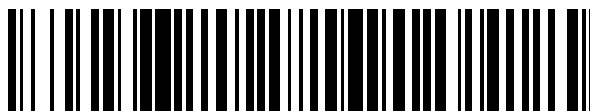


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 141**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2009** **PCT/EP2009/065858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010** **WO10060937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009** **E 09756528 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** **EP 2370076**

54 Título: **Combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de Hsp 90 y un inhibidor de mTOR**

30 Prioridad:

28.11.2008 EP 08170279

28.11.2008 EP 08170287

28.11.2008 EP 08170230

28.11.2008 EP 08170246

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL, RUGAARD y

GARCIA-ECHEVERRIA, CARLOS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 621 141 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de Hsp 90 y un inhibidor de mTOR

Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, la cual comprende un inhibidor de Hsp90 y un inhibidor de mTOR, como se define en las reivindicaciones, y a los usos de tal composición para el tratamiento de las enfermedades proliferativas, más específicamente de la cinasa objetivo de mamífero de rapamicina (mTOR), y de las enfermedades dependientes.

10 A pesar de las numerosas opciones de tratamiento para los pacientes de enfermedades proliferativas, sigue existiendo una necesidad de agentes anti-proliferativos efectivos y seguros y una necesidad de su uso en la terapia de combinación.

15 Ahora se ha encontrado que una combinación que comprende cuando menos un compuesto inhibidor de Hsp90 y cuando menos un inhibidor de mTOR, como se define más adelante, tiene un efecto benéfico sobre los trastornos proliferativos, incluyendo, sin limitación, tumores sólidos, mielomas, leucemias, soriasis, restenosis, esclerodermis y fibrosis.

Descripción de la técnica relacionada

20 La proteína de choque por calor 90 (Hsp90) es reconocida como un objetivo contra el cáncer. Hsp90 es una proteína esencial ubicuita altamente abundante (del 1 al 2 % de la proteína celular total), la cual funciona como una chaperona molecular para asegurar la estabilidad conformacional, la forma, y la función de las proteínas clientes.

25 Entre las proteínas de estrés, la Hsp90 es exclusiva debido a que no se requiere para la biogénesis de la mayoría de los polipéptidos (Nathan y colaboradores, 1997). Sus objetivos celulares, también denominados como las proteínas clientes, son transductores de señales conformacionalmente lábiles que tienen una función crítica en el control del crecimiento, la sobrevivencia celular, y el desarrollo del tejido (Pratt y Toft, 2003). La inhibición de su actividad intrínseca de ATPasa de la Hsp90 altera la interacción de Hsp90-proteína cliente dando como resultado su degradación por medio de la senda de proteasoma de ubiquitina. Un subconjunto de proteínas clientes de Hsp90, tales como Raf, AKT, fosfo-AKT, CDK4, y la familia de EGFR, incluyendo ErbB2, son moléculas de señalización oncogénica críticamente involucradas en los procesos de crecimiento, diferenciación y apoptosis celular, los cuales son importantes en las células de cáncer. Se cree que la degradación de una o múltiples oncoproteínas produce los efectos anti-tumorales observados con los inhibidores de Hsp90.

30 La familia de chaperonas Hsp90 está comprendida de cuatro miembros: Hsp90 α y Hsp90 β , ambas localizadas en el citosol, GRP94 en el retículo endoplásmico, y TRAP1 en la mitocondria (Csermely y colaboradores, 1998). Hsp90 es la chaperona celular más abundante, que constituye de aproximadamente el 1 % al 2 % de la proteína total (Jakob y Buchner, 1994).

35 Las chaperonas Hsp90, las cuales poseen un sitio de enlace de ATP conservado en su dominio N-terminal (Chene, 2002) que pertenece a una sub-familia de ATPasa pequeña conocida como la Girasa de ADN, Hsp90, Cinasa de Histidina, y la sub-familia MutL (GHKL) (Dutta e Inouye, 2000). La actividad de chaperona (pliegue) de la Hsp90 depende de su actividad de ATPasa, la cual es débil para la enzima aislada. Sin embargo, se ha demostrado que la actividad de ATPasa de la Hsp90 se mejora después de su asociación con las proteínas conocidas como co-chaperonas (Kamal y colaboradores, 2003). Por consiguiente, *in vivo*, las proteínas Hsp90 funcionan como subunidades de los complejos dinámicos grandes de las proteínas. La Hsp90 es esencial para la sobrevivencia celular eucariótica y se sobre-expresa en muchos tumores.

40 El tratamiento de las células de cáncer con un inhibidor de mTOR puede provocar la sobre-regulación de la proteína pro-sobrevivencia fosfo-AKT (O'Reilly, 2006). Debido a que la fosfo-AKT es una proteína cliente de Hsp90, el co-tratamiento con un inhibidor de Hsp90 prevendría o disminuiría la sobre-regulación de fosfo-AKT inducida por el inhibidor de mTOR, dando lugar a un aumento del efecto anti-tumoral.

Resumen de la invención

50 La presente invención también se refiere al uso de un inhibidor de Hsp90 que es una etilamida de ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)- 4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las combinaciones de la presente divulgación incluyen los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad/función de la cinasa de serina/treonina mTOR. Estos compuestos serán referidos como "inhibidores de mTOR" e incluyen, pero no se limitan a, los compuestos, proteínas o anticuerpos que dirigen/inhiben a los miembros

de la familia de cinasa mTOR, por ejemplo, RAD, rapamicina (sirolimus), y derivados/análogos de los mismos, tales como everolimus o RAD001. El sirolimus también se conoce por el nombre de RAPAMUNE, y el everolimus o RAD001 por el nombre de CERTICAN. Otros compuestos, proteínas o anticuerpos que dirigen/inhiben a los miembros de la familia de cinasa mTOR incluyen CCI-779, ABT578, SAR543, y ascomicina que es un análogo etílico de FK506. También se incluyen los AP23573 y AP23841 de Ariad.

Los inhibidores de mTOR preferidos son everolimus, rapamicina, ascomicina, y derivados de rapamicina.

Resumen de los dibujos

La Figura 1 muestra los niveles de fosforilación de Akt en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el compuesto I en las células tumorales de mama BT474.

La Figura 2 muestra los niveles de fosforilación de Akt en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el compuesto I en las células tumorales de mama MDA-MB-231.

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se proporcionan para entender mejor la invención.

Como se utiliza en la presente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales de metales alcalinotérreos o de ácido no tóxicas de los compuestos de 2-amino-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona de la divulgación. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de 2-amino-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona, o mediante la reacción por separado de las funciones de base o de ácido con un ácido o base orgánicos o inorgánicos adecuados, respectivamente. Las sales representativas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canfor-sulfonato, digluconato, ciclopentan-propionato, dodecil-sulfato, etan-sulfonato, 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. También, los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo, tales como cloruro de metilo, etilo, propilo, y butilo; bromuros y yoduros; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo, y diamilo, haluros de cadena larga, tales como cloruros, de decilo, laurilo, miristilo, y estearilo, bromuros y yoduros; haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. De esta manera, se obtienen productos solubles o dispersables en agua o en aceite.

Ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen los ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y los ácidos orgánicos como ácido oxálico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido succínico y ácido cítrico. Las sales de adición básicas se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de 2-amino-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona, o por separado mediante la reacción de las fracciones de ácido carboxílico con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal farmacéuticamente aceptable o con amoníaco, o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, y similares, así como los cationes no tóxicos de amonio, de amonio cuaternario, y de amina, incluyendo, pero no limitándose a, amonio, tetrametil-amonio, tetraetil-amonio, metil-amina, dimetil-amina, trimetil-amina, trietil-amina, etil-amina, y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de las sales de adición de base incluyen dietil-amina, etilen-diamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, y similares.

El término "profármacos farmacéuticamente aceptables", como se utiliza en la presente, se refiere a los profármacos de los compuestos de la presente divulgación que, dentro del alcance de un buen juicio médico, son adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de los seres humanos y de los animales inferiores sin una indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, de una manera conmensurada con una proporción razonable de beneficio/riesgo, y son efectivos para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, donde sea posible, de los compuestos de la divulgación. El término "profármaco" se refiere a los compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* para proporcionar el compuesto progenitor de la fórmula anterior, por ejemplo, mediante la hidrólisis en la sangre, tales como un éster. Se proporciona una discusión completa en Higuchi, T., y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," A. C. S. Symposium Series 14, y en "Bioreversible Carriers in Drug Design", en Edward B. Roche (Editor), American Pharmaceutical Association, Pergamon Press, 1987, ambos de los cuales se incorporan a la presente como referencia.

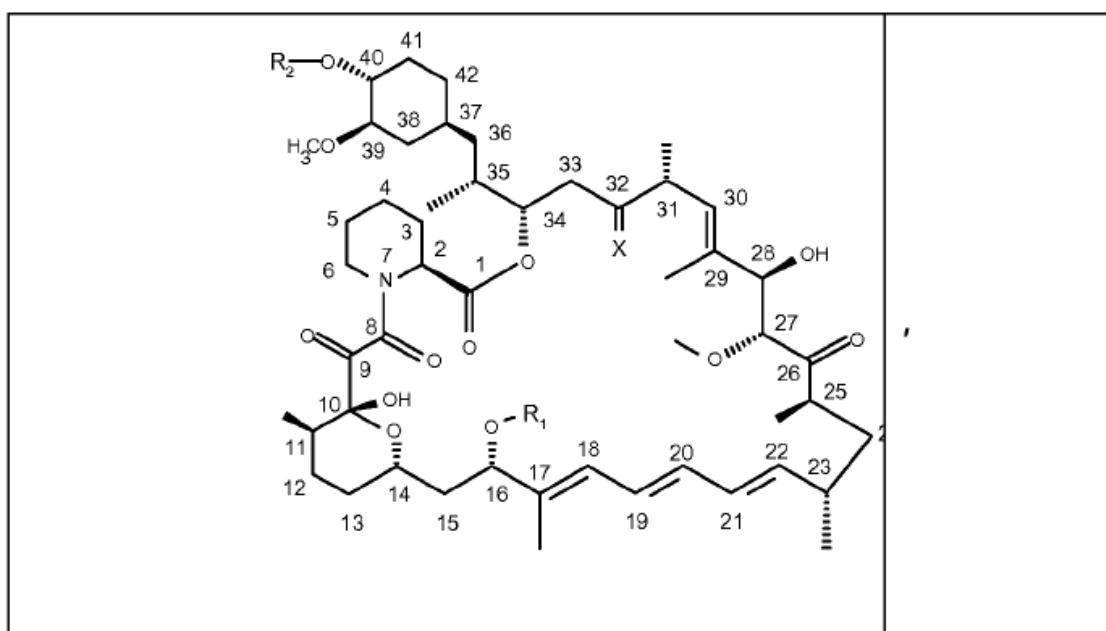
El inhibidor de Hsp90 de la combinación farmacéutica de la presente invención es la etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-4-(4-morfolin-4-il-metil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, que se divulga en la WO 04/072051 publicada el 26 de agosto de 2004.

Los inhibidores de mTOR adecuados incluyen, por ejemplo:

I. Rapamicina, la cual es una macrolida de lactama inmunosupresora que es producida por *Streptomyces hygroscopicus*.

II. Derivados de rapamicina, tales como:

- 5 a. rapamicina sustituida, por ejemplo, una rapamicina 40-O-sustituida por ejemplo, como se describe en la US 5,258,389, WO 94/09010 y WO 92/05179, US 5,118,677, US 5,118,678, US 5,100,883, US 5,151,413, US 5,120,842, WO 93/11130, WO 94/02136, WO 94/02485 y WO 95/14023;
- b. una rapamicina 16-O-sustituida, tal como se divulga en WO 94/02136, WO 95/16691 y WO 96/41807;
- c. una rapamicina 32-hidrogenada, tal como se describe en WO 96/41807 y US 5,256,790.
- 10 d. derivados de rapamicina preferidos son los compuestos de la fórmula I':



(I')

en donde:

R₁ es CH₃ o alquilo de 3 a 6 átomos de carbono,

- 15 R₂ es H o -CH₂-CH₂-OH, 3-hidroxi-2-(hidroxi-metil)-2-metil-propanoílo o tetrazolilo, y X es =O, (H,H) o (H,OH);
con la condición de que R₂ es diferente de H cuando X es =O y R₁ es CH₃,
o un profármaco de los mismos cuando R₂ es -CH₂-CH₂-OH, por ejemplo, un éter fisiológicamente hidrolizable de los mismos.

- 20 Los compuestos de la fórmula I' se divulgan, por ejemplo, en WO 94/09010, WO 95/16691 o WO 96/41807.
Se pueden preparar como se divulgan o por analogía a los procedimientos descritos en estas referencias

Los compuestos inhibidores de mTOR preferidos son 32-desoxo-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32-desoxo-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina y, más preferiblemente, 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, que se divulga como el Ejemplo 8 en la WO 94/09010.

- 25 Los derivados de rapamicina particularmente preferidos de la fórmula I' son 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroxi-metil)-2-metil-propanoato]-rapamicina (también denominada como CCI779), 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (también denominada como ABT578), 32-desoxo-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, o TAFE-93.

e. Los derivados de rapamicina también incluyen los denominados como rapálogos, por ejemplo, como se divulgan en WO 98/02441 y WO 01/14387, por ejemplo, AP23573, AP23464, o AP23841.

Se ha encontrado que la rapamicina y los derivados de la misma, con base en la actividad observada, por ejemplo, su enlace con la macrofilina-12 (también conocida como proteína de enlace de FK-506 o FKBP-12), por ejemplo, como se describe en WO 94/09010, WO 95/16691 o WO 96/41807, son útiles, por ejemplo, como inmunosupresores, por ejemplo, en el tratamiento de rechazo agudo de aloinjerto.

La presente invención proporciona:

Una combinación farmacéutica, la cual comprende:

etilamida del ácido 5-(2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

b) cuando menos un inhibidor de mTOR, como se define en las reivindicaciones.

El compuesto de la fórmula (E) puede ser un inhibidor de Hsp90.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto que es la etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-il-metil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos un inhibidor de mTOR, como se define en las reivindicaciones, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad proliferativa.

El inhibidor de mTOR utilizado de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar a partir de rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus o RAD001; CCI-779, AP23573. Los inhibidores de mTOR particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención son sirolimus y/o everolimus.

III. De la misma manera se divulgan las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los racematos correspondientes, diaestereoisómeros, enantiómeros, tautómeros, así como las modificaciones de cristal correspondientes de los compuestos anteriormente divulgados, en donde estén presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, que se divulgan en las mismas. Los compuestos utilizados como ingredientes activos en las combinaciones de la invención se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados, respectivamente. También, dentro del alcance de esta invención, está la combinación de más de dos ingredientes activos separados como se estipula anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de esta invención podría incluir tres ingredientes activos o más.

En las realizaciones, el inhibidor de mTOR utilizado de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar a partir de rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus o RAD001; CCI-779, ABT578, y AP23573.

El término "enfermedades dependientes de cinasa mTOR" incluye, pero no se restringe a, los siguientes síntomas:

- Rechazo de trasplante de órganos o tejidos, por ejemplo, para el tratamiento de los receptores, por ejemplo, de trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea; enfermedad del injerto contra el huésped, tal como en seguida del trasplante de la médula ósea;

- Restenosis

- Síndromes de Hamartoma, tales como esclerosis tuberosa o Enfermedad de Cowden

- Linfangioleiomiomatosis

- Retinitis pigmentosa

- Enfermedades autoinmunes, incluyendo encefalomielitis, diabetes mellitus dependiente de insulina, lupus, dermatomiositis, artritis y enfermedades reumáticas.

- Leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides

- Enfermedades fibróticas, incluyendo esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis quística

- Hipertensión pulmonar

- Inmunomodulación

- Esclerosis múltiple

- Síndrome de VHL
- Complejo de Carney
- Poliposis adenomatosa familiar
- Síndrome de poliposis juvenil

- 5
- Síndrome de Birt-Hogg-Duke
 - Cardiomiopatía hipertrófica familiar
 - Síndrome de Wolf-Parkinson-White

- 10
- Trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Parkinson, de Huntington, de Alzheimer, y demencias causadas por mutaciones de tau, ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de neuronas motoras causada por mutaciones de SOD1, lipofuscinosis cerioide neuronal/enfermedad de Batten (neurodegeneración pediátrica).

- Degeneración macular húmeda y seca
- Consunción muscular (atrofia, caquexia) y miopatías, tales como enfermedad de Danon

- 15
- Infecciones bacterianas y virales, incluyendo M. tuberculosis, estreptococos del grupo A, HSV tipo I, infección por VIH.
 - Neurofibromatosis, incluyendo Neurofibromatosis tipo 1
 - Síndrome de Peutz-Jeghers.

- 20
- Adicionalmente, las "enfermedades dependientes de cinasa mTOR" incluyen cánceres y otras malignidades relacionadas. Una lista no limitante de los cánceres asociados con las cascadas de señalización de mTOR patológicas incluye cáncer de mama, carcinoma de células renales, tumores gástricos, tumores neuroendocrinos, linfomas y cáncer de próstata.

- 25
- Ejemplos para una enfermedad proliferativa que se puede tratar con una combinación del inhibidor de Hsp90 y de mTOR, como se define en las reivindicaciones, son por ejemplo, tumor benigno o maligno, carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándula suprarrenal, vejiga, mama, estómago, tumores gástricos, de ovarios, colon, recto, próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, del área genitourinaria, melanoma, glioma, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, en especial carcinoma de colon o adenoma colo-rectal, o un tumor de cuello y cabeza, una hiper-proliferación epidérmica, soriasis, hiperplasia de próstata, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, neuroblastoma, linfomas, un carcinoma mamario, o una leucemia.

- 30
- En particular, las composiciones de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de:

un tumor de mama; un tumor epidermoide, tal como un tumor epidermoide de cabeza y/o cuello, o un tumor de boca; un tumor de pulmón, por ejemplo, un tumor pulmonar microcelular o no microcelular; un tumor gastrointestinal, por ejemplo, un tumor colo-rectal; o un tumor genitourinario, por ejemplo, un tumor de próstata (en especial un tumor de próstata refractario a hormonas); o

- 35
- (ii) una enfermedad proliferativa que sea refractaria al tratamiento con otros productos quimioterapéuticos; o
 - (iii) un tumor que sea refractario al tratamiento con otros productos quimioterapéuticos debido a resistencia a múltiples fármacos.

- 40
- En un sentido más amplio de la invención, una enfermedad proliferativa puede ser adicionalmente una condición hiper-proliferativa, tal como leucemias, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, por ejemplo, leucemia mieloide crónica, por ejemplo, leucemia linfática crónica, por ejemplo, leucemia linfática aguda, por ejemplo, mieloma múltiple, por ejemplo, linfomas, y/o para utilizarse en el tratamiento de síndrome mielodisplásico, mastocitosis sistémica, hiperplasias, fibrosis (en especial pulmonar, pero también otros tipos de fibrosis, tales como fibrosis renal), angiogénesis, soriasis, ateroescclerosis, proliferación de músculo liso en los vasos sanguíneos, tal como estenosis o restenosis en seguida de angioplastia, síndrome de von Hippel-Lindau, enfermedad de Castleman multicéntrica y/o soriasis.

- 45
- La combinación de la presente invención también se puede utilizar para prevenir o tratar las enfermedades que sean desencadenadas por una angiogénesis persistente, tales como soriasis; sarcoma de Kaposi; restenosis, por ejemplo, restenosis inducida por estent; endometriosis; enfermedad de Crohn; enfermedad de Hodgkin; leucemia; artritis, tal como artritis reumatoide; hemangioma; angiofibroma; enfermedades de los

ojos, tales como retinopatía diabética y glaucoma neovascular; enfermedad renales, tales como glomerulonefritis; nefropatía diabética; nefroesclerosis maligna; síndromes microangiopáticos trombóticos; rechazo de trasplantes y glomerulopatía; enfermedades fibróticas, tales como cirrosis del hígado; enfermedades proliferativas de las células mesangiales; arterioesclerosis; lesiones del tejido nervioso; y para inhibir la re-oclusión de los vasos después del tratamiento con catéter de globo, para utilizarse en prótesis vasculares, o después de insertar dispositivos mecánicos para mantener abiertos los vasos, tales como, por ejemplo, estents, como inmunosupresores, como un auxiliar en el sanado de heridas sin cicatriz, y para el tratamiento de manchas por la edad y dermatitis por contacto.

Las combinaciones de la presente invención incluyen el uso para el tratamiento, prevención o inhibición de las enfermedades caracterizadas por proliferación celular e infiltración de células inflamatorias, tal como inflamación, RHA, asma, bronquitis crónica, arterioesclerosis, y rechazo de trasplante.

Cuando se menciona un tumor, una enfermedad tumoral, un carcinoma, o un cáncer, también se implica la metástasis en el órgano o tejido original y/o en cualquier otra localización de una manera alternativa o en adición, cualquiera que sea la localización del tumor y/o de la metástasis.

Los estudios clínicos adecuados pueden ser, por ejemplo, estudios de escala de dosis, de etiqueta abierta, en los pacientes con enfermedades proliferativas. Estos estudios prueban en particular el sinergismo de los ingredientes activos de la combinación de la invención. Los efectos benéficos sobre las enfermedades proliferativas se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios, los cuales son conocidos como tales por una persona experta en este campo. Estos estudios pueden ser, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia utilizando los ingredientes activos y una combinación de la invención. De preferencia, la dosis del agente (a) se escala hasta que se alcance la Máxima Dosificación Tolerada, y el agente (b) se administra en una dosis fija. De una manera alternativa, el agente (a) se puede administrar en una dosis fija y la dosis del agente (b) se puede escalar. Cada paciente puede recibir dosis del agente (a) ya sea diariamente, o bien de una forma intermitente. La eficacia del tratamiento se puede determinar en estos estudios, por ejemplo, después de 12, 18 o 24 semanas, mediante la evaluación de los puntajes de síntomas cada 6 semanas.

La administración de una combinación farmacéutica de la invención puede dar como resultado no solamente un efecto benéfico, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, por ejemplo, con respecto a aliviar, demorar el progreso de, o inhibir los síntomas, sino también efectos benéficos adicionales sorprendentes, por ejemplo, más pocos efectos secundarios, una mejor calidad de vida o una patología reducida, comparándose con una monoterapia que aplique solamente uno de los ingredientes farmacéuticamente activos utilizados en la combinación de la invención.

Un beneficio adicional puede ser que se utilice una dosis más baja de los ingredientes activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que las dosificaciones no necesiten solamente ser con frecuencia más pequeñas, sino que también se puedan aplicar con menor frecuencia, lo cual puede disminuir la incidencia o la gravedad de los efectos secundarios. Esto está de acuerdo con los deseos y requerimientos de los pacientes que se vayan a tratar.

Es un objetivo de esta invención, proporcionar una combinación farmacéutica, tal como una composición que comprende una cantidad de un primer componente y un segundo componente, como se describe anteriormente, los cuales pueden ser conjuntamente efectivos terapéuticamente para dirigir o prevenir las enfermedades proliferativas. Estos primero y segundo componentes se pueden proporcionar para su administración en una combinación fija, es decir, en una sola composición galénica, la cual se puede preparar de una manera conocida por sí misma, adecuada para su administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo a seres humanos, en combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en especial adecuados para aplicación enteral o parenteral.

De una manera alternativa, la combinación es un primer componente y un segundo componente que se pueden proporcionar como una combinación que sea de las dosis farmacéuticas separadas que incluyan las composiciones en un kit, o dosis farmacéuticas no vendidas como un kit.

Las composiciones farmacéuticas para la administración separada del primer componente y el segundo componente se pueden preparar de una manera conocida por sí misma, y son aquellas adecuadas para su administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo a seres humanos. Cada composición para la administración separada comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cuando menos un componente farmacológicamente activo en combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

El término componente farmacéutico se utiliza sinónimamente con los términos agente farmacéutico o ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden contener, por ejemplo, de aproximadamente el 0.1 % a aproximadamente el 99.9 %, de preferencia de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 60 %, de los ingredientes activos. Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para su administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquéllas que están en formas de dosificación unitaria, tales como tabletas recubiertas con azúcar, tabletas, cápsulas o supositorios, o ampollitas. Si no se indica de otra manera, éstas se preparan de una manera conocida por sí misma, por ejemplo, por medio de los procesos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución, o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario de un componente farmacéutico contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí mismo una cantidad efectiva, debido a que se puede alcanzar la cantidad efectiva necesaria mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

En un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, el primer componente y el segundo componente se pueden administrar juntos, en secuencia o por separado. El primero y segundo componentes se pueden suministrar en una forma de dosificación unitaria combinada, o en múltiples formas de dosificación unitaria separadas.

En particular, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cada uno de los componentes farmacéuticos de la invención de una manera simultánea o en secuencia y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como una combinación fija. Por ejemplo, el método para prevenir o tratar las enfermedades proliferativas de acuerdo con la invención, puede comprender: (i) la administración del primer componente en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, y (ii) la administración del segundo componente en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, de una manera simultánea o en secuencia en cualquier orden, en cantidades conjuntamente efectivas terapéuticamente, de preferencia en cantidades sinérgicamente efectivas, por ejemplo, en dosificaciones diarias o intermitentes correspondientes a las cantidades descritas en la presente. Los componentes de combinación individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en diferentes tiempos durante el curso de la terapia, o de una manera concurrente en formas de combinación divididas o individuales. Adicionalmente, el término administración también abarca el uso de un profármaco de un componente de combinación que se convierta *in vivo* hasta el componente de la combinación como tal. Por consiguiente, se debe entender que la presente invención abarca todos los regímenes de tratamiento simultáneo o alternado, y el término "administrar" se debe interpretar de conformidad con lo anterior.

La dosificación efectiva de cada uno de los componentes empleados en la combinación de la invención puede variar dependiendo del compuesto o composición farmacéutica particular empleada, del modo de administración, de la condición que se esté tratando, de la gravedad de la condición que se esté tratando. Por consiguiente, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo la vía de administración y la función renal y hepática del paciente. Un clínico o médico de una experiencia ordinaria puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de los ingredientes activos individuales requeridos para aliviar, contrarrestar, o detener el progreso de la condición. La precisión óptima para alcanzar la concentración de los ingredientes activos dentro del intervalo que proporcione eficacia sin toxicidad, requiere de un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos para los sitios objetivo.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la enfermedad particular que se esté sometiendo a terapia. La cantidad terapéuticamente efectiva para una situación dada puede ser fácilmente determinada mediante experimentación de rutina y está dentro de la experiencia y juicio del médico ordinario.

Para los propósitos de la presente invención, una dosis terapéuticamente efectiva será, en términos generales, una dosis diaria total administrada a un huésped en una sola dosis o en dosis divididas, puede ser en cantidades, por ejemplo, de 0.001 a 1000 miligramos/kilogramo de peso corporal al día, y más preferiblemente de 1.0 a 30 miligramos/kilogramo de peso corporal al día. Las composiciones unitarias de dosificación pueden contener las cantidades de submúltiplos de las mismas para formar la dosis diaria.

Los compuestos de acuerdo con la fórmula (I), los inhibidores de mTOR, y las composiciones farmacéuticas que comprenden estos ingredientes activos, se pueden administrar oralmente, parenteralmente, sublingualmente, mediante aerosolización o por aspersión de inhalación, rectalmente, o tópicamente, en formulaciones unitarias de dosificación que contengan los portadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales, como sea deseado. La administración tópica también puede involucrar el uso de administración transdérmica, tal como parches transdérmicos o dispositivos de ionoforesis. El término "parenteral", como se utiliza en la presente, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, o técnicas de infusión.

- Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida, utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-propanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro de sodio. En adición, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo los mono- o di-glicéridos sintéticos. En adición, los ácidos grasos, tales como ácido oleico, encuentran uso en la preparación de inyectables.
- Los supositorios para la administración rectal del fármaco se pueden preparar mediante la mezcla del fármaco con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao y polietilenglicoles, los cuales son sólido a las temperaturas ordinarias, pero líquidos a la temperatura rectal y, por consiguiente, se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.
- Las formas de dosificación sólidas para su administración oral pueden incluir cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, y gránulos. En estas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se puede mezclar con cuando menos un diluyente inerte, tal como sacarosa, lactosa, o almidón. Estas formas de dosificación también pueden comprender, como es la práctica normal, sustancias adicionales diferentes de los diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. En el caso de las cápsulas, tabletas, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes reguladores. Las tabletas y píldoras se pueden preparar adicionalmente con recubrimientos entéricos.
- Las formas de dosificación líquidas para su administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables que contengan los diluyentes inertes comúnmente utilizados en la materia, tales como agua. Estas composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, ciclodextrinas, y agentes edulcorantes, saborizantes, y perfumantes.
- Los compuestos de acuerdo con la fórmula (I), los inhibidores de mTOR, y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, también se pueden administrar en la forma de liposomas. Como se conoce en este campo, los liposomas se derivan en términos generales a partir de fosfolípidos u otras sustancias lípidas. Los liposomas se forman mediante los cristales líquidos hidratados mono- o multi-lamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, en adición a un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservadores, excipientes, y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidil colinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Prescott (ed.), "Methods in Cell Biology", Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, 1976, páginas 33 y siguientes.

Ejemplo 1

- Se utilizan dos líneas celulares derivadas de cáncer (BT474 y MDA-MB-231). Éstas son líneas celulares de carcinoma de mama humano. Las líneas celulares están comercialmente disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC). Las células BT474 se mantienen en un medio Hybri-care (ATCC) complementado con suero fetal de ternera al 10 % por volumen/volumen y L-glutamina 2 mM. Las células MDA-MB-231 se cultivan en un medio RPMI 1640 (Animed, Allschwil, Suiza) complementado con suero fetal de ternera al 10 % por volumen/volumen y L-glutamina 2 mM. El medio se complementa con 100 microgramos/mililitro de penicilina/ estreptomycin, y las células se mantienen a 37°C en CO₂ al 5 %.
- Después de la división y del cambio del medio, las células a partir del cultivo de suministro se siembran en una densidad de 3.3×10^4 células/cm² (BT474) y de 1.2×10^4 células/cm² (MDA-MB-231) en placas de células, y se incuban durante 48 horas a 37°C y con CO₂ al 5 % antes del tratamiento con el vehículo de DMSO, everolimus 20 nM (RAD001) y/o diferentes concentraciones de AUY922 (compuesto 1) durante 24 horas. Para preparar los lisados celulares, las placas de cultivo se lavan una vez con suero regulado con fosfato helado (PBS) que contiene fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 1 mM (PMSF), y una vez con regulador de extracción helado (Hepes 50 mM, pH de 7.4, NaCl 150 mM, beta-glicerofosfato 25 mM, NaF 25 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, PPI 15 mM, orto-vanadato de sodio 2 mM, molibdato de sodio 10 mM, leupeptina (10 microgramos/mililitro), aprotinina (10 microgramos/mililitro), DTT 1 mM, y PMSF 1 mM. Las células se extraen en el mismo regulador, que contiene NP-40 al 1 %. Los extractos se homogeneizan, se limpian mediante centrifugación, se dividen en alícuotas, y se congelan a -80°C. La concentración de proteína se determina con el Ensayo de Proteína BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA).
- Veinte microgramos de extractos celulares se resuelven electroforéticamente en geles desnaturizantes de dodecil-sulfato de sodio/poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE), y se transfieren a los filtros de difluoruro de polivinilideno mediante transferencia húmeda (1 hora a 250 mA), y se sondan durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:

Anti-fosfo-Akt (Ser473) (clon 14-05; 1:2000) obtenido en DAKO (Glostrup, Dinamarca) y diluido en PBS, Tween al 0.5 % por volumen/volumen.

Anti-fosfo-Akt (T308) (cat # 9275; 1:1000) obtenido en Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA) y diluido en PBS, Tween al 0.1 % por volumen/volumen.

- 5 Anti-Akt (cat # 1085-1; 1:5000) obtenido en Epitomics (Burlingame, CA, EUA) y diluido en PBS, Tween al 0.5 % por volumen/volumen.

Anti-Actina (cat # MAB1501; 1:20,000) obtenido en Chemicon (Billerica, MA, EUA) y diluido en PBS, Tween al 0.1 % por volumen/volumen.

- 10 Después de la incubación con el anticuerpo primario apropiado (anterior), se revelan las proteínas desnucleadas utilizando inmunoglobulinas anti-ratón o anti-conejo conjugadas con peroxidasa de radícula roja, seguido por una mejor quimiluminiscencia (kit ECL Plus), y se cuantifican utilizando el software Quantity One (Bio-Rad, Munich, Alemania).

Ejemplo 2

- 15 La Figura 1 muestra los niveles de fosforilación de AKT en la presencia de everolimus (RAD001), y everolimus (RAD001) en combinación con el compuesto I ((R)-2-amino-7-[2-(6-metoxi-piridin-2-il)-fenil]-4-metil-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona) en células tumorales de mama BT474. La inhibición de mTOR con RAD001 activa el Akt en las células tumorales (O'Reilly y colaboradores, 2006). El análisis Western blot demuestra que, en las células BT-474 tratadas con RAD001 20 nM, se observa un aumento en los niveles de AKT fosforilado (P-AKT(S₄₇₃), y P-AKT(T₃₀₈)) comparándose con un control no tratado. Cuando las células se trataron con 50 a 100 nM del compuesto I ((R)-2-amino-7-[2-(6-metoxi-piridin-2-il)-fenil]-4-metil-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona), disminuyó la fosforilación de AKT ((P-AKT(S₄₇₃), y P-AKT(T₃₀₈)). En la presencia de 50 a 100 nM del compuesto I, la adición de RAD001 20 nM no provocó un aumento en la fosforilación de AKT (P-AKT(S₄₇₃), y P-AKT(T₃₀₈)). Los niveles de AKT no fueron significativamente afectados por cualquiera de los tratamientos. Se utiliza actina para demostrar una carga igual de proteína en cada pista del Western blot.
- 25

Ejemplo 3

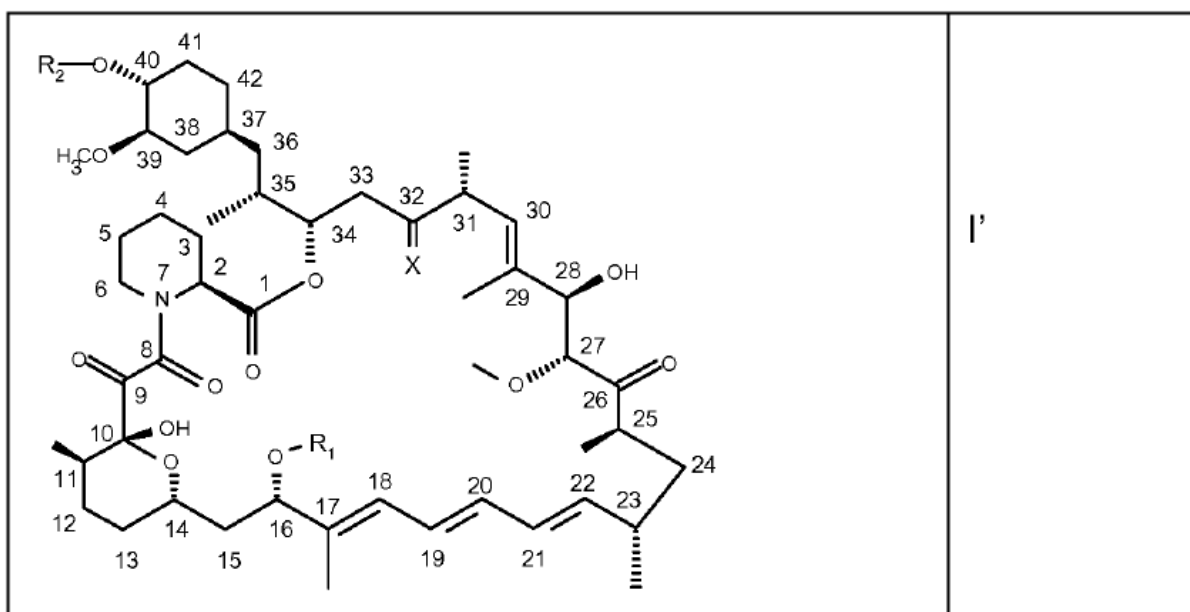
- 30 La Figura 2 muestra los niveles de fosforilación de Akt en la presencia de everolimus (RAD001), y everolimus (RAD001) en combinación con el compuesto I ((R)-2-amino-7-[2-(6-metoxi-piridin-2-il)-fenil]-4-metil-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona) en células tumorales de mama MDA-MB-231. Se ha demostrado que la inhibición de mTOR con RAD001 activa el Akt en las células tumorales (O'Reilly y colaboradores, 2006). El análisis Western blot demuestra que, en las células MDA-MB-231 tratadas con RAD001 20 nM, se observa un aumento de los niveles de AKT fosforilado (P-AKT(S₄₇₃)) comparándose con un control no tratado. Cuando las células se trataron con 50 a 100 nM del compuesto I, disminuyó la fosforilación de AKT (P-AKT(S₄₇₃)). En la presencia de 50 a 100 nM del compuesto I ((R)-2-amino-7-[2-(6-metoxi-piridin-2-il)-fenil]-4-metil-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona), la adición de RAD001 20 nM no provocó un aumento en la fosforilación de AKT en el residuo de aminoácido T₃₀₈. Los niveles de AKT disminuyeron ligeramente en la presencia del compuesto I 100 nM ((R)-2-amino-7-[2-(6-metoxi-piridin-2-il)-fenil]-4-metil-7,8-dihidro-6H-pirido-[4,3-d]-pirimidin-5-ona), siendo esto consistente con el hecho de que AKT es una proteína cliente para Hsp90. Se utilizó actina para demostrar una carga igual de proteína en cada pista del Western blot.
- 35

40

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de Hsp90 que es etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un inhibidor de mTOR que es rapamicina, CCI-779, ABT578 o AP23573, o un derivado del mismo

de acuerdo con la fórmula I'



en donde:

R₁ es CH₃ o alquilo de 3 a 6 átomos de carbono,

R₂ es H o -CH₂-CH₂-OH, 3-hidroxi-2-(hidroxi-metil)-2-metil-propanoilo o tetrazolilo, y

X es =O, (H,H) o (H,OH),

con la condición de que

R₂ es diferente de H cuando X es =O, y

R₁ es CH₃ cuando R₂ es -CH₂-CH₂-OH.

2. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de mTOR es rapamicina.

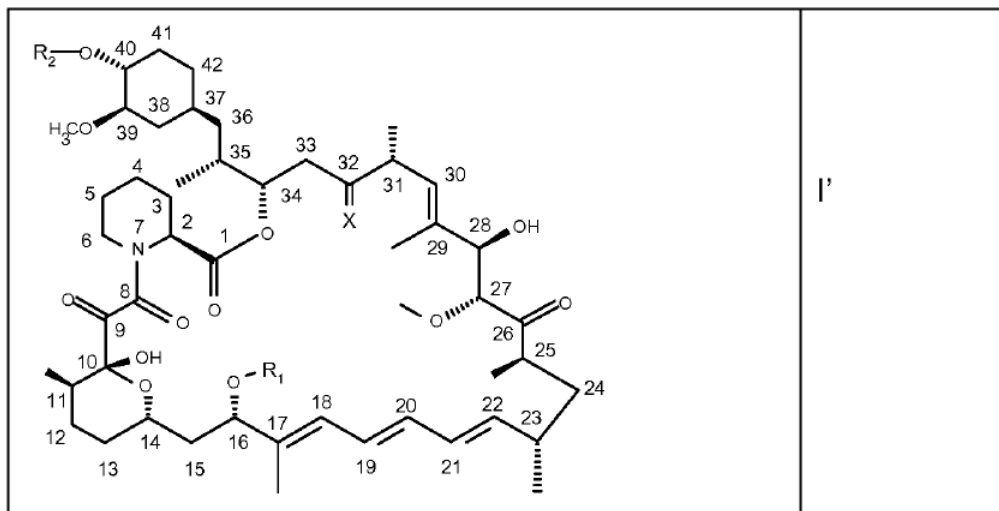
3. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de mTOR es everolimus.

4. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de mTOR es CCI-779, ABT578 o AP23573.

5. Un primer componente farmacéutico en combinación con un segundo componente farmacéutico para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, en donde el primer componente farmacéutico es un inhibidor de Hsp90 que es etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde el segundo componente farmacéutico es un inhibidor de mTOR que es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. El primer componente farmacéutico en combinación con un segundo componente farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el inhibidor de mTOR es everolimus o rapamicina.

7. El primer componente farmacéutico en combinación con un segundo componente farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende administrar un derivado de rapamicina de acuerdo con la fórmula I'



5 en donde:

R₁ es CH₃ o alquino de 3 a 6 átomos de carbono,

X es =O, (H,H) o (H,OH),

R₂ es H o -CH₂-CH₂-OH, 3-hidroxi-2-(hidroxi-metil)-2-metil-propanoílo o tetrazolilo, y

con la condición de que

10 R₂ es diferente de H cuando X es =O, y

R₁ es CH₃ cuando R₂ es -CH₂-CH₂-OH.

8. El primer componente farmacéutico en combinación con un segundo componente farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 5, 6 o 7, en donde tratar dicho trastorno proliferativo es el tratamiento de tumores, mielomas, leucemias, psoriasis, restenosis, esclerodermis o fibrosis.

15 9. Un kit que comprende: (a) una primera composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Hsp90 que es etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de mTOR que es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en un segundo vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un kit de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el inhibidor de mTOR es everolimus o rapamicina.

20 11. El primer componente farmacéutico en combinación con un segundo componente farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde Hsp90 y el inhibidor de mTOR se administran simultáneamente, concurrentemente, por separado o secuencialmente para tratar una enfermedad proliferativa.

25 12. Una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de Hsp90 que es etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de mTOR que es everolimus para uso en un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa que se selecciona de tumores, mielomas, leucemias, psoriasis, restenosis, esclerodermis o fibrosis.

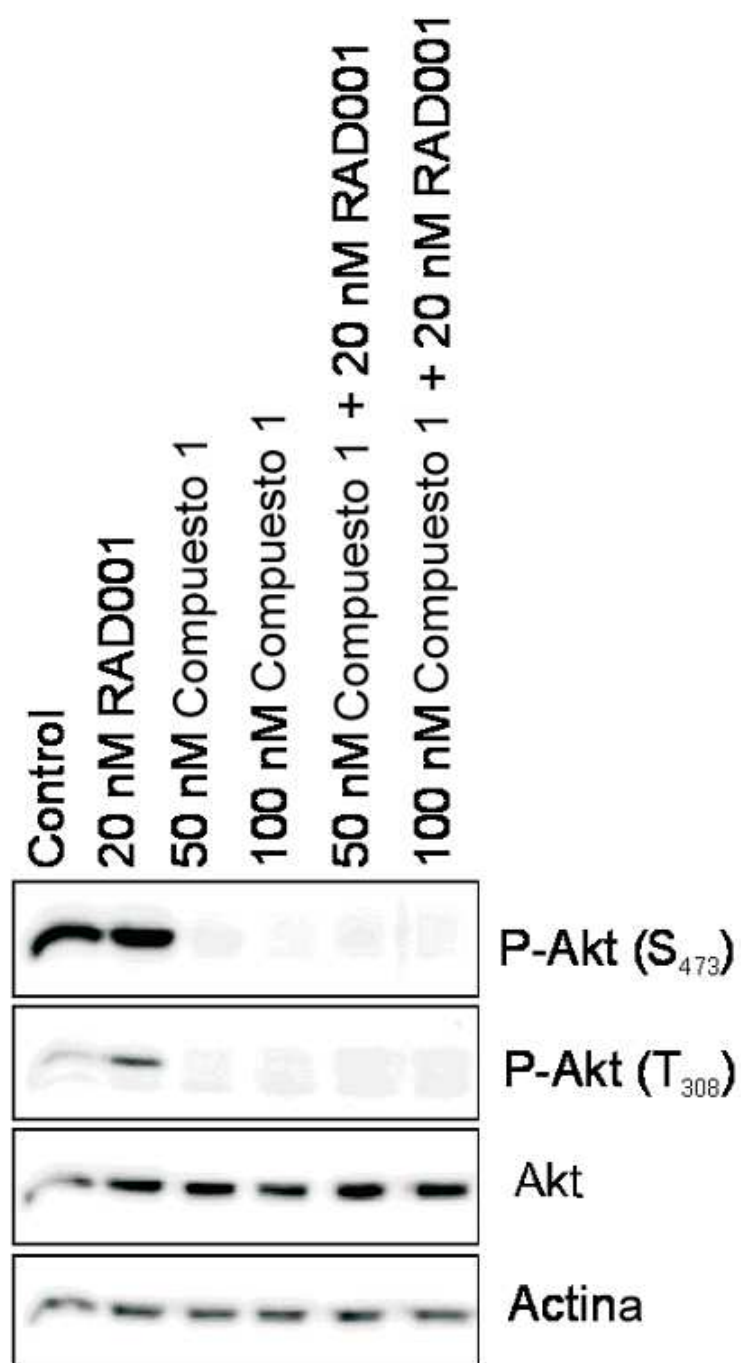


FIG. 1

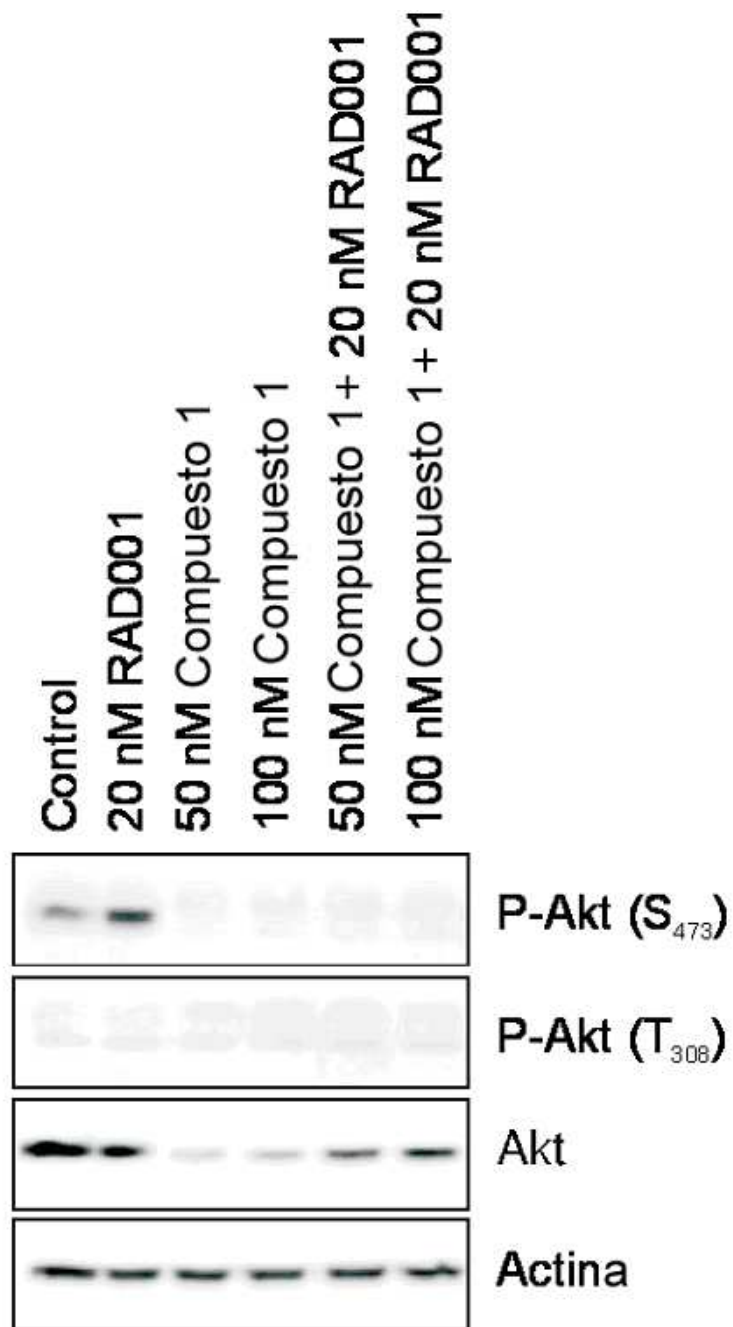


FIG. 2