

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 677**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2009 PCT/EP2009/064274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10049481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 09744391 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2349275**

54 Título: **Combinación de un inhibidor de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y un inhibidor de mTOR**

30 Prioridad:

31.10.2008 EP 08168044

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

31.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARCIA-ECHEVERRIA, CARLOS y
MAIRA, SAUVEUR-MICHEL**

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 2 627 677 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de un inhibidor de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y un inhibidor de mTOR

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) que es el compuesto 5-(2,6-dimorfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina, o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de mTOR que es everolimus, y los usos de tal combinación en el tratamiento de enfermedades proliferativas, más específicamente de enfermedades dependientes de diana en mamíferos de rapamicina (mTOR) cinasa, tal como se describe en las reivindicaciones.

10 Antecedentes de la invención

15 Se ha demostrado que la inhibición de mTOR puede inducir la señalización corriente arriba del receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1R) que da como resultado la activación de AKT en células cancerosas. Se ha sugerido que este fenómeno juega un papel en la atenuación de las respuestas celulares hacia la inhibición de mTOR y podría atenuar la actividad clínica de los inhibidores de mTOR. Por ejemplo, se ha descubierto un incremento en pAKT en aproximadamente el 50 % en los tumores de todos los pacientes en un estudio de Fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados (Taberno et al., Journal of Clinical Oncology, 26 (2008), págs. 1603-1610). A pesar de las numerosas opciones de tratamiento para pacientes con enfermedades proliferativas, sigue existiendo la necesidad de agentes terapéuticos eficaces y seguros y la necesidad respecto a su uso preferencial en terapia de combinación.

20 El documento WO 2008/098058 divulga determinados derivados de pirimidina como compuestos inhibidores de PI3K y métodos de su uso solos o en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

El documento WO 2006/044453 divulga análogos de 17-hidroxiwortmanina como inhibidores de PI3K y métodos de su uso.

25 El documento WO 2007/120897 divulga composiciones que contienen rapamicina o derivados de rapamicina en combinación con un inhibidor de PI3K y/o un inhibidor de leptina, y métodos para el tratamiento y/o prevención de hiperplasia intimal, estenosis vascular y/o restenosis.

30 Winbanks et al., ["Role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR pathways in the regulation of renal fibroblast function and differentiation", Internal Journal of Biochemistry and Cell Biology, EXETER, GB, vol. 39, n.º 1, 1 de enero de 2007, págs. 206-219] se refiere a inhibidores específicos de mTOR (RAD) y fosfatidilinositol 3-cinasa (LY294002) y los mecanismos de fibrogénesis.

Sun Shi-Yong et al., ["Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition", Cancer Research, vol. 65, n.º 16, agosto de 2005 (2005-08), págs. 7052-7058] divulga los efectos de LY294002 en combinación con rapamicina en células NSCLC humanas.

35 Chaisurapat Risa et al., ["Dual inhibition of PI3K α and mTOR as an alternative treatment for Kaposi's sarcoma", Cancer Research, 15 OCT 2008, vol. 68, n.º 20, 15 de octubre de 2008 (2008-10-15), págs. 8361-8368] describe el PI-103 como una opción terapéutica para el tratamiento del sarcoma de Kaposi.

Sumario de la invención

40 Se ha descubierto de acuerdo con la presente divulgación que un inhibidor de PI3K reduce o bloquea la fosforilación y activación de AKT mediante los inhibidores de mTOR. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para reducir o bloquear la fosforilación y activación de AKT mediante los inhibidores de mTOR que comprende administrar un inhibidor de PI3K a un animal de sangre caliente que lo necesite.

La presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende (a) el compuesto 5-(2,6-dimorfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina, o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un inhibidor de mTOR que es everolimus.

45 En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad proliferativa dependiente de la fosforilación y activación adquiridas de AKT durante el tratamiento con un inhibidor de mTOR que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de PI3K a un animal de sangre caliente que lo necesite.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad proliferativa que se ha vuelto resistente o que tiene una sensibilidad disminuida al tratamiento con un inhibidor de mTOR que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de PI3K a un animal de sangre caliente que lo necesite. La resistencia se debe, por ejemplo, a la fosforilación y activación de AKT.

- 5 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para mejorar la eficacia del tratamiento de una enfermedad proliferativa con un inhibidor de mTOR que comprende administrar una combinación que comprende un inhibidor de PI3K y un inhibidor de mTOR a un animal de sangre caliente que lo necesite.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de PI3K y al menos un inhibidor de mTOR.

- 10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un compuesto inhibidor de PI3K y al menos un inhibidor de mTOR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa mediante la administración de un compuesto inhibidor de PI3K y al menos un inhibidor de mTOR.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de PI3K 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina, o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un inhibidor de mTOR que es everolimus para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa dependiente de diana en mamíferos de rapamicina (mTOR) cinasa que se selecciona entre cáncer de mama, carcinoma de las células renales, tumores gástricos, tumores neuroendocrinos, linfomas y cáncer de próstata. En una realización de la presente invención, cada elemento de combinación de la combinación se administra simultánea o secuencialmente y en cualquier orden.
- 20

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de PI3K 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina, o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de mTOR que es everolimus.

- 25 Descripción detallada de las figuras

La figura 1 muestra los niveles de fosforilación de AKT en presencia de everolimus (RAD001) y de everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I en células de tumor de mama BT474.

La figura 2 muestra los niveles de fosforilación de AKT en presencia de everolimus (RAD001) y de everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I en células de tumor de mama MDA-MB-231.

- 30 Descripción detallada de la invención

El documento WO07/084786 describe derivados de pirimidina, que han descubierto la actividad de las cinasas lípidas, tales como las PI3-cinasas.

- 35 Un compuesto preferido de la presente combinación inventiva es un compuesto que se describe específicamente en el documento WO07/084786 y que es 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina (Compuesto I). La síntesis de 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina se describe en el documento WO07/084786 como Ejemplo 10.

- 40 Las combinaciones de la presente divulgación incluyen compuestos que se dirigen, disminuyen o inhiben la actividad/función de la serina/treonina mTOR cinasa. Dichos compuestos se denominarán como "inhibidores de mTOR" e incluyen, pero no se limitan a, compuestos, proteínas o anticuerpos que se dirigen/inhiben a los miembros de la familia de mTOR cinasa, por ejemplo, RAD, rapamicina (sirolimus) y derivados/análogos de los mismos tales como everolimus o RAD001 o compuestos que inhiben la actividad de cinasa de mTOR uniéndose directamente a la hendidura de unión al ATP de la enzima. El sirolimus también es conocido con el nombre RAPAMUNE y el everolimus o RAD001 con el nombre CERTICAN. Otros compuestos, proteínas o anticuerpos que se dirigen/inhiben a los miembros de la familia de mTOR cinasa incluyen CCI-779, ABT578, SAR543, y ascomicina que es un análogo etílico de FK506. También están incluidos AP23573, AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, 45 AZD08055 y OSI027. Un compuesto particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es RAD001.

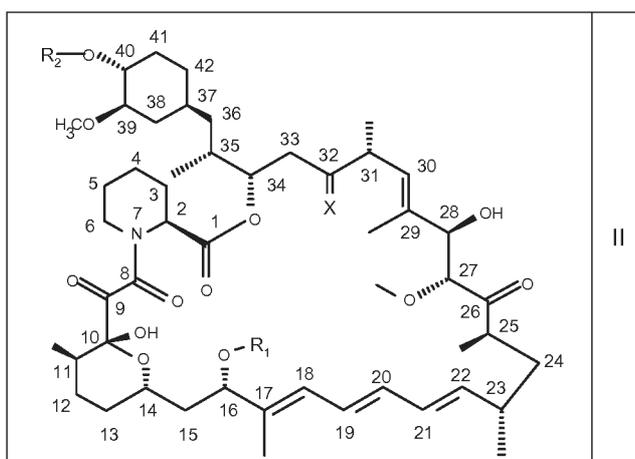
Los inhibidores de mTOR adecuados incluyen, por ejemplo:

- I. Rapamicina, que es un macrólido de tipo lactama inmunosupresor que es producida por *Streptomyces*

hygroscopicus.

II. Derivados de rapamicina tales como:

- a. rapamicina sustituida, por ejemplo, una rapamicina 40-O-sustituida, por ejemplo, como la descrita en los documentos US 5.258.389, WO 94/09010, 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, por ejemplo, como la descrita en los documentos WO 94/02136, WO 95/16691 y WO 96/41807;
- c. una rapamicina 32-hidrogenada, por ejemplo, como la descrita en los documentos WO 96/41807 y US 5 256 790.
- d. Los derivados de rapamicina preferidos son compuestos de la fórmula (II)



10

en la que

R₁ es CH₃ o alquilo C₃₋₆,

R₂ es H o -CH₂-CH₂-OH, 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metil-propanoilo o tetrazolilo, y X es =O, (H,H) o (H,OH) con la condición que R₂ sea diferente de H cuando X es =O y R₁ es CH₃,

- 15 o un profármaco del mismo cuando R₂ es -CH₂-CH₂-OH, por ejemplo, un éter fisiológicamente hidrolizable del mismo.

Los compuestos de la fórmula (II) se divulgan, por ejemplo, en los documentos WO 94/09010, WO 95/16691 o WO 96/41807. Estos se pueden preparar en la forma divulgada o mediante analogía a los procedimientos descritos en dichas referencias.

- 20 Los compuestos adecuados son 32-desoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32-desoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina y, más preferentemente, 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, divulgado como Ejemplo 8 en el documento WO 94/09010.

- 25 Los derivados de rapamicina particularmente adecuados de la fórmula (II) son 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también llamado CCI779), 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (también llamado ABT578), 32-desoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, o TAFE-93.

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

- 30 Se ha descubierto que la rapamicina y los derivados de la misma, con base a la actividad observada, por ejemplo, unión a macrofilina-12 (también conocida como proteína de unión a FK-5G6 o FKBP-12), por ejemplo, como se divulga en los documentos 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.

III. Ascomicina, que es un análogo etílico de FK506.

IV. AZD08055 y OSI127, que son compuestos que inhiben la actividad de cinasa de mTOR uniéndose directamente a la hendidura de unión al ATP de la enzima.

5 De igual manera quedan comprendidas las sales farmacéuticas de los mismos, los racematos, diastereoisómeros, enantiómeros, tautómeros, correspondientes, así como las modificaciones de cristal correspondientes de los compuestos divulgados anteriormente en casos en los que estén presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, que se divulgan en los mismos. Los compuestos usados como principios 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 la presente invención está la combinación de más de dos principios activos separados como se indicó anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de la presente invención podría incluir tres o más principios activos.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de PI3K 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina como se describió anteriormente y al menos un inhibidor de mTOR que es everolimus.

15 En otro aspecto se proporciona el uso de un compuesto inhibidor de PI3K 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina y al menos un inhibidor de mTOR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un compuesto 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina y al menos un inhibidor de mTOR para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad proliferativa administrando un compuesto 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina y al menos un inhibidor de mTOR.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina y al menos un inhibidor de mTOR para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una combinación de un compuesto 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina (Compuesto I) y un inhibidor de mTOR seleccionado entre el grupo que consiste en RAD rapamicina (sirolimus) y derivados/análogos del mismo tales como everolimus o RAD001; CCI-779, ABT578, SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), AP23573, AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055 y OSI027, en la que los principios activos están presentes en cada caso en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de enfermedades dependientes de diana en mamíferos de rapamicina (mTOR) cinasa.

35 La presente divulgación proporciona un método para reducir o bloquear la fosforilación y activación de AKT mediante los inhibidores de mTOR que comprende administrar un compuesto de la fórmula (II) a un animal de sangre caliente que lo necesite. En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad proliferativa dependiente de fosforilación adquirida y activación de AKT durante el tratamiento con un inhibidor de mTOR que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (I) a un animal de sangre caliente que lo necesite.

40 En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad proliferativa que se ha vuelto resistente o tiene una sensibilidad disminuida al tratamiento con un inhibidor de mTOR que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (I) a un animal de sangre caliente que lo necesite. La resistencia se debe, por ejemplo, a fosforilación y activación de AKT.

45 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para mejorar la eficacia del tratamiento de una enfermedad proliferativa con un inhibidor de mTOR que comprende administrar una combinación que comprende un compuesto 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina y un inhibidor de mTOR a un animal de sangre caliente que lo necesite.

50 El inhibidor de mTOR usado de acuerdo con la presente divulgación se puede seleccionar entre RAD rapamicina (sirolimus) y derivados/análogos del mismo tales como everolimus o RAD001; CCI-779, ABT578, SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), AP23573, AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055 y OSI027. Los inhibidores de mTOR particularmente preferidos de acuerdo con la presente divulgación

son sirolimus y/o everolimus.

La expresión "enfermedades dependientes de mTOR cinasa" incluye pero no está restringida a los siguientes síntomas:

- 5 • rechazo de trasplante de órgano o tejido, por ejemplo, para el tratamiento de receptores de, por ejemplo, trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, hígado, riñón, pancreático, piel o córnea; enfermedad de injerto contra huésped, tal como después del trasplante de médula ósea;
- reestenosis
- síndromes de hamartoma, tales como esclerosis tuberosa o enfermedad de Cowden
- linfoangioleiomiomatosis
- 10 • retinitis pigmentosa
- enfermedades autoinmunitarias incluyendo encefalomiелitis, diabetes *mellitus* dependiente de insulina, lupus, dermatomiositis, artritis y enfermedades reumáticas
- leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides
- enfermedades fibróticas incluyendo escleroderma, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis quística
- 15 • hipertensión pulmonar
- inmunomodulación
- esclerosis múltiple
- síndrome de VHL
- complejo de Carney
- 20 • poliposis adenomatosa familiar
- síndrome de poliposis juvenil
- síndrome de Birt-Hogg-Duke
- cardiomiopatía hipertrófica familiar
- síndrome de Wolf-Parkinson-White
- 25 • trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson, de Huntington, de Alzheimer y demencias ocasionadas por mutaciones de tau, ataxia espinocerebelar de tipo 3, enfermedad de neurona motora causada por mutaciones de SOD1, lipofuscinosis ceroides neuronal/enfermedad de Batten (neurodegeneración pediátrica)
- degeneración macular húmeda y seca
- consunción muscular (atrofia, caquexia) y miopatías tales como enfermedad de Danon
- 30 • infecciones bacterianas y víricas incluyendo infecciones por *M. tuberculosis*, *Streptococcus* del grupo A, VSH tipo I, VIH
- neurofibromatosis incluyendo neurofibromatosis tipo 1
- síndrome de Peutz-Jeghers.

35 Asimismo, "enfermedades dependientes de mTOR cinasa" incluyen cánceres y otros tumores malignos relacionados. Una lista no limitante de los cánceres asociados con cascadas de señalización de mTOR patológicas incluye cáncer de mama, carcinoma de células renales, tumores gástricos, tumores neuroendocrinos, linfomas y

cáncer de próstata.

Los ejemplos para una enfermedad proliferativa son, por ejemplo, tumores benignos o malignos, carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándulas adrenales, vejiga urinaria, mama, estómago, tumores gástricos, ovarios, colon, recto, próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, en especial carcinoma de colon o adenoma colorrectal o un tumor de la cabeza y cuello, una hiperproliferación epidérmica, psoriasis, hiperplasia prostática, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, linfomas, un carcinoma mamario o una leucemia.

Las composiciones o combinación farmacéutica de acuerdo con la presente invención se pueden someter a ensayo en estudios clínicos. Los estudios clínicos adecuados pueden ser, por ejemplo, estudios de aumento gradual de dosis, abierto, en pacientes con enfermedades proliferativas. Dichos estudios demuestran, en particular, el sinergismo de los principios activos de la combinación de la invención. Los efectos beneficiosos sobre las enfermedades proliferativas se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios que son conocidos como tal por el experto en la materia. Dichos estudios pueden ser, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia usando los principios activos y una combinación de la invención. Preferentemente, la dosis del agente (a) se escala hasta que se alcanza la Dosificación Máxima Tolerada, y el agente (b) se administra con una dosis fija. Como 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 de manera intermitente. La eficacia del tratamiento se puede determinar en dichos estudios, por ejemplo, después de 12, 18 o 24 semanas mediante evaluación de las puntuaciones de los síntomas cada seis semanas.

La administración de una combinación farmacéutica de la invención puede dar como resultado no solo un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, con respecto a, por ejemplo, aliviar, retrasar el avance de o inhibir los síntomas, sino también efectos beneficiosos adicionales sorprendentes, por ejemplo, menos efectos secundarios, una calidad de vida mejorada o una morbilidad disminuida, en comparación con una monoterapia que aplica solamente uno de los principios farmacéuticamente activos usados en la combinación de la invención.

Un beneficio adicional puede ser que se pueden usar dosis más bajas de los principios activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que con frecuencia las dosificaciones no solo necesitan ser más pequeñas sino que también se podrían aplicar menos frecuentemente, lo cual puede disminuir la incidencia o gravedad de los efectos secundarios. Esto es de acuerdo con los deseos y necesidades de los pacientes a ser tratados.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que puede ser una combinación de la invención conjuntamente eficaz terapéuticamente para dirigirse a o para prevenir enfermedades proliferativas. En esta composición, el agente (a) y el agente (b) se pueden administrar juntos, uno después del otro o por separado en una forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas para administración por separado del agente (a) y del agente (b) o para la administración en una combinación fija, es decir, una composición galénica individual que comprende al menos dos elementos de combinación (a) y (b), según la invención se pueden preparar en una manera conocida *per se* y son aquellas adecuadas para administración por vía entérica, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo humanos, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un elemento de combinación farmacológicamente activo solo, por ejemplo, como se indicó anteriormente, o en combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para aplicación entérica o parenteral.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden contener, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 99,9 %, preferentemente desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 60 %, del o los principios activos. Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración por vía entérica o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, o ampollas. Si no se indica lo contrario, estas se preparan en una manera conocida *per se*, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario de un elemento de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí mismo una cantidad eficaz puesto que la cantidad eficaz necesaria se puede alcanzar mediante administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

En particular, una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los elementos de combinación de la combinación de la invención se puede administrar simultánea o secuencialmente 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 enfermedades proliferativas de según la invención puede comprender (i) administración del primer agente (a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) administración de un agente (b) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades

conjuntamente eficaces terapéuticamente, preferentemente en cantidades sinérgicamente eficaces, por ejemplo, en dosificaciones diarias o de manera intermitente que correspondan a las cantidades descritas en el presente documento. Los elementos de combinación individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en tiempos diferentes durante el curso de la terapia o en forma concurrente en formas de combinación dividida o individual. Asimismo, el término administrar también abarca el uso de un profármaco de un elemento de combinación que se convierte *in vivo* en el elemento de combinación como tal. Por lo tanto, se debe entender que la presente invención abarca todos de dichos regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y que el término "administrar" se debe interpretar en forma correspondiente.

La dosificación eficaz de cada uno de los elementos de combinación empleados en la combinación de la invención puede variar en función del compuesto o composición farmacéutica particular empleados, del modo de administración, la condición a ser tratada, la gravedad de la enfermedad que está siendo tratada. Por tanto, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores que incluyen la vía de administración y la función renal y hepática del paciente. Un facultativo o médico experto habitual puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de los principios activos individuales requerida para aliviar, contrarrestar o detener el avance de la enfermedad. La precisión óptima para lograr la concentración de los principios activos dentro del intervalo que produzca eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los principios activos hacia los sitios diana.

Ejemplo 1: Efecto de la combinación de RAD001 (everolimus) con el Compuesto I en células BT474 y MDA-MB-231 de tumor de mama

20 Materiales y métodos

1. Preparación de los compuestos

El compuesto RAD001 es sintetizado por Novartis Pharma AG. Se prepara una solución madre 20 mM en DMSO y se almacena a -20 °C. Se prepara una solución madre 10 mM del Compuesto I en DMSO y se almacena a -20 °C.

2. Células y condiciones de cultivo celular

Se obtienen células de carcinoma de mama de humano BT474 (ATCC HTB-26) y MDA-MB-231 (ATCC HTB-20) a partir de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.). Las células BT474 se mantienen en medio Hybri-Care (ATCC) complementado con suero fetal de bovino al 10 % v/v y L-glutamina 2 mM. Las células MDA-MB-231 se cultivan en medio RPMI 1640 (Amimed, Allschwil, Suiza) complementado con suero fetal de bovino al 10 % v/v y L-glutamina 2 mM. Todos los medios se complementan con 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina y las células se mantienen a 37 °C en CO₂ al 5 %.

3. Tratamiento celular y extracción celular

Las células BT474 y MDA-MB-231 se siembran a una densidad de 3,3 X 10⁴ células/cm² y 1,6 X 10⁴ células/cm², respectivamente, y se incuban durante 48 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %, antes del tratamiento con vehículo de DMSO, RAD001 20 nM y/o diversas concentraciones del Compuesto I durante 24 horas. Los lisados celulares se preparan de la siguiente manera. Las placas de cultivo se lavan una vez con PBS enfriada con hielo que contiene PMSF 1mM y una vez con tampón de extracción enfriado con hielo [Hepes 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, β-glicerofosfato 25 mM, NaF 25 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, PPI 15 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, molibdato de sodio 10 mM, leupeptina (10 µg/ml), aprotinina (10 µg/ml), DTT 1 mM y PMSF 1 mM]. Los inhibidores de proteasa se obtienen a partir de SIGMA Chemical, St. Louis, Mo. Las células se extraen en el mismo tampón, que contiene NP-40 al 1 % (SIGMA Chemicals). Los extractos se vuelven a homogenizar, se limpian mediante centrifugación, se dividen en alícuotas y se congelan a -80 °C. Las concentraciones de proteína se determinan con el Análisis de la Proteína BCA (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

4. Inmunotransferencia

Veinte microgramos de los extractos celulares se resuelven mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) desnaturalizantes al 12 % y se transfieren a filtros de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.) mediante transferencia en húmedo (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 a partir de DAKO (Glostrup, Dinamarca) y diluido en PBS, Tween al 0,5 % v/v.

50 anti-fosfo-Akt (T308) (cat n.º 9275; 1:1000) obtenido a partir de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE.UU.) y diluido en PBS, Tween al 0,1 % v/v.

ES 2 627 677 T3

anti-Akt (cat n.º 1085-1; 1:5000) obtenido a partir de Epitomics (Burlingame, CA, EE.UU.) y diluido en PBS, Tween al 0,5 % v/v.

Anti-actina (cat n.º MAB1501; 1:20,000) obtenido a partir de Chemicon (Billerica, MA, EE.UU.) y diluido en PBS, Tween al 0,1 % v/v.

- 5 Después de la incubación con el anticuerpo primario adecuado (anterior), las proteínas decoradas se manifiestan usando inmunoglobulinas anti-ratón o anti-conejo conjugadas con peroxidasa de rábano picante seguido por quimioluminiscencia mejorada (kit ECL Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) y se cuantifican usando el software Quantity One (Bio-Rad, Múnich, Alemania).

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende
 - a) el compuesto 5-(2,6-di-morfolin-4-il-pirimidin-4-il)-4-trifluorometil-piridin-2-ilamina, o un estereoisómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y
 - b) un inhibidor de mTOR que es everolimus.
2. Una combinación farmacéutica según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad dependiente de diana en mamíferos de rapamicina (mTOR) cinasa que se selecciona entre cáncer de mama, carcinoma de células renales, tumores gástricos, tumores neuroendocrinos, linfomas y cáncer de próstata.
3. Una combinación farmacéutica según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 2 en la que cada elemento de combinación de la combinación según la reivindicación 1 se administra simultánea o secuencialmente y en cualquier orden.
4. Una composición farmacéutica que comprende la combinación farmacéutica según la reivindicación 1.