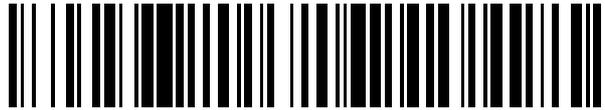


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 183**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/436** (2006.01)  
**A61K 31/4745** (2006.01)  
**A61K 31/5377** (2006.01)  
**A61K 31/52** (2006.01)  
**A61K 31/496** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12705457 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2675450**

54 Título: **Combinaciones de agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

**16.02.2011 US 201161443493 P**

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

**17.05.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GALIMBERTI, IVAN y  
MURPHY, LEON**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 570 183 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Combinaciones de agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con una combinación de agentes terapéuticos para uso en la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo enfermedad de Huntington, y productos y composiciones farmacéuticas que comprenden tal combinación para uso en la prevención o tratamiento de tales enfermedades neurodegenerativas.

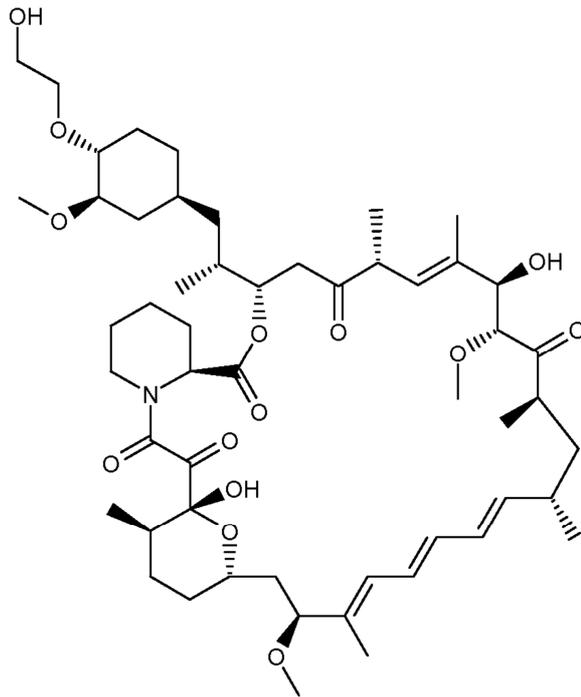
Materia que no es abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada aquí.

10 En células de mamíferos, el objetivo de la rapamicina quinasa (mTOR) existe como un complejo de multiproteínas descrito como el complejo mTORC1 o complejo mTORC2, el cual detecta la disponibilidad de nutrientes y energía e integra el ingreso de factores de crecimiento y señalización de estrés. El complejo mTORC1 es sensible a los inhibidores mTOR alostéricos tales como rapamicina, está compuesto de mTOR, GβL y proteínas reguladoras asociadas del mTOR (ráptor), y se enlaza a la proteína peptidil proil isomerasa FKBP12 (una proteína enlazante de FK506 1A, 12 kDa). En contraste, el complejo mTORC2 está compuesto de mTOR, GβL y proteínas acompañantes  
15 insensibles a la rapamicina de mTOR (ríctor) y no se enlaza a la proteína FKBP12 *in vitro*.

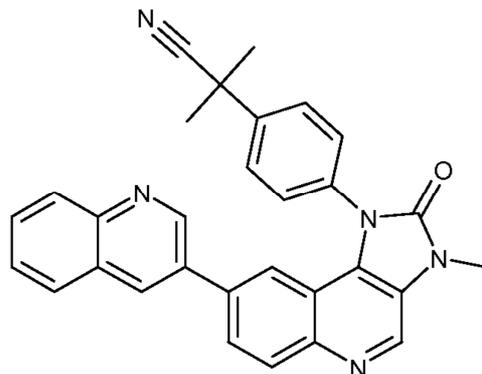
20 El complejo mTORC1 ha demostrado estar involucrado en el control de traducción de proteínas, operando como un factor de crecimiento y un aparato sensible a los nutrientes para la regulación del crecimiento y la proliferación. El mTORC1 regula la traducción de proteínas a través de dos sustratos clave corriente abajo: S6 quinasa, el cual a su vez fosforila la proteína ribosómica S6, y la proteína 1 de enlazamiento al factor de traducción eucariota 4E (4EBP1), el cual juega un papel clave en la modulación de la traducción dependiente de la caperuza regulada por eIF4E. El complejo mTORC1 regula el crecimiento celular en respuesta a la energía y a la homeostasis de nutrientes de la célula, y la desregulación de mTORC1 es común en una amplia variedad de cánceres humanos. La función del mTORC2 involucra la regulación de la supervivencia celular a través de la fosforilación de Akt y la modulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.

25 El complejo mTORC1 es sensible a los inhibidores alostéricos de mTOR tales como la rapamicina y sus derivados en gran parte debido al modo de acción de la rapamicina, el cual involucra la formulación de un complejo intracelular con FKBP12 y enlaza al dominio de enlazamiento FKBP12-rapamicina (FRB) del mTOR. Esto da como resultado un cambio conformacional en el mTORC1 el cual se cree que altera y debilita la interacción con su proteína ráptor de andamio, impidiendo a su vez que los sustratos tales como S6K1 tengan acceso a mTOR y sean fosforilados. La  
30 rapamicina y los análogos tales como RAD001 han ganado relevancia clínica inhibiendo la hiperactivación de mTOR asociada con trastornos de proliferación tanto benignos como malignos.

35 El RAD001 es de otra forma conocido como everolimus (Afinitor®), tiene el nombre químico (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-((1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil)-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-2,3,10,14,20-pentaona y la siguiente estructura química



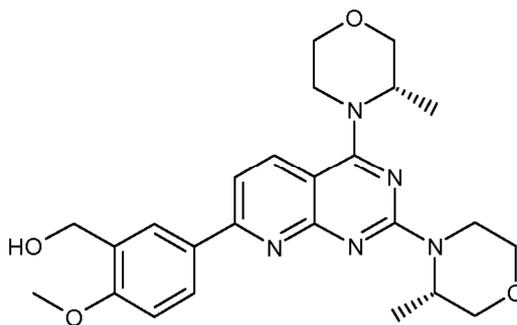
- El everolimus es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de riñón avanzado y aún está siendo investigado en varios otros ensayos de fase clínica III en oncología. Los estudios preclínicos han demostrado que el everolimus es capaz de inhibir la proliferación de una amplia variedad de líneas celulares tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*, presumiblemente a través de la supresión de la función de mTORC1 sensible a la rapamicina. El everolimus, como un derivado de la rapamicina, es un inhibidor de mTOR alostérico que es altamente potente al inhibir parte de la función de mTORC1, a saber la S6 quinasa (S6K) y el sustrato S6 de S6K corriente abajo. Sin embargo, el everolimus (y otros análogos de la rapamicina) tienen poco o ningún efecto para inhibir los eventos de fosforilación de cebadores en 4EBP1 (T37/46), el cual está implicado como una guía clave en la tumorigénesis y mantenimiento. Los inhibidores alostéricos de mTOR tales como everolimus (y otros análogos de la rapamicina) tienen poco o ningún efecto en inhibir la ruta del mTORC2, o su activación resultante de la señalización de Akt. Ejemplos adicionales de inhibidores de mTOR alostéricos incluyen sirolimus (rapamicina, AY-22989), 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también llamado Temsirolimus o CCI-779) y Deferolimus (AP-23573/MK-8669).
- 15 Alternativamente, se ha encontrado que los inhibidores de mTOR competitivos por el ATP, catalíticos, apuntan al dominio de mTOR quinasa directamente y apuntan tanto a mTORC1 como a mTORC2. También hay inhibidores más efectivos de mTORC1 que tales inhibidores de mTOR alostéricos como la rapamicina, puesto que modulan mTORC1 resultantes resistentes a la rapamicina tales como la fosforilación de 4EBP1-T37/46 y la traducción dependiente de la caperuza.
- 20 El BEZ235 es un inhibidor catalítico de mTOR, que tiene el nombre químico 2-metil-2-[4-(3-metil-2-oxo-8-quinolin-3-il-2,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-fenil]-propionitrilo y la siguiente estructura química



El BEZ235 también puede ser utilizado en su forma de sal monotosilato. La síntesis de BEZ235 está descrita en WO2006/122806.

5 Como inhibidor catalítico del mTOR el BEZ235 es capaz de suspender la función completa del complejo mTORC1, incluyendo tanto las funciones sensibles a la rapamicina (fosforilación de S6K, y subsecuentemente la fosforilación de S6) e insensibles a la rapamicina (fosforilación de 4EBP1). El BEZ235 tiene un efecto diferencial de acuerdo con la concentración de fármaco usada, con lo cual la inhibición de mTOR predomina a una concentración baja (menos de 100 nmol/L) pero lo hace la inhibición dual PI3K/mTOR a concentraciones relativamente más altas (aproximadamente 500 nmol/L), Serra et al., 2008.

10 Un inhibidor catalítico de mTOR adicional descrito en la literatura es CCG168 (conocido de otra manera como AZD-8055, Chresta et al., 2010) el cual tiene el nombre químico {5-[2,4-bis-((S)-3-metil-morfolin-4-il)-pirido[2,3d]pirimidin-7-il]-2-metoxi-fenil}-metanol y la siguiente estructura química



15 Ejemplos adicionales de inhibidores catalíticos de mTOR incluyen 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-one (WO2006/122806), Ku-0063794 (Garcia-Martinez et al., 2009) y WYE-354 (Yu et al., 2009).

20 La enfermedad de Huntington (HD) está caracterizada por la muerte de células neuronales selectivas en el córtex y el estriato lo cual lleva a demencia progresiva, incapacidad motora y cambios de personalidad. Una característica molecular principal en el HD es la aparición gradual de inclusiones citosólicas y nucleares de poliQ las cuales avanzan en paralelo con la aparición y progresión de la enfermedad. En el estriato, las neuronas de la espina de tamaño mediano (MNs) exhiben un incremento gradual de inclusiones de poliQ, descenso de DARPP-32 y degeneración global de los axones ((The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993; Davies et al., 1997; Bibb et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2000). Para seguir la degeneración del estriato, se ha desarrollado un modelo *ex-vivo* para la enfermedad de Huntington utilizando cultivos de secciones corticoestriatales del modelo de ratón R6/2. Esta metodología está basada en el método de interfaz y produce cultivos en sección que pueden ser mantenidos por varias semanas (Galimberti et al., 2006; Gogolla et al., 2006; Galimberti et al., 2010). Cuando las secciones de R6/2 fueron investigadas en diferentes semanas *in vitro*, se observó un incremento gradual en las inclusiones de poliQ, un descenso de DARPP-32 y una pérdida global de neurofilamentos en el estriato.

30 Tal como se describe aquí, se iniciaron estudios en secciones de R6/2 para investigar si la eliminación de Huntington mutante (mHtt) es suficiente para preservar la degeneración del estriato. En particular, se indujo autofagia inhibiendo la ruta del mTOR de los días 14 a 21 *in vitro* (DIV). La inhibición de mTOR indujo la autofagia, inclusiones reducidas de poliQ y preservó el DARPP-32 y la pérdida de neurofilamentos en el estriato. De manera interesante, una combinación de dosis bajas de un inhibidor alostérico de mTOR (RAD001) y un inhibidor catalítico de mTOR (BEZ235 o CCG168) trabajó de manera sinérgica en comparación con RAD001 250 nM y BEZ235 50 nM como tratamientos individuales. Además, la inhibición combinacional de mTOR de RAD001 250 nM/BEZ235 30 nM preservó la degeneración del estriato en una concentración de BEZ235 10 veces más baja. Así, los resultados descritos aquí sugieren que combinaciones de dosis bajas de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR reduce la degeneración del estriato en secciones R6/2 y representan una oportunidad terapéutica para el tratamiento de HD. Esta interacción sinérgica inesperada permite una reducción en la dosis adquirida, llevando a efectos colaterales menores y potenciando la efectividad clínica.

40 Además de HD, pueden tratarse también otras enfermedades neurodegenerativas causadas por proteínas susceptibles de agregación por inducción de la autofagia a través de la inhibición de la ruta de mTOR, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3 (también conocida como enfermedad de Machado-Joseph), enfermedad de Alzheimer, enfermedad neuronal motora causada por mutaciones en la superóxido dismutasa 1 y formas de neuropatía periférica causadas por mutaciones en la proteína mielina 22 periférica. Para descripción adicional del enlace entre la autofagia y la neurodegeneración véase Rubinstein DC et al., 2007 and Sarkar S et al.,

2009. La WO2008103636 divulga compuestos de fórmula (I), tales como el BEZ235 preferido para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad neuronal motora.

5 La WO2010118419 divulga inhibidores de mTOR para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad, tales como entre otros enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington.

La WO2010049481 divulga combinaciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de PK3K de fórmula (I) e inhibidores de mTOR, tales como RAD001, AZD-8055 (CCG168), etc. Las combinaciones entre otras son usadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad neuronal motora.

10 Resumen de la invención

En un primer aspecto de la invención, se provee por lo tanto una combinación de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR de BEZ235 o CCG168.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto de combinación que comprende un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un inhibidor alostérico de mTOR, un inhibidor catalítico de mTOR y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.

Descripción detallada de las figuras

Figura 1: La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 induce autofagia en secciones de cerebro de R6/2.

30 (A) Descripción esquemática del tratamiento de secciones de cerebro. Las secciones fueron preparadas en el día postnatal 7 (P7) y tratadas con RAD001, BEZ235 y CCG168 de DIV14 a DIV21.

(B) Análisis bioquímico de la actividad de mTORC1 (p-S6 S240/244), inducción de autofagia (conversión de LC3-II/I) y B-actina. El tratamiento con BEZ235 50 nM no redujo p-S6 S240/244 y no tuvo efecto en el incremento de la conversión LC3-II/I (relación LC3-II/I). Sin embargo, RAD001 250 nM y RAD001 250 nM/BEZ235 50 nM redujo p-S6 S240/244 y la combinación de ambos incrementó adicionalmente el nivel de LC3-II.

35 (C) Análisis cuantitativo de la conversión de LC3-II/I (relación LC3-II/I). Nótese que la combinación de RAD001/BEZ235 indujo una conversión significativa de LC3-II/I en comparación con concentraciones bajas individuales. BEZ235 300 nM y CCG168 300 nM alcanzaron eficacia similar, indicando que BEZ235 o CCG168 juntos con RAD001 inducen de manera sinérgica la autofagia (N=5 secciones para cada condición, ANOVA \*\* una vía  $p < 0.01$ , Prueba t de Student Post hoc, \*\*\*  $p < 0.001$ ).

40 Figura 2: La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 reduce las inclusiones de poliQ en secciones de cerebro de R6/2.

La cuantificación de la densidad de poliQ a partir de DIV7 hasta DIV21 y bajo tratamientos diferentes en DIV21. La combinación de RAD001/BEZ235 redujo en  $40\% \pm 11$  de la densidad de poliQ en comparación con las secciones tratadas en DIV21 R6/2 DMSO, mientras que concentraciones individuales de RAD001 de 250 nM y BEZ235 de 50 nM no mostraron efecto. La combinación de RAD001/CCG168 también redujo la densidad de poliQ en comparación con las secciones tratadas con DIV21 R6/2 DMSO. (N=5 secciones para cada condición, ANOVA \* una vía  $p < 0.05$ , prueba t de Student Post hoc, \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Figura 3: La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 evita la degeneración del estriato en secciones de cerebro de R6/2 según se estableció por análisis cuantitativo de la intensidad de DARPP-32 a DIV21.

La combinación de RAD001/BEZ235 preservó  $80\% \pm 5$  del nivel de DARPP-32 en comparación con las secciones R6/2 de control. La combinación de RAD001/CCG168 también fue efectiva para preservar los niveles de DARPP-32 (N=5 secciones para cada condición, ANOVA\*\* de una vía  $p < 0.01$ , prueba t de Student Post hoc, \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

5 Figura 4: La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 evita la degeneración del estriato en secciones de cerebro de R6/2 según se establece por análisis cuantitativo de la intensidad de neurofilamento a DIV21.

10 La combinación de RAD001/BEZ235 preservó el  $95\% \pm 12$  del nivel de neurofilamentos en comparación con las secciones de control de R6/2. La combinación de RAD001/CCG168 también fue efectiva en preservar los niveles de neurofilamentos. (N=5 secciones para cada condición, ANOVA \*\* una vía  $p < 0.01$ , prueba t de Student Post hoc, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Descripción detallada de la invención

15 En un primer aspecto de la invención, se provee por lo tanto una combinación de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.

20 En una realización, se provee una combinación de RAD001 y BEZ235 o CCG168 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el RAD001 o el CCG168 se administran a una dosis de aproximadamente 1.5 mg/kg/día y el BEZ235 se administra a una dosis de aproximadamente 2.5 mg/kg/día.

En una realización, se provee una combinación de RAD001 y BEZ235 o CCG168 para uso en el tratamiento o prevención de enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde:

25 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.4 y 1.6 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.4 y 2.6 mg/kg/día;

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.3 y 1.7 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.3 y 2.7 mg/kg/día;

30 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.2 y 1.8 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.2 y 2.8 mg/kg/día;

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.1 y 1.9 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.1 y 2.9 mg/kg/día;

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.0 y 2.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.0 and 3.0 mg/kg/día;

35 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.8 y 2.2 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.8 y 2.6 mg/kg/día;

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.6 y 2.4 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.6 y 2.8 mg/kg/día;

40 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.4 y 2.6 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.4 and 3.0 mg/kg/día;

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.2 y 2.8 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.0 and 3.5 mg/kg/día;

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 and 3.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.5 and 4.0 mg/kg/día;

45 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 and 5.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.01 and 5.0 mg/kg/día; o

- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día.

5 En una realización, se provee una combinación de RAD001 y BEZ235 o CCG168 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 se administra a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto de combinación que comprende un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.

15 En una realización, se provee un producto de combinación que comprende una o múltiples dosis de aproximadamente 100 mg de RAD001 y aproximadamente 175 mg de BEZ235 o CCG168 bien como preparaciones individuales o como una combinación preparada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

20 En una realización, se provee un producto de combinación que comprende una o múltiples dosis de 90 a 100 mg de RAD001 y 165 a 185 mg de BEZ235 o CCG168; 80 a 120 mg de RAD001 y 155 a 195 mg de BEZ235 o CCG168; 70 a 130 mg de RAD001 y 145 a 205 mg de BEZ235 o CCG168; 60 a 140 mg de RAD001 y 135 a 215 mg de BEZ235 o CCG168; 50 a 150 mg de RAD001 y 125 a 225 mg de BEZ235 o CCG168; 50 a 200 mg de RAD001 y 100 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; 25 a 175 mg de RAD001 y 100 a 250 mg de BEZ235 o CCG168; 1 a 200 mg de RAD001 y 50 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; 1 a 300 mg de RAD001 y 1 a 500 mg de BEZ235 o CCG168; o 1 a 500 mg de RAD001 y 1 a 800 mg de BEZ235 o CCG168; bien sea como preparaciones individuales o como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

30 En otro aspecto de la invención, se provee una composición farmacéutica que comprende un inhibidor alostérico de mTOR, un inhibidor catalítico de mTOR y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- aproximadamente 100 mg de RAD001;

35 - aproximadamente 175 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

40 En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 90 a 110 mg de RAD001;

- 165 a 185 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

45 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 80 a 120 mg de RAD001;
- 155 a 195 mg de BEZ235 o CCG168; y
- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

5 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 70 a 130 mg de RAD001;
- 145 a 205 mg de BEZ235 o CCG168; y

10 - un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 15
- 60 a 140 mg de RAD001;
  - 135 a 215 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

20 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 50 a 150 mg de RAD001;
- 125 a 225 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

25 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 50 a 200 mg de RAD001;

30 - 100 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

35 En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 25 a 175 mg de RAD001;

- 100 a 250 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

5 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 1 a 200 mg de RAD001;

- 50 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

10 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 1 a 300 mg de RAD001;

15 - 1 a 500 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

20 En una realización, se provee una composición farmacéutica que comprende:

- 1 a 500 mg de RAD001;

- 1 a 800 mg de BEZ235 o CCG168; y

- un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

25 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.

En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor alostérico de mTOR y el inhibidor catalítico de mTOR se administran oralmente.

30 En una realización preferida adicional de la presente invención, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Huntington.

Tal como se utiliza aquí, el término “un”, “una”, “el/la” y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se considera que cubren tanto los singulares como los plurales al menos que se indique otra cosa aquí o se contradiga claramente por el contexto.

35 Tal como se utiliza aquí, el término “aproximadamente” en conexión con una dosis de fármaco particular tendrá el significado de una dosis de fármaco en el rango de más/menos 10%, preferiblemente más/menos 5%, más preferiblemente más/menos 2.5%, o más preferiblemente todavía más/menos 1%, de la dosis nominal de fármaco. A manera de ejemplo, una dosis nominal de fármaco de aproximadamente 100 mg de ingrediente activo puede contener desde 90 a 110 mg, preferiblemente desde 95 hasta 105 mg, más preferiblemente desde 97.5 a 102.5 mg, o más preferiblemente todavía de 99 a 101 mg de ingrediente activo por dosis.

40 Tal como se utiliza aquí, el término “inhibidor alostérico de mTOR” se refiere a un compuesto que apunta, hace

disminuir o inhibe la actividad/función de la mTOR quinasa a través del enlazamiento a un sitio de enlazamiento alostérico, por ejemplo el sitio de enlazamiento de FKBP12 rapamicina (FRB), del complejo mTORC1. Ejemplos de inhibidores alostéricos de mTOR incluyen sirolimus (rapamicina, AY22989), RAD001, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también llamado Temsirolimus o CCI-779) y Deferolimus (AP-23573/MK-8669). Referencia a cualquier inhibidor alostérico particular de mTOR aquí también comprende cualquier sal, estereoisómero, tautómero, solvatos, hidratos y polimorfos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Si una sustancia en particular es o no un inhibidor alostérico de mTOR puede establecerse utilizando análisis cinéticos de enzimas estándar bien conocidos para los experimentados en el arte, Childs et al., (1976), Fersth A. (1985) y Dixon M. (2000). Si una sustancia en particular funciona o no como un inhibidor alostérico enlazándose al FRB del complejo mTORC1 puede establecerse utilizando el ensayo de transferencia de energía de resonancia por fluorescencia resuelta en tiempo (TR-FRET) descrito más adelante.

Tal como se utiliza aquí, el término "BEZ235" también comprende cualquier sal, estereoisómero, tautómero, solvato, hidrato y polimorfos farmacéuticamente aceptables del mismo. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, el BEZ235 es provisto en su forma de sal de monotosilato.

Tal como se utiliza aquí, el término "inhibidor catalítico de mTOR" se refiere a un compuesto que apunta, disminuye o hace inhibir la actividad/función catalítica del mTOR enlazándose en su sitio de enlazamiento de ATP. El término "inhibidor catalítico de mTOR" tal como se utiliza aquí incluye tanto inhibidores catalíticos PI3K/mTOR como inhibidores catalíticos selectivos de mTOR. Ejemplos de inhibidores catalíticos de mTOR incluyen BEZ235, 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-one (WO2006/122806), AZD-8055, Ku-0063794 (Garcia-Martinez et al., 2009) y WYE-354 (Yu et al., 2009). La referencia a cualquier inhibidor catalítico de mTOR en particular aquí también comprende cualquier sal, estereoisómero, tautómero, solvato, hidrato y polimorfos farmacéuticamente aceptables del mismo. Si una sustancia en particular es o no un inhibidor catalítico de mTOR puede establecerse utilizando análisis cinéticos de enzima estándar bien conocidos para los experimentados en el arte, Childs et al., (1976), Fersth A. (1985) y Dixon M. (2000).

Tal como se utiliza aquí, el término "CCG168" también comprende cualquier sal, estereoisómero, tautómero, solvato, hidrato y polimorfos farmacéuticamente aceptables del mismo.

Tal como se utiliza aquí, el término "combinación" se refiere a cualquier combinación de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR útil en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo enfermedad de Huntington. Cualquier tal combinación puede ser administrada simultáneamente o secuencialmente. El término "combinación" también incluye "producto de combinación".

Tal como se utiliza aquí, el término "producto de combinación" se refiere a cualquier producto que comprende tanto un inhibidor alostérico de mTOR como un inhibidor catalítico de mTOR, por ejemplo, una composición farmacéutica de dosis fija combinada que comprende un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR como ingredientes activos, o un conjunto de partes que comprende preparaciones individuales o combinadas de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR en formas adecuadas para administración simultánea, separada o secuencial. Una composición farmacéutica de dosis fija combinada comprende tanto un inhibidor alostérico de mTOR como un inhibidor catalítico de mTOR en una composición farmacéutica sencilla, por ejemplo una píldora o comprimido sencillos que comprenden RAD001 y BEZ235 o CCG168.

Tal como se utiliza aquí, un sujeto "requiere" un tratamiento si tal sujeto se beneficiaría biológicamente, medicamento o en calidad de vida de tal tratamiento.

Tal como se utiliza aquí, el término "inhibir", "inhibición" o "que inhibe" se refiere a la reducción o supresión de una condición, síntoma, o trastorno, o enfermedad, dados, o un descenso significativo en la actividad de línea base de una actividad o proceso biológicos.

Tal como se utiliza aquí, el término "mg/kg/día" se refiere a mg de compuesto por kg de peso corporal de sujeto por día.

Tal como se utiliza aquí, el término "preparación de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR" incluye composiciones farmacéuticas de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR. El término "preparaciones individuales de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR" se refiere a preparaciones separadas de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR, mientras que "una preparación combinada de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR" se refiere a una preparación sencilla que comprende tanto un inhibidor alostérico de mTOR como un inhibidor catalítico de mTOR, por ejemplo, una composición farmacéutica de dosis fija combinada que comprende tanto un inhibidor alostérico de mTOR como un inhibidor catalítico de mTOR, por ejemplo RAD001 y BEZ235 o CCG168 en una píldora o comprimido sencillos.

- 5 Tal como se utiliza aquí, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes, (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardo de la absorción, sales, conservantes, estabilizadores de fármaco, aglomerantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes endulzantes, agentes saborizantes, colorantes y similares y combinaciones de los mismos, tal como es sabido por los experimentados en el arte (véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en el caso de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas está contemplado.
- 10 Tal como se utiliza aquí, el término “prevención” de cualquier enfermedad o trastorno en particular se refiere a la administración de un compuesto de la invención a un sujeto antes de que los síntomas de esa enfermedad o trastorno sean evidentes.
- Tal como se utiliza aquí, el término “RAD001” también comprende cualquier sal, estereoisómero, tautómero, solvato, hidrato y polimorfo farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 15 Tal como se utiliza aquí, el término “sujeto” se refiere a un animal. Típicamente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere por ejemplo a primates (por ejemplo, humanos, masculino o femenino), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En aún otras realizaciones, el sujeto es un humano.
- 20 El término “una cantidad terapéuticamente efectiva” de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad del compuesto de la presente invención que iniciará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, reducción o inhibición de una enzima o una actividad proteínica, o mejora síntomas, alivia condiciones, hace más lenta o retarda la progresión de una enfermedad, o evita una enfermedad, etc.
- 25 Tal como se utiliza aquí, el término “tratar”, “que trata” o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (esto es, hacer más lento o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma) en un sujeto por administración de una combinación de acuerdo con la presente invención. En una realización “tratar”, “que trata” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En aún otra realización, “tratar”, “que trata” o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo estabilización de un parámetro físico), o ambos.
- 30 Todos los métodos descritos aquí pueden ser ejecutados en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa aquí o que sea contradicho claramente de otra manera por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (por ejemplo “tal como”) provistos aquí pretende solamente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación sobre el alcance de la invención reivindicada de otra forma.
- 35 Los compuestos de las combinaciones de la presente invención pueden ser administrados bien sea simultáneamente o secuencialmente. Los compuestos de las combinaciones de la presente invención también pueden ser administrados separadamente, mediante la misma o diferente ruta de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica.
- 40 Un Kit de partes de la presente invención comprende medios para retener separadamente preparaciones individuales o combinadas de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR, tales como un contenedor, botella dividida o paquetes en lámina divididos. Un ejemplo de tal conjunto es un empaque blíster tal como se utiliza típicamente para el empaque de comprimidos, cápsulas y similares.
- 45 El conjunto de la invención también puede ser utilizado para administrar formas de dosificación diferente, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas una contra otra. Para ayudar en el cumplimiento, el conjunto de la invención comprende típicamente instrucciones para administración.
- 50 El inhibidor alostérico de mTOR y el inhibidor catalíticos de mTOR de las combinaciones de la invención pueden ser puestos juntos en una terapia de combinación: (i) antes de entregar el producto de combinación a los médicos (por ejemplo en el caso de un conjunto); (ii) por los médicos mismos (o bajo la guía del médico) justo antes de la administración; o (iii) en los pacientes mismos, por ejemplo durante la administración secuencial de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR.
- La composición farmacéutica de la presente invención puede ser formulada para rutas particulares de administración tales como administración oral, administración parenteral y administración rectal, etc. En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor alostérico de mTOR y el inhibidor catalítico de mTOR son administrados

oralmente. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden configurarse en una forma sólida (incluyendo sin limitación cápsulas, comprimidos, píldoras, gránulos, polvos o supositorios), o en una forma líquida (incluyendo sin limitación soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden ser sometidas a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener diluyentes, agentes lubricantes o agentes reguladores inertes convencionales, así como adyuvantes, tales como conservantes, estabilizadores, agentes de humectación, emulsificantes y reguladores, etc.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas son comprimidos o cápsulas de gelatina que comprende los ingredientes activos junto con

- a) diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, células y/o glicina;
- 10 b) lubricantes, por ejemplo sílica, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol; para comprimidos también
- c) aglomerantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona; si se desea
- d) desintegrantes, por ejemplo, almidones, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; y/o
- 15 e) absorbentes, colorantes, sabores y endulzantes.

Los comprimidos pueden ser bien recubiertos por una película o con recubrimiento entérico de acuerdo con métodos conocidos en el arte.

Composiciones adecuadas para administración oral incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención en la forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones previstas para uso oral se preparan de acuerdo con cualquier método conocido en el arte para la manufactura de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo consistente de agentes endulzantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes de conservación con el fin de proveer preparaciones farmacéuticamente elegantes y palatables. Los comprimidos pueden contener los ingredientes activos en mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la manufactura de tabletas. Estos excipientes son, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes de aglomeración, por ejemplo almidón, gelatina o acacia; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos son no recubiertos o recubiertos por técnicas conocidas para retardar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto proveer una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material para retardo en el tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para uso oral pueden ser presentadas como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el ingrediente activo está mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Puede proveerse una composición farmacéutica individual que comprende BEZ235 en forma de una cápsula de gelatina dura para administración oral que comprende 5, 25 o 100 mg de BEZ235. Los excipientes pueden ser: lactosa, crospovidona, polivinilpirrolidona K30, almidón, aerosil y estearato de magnesio. Las cápsulas de 5 y 25 mg pueden utilizar una cubierta de cápsula de Tamaño 4; la cápsula de 100 mg puede utilizar una cubierta de cápsula de Tamaño 1.

El RAD001 es un fármaco aprobado por la FDA y por lo tanto las composiciones farmacéuticas individuales adecuadas que comprenden RAD001 están disponibles comercialmente. Por ejemplo, el RAD001 puede ser administrado en forma de comprimido para administración oral en un comprimido que comprende una cantidad adecuada de RAD001 e hidroxitolueno butilado (BHT), estearato de magnesio, hidroxipropil metilcelulosa, crospovidona y lactosa como excipientes. El RAD001 también puede ser administrado como un comprimido dispersable que comprende una cantidad adecuada de RAD001 y BHT, estearato de magnesio, hidroxipropil metilcelulosa, crospovidona, sílica anhidra coloidal y lactosa como excipientes.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones isotónicas o suspensiones acuosas, y se preparan ventajosamente supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden ser esterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes de conservación, de estabilización, de humectación o emulsificación, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o reguladores. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones se preparan de

acuerdo con métodos de mezcla, granulado y recubrimiento convencionales, respectivamente, y contienen aproximadamente 0.1-75%, o contienen aproximadamente 1-50%, del ingrediente activo.

5 Composiciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención con un vehículo adecuado. Vehículos adecuados para administración transdérmica incluyen solventes absorbibles farmacológicamente aceptables para ayudar en el paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en la forma de una venda que comprende un miembro de soporte, un reservorio que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera que controla la rata para suministrar el compuesto a la piel del huésped a una rata controlada y predeterminada durante un período prolongado de tiempo, y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

10 Composiciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles o formulaciones asperjables, por ejemplo, para administración mediante un aerosol o similares. Tales sistemas de administración tópica serán apropiados en particular para la aplicación dérmica, por ejemplo para el tratamiento de cáncer de piel, por ejemplo, para uso profiláctico en cremas solares, lociones, aspersiones y similares. Son así particularmente adecuadas para uso en formulaciones tópicas, incluyendo cosméticos bien conocidas en el arte. Pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes potenciadores de la tonicidad, reguladores y conservantes.

20 Tal como se utiliza aquí una aplicación tópica también puede ser pertinente a una inhalación o a una aplicación intranasal. Pueden ser suministradas convenientemente en la forma de un polvo seco (bien sea solo, como una mezcla, por ejemplo una mezcla seca con lactosa, o una partícula componente mezclada, por ejemplo con fosfolípidos) a partir de un inhalador para polvo seco o una presentación de aspersión en aerosol a partir de un contenedor presurizado, bomba, aspersor, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado.

La presente invención provee adicionalmente composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que comprenden un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR como ingredientes activos, puesto que el agua puede facilitar la degradación de ciertos compuestos.

25 Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras de la invención pueden ser preparadas utilizando ingredientes anhidros o con bajo contenido de humectación y condiciones de baja humectación o baja humedad. Una composición farmacéutica anhidra puede ser preparada y almacenada de tal manera que se mantenga su naturaleza anhidra. De acuerdo con lo anterior, las composiciones anhidras son empacadas utilizando materiales conocidos por evitar la exposición al agua de tal manera que pueden ser incluidos en kits de formulación adecuados. Ejemplos de empaques adecuados incluyen, pero no se limitan a, láminas selladas herméticamente, plásticos, contenedores de dosis unitarias (por ejemplo, viales), empaques blíster y empaques de banda.

30 La invención provee adicionalmente composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la rata en la cual el compuesto de la presente invención como ingrediente activo se descompondrá. Tales agentes, se denominan aquí como "estabilizadores".

35 Las dosificaciones de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR de las composiciones y combinaciones farmacéuticas de la presente invención dependen de la especie del sujeto, del peso corporal, edad y condición individual, o de la severidad de la enfermedad que está siendo tratada. Un médico, practicante clínico o un veterinario de experiencia normal puede determinar fácilmente la cantidad efectiva de cada uno de los ingredientes activos necesaria para evitar, tratar o inhibir el progreso de la enfermedad.

40 Las propiedades de dosificación antes citadas pueden ser demostradas en pruebas *in vitro* e *in vivo* utilizando ventajosamente mamíferos, por ejemplo, ratones, ratas, perros, monos u órganos, tejidos aislados y preparaciones de los mismos. Los compuestos de las combinaciones de la presente invención pueden ser aplicados *in vitro* en la forma de soluciones, por ejemplo soluciones acuosas, e *in vivo* bien sea por vía entérica, parenteral, ventajosamente por vía intravenosa, por ejemplo, como una suspensión o una solución acuosa. Las concentraciones de dosificación *in vitro* para RAD001 pueden variar entre 1 a 500 nM, 100 a 350 nM, 200 a 200 nM o aproximadamente 250 nM, mientras que las concentraciones *in vitro* para BEZ235 o CCG168 pueden variar entre 1 a 200 nM, 1 a 100 nM, 25 a 75 nM o aproximadamente 50 nM. Las concentraciones de dosificación *in vivo* se proveen aquí anteriormente.

## Ejemplos

50 **Ejemplo 1:** La combinación en baja dosis de RAD001 y BEZ235 o CCG168 induce autofagia en secciones de cerebro de R6/2

Estudios recientes han demostrado que la autofagia es una ruta de limpieza clave para la acumulación de mHtt y que la inhibición de la ruta del mTOR es suficiente para inducir la autofagia. En particular, los inhibidores de la ruta del mTOR demostraron inducir la autofagia, hacer disminuir la acumulación de mHtt y proteger de la

neurodegeneración en diferentes modelos celulares en mosca y animales de la enfermedad de Huntington (Ravikumar et al., 2004; Ravikumar et al., 2006; Levine et al., 2008; Sakar et al., 2009). Para evaluar si los inhibidores alostéricos y catalíticos de mTOR podrían inducir autofagia y mantener la degeneración del estriato, se trataron secciones de R6/2 utilizando RAD001, BEZ235 y CCG168 ((5-[2,4-bis-((S)-3-metil-morfolin-4-il)-pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-2-metoxi-fenil)-metanol) a partir de DIV14 a DIV21 y la actividad de mTOR y la conversión de LC3-II/I en DIV21 fueron analizadas (figura 1). El BEZ235 300 nM y el CCG168 300 nM indujeron autofagia, mientras que el RAD001 250 nM y BEZ235 50 nM no tuvieron efecto. De manera interesante, el BEZ235 50 nM no redujo el nivel de p-S6 S240/244 en contraste con el RAD001 de 250 nM y el RAD001 de 250 nM/ BEZ235 50 nM. De manera sorprendente, las combinaciones RAD001 250 nM/BEZ235 50 nM y RAD001 250 nM/CCG168 50 nM fueron suficientes para inducir autofagia en comparación con RAD001 de 250 nM y BEZ235 de 50 nM como concentraciones individuales, indicando que el BEZ235 y el CCG168 trabajan de manera sinérgica con el RAD001 para incrementar los niveles de LC3-II (figura 1).

**Ejemplo 2:** La combinación en bajas dosis de RAD001 y BEZ235 o CCG168 reduce las inclusiones poliQ en secciones de cerebro de R6/2

Con el fin de investigar si la combinación de RAD001/BEZ235 podría trabajar de manera sinérgica en la reducción de inclusiones de poliQ, la densidad de poliQ de secciones de R6/2 tratadas en DIV21 fue medida comparando la detección inmunohistoquímica de inclusiones de poliQ y núcleos en secciones de R6/2. Las secciones tratadas con RAD001 de 250 nM o BEZ235 de 50 nM exhibieron una distribución de poliQ similar en comparación con las R6/2 de control, mientras que la combinación de RAD001/BEZ235 y RAD001/CCG168 redujo la densidad de poliQ. Se observó que las concentraciones bajas individuales de RAD001 y BEZ235 no redujeron las inclusiones de poliQ, mientras que la combinación tuvo un efecto significativo y redujo en 40%  $\pm$  11 la densidad de poliQ en comparación con las secciones de R6/2. Además, la concentración individual efectiva de BEZ235 300 nM llevó a un descenso similar, sugiriendo que el BEZ235 junto con RAD001 trabajan de manera sinérgica en la reducción de la densidad de poliQ (figura 2).

**Ejemplo 3:** La combinación en dosis bajas de RAD001 y BEZ235 o CCG168 evita la degeneración del estriato en secciones de cerebro de R6/2

La progresión de la HD está caracterizado por la pérdida gradual de DARPP-32 del estriato y degeneración de los axones (The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993; Davies et al., 1997; Bibb et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2000). En secciones de R6/2, se monitorizó una pérdida gradual de DARPP-32 del estriato y neurofilamentos iniciando en DIV21. Por lo tanto, para establecer si la combinación de RAD001/BEZ235 podría mantener de manera sinérgica la degeneración de estriato en avance, las tinciones de DARPP-32 y neurofilamentos en DIV21 fueron analizadas por detección inmunohistoquímica de DARPP-32 y neurofilamentos en secciones de WT y R6/2. Las concentraciones bajas individuales de RAD001 y BEZ235 no fueron efectivas en la conservación de los niveles de DARPP-32 y neurofilamentos. Sin embargo, la combinación conservo el 95%  $\pm$  12 del nivel de neurofilamentos y 80%  $\pm$  5 del nivel de DARPP-32. La concentración en combinación efectiva más baja fue RAD001 250 nM/BEZ235 30 nM (figuras 3 y 4). Una combinación de RAD001 de 250 nM y CCG168 de 50 nM también fue efectiva en el mantenimiento de los niveles de DARPP-32 y neurofilamentos.

#### Conclusión

Tomados en conjunto estos resultados indican que la combinación de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR, por ejemplo RAD001/BEZ235 o CCG168, trabaja de manera sinérgica para introducir autofagia, reducir inclusiones de poliQ y evitar la degeneración del estriato y sorprendentemente permite eficacia a una concentración más baja en comparación con un inhibidor catalítico de mTOR solo, por ejemplo una concentración 10 veces más baja en comparación con BEZ235 de 300 nM. Así, las combinaciones de dosis bajas de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR representan una oportunidad para curar la HD y otras enfermedades neurodegenerativas causadas por proteínas susceptibles de agregación con una exposición reducida al fármaco.

#### Procedimientos experimentales

Los ejemplos 1 a 3 anteriores fueron llevados a cabo utilizando los siguientes procedimientos experimentales

#### Cultivos de ratones y secciones

Los ratones transgénicos que expresan el Exon-1Q200 de Huntington humano (modelo de ratón R6/2 descrito en Davies et al., 1997) fueron alojados en un cuarto controlado en temperatura y mantenidos en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* y se llevaron a cabo experimentos de acuerdo con las guías de las autoridades locales para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los cultivos de secciones fueron establecidos de acuerdo con el procedimiento descrito por Stoppini y colegas (Stoppini et al., 1991 y Gogolla

et al., 2006) y se utilizó un ángulo de corte particular para producir secciones de cerebro con una ruta corticoestriato preservada. Finalmente, se seleccionaron secciones, se colocaron sobre Millicel (Millipore, PICM03050) y se cultivaron en placas de 6 pozos a 35°C y 5% de CO<sub>2</sub> en la presencia de 1 ml de medio de cultivo.

Tratamiento con inhibidores de mTOR

5 Las secciones fueron tratadas con diferentes inhibidores de mTOR de DIV14 a DIV21. El medio de cultivo fue intercambiado cada segundo día y se agregaron fármacos en el medio de cultivo fresco. Se utilizó este protocolo para evaluar la acción de los siguientes inhibidores de mTOR: BEZ235 (50 y 300 nM en DMSO), RAD001 (250 nM en DMSO), CCG168 (300 nM en DMSO), RAD001 + BEZ235 (250 10, 250 30 y 250 50 nM en DMSO) y RAD001 + CCG168 (250 y 50 nM en DMSO).

10 Bioquímica

Se lavaron las secciones en PBS y se sometieron a lisis en Triton X-100/PBS al 1% que contenía Complete Mini (Roche, # 04693124001) y PhosSTOP (Roche, # 04906837001). Los lisados fueron sometidos a ultrasonido y analizados por inmunoprecipitación Western en cuanto a B-actina (Sigma, # A5441), pS6 Ser 240/244 (Cell Signalling, # 2215), y LC3B (Cell Signalling, # 2775). Las inmunoprecipitaciones fueron desarrolladas con el reactivo de detección ECL (Amersham Biosciences).

15

Inmunohistoquímica

Las secciones fueron fijadas durante 10 minutos en PFA al 4%, lavadas en PBS y bloqueadas durante 4 horas a temperatura ambiente en Triton X-100 al 0.3% con suero de caballo/PBS al 20% (solución bloqueadora). Los anticuerpos para DARPP-32 (Cell Signaling, # 2306S, 1:200), neurofilamentos (NeuF, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa; # 2H3, 1:200) y EM48 (Millipore, # MAB5374, 1:200) fueron incubados durante 48 horas a 4°C en la solución de bloqueo. Después de esto, las secciones fueron lavadas en PBS, incubadas durante 2 horas en Triton X-100/PBS al 0.3% con anticuerpos secundarios conjugados Alexa 488 (Invitrogen, 1:500) y Alexa 555 (Invitrogen, 1:500). Finalmente, las secciones fueron lavadas con PBS, incubadas durante 10 minutos con DAPI (Invitrogen, # D1306 1:10000) y embebidas sobre placas de vidrio utilizando ProLong (Invitrogen, # P36934).

20

25

Microscopía y cuantificación

Se obtuvieron imágenes de alta resolución en un microscopio con focal vertical Zeiss LSM700, utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan-Neofluar 40x/1.3. Para la cuantificación de la densidad de poliQ y la intensidad de la señal de DARPP-32/NeuF, se obtuvieron al menos tres apilamientos/sección con focales 3D en el estriato para cada experimento (cinco secciones por condición), y se analizaron utilizando los softwares Imaris 4.2 (Bitplane AG) e Image J.

30

Análisis estadístico

Todos los datos son expresados como media ± SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico por análisis de varianza (ANOVA) seguido por la Prueba t de Student (Excel, Microsoft, Estados Unidos). El nivel significativo fue fijado a p<0.05.

35

Ensayo de mTOR por TR-FRET

Reactivos e instrumentación: Los componentes del ensayo de enlazamiento de mTOR por TR-FRET pueden ser adquiridos en Invitrogen Corporation (Carlsbad/CA, Estados Unidos): GFP-FKBP12 (muestra 691-145-3B, 47 μM, MW=38KDa), Anticuerpo Tb<sup>3+</sup>-α-GST (Cat. No. PV4216), regulador de dilución propio para TR-FRET (Cat. No. PV3574), GFP-4EBP1 (Cat. No. PV4759). DMSO (Fluka, Cat. No. 41644). Un lector de microplaca Synergy 2 de Biotek Instruments, Winooski, Vermont (obtenido a través de Witec, Suiza) con las siguientes características puede usarse: método de detección fluorescencia resuelta en tiempo, fuente de luz instantánea de Xenón, tipo de lectura punto final, velocidad de lectura normal, retardo después del movimiento de la placa 100 mseg, retardo antes de la recolección de datos 100 μs, mediciones por punto de datos 10, tiempo de recolección de datos 200 μs, sensibilidad automática, filtro de excitación 340/30, filtros de emisión 520/25 y 495/10.

40

45

Las placas de poliestireno sin enlazamiento negras en formato de 384 pozos para el ensayo de enlazamiento de mTOR por TR-FRET están disponibles en Corning (bajo volumen, fondo redondo, Cat. No. NBS#3676).

Los compuestos inhibidores de la muestra son preparados frescos como soluciones 10 mM en DMSO.

Los compuestos de reserva de 10 mM son diluidos primero en DMSO, luego en regulador TR-FRET.

Placas de ensayo: los compuestos son diluidos directamente en la placa de ensayo de 384 pozos y se mantiene constante una concentración final de DMSO en 1%. Los compuestos en dilución son mezclados con 10  $\mu$ L de GFP-FKBP-12, anticuerpo Tb<sup>3+</sup>- $\alpha$ -GST y GSTmTOR. El volumen final en la placa de ensayos es 20  $\mu$ L.

5 Principio: La transferencia de energía de resonancia en fluorescencia resuelta en tiempo (TR-FRET) es una tecnología basada en la transferencia de energía entre dos colorantes adyacentes, desde un electrón excitado en un colorante (el donante) a un electrón de un colorante adyacente (el aceptor) a través de resonancia, luego liberada como un fotón. Esta transferencia de energía es detectada por un incremento en la emisión de fluorescencia del aceptor, y un descenso en la emisión de fluorescencia del donante.

10 Los ensayos de TR-FRET utilizan quelatos o criptatos de lantánidos de tiempo de vida largo como especie donante que superan la interferencia de la autofluorescencia del compuesto o la dispersión de luz de compuestos precipitados, introduciendo un retardo después de la excitación mediante una fuente de excitación de lámpara instantánea. Los resultados son expresados frecuentemente como una relación de las intensidades de los fluoróforos aceptor y donante (520 nm/495 nm). La naturaleza relacional de tal valor corrige las diferencias en los volúmenes de ensayo entre los pozos, así como corrige los efectos de detención debido a los compuestos coloreados.

15 Ensayo de enlazamiento de mTOR por TR-FRET: Se mezclan 10  $\mu$ L de las diluciones del compuesto inhibidor con 10  $\mu$ L de GFP-FKBP12, el anticuerpo de Tb<sup>3+</sup>- $\alpha$ -GST, y GST-mTOR en regulador para TR-FRET y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz antes de la lectura. Las placas son leídas en un lector Synergy2 utilizando un tiempo de integración de 200  $\mu$ s y un retardo de 100  $\mu$ s. Se llevan a cabo los siguientes controles para dar la señal de base incluyendo el ensayo con DMSO al 2% (sin compuesto), ensayo sin GST-mTOR, ensayo con GFP-4EBP1 (sin GFP-FKBP12).

20 El GFP-FKBP12 se enlaza al mTOR cuando forma un complejo con un inhibidor alostérico de mTOR que se enlaza al FRB del complejo de mTORC1, por ejemplo rapamicina. El ensayo de enlazamiento de mTOR utiliza un anti-GST-Ab específico marcado con Tb<sup>3+</sup> que reconoce el mTOR etiquetado con GST. Los ensayos de TR-FRET utilizan este quelato de Tb<sup>3+</sup> de tiempo de vida largo como especie donante para transferir la energía al GFP-FKBP12 dando como resultado una emisión de aceptor y donante de 520 nm y 495 nm, respectivamente. Los resultados son expresados como una relación de las intensidades de los fluoróforos aceptor y donante.

25 Determinación de EC<sub>50</sub>: Los valores de EC<sub>50</sub> del porcentaje de inhibición de cada compuesto inhibidor alostérico potencial de mTOR puede derivarse ajustando una curva sigmoideal de respuesta a la dosis (pendiente variable) con respecto a una gráfica de lectura de ensayo contra concentración del inhibidor.

Expresión y purificación de GST-mTOR y GFP-FKBP12 humanos

TOR Humano UniProtKB/Swiss-Prot: P42345; NCBI/Protein Database: NP002638

FKBP12 UniProtKB/Swiss-Prot: P62942

35 4-EBP1 UniProtKB/Swiss-Prot: Q13541

GST-mTOR (1360-2549): El GST-mTOR y GFP-FKBP12 etiquetados con terminal N fueron adquiridos de Invitrogen. El mTOR etiquetado con GST truncado en terminal N humano recombinante (aminoácidos 1360-2549) fue expresado en células de insecto y obtenido de Invitrogen (PV4753, MW=163.9 kDa).

His-GFP-FKBP12: El GFP-FKBP12 también fue obtenido de Invitrogen (muestra 691-145-3B, 47  $\mu$ M, MW =43 KDa).

40 His-GFP-4-EBP1: El GFP-4-EBP1 también fue obtenido de Invitrogen (Cat. No. PV4759, MW = 45 KDa).

Referencias

Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messers A, and Greengard P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. PNAS 97: (12) 6809-6814.

45 Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P, James D, Howard Z, Dudley P, Hughes G, Smith L, Maguire S, Hummersone M, Malagu K, Menear K, Jenkins R, Jacobsen M, Smith GCM, Guichard S and Pass M. (2010). AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable

- ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with In vitro and In vivo Antitumor Activity. *Cancer Research* 70(1), 288-298.
- 5 Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L and Bates GP. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537-48.
- Galimberti I, Bednarek E, Donato F, and Caroni P (2010). EPHA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the Hippocampus. *Neuron*. 65, 627-642.
- Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Muller D, and Caroni P (2006). Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*. 50, 749-763.
- 10 Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM and Alessi DR (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*. 421(1), 29-42.
- Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, and Caroni P (2006a). Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nat. Protoc.* 1, 1165-1171.
- 15 Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441, 885-9.
- Levine B, and Kroemer G (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Luthi-Carter R, A Strand, NL Peters, SM Solano, ZR Hollingsworth, AS Menon, AS Frey, BS Spektor, EB Penney, GS chilling, CA Ross, DR Borchelt, SJ Tapscott, AB Young, JH Cha, and JM Olson (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1259-1271.
- 20 Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies J.E, Luo S, Oroz, L.G, Scaravilli F, Easton D.F, Duden R, O'Kane C.J, and Rubinsztein D.C (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36, 585-595.
- Ravikumar B, and D.C.Rubinsztein (2006). Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: a step towards therapy? *Mol. Aspects Med.* 27, 520-527.
- 25 Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6,304-12.
- Sarkar S, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2009). Autophagic clearance of aggregate-prone proteins associated with neurodegeneration. *Methods Enzymol.* 453, 83-110.
- 30 Sarkar S, Rubinsztein DC (2008). Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J.* 275, 4263-70.
- Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn P, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res.* 68(19), 8022-8030.
- 35 Stoppini L, Buchs PA and Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* 37, 173-182.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 72, 971-983.
- 40 Tsvetkov AS, Miller J, Arrasate M, Wong JS, Pleiss MA, Finkbeiner S (2010). A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 16982-16987.
- 45 Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang WG, Lucas J, Shor B, Kirn J, Veheijen J, Curran K, Malwitz DJ, Cole DC, Ellingboe J, Ayril-Kaloustian S, Mansour TS, Gibbons JJ, Abraham RT, Nowak P and Zask A (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of

Rapamycin. *Cancer Res.* 69(15): 6232-6240.

Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 465, 942-6.

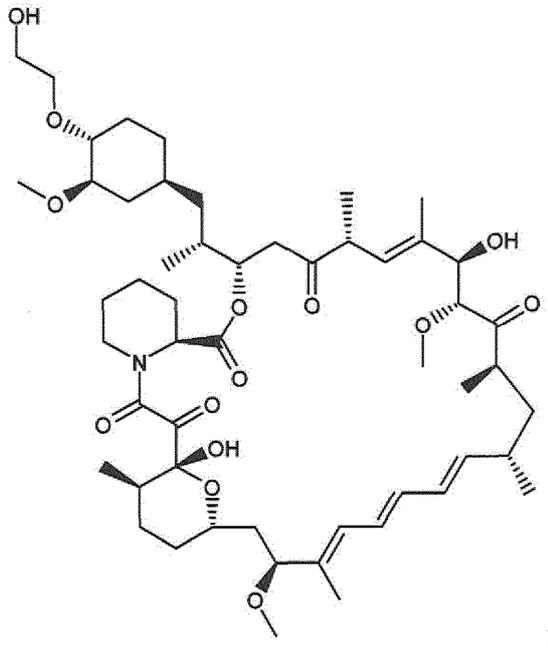
REIVINDICACIONES

1. Una combinación de un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168;

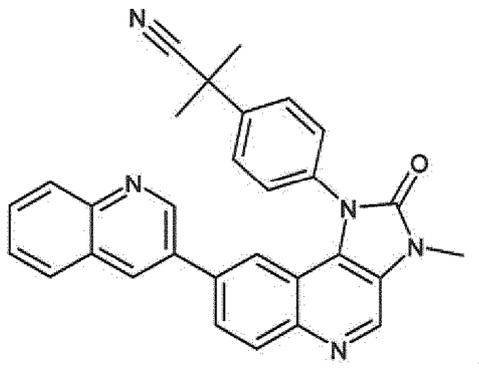
en donde

RAD001 tiene el siguiente nombre y estructura química:

10 (1R,9S,12S,15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R)-1,18-dihidroxi-12-((1R)-2-((1S,3R,4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-metoxiciclohexil)-1-metiletil)-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-2,3,10,14,20-pentaona



BEZ235 tiene el siguiente nombre químico y estructura: 2-metil-2-[4-(3-metil-2-oxo-8-quinolin-3-il-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-fenil]-propionitrilo

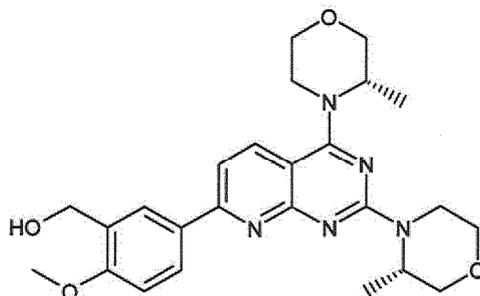


15

y

CCG168 tiene el siguiente nombre químico y estructura: {5-[2,4-bis-((S)-3-metil-morfolin-4-il)-pirido[2,3d]pirimidin-7-

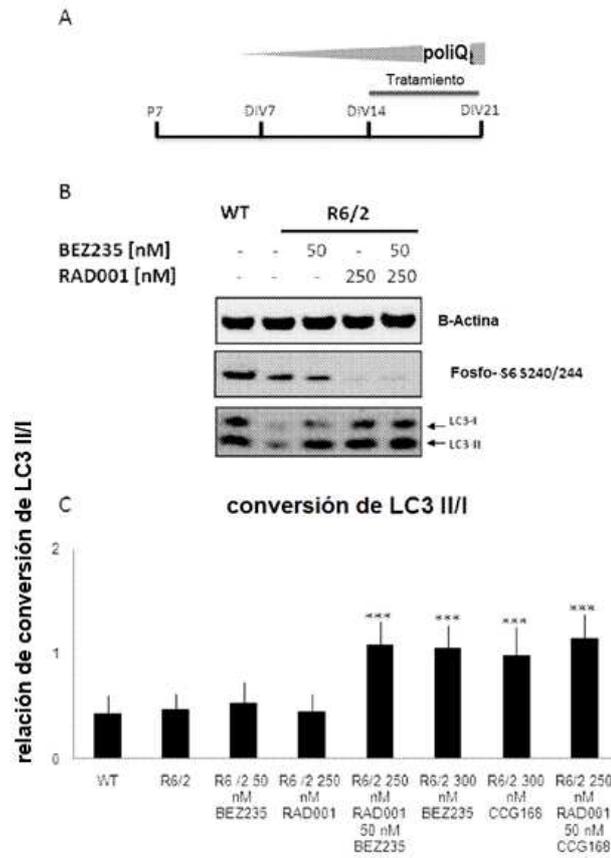
il]-2-metoxi-fenil)-metanol



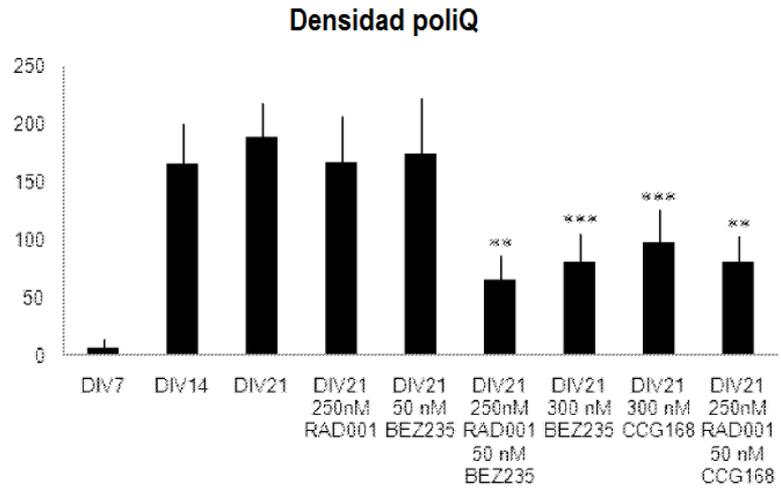
2. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde:
- 5 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.4 y 1.6 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.4 y 2.6 mg/kg/día;
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.3 y 1.7 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.3 y 2.7 mg/kg/día;
- 10 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.2 y 1.8 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.2 y 2.8 mg/kg/día;
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.1 y 1.9 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.1 y 2.9 mg/kg/día;
- 15 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 1.0 y 2.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 2.0 and 3.0 mg/kg/día;
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.8 y 2.2 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.8 y 2.6 mg/kg/día;
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.6 y 2.4 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.6 y 2.8 mg/kg/día;
- 20 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.4 y 2.6 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.4 and 3.0 mg/kg/día;
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.2 y 2.8 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 1.0 and 3.5 mg/kg/día;
- 25 - el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 and 3.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.5 and 4.0 mg/kg/día;
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 and 5.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.01 and 5.0 mg/kg/día; o
- el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día.
- 30 3. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el RAD001 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día y el BEZ235 o CCG168 es administrado a una dosis de entre 0.01 y 10.0 mg/kg/día.
- 35 4. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Huntington.
5. Un producto de combinación que comprende un inhibidor alostérico de mTOR y un inhibidor catalítico de mTOR

para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.

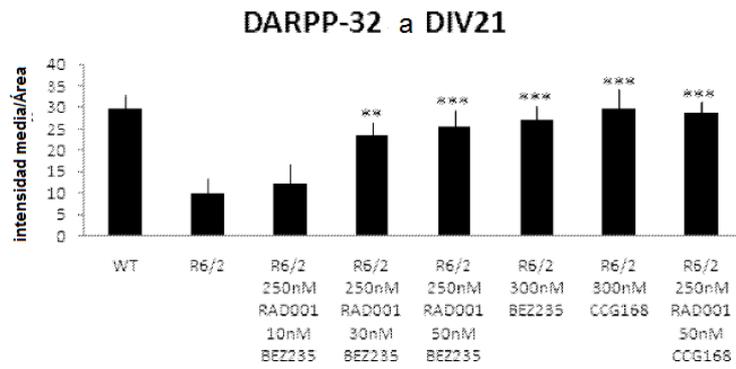
- 5 6. Un producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende una o múltiples dosis de 90 a 110 mg de RAD001 y 165 a 185 mg de BEZ235 o CCG168; 80 a 120 mg de RAD001 y 155 a 195 mg de BEZ235 o CCG168; 70 a 130 mg de RAD001 y 145 a 205 mg de BEZ235 o CCG168; 60 a 140 mg de RAD001 y 135 a 215 mg de BEZ235 o CCG168; 50 a 150 mg de RAD001 y 125 a 225 mg de BEZ235 o CCG168; 50 a 200 mg de RAD001 y 100 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; 25 a 175 mg de RAD001 y 100 a 250 mg de BEZ235 o CCG168; 1 a 200 mg de RAD001 y 50 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; 1 a 300 mg de RAD001 y 1 a 500 mg de BEZ235 o CCG168; o 1 a 500 mg de RAD001 y 1 a 800 mg de BEZ235 o CCG168; como preparaciones bien sea individuales o como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.
- 10
- 15 7. Un producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende una o múltiples dosis de 1 a 300 mg de RAD001 y 1 a 500 mg de BEZ235 o CCG168 así como preparaciones individuales o como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora
- 20 8. Un producto de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Huntington.
- 25 9. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor alostérico de mTOR, un inhibidor catalítico de mTOR y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora en donde el inhibidor alostérico de mTOR es RAD001 y el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235 o CCG168.
- 30 10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende de 90 a 110 mg de RAD001 y 165 a 185 mg de BEZ235 o CCG168; 80 a 120 mg de RAD001 y 155 a 195 mg de BEZ235 o CCG168; 70 a 130 mg de RAD001 y 145 a 205 mg de BEZ235 o CCG168; 60 a 140 mg de RAD001 y 135 a 215 mg de BEZ235 o CCG168; 50 a 150 mg de RAD001 y 125 a 225 mg de BEZ235 o CCG168; 50 a 200 mg de RAD001 y 100 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; 25 a 175 mg de RAD001 y 100 a 250 mg de BEZ235 o CCG168; 1 a 200 mg de RAD001 y 50 a 300 mg de BEZ235 o CCG168; 1 a 300 mg de RAD001 y 1 a 500 mg de BEZ235 o CCG168; o 1 a 500 mg de RAD001 y 1 a 800 mg de BEZ235 o CCG168; y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora
- 35 11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende:
- 1 a 300 mg de RAD001;
  - 1 a 500 mg de BEZ235 o CCG168; y
  - un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- 40 para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de Alzheimer y enfermedad neuronal motora.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Huntington.
- 45 13. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un producto de combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el inhibidor catalítico de mTOR es BEZ235.



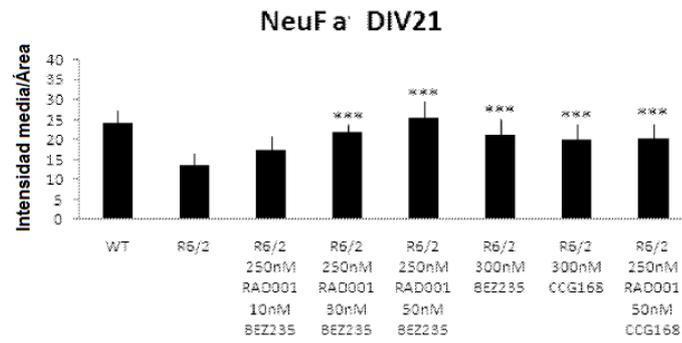
**Figura 1:** La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 induce autofagia en secciones de cerebro de R6/2.



**Figura 2:** La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 reduce las inclusiones de poliQ en secciones de cerebro de R6/2.



**Figura 3:** La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 evita la degeneración del estriato en secciones de cerebro de R6/2 según se estableció por análisis cuantitativo de la intensidad de DARPP-32 a DIV21.



**Figura 4:** La combinación de RAD001/BEZ235 o CCG168 evita la degeneración del estriato en secciones de cerebro de R6/2 según se establece por análisis cuantitativo de la intensidad de neurofilamento a DIV21.