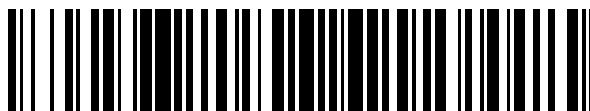


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 916**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012** **E 12705608 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2675451**

54 Título: **Terapia de combinación de inhibidores de mTOR/JAK**

30 Prioridad:

18.02.2011 US 201161444581 P

01.07.2011 US 201161503789 P

01.07.2011 US 201161503785 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2015

73 Titular/es:

NOVARTIS PHARMA AG (50.0%)

Postfach

4002 Basel, CH y

INCYTE CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

VANNUCCHI, ALESSANDRO M.;

BOGANI, COSTANZA y

GUGLIELMELLI, PAOLA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 547 916 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación de inhibidores de mTOR/JAK

5 Antecedentes

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son un grupo de trastornos que producen una sobreproducción de glóbulos sanguíneos (plaquetas, glóbulos blancos y glóbulos rojos) en la médula ósea. Las NMP incluyen policitemia verdadera (PV), trombocitemia primaria o esencial (TE), mielofibrosis primaria o idiopática, leucemia mielógena (mielocítica) crónica (LMC), leucemia neutrófila crónica (LNC), leucemia mielomonocítica juvenil (LMJ) y leucemia eosinófila crónica (LEC)/síndrome hipereosinofílico (SHE). Estos trastornos se agrupan juntos debido a que comparten algunas o todas de las siguientes características: participación de una célula progenitora hematopoyética multipotente, dominancia del clon transformado con respecto a las células progenitoras hematopoyéticas no transformadas, sobreproducción de uno o más linajes hematopoyéticos en ausencia de un estímulo definible, formación de colonias independiente del factor de crecimiento *in vitro*, hiperplasia de la médula ósea, hiperplasia y displasia de megacariocitos, anomalías que implican predominantemente a los cromosomas 1, 8, 9, 13 y 20, diátesis trombótica y hemorrágica, hematopoyesis extramedular exuberante y transformación espontánea a leucemia aguda o desarrollo de fibrosis de la médula ósea, pero a una baja tasa, en comparación con la tasa en LMC. La incidencia de NMP varía ampliamente, oscilando de aproximadamente 3 por cada 100.000 individuos mayores de 60 años anualmente para LMC a 0,13 por cada 100.000 niños desde el nacimiento hasta los 14 años anualmente para LMJ (Vardiman JW et al., Blood 100 (7): 2292-302, 2002).

El documento US20080312259 y MESA RUBEN A ET AL.: "Emerging drugs for the therapy of primary and post essential thrombocythemia, post polycythemia vera mielofibrosis", EXPERT OPINION ON EMERGING DRUGS ENGLAND, vol. 14, Nº 3, 1 de septiembre de 2009 (01-09-2009), páginas 471-479, desvelan (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (compuesto I, ruxolitinib, o INCB018424) para su uso en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos (TMP) tales como policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (SHE), enfermedad sistémica de mastocitos (ESM), trombocitemia primaria y post-esencial, mielofibrosis post-policitemia verdadera.

VANNUCCHI ALESSANDRO M ET AL.: "RAD001, An Inhibitor of mTOR, Shows Clinical Activity in a Phase I/II Study in Patients with Primary Myelofibrosis (MFP) and Post Polycythemia Vera/Essential Thrombocythemia Myelofibrosis (PPV/PET MF)", BLOOD, vol. 114 Nº 22, noviembre de 2009 (11-2009), VANNUCCHI ALESSANDRO M ET AL.: "The mTOR Inhibitor, RAD001, Inhibits the Growth of Cells From Patients with Myeloproliferative Neoplasms", BLOOD; 51 ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US; NEW ORLEANS, US, vol. 114 Nº 22, 20 de noviembre de 2009 (20-11-2009), página 1139, JANES MATTHEW R ET AL.: "Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor", NATURE MEDICINE FEB 2010 LNKD-PUBMED:20072130, vol. 16 Nº 2, febrero de 2010 (02-2010), páginas 205-213, y MANCINI MANUELA ET AL.: "RAD 001 (everolimus) prevents mTOR and Akt late re-activation in response to imatinib in chronic myeloid leukemia", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 1 FEB 2010 LNKD-PUBMED:20014066, vol. 109 Nº 2, febrero de 2010 (01-02-2010), páginas 320-328, desvelan los inhibidores de mTOR everolimus (RAD001) y 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242) para el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas, tales como mielofibrosis primaria y mielofibrosis post-policitemia verdadera/trombocitemia esencial, leucemia mieloide crónica.

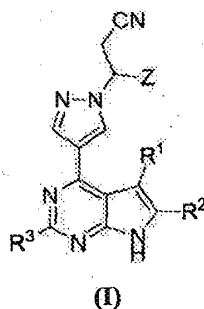
Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de nuevos tratamientos de NMP, además de otros cánceres.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Materias que no están englobadas por el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención reivindicada.

En el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK como se definen en las reivindicaciones adjuntas. La terapia de combinación es útil para el tratamiento de una variedad de cánceres, que incluyen NMP. La terapia de combinación también es útil para el tratamiento de cualquier número de enfermedades asociadas a JAK.

Por consiguiente, en un aspecto, en el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK como se definen en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, el inhibidor de JAK tiene la fórmula general expuesta en la fórmula I:



o estereoisómeros, tautómeros, racematos, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una composición que comprende un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK. En una realización particular, el compuesto de fórmula I es (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (compuesto A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, el inhibidor de JAK es 5-cloro-N²-[(1S)-1-(5-fluoropirimidin-2-il)etil]-N⁴-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-pirimidin-2,4-diamina (AZD1480), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otra realización el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001) o 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242).

En una realización particular, la terapia de combinación comprende everolimus y el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización particular, la terapia de combinación comprende PP242 y el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización de la terapia de combinación proporcionada en el presente documento, el inhibidor de mTOR y el inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) como se definen en las reivindicaciones adjuntas están en una única formulación o forma de dosificación unitaria. La formulación única o forma de dosificación unitaria puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el inhibidor de mTOR y el inhibidor de JAK se administran por separado.

La terapia de combinación proporcionada en el presente documento es útil para el tratamiento de una enfermedad asociada a JAK en un sujeto. Por consiguiente, en un aspecto, en el presente documento se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)). En una realización, el cáncer es una neoplasia mieloproliferativa. Ejemplos no limitantes de neoplasias mieloproliferativas que pueden tratarse usando la terapia de combinación de la invención incluyen, pero no se limitan a, leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria o idiopática (MFP), leucemia neutrófila crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica y leucemia mielógena crónica atípica. En otra realización, la terapia de combinación puede usarse para el tratamiento de mielofibrosis de riesgo intermedio o alto, que incluye mielofibrosis primaria, mielofibrosis post-policitemia verdadera o mielofibrosis post-trombocitemia esencial.

En una realización de estos métodos de tratamiento, el sujeto es humano. En otra realización, el tratamiento comprende co-administrar un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) como se definen en las reivindicaciones adjuntas. En otra realización, el inhibidor de mTOR y el inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) están en una formulación única o forma de dosificación unitaria. El inhibidor de mTOR y el inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) pueden estar en formulaciones separadas o formas de dosificación unitaria. En otra realización adicional, el tratamiento comprende administrar el inhibidor de mTOR y el inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) sustancialmente a la vez, o momentos diferentes. En otra realización, el inhibidor de mTOR se administra al sujeto, seguido de administración del inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)). En otra realización adicional, el inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) se administra al sujeto, seguido de administración del inhibidor de mTOR. En otra realización del método, el inhibidor de mTOR y/o el inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) se administran en cantidades que no serían eficaces cuando uno o ambos del inhibidor de mTOR y el

inhibidor de JAK (por ejemplo, un compuesto de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se administraran solos, pero cantidades que son eficaces en combinación.

La terapia de combinación proporcionada en el presente documento también es útil para inhibir la fosforilación de STAT5. La fosforilación de STAT5 puede inhibirse en un sujeto en necesidad de la misma. En una realización, la inhibición de la fosforilación de STAT5 en un sujeto trata una neoplasia mieloproliferativa en el sujeto. La neoplasia mieloproliferativa puede seleccionarse del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria o idiopática (MFP), leucemia neutrófila crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica y leucemia mielógena crónica atípica.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para tratar una neoplasia mieloproliferativa que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo everolimus y el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para tratar una neoplasia mieloproliferativa que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo PP242 y el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización de estos aspectos, la neoplasia mieloproliferativa es mielofibrosis primaria, mielofibrosis post-policitemia verdadera o mielofibrosis post-trombocitemia esencial.

Breve descripción de dibujos

Las Figuras 1A - 1E muestran el efecto de inhibidores de mTOR seleccionados, un inhibidor de JAK1/JAK2, inhibidores de histona desacetilasa e hidroxiurea sobre la apoptosis celular y el ciclo celular en células SET2 o HEL.

La Figura 2 muestra el efecto de inhibidores de mTOR seleccionados, un inhibidor de JAK1/JAK2, inhibidores de histona desacetilasa e hidroxiurea sobre la señalización de mTOR y JAK/STAT en células SET2.

Descripción detallada

Se ha descubierto que administrar una combinación de un inhibidor de mTOR y un inhibidor de cinasas JAK (por ejemplo, un inhibidor de cinasas JAK de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)) como se define en las reivindicaciones adjuntas proporciona sorprendentes efectos sinérgicos para tratar cáncer, por ejemplo, neoplasias mieloproliferativas (NMP), en un sujeto. Un enfoque tal - combinación o co-administración de los dos tipos de agentes - puede ser útil para tratar individuos que padecen cáncer que no responden o son resistentes a las terapias actualmente disponibles. La terapia de combinación proporcionada en el presente documento también es útil para mejorar la eficacia y/o reducir los efectos secundarios de las terapias para el cáncer actualmente disponibles para individuos que responden a tales terapias.

Ciertos términos usados en el presente documento se describen a continuación. Los compuestos de la presente invención se describen usando nomenclatura estándar. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Combinación de inhibidor de mTOR / inhibidor de JAK

En el presente documento se proporciona una combinación de agentes terapéuticos y métodos de administración para la combinación de agentes para tratar cáncer, por ejemplo, NMP. Como se usa en el presente documento, una "combinación de agentes" y términos similares se refiere a una combinación de dos tipos de agentes: (1) un inhibidor de mTOR y (2) un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de cinasas JAK de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo)).

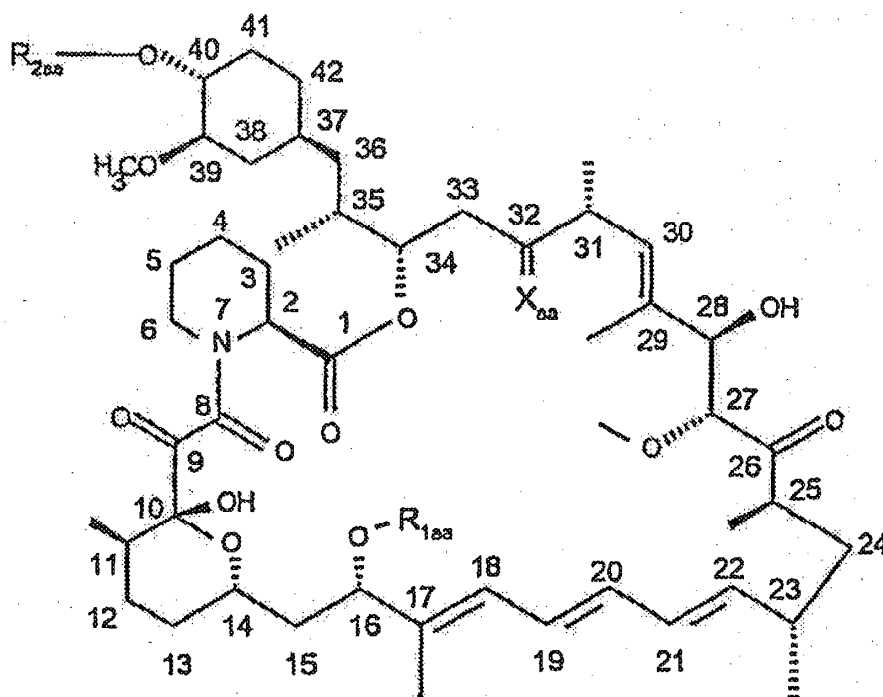
La diana de mamífero de la rapamicina, comúnmente conocida como mTOR, es una proteína cinasa serina/treonina que regula el crecimiento celular, proliferación celular, motilidad celular, supervivencia celular, síntesis de proteínas y transcripción. mTOR es un producto intermedio clave en múltiples vías de señalización mitogénicas y desempeña una función central en la modulación de la proliferación y angiogénesis en tejidos normales y procesos neoplásicos. La hiperactivación de la señalización de mTOR participa en la tumorigénesis, y estudios en varios tipos de tumores sugieren que las propiedades antiproliferativas y antiangiogénicas de inhibidores de mTOR son útiles en terapia para el cáncer. mTOR existe dentro de dos complejos, mTORC1 y mTORC2. mTORC1 es sensible a análogos de la rapamicina (tales como temsirolimus o everolimus) y mTORC2 es ampliamente insensible a la rapamicina. Se han evaluado o están siendo evaluados varios inhibidores de mTOR en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de mTOR" se refiere a un compuesto o un ligando que inhibe al menos una actividad de un mTOR, tal como la actividad de la proteína cinasa serina/treonina sobre al menos uno de sus sustratos (por ejemplo, p70S6 cinasa 1, 4E-BP1, AKT/PKB y eEF2). Un experto en la materia puede determinar fácilmente si un compuesto, tal como rapamicina o un análogo o derivado de la misma, es un inhibidor de mTOR. Métodos de identificación de tales compuestos o ligandos se conocen en la técnica. Ejemplos de inhibidores

de mTOR incluyen, sin limitación, rapamicina (sirolimus), derivados de rapamicina, CI-779, everolimus (Certican[™]), ABT-578, tacrolimus (FK 506), ABT-578, AP-23675, BEZ-235, OSI-027, QLT-0447, ABI-009, BC-210, salirasib, TAFA-93, deforolimus (AP-23573), temsirolimus (Torisel[™]), 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242) y AP-23841.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor selectivo de mTOR" se refiere a un compuesto o un ligando que inhibe la actividad de mTOR, pero no inhibe la actividad de PI3K. Inhibidores selectivos de mTOR adecuados incluyen RAD001. Por consiguiente, en un aspecto, en el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende un inhibidor selectivo de mTOR y un inhibidor de JAK.

La rapamicina es un antibiótico macrólido conocido producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Derivados adecuados de la rapamicina incluyen, por ejemplo, compuestos de fórmula II:



II

en la que

R_{1aa} es CH₃ o alquililo C₃₋₆,

R_{2aa} es H o -CH₂-CH₂-OH, 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metil-propanoilo o tetrazolilo, y

X_{aa} es =O, (H,H) o (H,OH)

o un profármaco de los mismos cuando R_{2aa} es -CH₂-CH₂-OH, por ejemplo, un éter fisiológicamente hidrolizable del mismo.

Los compuestos de fórmula II se desvelan, por ejemplo, en los documentos WO 94/09010, WO 95/16691, WO 96/41807, la patente de EE.UU. N° 5.362.718 y el documento WO 99/15530.

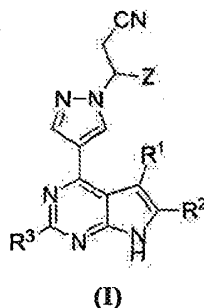
Derivados de rapamicina representativos de fórmula II son, por ejemplo, 32-desoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32-desoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S o R)-dihidro-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S o R)-dihidro-40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también llamada CCI779) o 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (también llamada ABT578). Los derivados de rapamicina también pueden incluir los llamados rapálogos, por ejemplo, como se desvelan en los documentos WO 98/02441 y WO 01/14387, por ejemplo, AP23573, AP23464, AP23675 o AP23841. Otros ejemplos de un derivado de rapamicina son los desvelados bajo el nombre TAFA-93 (un profármaco de rapamicina), biolimus-7 o biolimus-9.

En una realización preferida, el inhibidor de mTOR usado en la terapia de combinación proporcionada en el presente documento es everolimus (RAD001) o 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242) (véase, por ejemplo, Apsel et al., Nature Chemical Biology 4, 691-699 (2008)).

La familia de JAK desempeña una función en la regulación dependiente de citocinas de la proliferación y función de células que participan en la respuesta inmunitaria. Actualmente, hay cuatro miembros de la familia de JAK de mamífero conocidos: JAK1 (también conocida como cinasa de Janus-1), JAK2 (también conocida como cinasa de Janus-2), JAK3 (también conocida como cinasa de Janus, leucocito; JAKL; L-JAK y cinasa de Janus-3) y TYK2 (también conocida como proteína-tirosina cinasa 2). Las proteínas JAK oscilan en tamaño de 120 a 140 kDa y comprenden siete dominios de homología de JAK (JH) conservados; uno de éstos es un dominio de cinasa catalítico funcional, y otro es un dominio de pseudocinasa que posiblemente sirve a una función reguladora y/o que sirve a un sitio de enlace para STAT (Scott, M. J., C. J. Godshall, et al. (2002) Clin Diagn Lab Immunol 9(6): 1153-9).

Como se usa en el presente documento, un "inhibidor de JAK" se refiere a un compuesto o un ligando que inhibe al menos una actividad de una cinasa JAK. Un "inhibidor de JAK" también puede ser un "inhibidor de JAK1/JAK2". En ciertas realizaciones, el inhibidor de JAK induce un estado inhibido por JAK. Ejemplos de inhibidores de JAK incluyen compuestos de fórmula I y AZD1480.

El compuesto de fórmula I se define como sigue:



o estereoisómeros, tautómeros, racematos, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que

R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo C_{1-4} ; y
Z es cicloalquilo C_{3-6} (por ejemplo, ciclopentilo).

Ejemplos de compuestos de fórmula I incluyen los compuestos descritos en la patente de EE.UU. Nº 7.598.257. Métodos de preparación de los compuestos de fórmula I, que incluyen el compuesto A, pueden encontrarse en la patente de EE.UU. Nº 7.598.257 y la publicación PCT WO/2010/083283 (PCT/US2010/021003).

En una realización particular, el compuesto de fórmula I es 3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el compuesto de fórmula I es (3R)-3-ciclopeptil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (compuesto A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización adicional, el compuesto de fórmula I es (3S)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La síntesis de estos compuestos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 7.598.257 y la publicación PCT WO/2010/083283 (PCT/US2010/021003).

En otra realización, el compuesto de fórmula I es la sal del ácido maleico de (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo. En otra realización adicional, el compuesto de fórmula I es la sal del ácido sulfúrico de (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo. En otra realización más, el compuesto de fórmula I es la sal del ácido fosfórico de (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo ("sal del ácido fosfórico del compuesto A"). La síntesis de estos compuestos se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. Nº 12/137.892.

En una realización, en el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende la sal del ácido fosfórico del compuesto A y un inhibidor de mTOR, por ejemplo, everolimus o PP242.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquilo C_x-C_y ", en la que x es 1-5 e y es 2-10, indica un grupo alquilo particular (cadena ligera o ramificada) de un intervalo particular de carbonos. Por ejemplo, la expresión alquilo C_1-C_4 incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, terc-butilo e isobutilo.

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo C_{3-6} " se refiere a grupos de hidrocarburo monocíclicos o bicíclicos, saturados o insaturados, de 3-6 átomos de carbono, preferentemente 5 átomos de

carbono. Grupos de hidrocarburo monocíclico a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo.

El término "halógeno" o "halo" se refiere a grupos cloro, bromo, flúor y yodo.

Los agentes pueden contener uno o más elementos asimétricos tales como centros estereogénicos o ejes estereogénicos, por ejemplo, átomos de carbono asimétricos, de manera que los compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. Estos compuestos pueden ser, por ejemplo, racematos o formas ópticamente activas. Para compuestos con dos o más elementos asimétricos, estos compuestos pueden ser adicionalmente mezclas de diaestereómeros. Para los compuestos que tienen centros asimétricos, debe entenderse que están englobados todos los isómeros ópticos y mezclas de los mismos. Además, pueden producirse compuestos con dobles enlaces carbono-carbono en formas Z y E; todas las formas isoméricas de los compuestos están incluidas en la presente invención. En estas situaciones, los enantiómeros individuales (formas ópticamente activas) pueden obtenerse por síntesis asimétrica, síntesis a partir de precursores ópticamente puros, o por resolución de los racematos. La resolución de los racematos también puede llevarse a cabo, por ejemplo, por métodos convencionales tales como cristalización en presencia de un agente de resolución, o cromatografía, usando, por ejemplo, una columna de HPLC quiral.

A menos que se especifique de otro modo, o se indique claramente por el texto, referencia a compuestos útiles en la terapia de combinación de la invención incluyen tanto la base libre de los compuestos como todas las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos.

Como se usa en el presente documento, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales de ácidos o de metales alcalinotérreos no tóxicas de los compuestos de pirimidina de la invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de pirimidina, o haciendo reaccionar por separado las funciones de base o de ácido con un ácido o base orgánico o inorgánico adecuado, respectivamente. Sales representativas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemi-sulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Por tanto, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. Así se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite.

Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico, ácido cítrico, y aminoácidos tales como ácido aspártico y ácido glutámico.

En el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, el inhibidor de JAK de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo). La administración de la combinación (es decir, una combinación de un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, el inhibidor de JAK de fórmula I (por ejemplo, el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) incluye la administración de la combinación en una única formulación o forma de dosificación unitaria, administración de los agentes individuales de la combinación simultáneamente pero por separado, o administración de los agentes individuales de la combinación secuencialmente por cualquier vía adecuada. La dosificación de los agentes individuales de la combinación puede requerir administración más frecuente de uno del (de los) agente(s) en comparación con el (los) otro(s) agente(s) en la combinación. Por tanto, para permitir la dosificación apropiada, los productos farmacéuticos envasados pueden contener una o más formas de dosificación que contienen la combinación de agentes, y una o más formas de dosificación que contienen una de la combinación de agentes, pero no el (los) otro(s) agente(s) de la combinación.

El término "formulación individual", como se usa en el presente documento, se refiere a un excipiente o vehículo individual formulado para administrar cantidades eficaces de ambos agentes terapéuticos a un paciente. El vehículo individual se diseña para administrar una cantidad eficaz de cada uno de los agentes, junto con cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo es un comprimido, cápsula, píldora, o un parche. En otras realizaciones, el vehículo es una disolución o una suspensión.

El término "dosis unitaria" se usa en el presente documento para indicar la administración simultánea de ambos agentes juntos, en una forma de dosificación, al paciente que está tratándose. En algunas realizaciones, la dosis

unitaria es una formulación individual. En ciertas realizaciones, la dosis unitaria incluye uno o más vehículos de forma que cada vehículo incluye una cantidad eficaz de al menos uno de los agentes junto con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es uno o más comprimidos, cápsulas, píldoras o parches administrados al paciente al mismo tiempo.

El término "tratar" se usa en el presente documento para significar mitigar, reducir o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto. Dentro del significado de la presente invención, el término "tratar" también indica detener, retrasar la aparición (es decir, el periodo antes de la manifestación clínica de una enfermedad o síntoma de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollar o empeorar un síntoma de una enfermedad.

El término "sujeto" pretende incluir animales. Ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que padece, está en riesgo de padecer, o que potencialmente puede padecer cáncer, por ejemplo, neoplasias mieloproliferativas.

El término "aproximadamente" normalmente significa dentro del 20 %, más preferentemente dentro del 10 %, y lo más preferentemente todavía dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Alternativamente, especialmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un logaritmo (es decir, un orden de magnitud), preferentemente dentro de un factor de dos de un valor dado.

El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección terapéutica o trastorno descrito en la presente divulgación. Tal administración engloba la co-administración de estos agentes terapéuticos de una forma sustancialmente simultánea, tal como en una cápsula individual que tiene una relación fija de principios activos o en múltiples recipientes o en recipientes separados (por ejemplo, cápsulas) para cada principio activo. Además, tal administración también engloba el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial, tanto aproximadamente a la misma vez como en momentos diferentes. En cualquier caso, la pauta de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de las afecciones o trastornos descritos en el presente documento.

La combinación de agentes descrita en el presente documento muestra un efecto sinérgico. El término "efecto sinérgico", como se usa en el presente documento, se refiere a la acción de dos agentes tales como, por ejemplo, un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I), que produce un efecto, por ejemplo, ralentizamiento de la progresión sintomática del cáncer o síntomas del mismo, que es mayor que la simple adición de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. Un efecto sinérgico puede calcularse, por ejemplo, usando métodos adecuados tales como la ecuación de Emáx sigmoide (Holford, N. H. G. y Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación de la mediana del efecto (Chou, T. C. y Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación citada anteriormente puede aplicarse a datos experimentales para generar un gráfico correspondiente para ayudar en la evaluación de los efectos de la combinación de fármacos. Los gráficos correspondientes asociados a las ecuaciones citadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, curva de isoblograma y la curva del índice de combinación, respectivamente.

En una realización, en el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de JAK y un inhibidor de mTOR. Una "cantidad eficaz" de una combinación de agentes (es decir, un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I)) es una cantidad suficiente para proporcionar una mejora observable con respecto a los signos y síntomas clínicamente observables iniciales de los trastornos tratados con la combinación.

Una "forma de dosificación oral" incluye una forma de dosificación unitaria recetada o prevista para administración por vía oral.

Métodos de tratamiento usando una combinación de inhibidor de mTOR / inhibidor de JAK

La invención proporciona un método para tratar enfermedades asociadas a JAK, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, neoplasias mieloproliferativas, en un individuo administrando al individuo una combinación de un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I).

En una realización, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad asociada a JAK o trastorno en un sujeto (por ejemplo, paciente) administrando al individuo en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis de una combinación de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma. Una enfermedad asociada a JAK puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que esté directa o indirectamente asociada a la expresión o actividad de JAK, que incluye niveles de expresión en exceso y/o de actividad anormal. Una enfermedad asociada a JAK también puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que pueda prevenirse, mejorar o curar modulando la actividad de JAK.

Ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades que implican el sistema inmunitario que incluyen, por ejemplo, rechazo de trasplante de órgano (por ejemplo, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped).

Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, diabetes de tipo I, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia grave, nefropatías por inmunoglobulina, trastornos tiroideos autoinmunes y similares. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno de la piel ampolloso autoinmune tal como pénfigo vulgar (PV) o penfigoide ampolloso (PA).

Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen afecciones alérgicas tales como asma, alergias alimentarias, dermatitis atópica y rinitis. Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades virales tales como virus de Epstein Barr (VEB), hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV I, virus de la varicela zóster (VZV) y virus del papiloma humano (VPH).

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas a JAK incluyen trastornos de la piel tales como psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgar), dermatitis atópica, erupción cutánea, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis de contacto o dermatitis alérgica de contacto). Por ejemplo, ciertas sustancias que incluyen algunos productos farmacéuticos cuando se aplican tópicamente pueden producir sensibilización de la piel. En algunas realizaciones, el trastorno de la piel se trata por administración tópica de la terapia de combinación.

En otras realizaciones, la enfermedad asociada a JAK es cáncer que incluye aquellos caracterizados por tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de la cabeza y el cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman, leiomiomasarcoma uterino, melanoma, etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda o mieloma múltiple) y cáncer de piel tal como linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT) y linfoma cutáneo de linfocitos B. Linfomas cutáneos de linfocitos T de ejemplo incluyen síndrome de Sezary y micosis fungoide.

Las enfermedades asociadas a JAK pueden incluir adicionalmente aquellas caracterizadas por la expresión de una JAK2 mutante tal como aquellas que tienen al menos una mutación en el dominio de pseudo-cinasa (por ejemplo, JAK2V617F).

Enfermedades asociadas a JAK pueden incluir adicionalmente trastornos mieloproliferativos (TMP) tales como policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mielóide con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (SHE), enfermedad sistémica de mastocitos (ESM) y similares.

Otras enfermedades asociadas a JAK incluyen inflamación y enfermedades inflamatorias. Enfermedades inflamatorias de ejemplo incluyen enfermedades inflamatorias del ojo (por ejemplo, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis o enfermedad relacionada), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (por ejemplo, las vías respiratorias superiores que incluyen la nariz y los senos tales como rinitis o sinusitis o las vías respiratorias inferiores que incluyen bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y similares), miopatía inflamatoria tal como miocarditis, y otras enfermedades inflamatorias.

La terapia de combinación descrita en el presente documento puede usarse adicionalmente para tratar lesiones de isquemia-reperusión o una enfermedad o afección relacionada con un evento isquémico inflamatorio tal como accidente cerebrovascular o parada cardíaca. La terapia de combinación descrita en el presente documento puede usarse adicionalmente para tratar anorexia, caquexia o fatiga tal como la resultante de o asociada a cáncer. La terapia de combinación descrita en el presente documento puede usarse adicionalmente para tratar reestenosis, esclerodermis o fibrosis. La terapia de combinación descrita en el presente documento puede usarse adicionalmente para tratar afecciones asociadas a hipoxia o astrogliosis tales como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer o neurodegeneración. Véase, por ejemplo, Dudley, A. C. et al. *Biochem. J.* 2005, 390(Pt 2):427-36 y Sriram, K. et al. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(19):19936-47. Epub 2004 Mar 2.

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas, que incluyen policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), se caracterizan por una mutación puntual V617F en el exón 14 de la cinasa de Janus 2 (JAK2) que se produce en más del 95 % de los pacientes con PV y el 60 % de los pacientes con TE o MFP. Otras mutaciones del exón 12 de JAK2 se detectan en pacientes raros con PV, mientras que se ha informado de mutaciones en *MPL* en el 5-10 % de los pacientes con TE o MFP (Vannucchi AM, Guglielmelli, P, Tefferi, A. *Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms.* AC- A Cancer Journal for Clinicians. 2009;59:171-191). Estas anomalías moleculares están todas asociadas a la activación constitutiva de la vía de señalización de JAK/transductor de señal y activador de transcripción (STAT) y contribuyen a la hipersensibilidad de las citocinas y al crecimiento independiente de citocinas de células mutantes, como se ejemplifica por las colonias eritroides independientes de eritropoyetina (CEE). El trasplante de células hematopoyéticas que expresan en exceso JAK2V617F en ratones es suficiente para recapitular un fenotipo de PV, que en algunos modelos evolucionó a

mielofibrosis. También se ha obtenido un trastorno de NMP con el fenotipo de PV o TE en ratones activados condicionales. La disregulación de la vía de JAK/STAT está asociada al desarrollo de cánceres sólidos y hematológicos y mutantes de STAT5A o STAT5B constitutivamente activados (caSTAT5) muestran propiedades oncogénicas *in vitro* e *in vivo*. En total, JAK2 representa una diana terapéutica posiblemente valiosa en pacientes con NMP (ídem), como se respalda por los efectos en modelos murinos de NMP y la actual evidencia en ensayos clínicos.

La activación de otras vías aguas abajo mediante la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) se ha documentado en células mutadas JAK2V617F. La proteína cinasa serina/treonina B/Akt está aguas abajo de PI3K; es un regulador clave de muchos procesos celulares que incluyen supervivencia, proliferación y diferenciación celular, y está comúnmente disregulada en células cancerosas. Aunque la Akt resultó constitutivamente activada en células mutadas JAK2V617F *in vitro* y en ratones transgénicos o activados para V617F (Akada H, Yan D, Zou H, Fiering. S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. Blood. 2010;115:3589-3597), la contribución de la señalización de PI3K/Akt a la patogénesis de NMP está todavía muy poco caracterizada. Akt está fosforilada y se activa por PI3K en respuesta a la interacción con ligando del receptor de eritropoyetina (EPO) y tiene una función en la diferenciación eritroide normal. En particular, Akt puede soportar la diferenciación eritroide en células progenitoras de hígado fetal deficientes en JAK2 mediante un mecanismo aguas abajo de EpoR y al menos en parte relacionado con la fosforilación de GATA-1. Akt resultó activada en eritroblastos de la médula ósea o el bazo de ratones con alelo activado de JAK2V617F condicional, especialmente en animales homocigóticos para V617F. Se demostró fosforilación de STAT5 y Akt comparablemente elevada por inmunocitoquímica en la médula ósea de pacientes con NMP, particularmente en megacariocitos. La activación preferencial de Akt en megacariocitos puede reconciliarse con la fuerte inhibición de la proliferación de progenitores de megacariocitos humanos después del bloqueo de la señalización de mTOR por rapamicina. Además, inhibidores de molécula pequeña de la vía de JAK/STAT o PI3K/Akt causaron la inhibición comparable de la diferenciación eritroide espontánea e inducida por EPO en células progenitoras de PV cultivadas.

Por consiguiente, en una cierta realización, el cáncer que puede tratarse usando la combinación en el presente documento proporciona un trastorno mieloproliferativo. Los trastornos mieloproliferativos (TMP), denominados ahora comúnmente neoplasias mieloproliferativas (NMP), están en la clase de los tumores malignos hematológicos que son trastornos clónicos de progenitores hematopoyéticos. Tefferi, A. y Vardiman, J. W., Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms, Leukemia, septiembre de 2007, 22: 4-22; se incorpora por este documento por referencia. Se caracterizan por proliferación y supervivencia mejoradas de uno o más tipos de células de linaje mieloide maduro. Esta categoría incluye, pero no se limita a, leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria o idiopática (MFP), leucemia neutrófila crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica y leucemia mielógena crónica atípica. Tefferi, A. y Gilliland, D. G., Oncogenes in myeloproliferative disorders, Cell Cycle. March 2007, 6(5): 550-566, se incorpora por este documento completamente por referencia en su totalidad para todos los fines.

En otra realización, la terapia de combinación en el presente documento se proporciona útil para el tratamiento de mielofibrosis primaria, mielofibrosis post-policitemia verdadera, mielofibrosis post-trombocitemia esencial y leucemia mielógena aguda secundaria.

En otra realización, la terapia de combinación proporcionada en el presente documento puede usarse para tratar pacientes con mielofibrosis de riesgo intermedio o alto, que incluye mielofibrosis primaria, mielofibrosis post-policitemia verdadera y mielofibrosis post-trombocitemia esencial.

En algunas realizaciones, se determina que el sujeto que va a tratarse (por ejemplo, un ser humano) es no sensible o resistente a una o más terapias para trastornos mieloproliferativos.

En una realización particular, en el presente documento se proporciona un método para tratar una neoplasia mieloproliferativa en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende Everolimus y el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, en el presente documento se proporciona el uso de un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, un trastorno mieloproliferativo, por ejemplo, mielofibrosis de riesgo intermedio o alto que incluye mielofibrosis primaria, mielofibrosis post-policitemia verdadera y mielofibrosis post-trombocitemia esencial.

En otra realización, en el presente documento se proporciona un método para tratar una neoplasia mieloproliferativa en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende PP242 y el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar enfermedad, por ejemplo, un trastorno mieloproliferativo, administrando una cantidad eficaz de un compuesto de un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK a un individuo que padece una enfermedad. La cantidad de la combinación de agentes es eficaz para tratar la enfermedad. Es importante observar los efectos sinérgicos de la combinación de agentes: aún cuando uno o más de los agentes administrados solos a una dosificación particular pueden no ser eficaces, cuando se administran en combinación, a la misma dosificación de cada agente, el tratamiento es eficaz. Por tanto, las dosis del uno o más de los agentes en la combinación pueden ser inferiores a las dosis autorizadas por la FDA de cada agente.

Dosificaciones

La dosis óptima de la combinación de agentes para el tratamiento de enfermedad puede determinarse empíricamente para cada individuo usando métodos conocidos y dependerá de una variedad de factores, que incluyen, aunque no se limitan a, el grado de avance de la enfermedad; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del individuo; el momento y vía de administración; y otras medicaciones que está tomando el individuo. Pueden establecerse dosificaciones óptimas usando pruebas y procedimientos rutinarios que son muy conocidos en la técnica.

La cantidad de combinación de agentes que pueden combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del individuo tratado y el modo particular de administración. En algunas realizaciones, las formas de dosificación unitaria que contienen la combinación de agentes como se describen en el presente documento contendrán las cantidades de cada agente de la combinación que normalmente se administran cuando los agentes se administran solos.

La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo del compuesto usado y la afección particular que va a tratarse o prevenirse. En general, se prefiere el uso de la dosificación mínima que es suficiente para proporcionar terapia eficaz. Los pacientes pueden monitorizarse generalmente para eficacia terapéutica usando ensayos adecuados para la afección que se trata o previene, que será familiar para aquellos expertos habituales en la materia.

La forma de dosificación puede prepararse por diversas técnicas de mezcla, trituración y fabricación convencionales fácilmente evidentes para aquellos expertos en la química de formulaciones de fármacos.

La forma de dosificación oral que contiene la combinación de agentes o agentes individuales de la combinación de agentes puede estar en forma de micro-comprimidos encerrados dentro de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina. Para esto puede usarse una cápsula gelatina como se emplea en formulaciones farmacéuticas, tal como la cápsula de gelatina dura conocida como CAPSUGEL, disponible de Pfizer.

Muchas de las formas de dosificación orales útiles en el presente documento contienen la combinación de agentes o agentes individuales de la combinación de agentes en forma de partículas. Tales partículas pueden comprimirse en un comprimido, presente en un elemento de núcleo de una forma de dosificación recubierta, tal como una forma de dosificación de sabor enmascarado, una forma de dosificación recubierta comprimida, o una forma de dosificación recubierta entérica, o pueden estar contenidas en una cápsula, forma de dosificación de bomba osmótica, u otra forma de dosificación.

Los compuestos de fármaco de la presente invención (por ejemplo, un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK) están presentes en las combinaciones, formas de dosificación, composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas desveladas en el presente documento en una relación en el intervalo de 100:1 a 1:100. Por ejemplo, la relación de un compuesto de fórmula I : un inhibidor de mTOR puede estar en el intervalo de 1:100 a 1:1, por ejemplo, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2 o 1:1 de fórmula I: un inhibidor de mTOR. En otro ejemplo, la relación de un inhibidor de mTOR: un compuesto de fórmula I puede estar en el intervalo de 1:100 a 1:1, por ejemplo, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2 o 1:1 de un inhibidor de mTOR: un compuesto de fórmula I.

Las relaciones óptimas, dosificaciones individuales y combinadas y concentraciones de los compuestos de fármaco que dan eficacia sin toxicidad se basan en la cinética de la disponibilidad de los principios activos para sitios diana, y se determinan usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas o combinaciones proporcionadas en el presente documento (es decir, un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I)) pueden probarse en estudios clínicos. Estudios clínicos adecuados pueden ser, por ejemplo, estudios de aumento de dosis de etiqueta abierta en pacientes con enfermedades proliferativas. Tales estudios demuestran en particular la sinergia de los principios activos de la combinación de la invención. Los efectos beneficiosos sobre las enfermedades proliferativas pueden determinarse directamente mediante los resultados de estos estudios que son conocidos como tales para un experto en la materia. Tales estudios pueden ser, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia usando los principios activos y una combinación de la invención. En una realización, la dosis de un compuesto de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, everolimus (RAD001) o PP242, se aumenta hasta que se alcance la máxima

dosificación tolerada, y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I) se administra con una dosis fija. Alternativamente, un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I) puede administrarse en una dosis fija y la dosis del inhibidor de mTOR puede aumentarse. Cada paciente puede recibir dosis de los compuestos tanto diariamente como intermitentemente. La eficacia del tratamiento puede determinarse en tales estudios, por ejemplo, después de 12, 18 o 24 semanas por la evaluación de puntuaciones de síntomas cada 6 semanas.

La administración de una terapia de combinación de la invención puede producir no solo un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, por ejemplo, con respecto a aliviar, retrasar la progresión de o inhibir los síntomas, sino también efectos beneficiosos sorprendentes adicionales, por ejemplo, menos efectos secundarios, una calidad de vida mejorada o una disminución de la morbilidad, en comparación con una monoterapia aplicando solo uno de los principios farmacéuticamente activos usados en la combinación de la invención.

Otro beneficio puede ser que pueden usarse menores dosis de los principios activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que las dosificaciones no solo necesitan ser frecuentemente más pequeñas, sino que también pueden aplicarse menos frecuentemente, que puede disminuir la incidencia o gravedad de efectos secundarios. Esto está de acuerdo con los deseos y requisitos de los pacientes que van a tratarse.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que puede ser conjuntamente terapéuticamente eficaz en la elección como diana o prevención del cáncer, por ejemplo, un trastorno mieloproliferativo. En esta composición, un inhibidor de mTOR y un inhibidor de JAK (por ejemplo, un inhibidor de JAK de fórmula I) pueden administrarse juntos, uno después del otro o por separado, en una forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación unitaria separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas para administración separada de ambos compuestos, o para la administración en una combinación fija, es decir, una composición galénica individual que comprende ambos compuestos según la invención, pueden prepararse de un modo en sí conocido y son aquellas adecuadas para administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), que incluyen seres humanos, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un componente de combinación farmacológicamente activo solo, por ejemplo, como se indica anteriormente, o en combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para administración enteral o parenteral.

Formulaciones

Las combinaciones de fármaco proporcionadas en el presente documento pueden formularse mediante una variedad de métodos evidentes para aquellos expertos en la materia de la formulación farmacéutica. Las diversas propiedades de liberación descritas anteriormente pueden lograrse en una variedad de formas diferentes. Formulaciones adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, formulaciones de envoltura comprimida, y otras formulaciones fácilmente administradas.

Formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden contener, por ejemplo, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 99,9 %, preferentemente de aproximadamente el 1 %, a aproximadamente el 60 %, del (de los) principio(s) activo(s). Formulaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios o ampollas. Si no se indica de otro modo, éstas se preparan de un modo en sí conocido, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento de azúcar, disolución o liofilización. Se apreciará que el contenido de la unidad de un componente de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí misma una cantidad eficaz ya que la cantidad eficaz necesaria puede alcanzarse por la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

En particular, una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno del componente de combinación de la combinación de la invención puede administrarse simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden, y los componentes pueden administrarse por separado o como una combinación fija. Por ejemplo, el método para tratar una enfermedad según la invención puede comprender (i) administración del primer agente en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) administración del segundo agente en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades conjuntamente terapéuticamente eficaces, preferentemente en cantidades sinérgicamente eficaces, por ejemplo, en dosificaciones diarias o intermitentes correspondientes a las cantidades descritas en el presente documento. Los componentes de combinación individuales de la combinación de la invención pueden administrarse por separado en momentos diferentes durante el transcurso de la terapia o simultáneamente en formas de combinación divididas o individuales. Además, el término administrar también engloba el uso de un pro-fármaco de un componente de combinación que se convierte *in vivo* en el componente de combinación como tal. Por tanto, la presente invención debe entenderse como que engloba todas aquellas pautas de tratamiento simultáneo o alterno y el término "administrar" debe interpretarse en consecuencia.

La dosificación eficaz de cada uno de los componentes de combinación empleados en la combinación de la invención puede variar dependiendo del compuesto particular o la composición farmacéutica empleada, el modo de administración, la afección que está tratándose, la gravedad de la afección que está tratándose. Así, la pauta de dosificación de la combinación de la invención se selecciona según una variedad de factores que incluyen la vía de administración y la función renal y hepática del paciente. Un profesional clínico o médico con experiencia habitual puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de los principios activos individuales requeridos para aliviar, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

Dosificaciones adecuadas preferidas para los compuestos usados en el tratamiento descrito en el presente documento están en el orden de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 600 mg, preferentemente aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580 a aproximadamente 600 mg totales. En una realización, el inhibidor de JAK se administra en una dosis de 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg o 25 mg.

Por consiguiente, en una realización, en el presente documento se proporciona una composición que comprende un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I. En una realización, el compuesto de fórmula I es (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-dipirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001) o 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazol-3,4-dipirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242). En otra realización adicional, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos.

A continuación se presenta evidencia de que los fármacos dirigidos a la señalización de mTOR previnieron la proliferación celular inducida por citocinas e independiente de citocinas en diversos modelos celulares de NMP y que el tratamiento simultáneo con un inhibidor de JAK1/JAK2 o interferón- α produjo actividad sinérgica. Estos hallazgos proporcionan una exposición razonada para explorar la eficacia de la elección como diana de Akt/mTOR en el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas.

Métodos y materiales

Reactivos

Se obtuvieron RAD001 (un inhibidor alostérico específico de mTOR), PP242 (un inhibidor del dominio de ATP de mTOR) e hidroxiurea de Sigma-Aldrich (St. Louis, Alemania). Se obtuvo interferón- α de Pegasys. Los anticuerpos contra fosfo(p)-STAT5 (Tyr694), STAT5, p-4EBP1 (Thr70), 4EBP1, mTOR, p-JAK2 (Tyr1007/1008) y JAK2 fueron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.). El anticuerpo anti-tubulina humana fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Se compraron IL-3, GM-CSF, SCF y EPO humanos recombinantes de Miltenyi Biotec (Gladbach, Alemania). Los ARNip contra mTOR fueron de Dharmacon siGENOME Smart pool (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.); se usó siGENOME Non-Targeting siRNA Pool#1 (Thermo Scientific) como control negativo.

Líneas celulares y cultivo celular

Se compraron las líneas celulares humanas HEL, SET2 y K562 de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Células BaF/3 y BaF/3-EPOR murinas que expresan JAK2 no mutante (wt) o JAK2V617F fueron donadas por R. Skoda (Basilea, Suiza). Se cultivaron líneas celulares en RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS; Lonza, Bélgica) (20 % para células SET2), antibióticos y L-glutamina. Se añadieron mIL-3 y EPO al medio de cultivo de células BaF/3 y BaF/3-EPOR JAK2 wt, respectivamente.

Células humanas

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (SP) o médula ósea (MO) de pacientes diagnosticados con PV o MFP (criterios de la OMS de 2008) bajo el protocolo autorizado por el Comité de ética médica de Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi y después de obtener un consentimiento informado. Los donantes sanos de citoblastos hematopoyéticos proporcionaron el consentimiento informado para donar las células CD34⁺ en exceso. Se llevó a cabo investigación según los principios de la Declaración de Helsinki. Se seleccionaron inmunomagnéticamente células CD34⁺ como se ha descrito. El estado mutacional de JAK2V617F se determinó por un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real en granulocitos.

Inhibición del ensayo de proliferación, ensayo clonogénico y apoptosis o análisis del ciclo celular

Se sembraron células (2×10^4) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con concentraciones crecientes del (de los) fármaco(s), por triplicado; se evaluaron las células viables usando el ensayo de WST-1 (Roche, EE.UU.) y se normalizaron a pocillos que contenían un volumen de vehículo equivalente (DMSO) solo. Se calculó la concentración a la que se produjo el 50 % de inhibición de la proliferación (CI_{50}) usando el software Origin (V 7.5, OriginLab Northampton, MA). En algunos experimentos también se emplearon pruebas clonogénicas. Se sembraron células (5×10^3) en placa en 0,5 % de agar en medio complementado con FBS, y se añadió cantidad variable del (de los) fármaco(s) (o un volumen equivalente de vehículo en placas de control) una vez al principio de cultivo. Las colonias se enumeraron por microscopía invertida después de 7 días de incubación. La cuantificación de las células apoptóticas se llevó a cabo por citometría de flujo usando el kit de tinción Annexin-V-FLUOS (Roche); se adquirieron al menos 20.000 eventos. Para el análisis de distribución del ciclo celular por citometría de flujo, 1×10^6 células se trataron con etanol al 95 %, RNasa 10 $\mu\text{g/ml}$ y yoduro de propidio 50 mg/ml .

Ensayos de colonias para progenitores hematopoyéticos humanos y genotipado de colonias

Se sembraron células mononucleares de MO de pacientes con NMP o sujetos de control a $1 \times 10^5/\text{ml}$ en metilcelulosa (MethoCult; StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) complementado con SCF 50 ng/ml , IL-3 10 ng/ml , IL-6 10 ng/ml , GM-CSF 10 ng/ml , G-CSF 10 ng/ml y EPO 3 U/ml para el crecimiento de BFU-E y CFU-GM. El ensayo de CEE se realizó sembrando $2,5 \times 10^5/\text{ml}$ de células mononucleares de SP de pacientes con PV en metilcelulosa que contenía medio acondicionado con leucocitos sin EPO (StemCell Technol., cat. N° 04531). Para el crecimiento de CFU-Mk, $5 \times 10^4/\text{ml}$ de células $CD34^+$ se sembraron en una placa de 24 pocillos en Megacult Collagen y medio con lípidos (StemCell Technol) complementado con trombopoyetina 50 ng/ml , IL-3 10 ng/ml , IL-6 10 ng/ml . Las colonias se enumeraron en el día 14 según criterios estándar.

Para el genotipado de colonias individuales JAK2V617F se usó un ensayo de PCR específico de alelo. Colonias separadas en pocillos (al menos 40 colonias por puntos) se arrancaron individualmente del medio semisólido en 5 μl de agua libre de DNasa/RNasa, se lisaron a 95 °C durante 5 minutos y se sometieron a amplificación por PCR y electroforesis en gel.

Lisis celular y transferencia Western en SDS-PAGE

Se resuspendieron células en tampón de lisis RIPA (50 mM a pH 7,4 Tris-HCl, NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, EDTA 1 mM) que contenía una mezcla de inhibidores de proteinasa (Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit, PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.) y se sometieron a separación por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida y transferencia Western sobre membrana de PVDF de inmunotransferencia (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.), según protocolos convencionales. Las membranas se sondaron con anticuerpos primarios, seguido de anticuerpo anti-Ig conjugado con peroxidasa de rábano picante producido en conejos (Sigma-Aldrich); se revelaron proteínas inmunorreactivas con ECL usando el aparato Imagen 350 (GE Healthcare, Little Chalfont, RU).

Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (RTQ-PCR)

Se purificó ARN total usando Trizol (Invitrogen-Life Technologies, Paisley, RU), y la concentración de ARN y pureza/integridad se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Techn., Wilmington, DE, EE.UU.). Se transcribió de forma inversa un microgramo de ARN usando High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se realizaron reacciones de RT-QPCR con TaqMan Universal PCR Master Mix usando ABI PRISM 7300 HT y ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems), por triplicado. La pauta de expresión génica se logró usando el método de ciclo umbral comparativo (C_T) de cuantificación relativa usando la sonda *RNasa P* marcada con VIC como gen de mantenimiento (ΔC_T).

Transfección de células

Se electroporaron células HEL en crecimiento exponencial con ARNip en Amaxa Nucleofector (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD, EE.UU.) usando el kit R de Amaxa. Brevemente, se transfectaron $2-5 \times 10^6$ células en 0,1 ml de volumen con ARNip 1 μM y se transfirieron inmediatamente a placas de 24 pocillos que contenían medio de cultivo precalentado. Se evaluaron la eficiencia de transfección y viabilidad celular por citometría de flujo con pmaxGFP® (Amaxa Biosystems), y resultó siempre superior al 85 %.

Métodos estadísticos

La comparación entre grupos se realizó por la prueba de la U de Mann-Whitney o de Fisher, según convenga, usando el software SPSS (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) u Origin. El nivel de significancia de las pruebas bilaterales fue $P < 0,05$. El índice de combinación (IC), que es una medida de la interacción entre dos fármacos, se calculó según el principio de la mediana del efecto del método de Chou y Talalay usando el software CalcuSyn. Según esta fórmula, si $IC < 1$, la interacción de dos fármacos se considera sinérgica, si $IC = 1$ la interacción es aditiva y si $IC > 1$ la interacción es antagonista.

RESULTADOS

Inhibidores de mTOR suprimen la proliferación de líneas celulares mutantes JAK2V617F

5 Para determinar si las líneas celulares de leucemia humana mutantes JAK2V617F fueron sensibles a la inhibición de mTOR se emplearon el inhibidor de mTOR alostérico selectivo RAD001 y el inhibidor competitivo de ATP del sitio activo de mTOR, PP242. Se descubrió que las células HEL y SET2 mutantes JAK2V617F fueron al menos tan sensibles a la inhibición de mTOR como las células K562 positivas para BCR/ABL usadas como valores de control. Los valores de CI_{50} se muestran en la Tabla 1. Se investigaron los efectos de inhibidores de mTOR en células dependientes de IL-3 murinas (Ba/F3) o dependientes de EPO (Ba/F3-EPOR) no mutantes para JAK2 o el homólogo JAK2V617F independiente de citocinas. Se encontró que las células Ba/F3 V617F fueron más sensibles a RAD001 que el homólogo JAK2 wt tanto en ausencia como en presencia de IL-3 en el medio de cultivo. Similarmente, en células Ba/F3-EPOR, la CI_{50} de células mutantes V617F fue 651 nM y 1.213 nM en ausencia y presencia de EPO, respectivamente, en comparación con una CI_{50} >10.000 nM en células JAK2 wt. PP242 fue similarmente eficaz: en células Ba/F3 V617F, la CI_{50} fue 800 nM y 1.600 nM, respectivamente, en ausencia o presencia de IL-3 frente a 3.400 nM en células wt; en células Ba/F3-EPOR wt, CI_{50} fue 5.931 nM frente a 500 nM y 750 nM en células V617F complementadas o no con EPO, respectivamente (Tabla 1). A su concentración CI_{50} , RAD001 y PP242 (no mostrados) causaron la detención del ciclo celular de células SET2 y HEL en la fase G0/G1 del ciclo celular (Figura 1A). Por otra parte, el tratamiento con RAD001 fue muy ineficaz en inducir la muerte celular, mientras que PP242 promovió una modesta apoptosis celular, aunque dependiente de la dosis, a las mayores concentraciones en células SET2 (Figura 1B) o HEL (no mostradas). Además de la inhibición de la proliferación celular se encontró que RAD001 también alteró el potencial clonogénico de células HEL, SET2 y UKE-1 mutantes JAK2V617F más eficazmente que K562. Por tanto, la formación de colonias por células Ba/F3 V617F se inhibió a concentraciones de RAD001 significativamente menores, independientemente de la citocina en el medio, que el homólogo wt (datos no mostrados). En general, estos datos indican que las células mutantes JAK2V617F son uniformemente sensibles a la inhibición de mTOR y sugieren que la supresión de la proliferación celular refleja principalmente un efecto citostático en vez de apoptótico.

A continuación se compararon los mecanismos de la inhibición de proliferación celular inducida por inhibidores de mTOR con aquellos del inhibidor de JAK1/JAK2 el compuesto A y el inhibidor de histona deacetilasa (HDAC) panobinostat. Aquellas moléculas fueron todas inhibidoras del crecimiento en células HEL y SET2 a concentraciones CI_{50} significativamente menores que aquellas medidas en la línea celular K562 (Tabla 1). Sin embargo, a diferencia de los inhibidores de mTOR, fueron potentes inductores dependientes de la dosis de la apoptosis celular (Figura 1C, D). Las células HEL (CI_{50} = 410 μ M) y SET2 (CI_{50} = 330 μ M) resultaron más sensibles al inhibidor de ribonucleósido difosfato reductasa hidroxurea que las células K562 (CI_{50} = 4,910 μ M (Tabla 1); la hidroxurea indujo la apoptosis de células dependiente de la dosis (Figura 1E).

El efecto del inhibidor de JAK1/JAK2 también se evaluó en células Ba/F3 para explotar la función de la exposición de citocinas a la sensibilidad del fármaco. Se encontró que las células Ba/F3 y Ba/F3-EPOR V617F fueron más sensibles al compuesto A (CI_{50} = 34 nM y 220 nM, respectivamente) que su homólogo wt (1.600 nM o 457 nM para el compuesto A, respectivamente). Sin embargo, la adición de la citocina apropiada al medio de cultivo suprimió el efecto inhibidor del crecimiento preferencial del inhibidor de JAK1/JAK2 sobre células mutantes V617F (CI_{50} = 1600 nM para el compuesto A, en células Ba/F3; CI_{50} = 521 nM para el compuesto A, en células Ba/F3-EPOR) (Tabla 1).

En general, estos datos indican que la actividad inhibidora del crecimiento de inhibidores JAK1/JAK2 y HDAC en líneas celulares de leucemia JAK2V617F está prevalentemente mediada por la apoptosis de células. Además, se confirmó que las citocinas redujeron sustancialmente la sensibilidad celular a inhibidores de JAK1/JAK2.

La Figura 1 muestra el efecto de inhibidores de mTOR seleccionados, un inhibidor de JAK1/JAK2, inhibidores de histona desacetilasa e hidroxurea sobre la apoptosis celular y el ciclo celular en células SET2 o HEL. En los paneles (B) a (E), el porcentaje de células apoptóticas positivas para Anexina V se midió por citometría de flujo en células SET2 que se habían expuesto durante 48 h a cantidad variable del inhibidores de mTOR RAD001 o PP242 (B), el inhibidor de JAK1/JAK2 el compuesto A (C), el inhibidor de HDAC panobinostat (D) o hidroxurea (E). Los resultados se expresan como porcentaje de células viables en comparación con pocillos de control que contienen vehículo (DMSO) solo. La fracción de células necróticas se identificó como las células positivas dobles para Anexina V/yoduro de propidio. Un representante de tres experimentos similares. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

La Tabla 4 muestra la inhibición del crecimiento clonogénico de líneas celulares mutantes JAK2V617F por los inhibidores de mTOR RAD001 o PP242 y el inhibidor de JAK1/JAK2 el compuesto A. Líneas celulares de origen humano mutantes JAK2V617F, tanto heterocigóticas (SET-2) como homocigóticas (HEL), y la línea celular K562 mutante para BCR/ABL (usada como control) se expusieron a concentraciones crecientes de RAD001, PP242 o el compuesto A. Se sembraron 10^3 células en agar en presencia de cantidad variables del fármaco; se contaron colonias en el día 7 y se expresaron como un porcentaje del número de colonias cultivadas en placas de control que contenían vehículo. Células BaF/3 murinas que expresan en exceso JAK2V617F se expusieron similarmente a RAD001, PP242 o compuesto A, y en comparación con células no mutantes (wt). Se añadió interleucina-3 (10 ng/ml)

o no al medio de cultivo. Los valores de Cl_{50} mostrados son la media $\pm$ DE de al menos tres experimentos independientes.

Inhibidores de mTOR atenúan la señalización aguas debajo de la vía de mTOR y reducen la fosforilación de STAT5 en líneas celulares mutadas JAK2V617F

A continuación se investigó el efecto de la inhibición de mTOR sobre la transducción de señales en células mutantes JAK2V617F usando células SET2 como modelo (Figura 2). Se observó que el tratamiento con RAD001 y PP242 redujo dependientemente de la dosis la fosforilación de la diana de mTOR 4E-BP1 e, inesperadamente, de STAT5, mientras que JAK2 tanto fosforilada como total quedó inafectada. En comparación, el inhibidor de JAK1/JAK2 el compuesto A redujo sustancialmente y dependientemente de la dosis la fosforilación de JAK2 y STAT5, dejando 4EBP1 sin afectar. El inhibidor de HDAC panobinostat redujo dependientemente de la dosis JAK2 fosforilada y total, STAT5 fosforilada y mostró un modesto efecto sobre 4E-BP1 fosforilado. En cambio, la hidroxiurea no afectó el nivel o el estado de fosforilación de 4EBP1 o STAT5.

Para caracterizar mejor la correlación entre la mutación JAK2V617F y la activación de mTOR, además de las consecuencias de la inhibición de mTOR sobre la fosforilación de STAT5, se usaron células Ba/F3 y Ba/F3-EPOR. Primero, se observó que 4E-BP1 se fosforiló mínimamente en células Ba/F3 y Ba/P3-EPOR JAK2 wt privadas de citocinas, mientras que se hiper-fosforiló en células V617F, soportando datos previos sobre la activación constitutiva de Akt en células mutadas JAK2V617F. La adición de citocinas produjo un aumento de la fosforilación de 4E-BP1 en células Ba/F3 y Ba/F3-EPOR JAK2 wt y mutadas V617F (datos no mostrados). En células incubadas con RAD001, se produjo una inhibición sustancial de la fosforilación de 4E-BP1 (datos no mostrados) y persistió hasta al menos 24 h (datos no mostrados). La fosforilación de STAT5 fue mayor en células V617F en comparación con células Ba/F3 o Ba/F3-EPOR JAK2 wt privadas de IL-3 o de EPO, y aumentó sustancialmente después de la exposición a citocinas. La fosforilación de STAT5 se reguló significativamente por disminución, reflejando los efectos sobre 4EBP1; la inhibición ya fue evidente a 60 min, se mantuvo hasta 24 h (no mostrado).

Para confirmar que la atenuación de la fosforilación de STAT5 estuvo en realidad mediada por la inhibición de mTOR en vez de resultante de un efecto directo de RAD001 sobre la fosforilación de STAT5, mTOR se silenció con ARNip específico en células HEL. Aunque el tratamiento con ARNip disminuyó los niveles de mTOR solo el 50-60 % a 24 h, el nivel de 4E-BP1 fosforilado disminuyó espectacularmente en comparación con células que se habían tratado con ARNip de control irrelevante; el contenido de proteína 4E-BP1 total no cambió en absoluto (datos no mostrados). A las 48 h, tanto mTOR como 4E-BP1 fosforilado fueron casi detectables. Al mismo tiempo, el nivel de STAT5 fosforilada apareció sustancialmente reducido a las 24-48 h en células que se habían nucleofectado con ARNip específico de mTOR en comparación con control; no cambió el contenido de STAT5 total.

La Figura 2 muestra el efecto de inhibidores de mTOR seleccionados, un inhibidor de JAK1/JAK2, inhibidores de histona desacetilasa e hidroxiurea sobre la señalización de mTOR y JAK/STAT en células SET2. Se incubaron células SET2 durante 24 h con concentraciones crecientes de los fármacos, y el nivel de JAK2 total y fosforilada, STAT5 y 4EBP1 se analizó por transferencia Western. Se usó tubulina para la normalización de carga. Los resultados mostrados son representativos de dos a cuatro experimentos similares para los diferentes fármacos.

La combinación de RAD001 o PP242 con el compuesto A produce la inhibición sinérgica de la proliferación de la línea celular leucémica JAK2V617F y formación de colonias

Se evaluaron los efectos de la inhibición simultánea de mTOR y JAK1/JAK2 en células SET2 y Ba/F3-EPOR V617F midiendo los efectos inhibidores de la proliferación. Se incubaron células con diferentes concentraciones de RAD001 o PP242 y; usando estas combinaciones de fármaco se midió un índice de combinación (IC) que oscilaba de 0,12 a 0,44, que sugiere fuerte actividad sinérgica de los dos fármacos (Tabla 3).

Se realizaron experimentos adicionales usando células SET2 y Ba/F3 epoR V617F en un ensayo de agar clonogénico (Tabla 5); se midió un IC que oscilaba de 0,22 a 0,81 en estos cultivos, señalando de nuevo a sinergias de fármacos.

La combinación de RAD001 o PP242 con el compuesto A produce la inhibición sinérgica de células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con NMP en el ensayo de formación de colonias CEE.

Para determinar si la proliferación de células leucémicas de pacientes con NMP podría afectarse por la elección de diana simultánea de la vía de mTOR y JAK, se incubaron PBMC de pacientes con PV con concentración creciente de RAD001, PP242, compuesto A o una combinación de RAD001 o PP242 y el compuesto A en un ensayo de CEE. Se cultivaron células mononucleares derivadas de sangre periférica de pacientes con PV en medio de metilcelulosa libre de EPO para el crecimiento de CEE, en ausencia o presencia de una cantidad fija de RAD001, PP242 y/o compuesto A. Las CEE se puntuaron a los 12 días y se expresaron como porcentaje del número de colonias medido en placas de control que contenían vehículo solo. *, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$. Los resultados expuestos en la Tabla 6 muestran IC de 0,2 y 0,26 en estos cultivos, demostrando adicionalmente sinergia entre inhibidores de mTOR y de JAK en la inhibición del crecimiento celular de JAK2V617F.

DISCUSIÓN

La mutación JAK2V617F asociada a NMP determina una activación constitutiva de la vía de JAK2/STAT; inhibidores de JAK2 reducen la proliferación de células mutantes JAK2V617F *in vitro*, mitigan la mieloproliferación en animales transgénicos JAK2V617F (Liu PC, Combined inhibition of Janus kinase 1/2 for the treatment of JAK2V617F-driven neoplasms: selective effects on mutant cells and improvements in measures of disease severity. Clin Cancer Res. 2009;15:6891-6900) y producen mejora clínica medible en pacientes con mielofibrosis (Verstovsek S, Kantaijian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med. 2010;363:1117-1127) o PV o TE resistente a hidroxiurea. Sin embargo, variaciones en la carga de JAK2V617F fueron modestas y todavía no se ha informado de remisión molecular. Además, la población de células que inicia la enfermedad en ratones activos en JAK2V617F no se afectó por el tratamiento con el inhibidor de JAK2 TG101348. En general, estas observaciones presentan la posibilidad de que la eficaz elección como diana del clon de NMP no pueda lograrse con inhibidores de JAK2 disponibles. Por tanto, se desea un conocimiento más detallado de señales celulares que participan en la proliferación desregulada de células mutantes con el fin de diseñar estrategias terapéuticas más eficaces. A este respecto, se ha mostrado que el co-tratamiento del HDACi panobinostat y el inhibidor de JAK2 TG101209 determinaron mayor atenuación de la señalización de JAK/STAT en células mutadas JAK2V617F humanas y murinas y aumentó la citotoxicidad contra células CD34⁺ de NMP en comparación con fármacos individuales.

Este estudio se basó en la diana de mamífero de rapamicina (mTOR), una diana aguas abajo clave de la vía de PI3k/Akt. La cinasa serina/treonina mTOR funciona como un regulador central del metabolismo, supervivencia, crecimiento, proliferación y autofagia celular. mTOR se inhibe por una familia de moléculas, llamados rapálogos, que siguen a su miembro fundador la rapamicina, que se han empleado recientemente en ensayos clínicos en cánceres. mTOR existe en dos complejos, TORC1 y TORC2. TORC1, formado con raptor, controla el nivel de traducción de ARNm dependiente de la tapa y fosforila efectores tales como la proteína 1 de unión al factor 4E de iniciación eucariota (4E-BP1) y S6 cinasa 1 (S6K1). A su vez, 4E-BP1 fosforilado conduce a la unión inhibida al factor 4E de iniciación eucariota (eIF4E) y previene la activación de la traducción de varios genes, que incluyen ciclina D1, Bcl-2, Bcl-X_L y factor de crecimiento endotelial vascular. Por otra parte, S6K1 regula el crecimiento celular fosforilando dianas clave tales como eIF4E, mTOR, factor 4B de iniciación eucariota y cinasa de alargamiento 2. Tanto eIF4E como SK1 participan en la transformación celular y se expresan en exceso en algunos cánceres de mal pronóstico. Componentes adicionales de TORC1 incluyen la proteína tipo LST8 de mamífero/subunidad β de la proteína G (mLST8/GβL) y los componentes recientemente identificados PRAS40 y DEPTOR. mTOR también se combina con Rictor en mTORC2, que es muy insensible a rapamicina, y está compuesto por GβL y proteína 1 de interacción con proteína cinasa activada por estrés de mamífero (mSIN1); TORC 2 participa en la fosforilación de Akt en Ser473. Este bucle de retroalimentación negativo de mTORC2 a Akt puede producir, en algunos casos, la agravada progresión del tumor, aunque se informó que RAD001 inhibió potentemente la actividad de Akt en células leucémicas mediante la supresión de tanto mTORC1 como mTORC2. Para vencer posibles limitaciones e inconvenientes de los inhibidores de mTOR alostéricos, tales como RAD001, se han desarrollado moléculas novedosas que actúan de inhibidores competitivos del sitio activo de ATP de mTOR; una de estas, PP242, suprime fuertemente tanto las actividades mediadas por TORC1 como TORC2 y ejerció potente citotoxicidad contra células de leucemia. RAD001 y PP242 se usaron para explorar *in vitro* la supuesta función de mTOR como diana para terapia en NMP.

Se demostró primero que los inhibidores de mTOR causaron una detención de la proliferación celular de líneas celulares de leucemia humana y murina mutadas JAK2V617F a concentraciones de fármaco significativamente menores que las células de control (Tabla 1). En cambio, RAD001 no indujo la muerte celular, mientras que PP242 producen algo de apoptosis celular a las mayores concentraciones; así, en estos entornos experimentales, los inhibidores de mTOR son principalmente citostáticos. Este modo de acción se diferenció del inhibidor de JAK1/JAK2 el compuesto A y el inhibidor de HDAC panobinostat en los que todos indujeron potentemente la apoptosis celular (Figura 1). Por otra parte, se demostró que la proliferación de la inhibición celular producida por inhibidores de mTOR no estuvo afectada por la maximizada activación de la vía de JAK/STAT que siguió a la exposición de citocinas de las células Ba/FE y Ba/F3-EPOR, a diferencia del caso para el inhibidor de JAK1/JAK2. La última observación estuvo en línea con la demostración de que la sensibilidad a inhibidores de JAK2 de progenitores eritroides de pacientes con PV produjo supresión mediante la adición de EPO al medio de cultivo, y sugiere indirectamente que los mecanismos subyacentes a la inhibición de la proliferación celular por RAD001 son al menos en parte independientes de la activación de JAK/STAT inducida por citocinas. Se demostró que RAD001 fue más selectiva contra progenitores mutados JAK2V617F que no mutantes en pacientes con PV, ya que el número de colonias de V617F disminuyó una media del 39 % en favor de las no mutantes (Tabla 2).

Se ha demostrado un efecto antiproliferativo prevalente en vez de pro-apoptótico de RAD001 en varias otras células cancerosas, y representa la exposición razonada para terapia de combinación con agentes que inducen preferencialmente apoptosis. Teniendo esto en mente, se exploraron los efectos de combinar mTOR y un inhibidor de JAK1/JAK2 *in vitro* y se demostró evidencia de una sinergia significativa referente a la inhibición de la proliferación (Tabla 3), potencial clonogénico (Tabla 5) de líneas celulares de leucemia. Además, la formación de

colonias hematopoyéticas por células progenitoras de pacientes con NMP se inhibió sinérgicamente combinando RAD001 o PP242 con el inhibidor de JAK1/JAK2 el compuesto A (Tabla 6).

El análisis de moléculas de señalización clave mostró que RAD001 y PP242 inhibieron la fosforilación de la diana aguas abajo 4EBP1, mientras que los inhibidores de JAK1/JAK2 e inhibidores de HDAC redujeron la fosforilación de tanto JAK2 como STAT; notablemente, los inhibidores de HDAC también redujeron la expresión de JAK2 total (Figura 2). Una observación interesante fue que la inhibición de mTOR debida a RAD001 y PP242 se asoció a una disminución apreciable de la fosforilación de STAT5, que no se justificó por el contenido de proteína STAT5 total reducido. Esta retroalimentación positiva entre mTOR y STAT5 se confirmó demostrando una atenuación simultánea de la fosforilación de 4B-BP1 y STAT5 con el uso de ARN inhibidor específico (ARNip) contra mTOR (datos no mostrados). El grado de inhibición de la fosforilación de STAT5 mediada por RAD001 fue mucho menos que con inhibidores de JAK1/JAK2 que no afectó la fosforilación de 4E-BP1, sugiriendo que la activación de mTOR en células NMP puede ser ampliamente independiente JAK2. Por otra parte, un inhibidor de HDAC demostró una modesta inhibición de la fosforilación de 4EBP1, aunque datos actuales no permiten a los presentes inventores llegar a la conclusión de si este efecto fue directo o no. En conjunto, estas observaciones indican que la fosforilación de STAT5 puede afectarse eligiendo como diana la señalización iniciada por JAK2 y mTOR. A este respecto, se ha demostrado la activación sensible a rapamicina de STAT3 mediante la señalización de tirosina cinasa de receptor/PI3K/Akt en varias células cancerosas y tumores de ratón o humanos.

Tabla 1. Determinación de CI_{50} de inhibidores de mTOR, un inhibidor de JAK1/JAK2, inhibidores de HDAC e hidroxurea usando ensayo de inhibición de la proliferación en líneas celulares mutadas JAK2V617F y de control no mutantes JAK2 humanas y murinas. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,00$. N.D., no hecho

FÁRMACO	BaF/3			BaF/3 -IL3		
	K562	HEL	SET2	WT	V617F	V617F + IL3
RAD001 (nM)	16.000 $\pm$ 2.500	14.000 $\pm$ 2.800	17.000 3.000**	$\pm$ 2.600 $\pm$ 1.200	10 $\pm$ 4**	10 $\pm$ 5**
PP242 (nM)	8.300 $\pm$ 1000	1.500 $\pm$ 113**	285 $\pm$ 11**	3.400 $\pm$ 300	800 $\pm$ 200**	1.600 $\pm$ 200**
Compuesto A (nM)	>20.000	790 $\pm$ 150**	160 $\pm$ 24**	1.600 $\pm$ 500	34 $\pm$ 2**	1.700 $\pm$ 300
Panobinostat (nM)	31 $\pm$ 8	8 $\pm$ 3*	7 $\pm$ 2*	N.D.	N.D.	N.D.
NuOH (μ M)	4.910 $\pm$ 15	410 $\pm$ 20*	330 $\pm$ 11*	N.D.	N.D.	N.D.

FÁRMACO	BaF/3 -EPOR		
	WT	V617F	V617F+EPO
RAD001 (nM)	>10.000	651 $\pm$ 50**	1.231 $\pm$ 100**
PP242 (nM)	5.931 $\pm$ 1.000	500 $\pm$ 100**	750 $\pm$ 100**
Compuesto A (nM)	457 $\pm$ 15	220 $\pm$ 20**	521 $\pm$ 45
Panobinostat (nM)	N.D.	N.D.	N.D.
HuOH (μ M)	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 2. Efectos de RAD001 sobre la proporción de colonias no mutantes JAK2 y V617F en ensayos clonogénicos de células CD34⁺ de pacientes con NMP.

Genotipo de JAK2				
Pac. N°	RAD001 (50 nM)	No mutante (%)	V617F (%)	% de disminución de V617F
1	-	80	20	70
	+	94	6	
2	-	53	47	15
	+	60	40	
3	-	28	72	21
	+	43	57	
4	-	52	48	17
	+	58	40	
5	-	68	32	72
	+	91	9	
Media $\pm$ DE				39 $\pm$ 29

Tabla 3. La combinación del inhibidor de mTOR e inhibidor de JAK1/JAK2 produce actividad sinérgica en la inhibición de la proliferación de la línea celular SET2 y células Ba/F3-EPOR JAK2V617F

Línea celular	CI_{50} (nM)		Combinación de fármacos		Índice CI
	RAD001	Compuesto A	RAD001	Comp A	
SET2	17.000 $\pm$ 3000	160 $\pm$ 24	3.0983	29	0,20
	PP242	Compuesto A 160 $\pm$ 24	PP242 66	Comp A 47	0,43

Línea celular		Combinación de fármacos			
	CI ₅₀ (nM)		CI ₅₀ (nM)		Índice CI
	285 ± 11				
Ba/F3-EPOR JAK2V617F	RAD001	Compuesto A	RAD001	Comp A	Índice CI 0,44
	651 ± 50	220 ± 20	363	125	
		PP242	Compuesto A	PP242	Comp A
	500 ± 100	220 ± 20	400	121	

El valor de CI₅₀ se calculó en el ensayo de inhibición de la proliferación en presencia de diferentes combinaciones de fármaco. Se informa la mediana del valor de CI₅₀ de al menos 3 experimentos de los fármacos usados en combinación. El índice de combinación (IC) se calculó según Chou y Talaly como se describe en Materiales y métodos. Un IC<1 indica que la interacción de los dos fármacos es sinérgica. Las dos primeras columnas (en gris) informan, por comodidad, el valor de CI₅₀ de los fármacos individuales como se calculan a partir de los datos en la Tabla 1.

Tabla 4. Determinación de CI₅₀ de RAD001, PP242 e INC242 usando el ensayo clonogénico para líneas celulares mutadas JAK2V617F murinas y controles.

Línea celular	CI ₅₀ (nM)		
	RAD001	PP242	Comp A
K562	10.000 ± 3.500	3.800 ± 200	> 15.000
HEL	85 ± 30 **	172 ± 59**	374 ± 177 **
SET2	130 ± 30 **	62 ± 19**	27 ± 9 **
Ba/F3 JAK2 no mutante	120 ± 13	100 ± 10	380 ± 120
Ba/F3 JAK2 V167F	6 ± 2 **	18 ± 7**	15 ± 10 **
Ba/F3 epoR JAK2 no mutante	22 ± 10	308 ± 100	740 ± 100
Ba/F3 epoR JAK2 V167F	4 ± 2 **	47 ± 12**	25 ± 15 **

El valor de CI₅₀ (es decir, la concentración de fármaco que redujo el número de colonias al 50 % que se midió en placas de control con vehículo solo) se calculó en el ensayo clonogénico de agar enumerando las colonias en el día 7 en presencia de diferentes concentraciones de fármaco. En caso de líneas celulares humanas, la línea celular de control era K562, mientras que en el caso de células murinas la referencia fue células no mutantes Ba/F3 mantenidas en presencia de Ilr3. **, P< 0,01.

Tabla 5. La combinación de RAD001 o PP242 e INC242 produce actividad sinérgica en la inhibición del potencial clonogénico de líneas celulares mutadas JAK2V617F humanas y murinas.

Línea celular	CI ₅₀ (nM)		Combinación de fármacos		
	RAD001	Comp A	RAD001	Comp A	Índice IC
SET 2	44 ± 15	27 ± 9	7	4	0,22
	PP242	Comp A	PP242	Comp A	
	62 ± 19	27 ± 9	17	7,6	0,81
Ba/F3 eporR JAK2 V617F	RAD001	Comp A	RAD001	Comp A	Índice IC
	4 ± 2	20 ± 15	1,1 (1,3 – 1)	5,9 (6,8 – 5,1)	0,59 (0,85 – 0,34)
	PP242	Comp A	PP242	Comp A	
	47 ± 12	20 ± 15	6,3 (10 – 2,5)	0,24 (0,38 – 0,1)	

El valor de CI₅₀ se calculó en ensayo clonogénico en agar enumerando las colonias cultivadas en el día 7 de cultivo establecido en presencia de diferentes combinaciones de fármaco. Se informa la mediana del valor de al menos 3 experimentos de CI₅₀ de los dos fármacos usados en combinación. El índice de combinación (IC) se calculó como se describe en Materiales y métodos. Un IC <1 indica que la interacción de los dos fármacos es sinérgica. Las dos primeras columnas (en gris) indican el valor de CI₅₀ calculado para los fármacos individuales y se informan aquí a partir de la Tabla 4 por comodidad.

Tabla 6. . La combinación de RAD001 o PP242 e INC242 produce actividad sinérgica en la inhibición del potencial clonogénico de células mononucleares de sangre periférica humana de pacientes con PV.

Línea celular	CI ₅₀ (nM)		Combinación de fármacos		
	RAD001	Comp A	RAD001	Comp A	Índice IC
PBMC de pacientes con PV	15 ± 10	1,8 ± 1	1,9	0,2	0,26

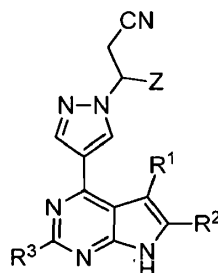
PP242	Comp A	PP242	Comp A	
$1 \pm 0,7$	$1,8 \pm 1$	0,05	0,1	0,2

El valor de CI_{50} se calculó en ensayo clonogénico en agar enumerando las colonias cultivadas en el día 7 de cultivo establecido en presencia de diferentes combinaciones de fármaco. El índice de combinación (IC) se calculó como se describe en Materiales y métodos. Un IC <1 indica que la interacción de los dos fármacos es sinérgica.

5

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I:



(I)

o estereoisómeros, tautómeros, racematos, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que

R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo C_{1-4} ; y
Z es cicloalquilo C_{3-6} ; y
en la que el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001) o 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242);
para uso combinado en el tratamiento de cáncer.

2. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I es (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-dipirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el inhibidor de mTOR y el compuesto de fórmula I están en una única formulación o forma de dosificación unitaria, que comprende preferentemente además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el inhibidor de mTOR y el compuesto de fórmula I se administran por separado.

5. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es una neoplasia mieloproliferativa, seleccionada preferentemente del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia verdadera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria o idiopática (MFP), leucemia neutrófila crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica y leucemia mielógena crónica atípica, más preferentemente mielofibrosis post-policitemia verdadera o mielofibrosis post-trombocitemia esencial.

6. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que el tratamiento comprende administrar el inhibidor de mTOR y el compuesto de fórmula I sustancialmente a la vez.

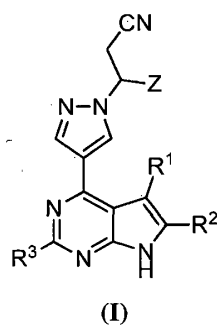
7. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el inhibidor de mTOR se administra al sujeto, seguido de la administración de un compuesto de fórmula I.

8. Un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el compuesto de fórmula I se administra al sujeto, seguido de la administración del inhibidor de mTOR.

9. Everolimus y (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-dipirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso combinado en el tratamiento de una neoplasia mieloproliferativa.

10. PP242 y (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-dipirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso combinado en el tratamiento de una neoplasia mieloproliferativa.

11. Una composición que comprende un inhibidor de mTOR y un compuesto de fórmula I:

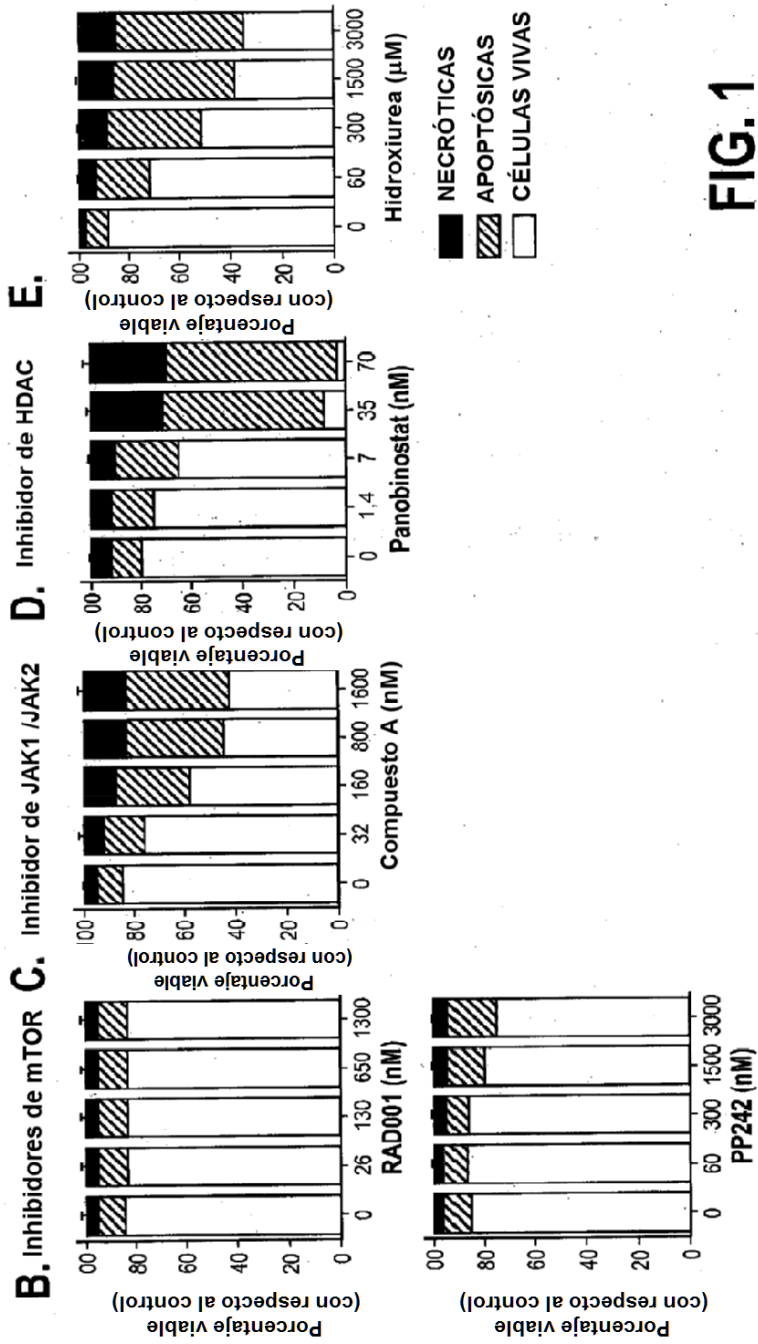


que incluye estereoisómeros, tautómeros, racematos, solvatos y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que

- 5 R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de H, halógeno y alquilo; y
 Z es cicloalquilo C_{3-6} ; y
 en el que el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001) o 2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol (PP242);
 10 que comprende preferentemente además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. La composición de la reivindicación 11, en el que el compuesto de fórmula I es (3R)-3-ciclopentil-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 13. La composición de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de cáncer, más preferentemente de una neoplasia mieloproliferativa.



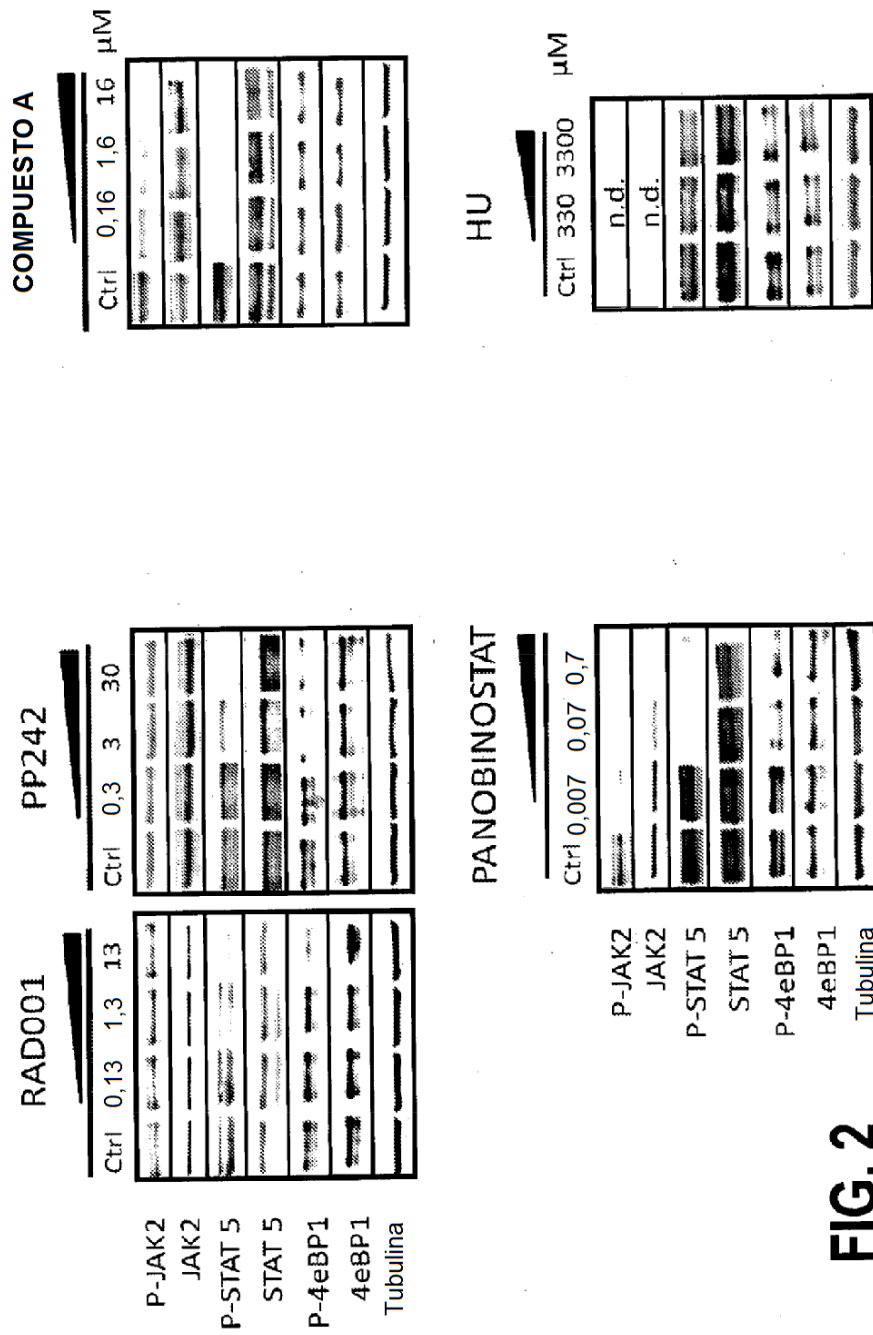


FIG. 2