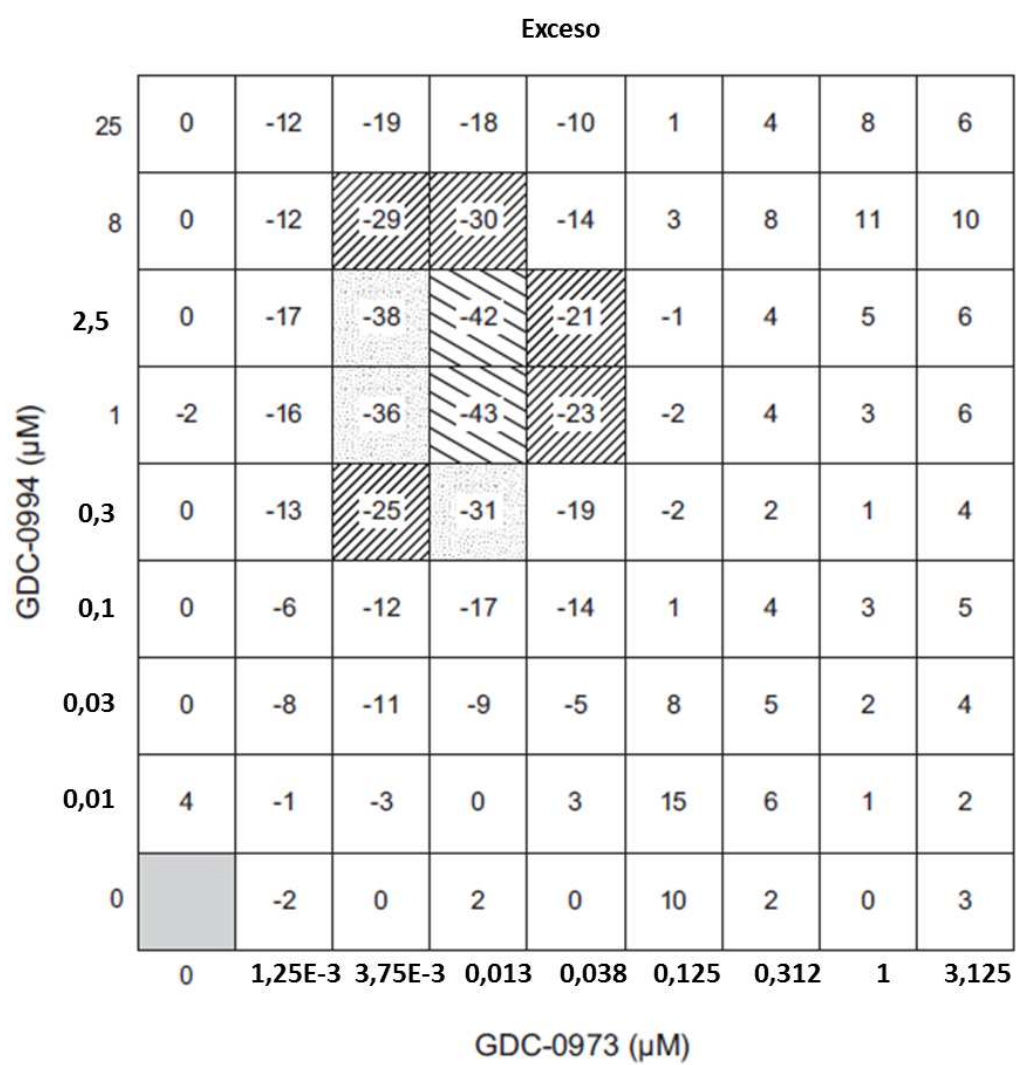


**FIG. 13D-3**