

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 689**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/566 (2006.01)

A61K 31/5685 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013 PCT/US2013/060292**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14047109**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013 E 13770771 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2897644**

54 Título: **Combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de fosfatidilinositol 3-quinasa y un inhibidor de aromatasa**

30 Prioridad:

20.09.2012 US 201261703533 P

01.10.2012 US 201261708070 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2018

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

GOLDBRUNNER, MICHAEL y

HUANG, XIZHONG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 686 689 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 fosfatidilinositol 3-quinasa y un inhibidor de aromatasa

Campo de la invención

- 5 La presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) de ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de aromatasa que es letrozol o exemestano, y tales combinaciones para uso en el tratamiento del cáncer, por ejemplo cáncer de mama.

Antecedentes de la invención

- 10 La vía PI3K/Akt/mTOR es una vía de supervivencia importante estrechamente regulada para la célula normal. Las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3K) son quinasas de lípidos expresadas ampliamente que catalizan la transferencia de fosfato a la posición D-3' de lípidos de inositol para producir fosfoinositol-3-fosfato (PIP), fosfoinositol-3,4-difosfato (PIP₂) y fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Estos productos de las reacciones catalizadas por PI3K actúan como segundos mensajeros y tienen funciones centrales en procesos celulares clave, que incluyen crecimiento, diferenciación, movilidad, proliferación y supervivencia celular.

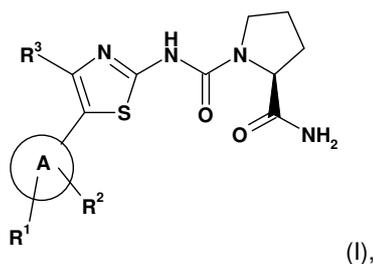
- 15 De las dos PI3K de clase 1, las PI3K de clase 1A son heterodímeros compuestos de una subunidad p110 catalítica (isoformas α , β , γ) asociada constitutivamente con una subunidad reguladora que puede ser p85 α , p55 α , p50, p85 β o p55 γ . La subclase de Clase 1B tiene un miembro de la familia, un heterodímero compuesto de una subunidad catalítica p110 γ asociado con una de dos subunidades reguladoras, p101 o p84 (Fruman et ál., Annu Rev. Biochem. 67:481 (1998); Suire et ál., Curr. Biol. 15:566 (2005)).

- 20 En muchos casos, PIP₂ y PIP₃ captan AKT en la membrana de plasma donde actúa como un punto nodal para muchas vías de señalización intracelular importantes para el crecimiento y la supervivencia (Fantl et ál., Cell 69:413-423(1992); Bader et ál., Nature Rev. Cancer 5:921 (2005); Vivanco y Sawyer, Nature Rev. Cancer 2:489 (2002)). La regulación aberrante de PI3K, la cual a menudo aumenta la supervivencia mediante la activación de AKT, es uno de los eventos más prevalentes en el cáncer humano y se ha observado que ocurre en múltiples niveles. El gen supresor de tumor PTEN, que desfosforila las fosfoinositidas en la posición 3' del anillo de inositol y al hacerlo antagoniza la actividad de PI3K, es eliminado funcionalmente en una variedad de tumores. En otros tumores, los genes para la isoforma de p110 α , PIK3CA, y para AKT, se amplifican y se ha demostrado el aumento de la expresión de proteínas de sus productos génicos en varios cánceres humanos. Además, las mutaciones somáticas en sentido contrario de aminoácido en PIK3CA que activan las vías de señalización corriente abajo fueron descritas frecuentemente en una amplia variedad de cánceres humanos (Kang et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:802 (2005); Samuels et ál., Science 304:554 (2004); Samuels et ál., Cancer Cell 7:561-573 (2005)). Por lo tanto, se sabe que los inhibidores de PI3K alfa tienen valor particular en el tratamiento de cáncer y otros trastornos.

- 25 A pesar de las numerosas opciones de tratamiento para los pacientes con cáncer, todavía existe la necesidad de agentes terapéuticos seguros y eficaces y una necesidad de su uso preferencial en terapia de combinación. Un compuesto derivado de 2-carboxamida cicloamino urea específico de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) de ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico inhibe selectivamente la isoforma p110- α de PI3K. Se ha descubierto de forma sorprendente que estos compuestos específicos de fórmula (I) tienen nuevos efectos beneficiosos, por ejemplo, interacción sinérgica, al usarse en combinación con inhibidores de aromatasa para el tratamiento de cáncer. Se cree que esta terapia de combinación será beneficiosa para provocar actividad antiproliferativa fuerte y/o respuesta antitumoral fuerte para el tratamiento de cáncer.

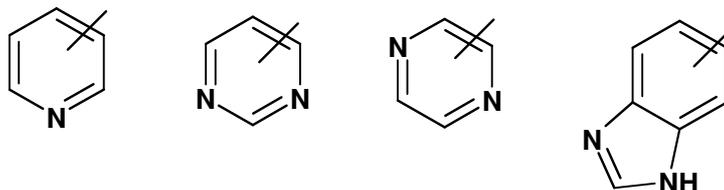
Resumen de la invención

La presente divulgación se refiere a una combinación farmacéutica que comprende (a) un compuesto de fórmula (I):



45 en donde

A representa un heteroarilo que se selecciona del grupo que consiste en:



R¹ representa uno de los siguientes sustituyentes: (1) alquilo de C₁-C₇ no sustituido o sustituido, preferiblemente sustituido, en donde dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de uno o más, preferiblemente uno a nueve de las siguientes porciones: deuterio, flúor, o una a dos de las siguientes porciones: cicloalquilo de C₃-C₅; (2) cicloalquilo de C₃-C₅ opcionalmente sustituido donde dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de una o más, preferiblemente una a cuatro de las siguientes porciones: deuterio, alquilo de C₁-C₄ (preferiblemente metilo), flúor, ciano, aminocarbonilo; (3) fenilo opcionalmente sustituido donde dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de una o más, preferiblemente una a dos de las siguientes porciones: deuterio, halógeno, ciano, alquilo de C₁-C₇, alquilamino de C₁-C₇, di(alquilo de C₁-C₇)amino, alquilaminocarbonilo de C₁-C₇, di(alquilo de C₁-C₇)aminocarbonilo, alcoxi de C₁-C₇; (4) opcionalmente amina mono- o disustituída; donde dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de las siguientes porciones: deuterio, alquilo de C₁-C₇ (que no está sustituido o está sustituido con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo de deuterio, flúor, cloro, hidroxilo), fenilsulfonilo (que no está sustituido o está sustituido con uno o más, preferiblemente uno, de alquilo de C₁-C₇, alcoxi de C₁-C₇, di(alquilo de C₁-C₇)amino-alcoxi de C₁-C₇); (5) sulfonilo sustituido; donde dicho sustituyente se selecciona de las siguientes porciones: alquilo de C₁-C₇ (que no está sustituido o está sustituido con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo de deuterio, flúor), pirrolidino (que no está sustituido o está sustituido con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo de deuterio, hidroxilo, oxo; particularmente un oxo); (6) flúor, cloro;

R² representa hidrógeno;

R³ representa (1) hidrógeno, (2) flúor, cloro, (3) metilo opcionalmente sustituido, donde dichos sustituyentes se seleccionan independientemente de una o más, preferiblemente una a tres de las siguientes porciones: deuterio, flúor, cloro, dimetilamino,

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos; y (b) al menos un inhibidor de aromatasa.

Tal combinación puede ser para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de un cáncer.

En las combinaciones farmacéuticas de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto A") o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromatasa que es letrozol o exemestano para su uso en el tratamiento de un cáncer, y también proporciona estas combinaciones para uso en el tratamiento del cáncer de mama como se describe en las reivindicaciones..

La divulgación se refiere además al uso de una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y al menos un inhibidor de aromatasa, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer.

También se divulga un método para el tratamiento de un cáncer que comprende administrar una cantidad de (a) un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un inhibidor de aromatasa, que es terapéuticamente eficaz de forma conjunta, a un animal de sangre caliente, preferiblemente un humano, que lo necesita.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este; y un inhibidor de aromatasa, que es exemestano o letrozol, se pueden administrar como una composición farmacéutica simple, como composiciones separadas o secuencialmente.

La presente invención proporciona además una combinación sinérgica que comprende (a) un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este; y (b) un inhibidor de aromatasa, que es o letrozol o exemestano como se describe en las reivindicaciones.

La divulgación también se refiere a un kit que comprende un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un inhibidor de aromatasa.

Descripción detallada de las figuras

La Figura 1 muestra un isoblograma y matriz de dosis extendida que demuestran los efectos de la combinación de dosis del Compuesto A y exemestano sobre la proliferación de células de carcinoma de mama humano MCF7/ARO con $\Delta 4A$.

- 5 La Figura 2 muestra un isoblograma y matriz de dosis extendida que demuestran los efectos de la combinación de dosis del Compuesto A y letrozol sobre la proliferación de células de carcinoma de mama humano MCF7/ARO con $\Delta 4A$.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende

- 10 (a) un compuesto de fórmula (I), que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y

(b) un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol.

Tal combinación puede ser para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de un cáncer.

- 15 Se proporcionan las siguientes definiciones generales para entender mejor la invención:

"Combinación" se refiere a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria o una combinación no fija (o kit de partes) para la administración combinada, donde un compuesto de la fórmula (I) y un compañero de combinación (por ejemplo, otro ingrediente activo como se explica a continuación, también denominado "agente terapéutico" o "agente conjunto") se pueden administrar independientemente al mismo tiempo o por separado en intervalos de tiempo, especialmente donde estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico. El término "combinación fija" hace referencia a que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) y un compañero de combinación, se administran a un paciente simultáneamente en forma de una sola entidad o dosis. Los términos "combinación no fija" o "kit de partes" hacen referencia a que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) y un compañero de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades individuales de forma simultánea o secuencial, sin límites de tiempo específicos, donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de dos ingredientes activos en el cuerpo del paciente.

20 "Tratamiento" incluye tratamiento profiláctico y terapéutico (incluido de modo no limitativo paliativo, de curación, para aliviar síntomas, para reducir síntomas) así como el retraso en el avance de una enfermedad o trastorno canceroso. El término "profiláctico" significa la prevención del inicio o reaparición de un cáncer. El término "retraso en el avance" como se usa en la presente significa la administración de la combinación a pacientes en una preetapa o en una fase temprana del cáncer a ser tratado, se diagnostica una preforma del cáncer correspondiente y/o en un paciente diagnosticado con una afección bajo la cual es probable que se desarrolle un cáncer correspondiente.

30 "Preparación farmacéutica" o "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla o solución que contiene al menos un agente terapéutico a administrarse a un animal de sangre caliente, por ejemplo, un humano.

35 "Administrar conjuntamente" o "administración combinada" o similares significa que comprende la administración de los agentes terapéuticos seleccionados (es decir, ingredientes activos) a un paciente único, y pretende incluir regímenes de tratamiento donde los agentes no necesariamente se administran por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

40 "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, según un criterio médico sensato, son adecuados para el contacto con los tejidos de mamíferos, especialmente humanos, sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, con una relación beneficio/riesgo correspondiente razonable.

45 "Terapéuticamente eficaz" se refiere preferiblemente a una cantidad de un agente terapéutico que es terapéuticamente o en un sentido más amplio también profilácticamente eficaz contra el avance de un cáncer.

"Terapéuticamente eficaz de forma conjunta" significa que los agentes terapéuticos se pueden administrar por separado (de cualquier manera escalonada cronológicamente, especialmente una manera específica de la secuencia) en los intervalos de tiempo que se prefieran, en el animal de sangre caliente, especialmente humano, que se tratará, aún muestra una interacción (preferiblemente sinérgica). Se puede determinar si este es el caso, entre otras cosas, siguiendo los niveles en sangre, lo que demuestra que ambos agentes terapéuticos están presentes en la sangre del ser humano que se tratará, al menos durante ciertos intervalos de tiempo.

"Sinergia", "sinérgico", "interacción sinérgica" o "efecto sinérgico" se refiere a la acción de dos agentes terapéuticos tales como, por ejemplo, (a) un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (b) un inhibidor de aromatasas, que produce un efecto, por ejemplo, ralentizando el avance sintomático de una enfermedad o trastorno canceroso, particularmente cáncer, o sus síntomas, que es mayor que la simple suma de los efectos de cada agente terapéutico administrado por sí mismo. Un efecto sinérgico se puede calcular, por ejemplo, usando métodos adecuados tales como la ecuación Sigmoid-Emax (Holford, N. H. G. and Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. and Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación de efecto mediano (Chou, T. C. and Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada una de las ecuaciones mencionadas anteriormente se puede aplicar a los datos experimentales para generar un gráfico correspondiente que ayude a evaluar los efectos de la combinación de agentes terapéuticos. Las gráficas correspondientes asociadas a las ecuaciones a las que se hace referencia con anterioridad son curva efecto-concentración, isoblograma y curva de índice de combinación, respectivamente. La sinergia se puede mostrar además calculando la puntuación de sinergia de la combinación de acuerdo con métodos conocidos por un experto en la técnica.

"Composición farmacéutica simple" se refiere a un portador o vehículo simple formulado para administrar cantidades eficaces de ambos agentes terapéuticos a un paciente. El vehículo único está diseñado para administrar una cantidad eficaz de cada uno de los agentes terapéuticos, junto con cualquier cantidad farmacéuticamente aceptable de portadores o excipientes. En algunas realizaciones, el vehículo es un comprimido, cápsula, píldora o parche. En otras realizaciones, el vehículo es una solución o una suspensión.

"Intervalo de dosis" se refiere a un límite superior e inferior de una variación aceptable de una cantidad del agente terapéutico especificado. Típicamente, una dosis del agente en cualquier cantidad dentro del intervalo especificado se puede administrar a pacientes sometidos a tratamiento.

"Sujeto", "paciente" o "animal de sangre caliente" pretende incluir animales. Algunos ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que sufre, que corre riesgo de sufrir o que puede sufrir una enfermedad de tumor cerebral. Particularmente preferido, el sujeto o animal de sangre caliente es humano.

El término "alrededor de" o "aproximadamente", generalmente significa, dentro del 20 %, más preferiblemente dentro del 10 % y más preferiblemente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Alternativamente, especialmente en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un logaritmo (o sea, una orden de magnitud) preferiblemente dentro de un factor de dos de un valor determinado.

Los documentos WO2010/029082 y US 2010/0105711, divulga compuestos que se ha encontrado que tienen actividad inhibidora considerable para la alfa-isoforma de fosfatidilinositol 3-quinasa (o PI3K). 2-amida 1-([4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico es el ejemplo 15, cuya síntesis se describe allí. Estos compuestos tienen propiedades farmacológicas ventajosas como un inhibidor de PI3K que muestra una alta selectividad para el subtipo de la isoforma alfa de la quinasa PI3 en comparación con los subtipos beta y/o delta y/o gamma.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden incorporar en la combinación de la presente invención en la forma de su base libre o cualquier sal de estos. Las sales pueden estar presentes solas o mezcladas con el compuesto libre, por ejemplo, el compuesto de la fórmula (I), y son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Se forman dichas sales de los compuestos de fórmula (I), por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, de compuestos de fórmula (I) con un átomo de nitrógeno básico. Los ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos de halógeno, como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido fumárico o ácido metanosulfónico. Con fines de aislamiento o purificación también es posible usar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, solamente se emplean sales o compuestos libres farmacéuticamente aceptables, (cuando corresponda en forma de preparaciones farmacéuticas) y por lo tanto estos son preferidos. Dada la estrecha relación entre los compuestos novedosos en forma libre y los que se encuentran en la forma de sus sales, incluidas las sales que se pueden usar como intermediarios, por ejemplo, en la purificación o identificación de los compuestos novedosos, se deberá entender que cualquier referencia a los compuestos libres anteriormente o a continuación se refiere también a las sales correspondientes, según corresponda y sea oportuno. Las sales de compuestos de fórmula (I) son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables; se conocen en el campo contraiones adecuados que forman sales farmacéuticamente aceptables.

Las combinaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen un inhibidor de aromatasas que es letrosol o exemestano. La expresión "inhibidor de aromatasas" como se usa en la presente se refiere a un compuesto que inhibe la producción de estrógeno, es decir, la conversión de los sustratos androstenodiona y testosterona en estrona y estradiol, respectivamente. Tales compuestos se denominan "inhibidores de aromatasas".

Los inhibidores de aromatasas incluyen,

- (a) esteroides, tales como exemestano y formestano; y
 (b) no esteroides, tales como aminoglutetimida, vorozol, fadrozol, anastrozol y, especialmente, letrozol.

En una realización, el inhibidor de aromatasa es exemestano, un esteroide. En una realización, el inhibidor de aromatasa es letrozol, un no esteroide.

- 5 El exemestano se puede administrar, por ejemplo, en la forma en que se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada AROMASIN® (Pfizer Inc.). El exemestano se ha descrito específicamente en la patente estadounidense No. 4,808,616 publicada el 28 de febrero de 1989. Letrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma en que se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada FEMARA® o FEMAR® (Novartis). Letrozol se ha descrito específicamente en la patente europea No. 0,236,940 publicada el 16 de setiembre de 1987, así como la patente estadounidense No. 4,978,672 publicada el 18 de diciembre de 1990, y la patente japonesa No. 2018112.

Los inhibidores de aromatasa preferidos para su uso en combinación de la presente invención son letrozol y/o exemestano.

- 15 La estructura de los agentes activos identificados por los números de código, nombres genéricos o nombres comerciales se puede obtener en la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o en las bases de datos, por ejemplo, patentes internacionales (por ejemplo, publicaciones mundiales de IMS).

- Asimismo están comprendidas las sales farmacéuticamente aceptables de estos, los racematos, diastereómeros, enantiómeros, tautómeros correspondientes, así como las modificaciones cristalinas correspondientes de los compuestos descritos anteriormente cuando están presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, que se describen allí. Los compuestos en las combinaciones de la presente invención se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados, respectivamente. También dentro del alcance de esta invención es la combinación de más de dos ingredientes activos separados como se establece anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de esta invención puede incluir tres ingredientes activos o más.

- 25 En una realización de la presente invención, la combinación farmacéutica comprende 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)- pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos un inhibidor de aromatasa que se selecciona del grupo que consiste en letrozol y exemestano o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 30 En una realización adicional de la presente invención, la combinación farmacéutica comprende 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)- pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromatasa letrozol o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- En una realización adicional de la presente invención, la combinación farmacéutica comprende 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)- pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromatasa exemestano o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 35 Se ha descubierto de forma sorprendente que la combinación de un compuesto de fórmula (I), que es un inhibidor de PI3K específico de alfa-isoforma altamente selectivo, y al menos un inhibidor de aromatasa posee propiedades terapéuticas beneficiosas, por ejemplo, interacción sinérgica, que lo hace particularmente útil para el tratamiento de cáncer. Se cree que esta terapia de combinación será beneficiosa para provocar actividad antiproliferativa fuerte y/o respuesta antitumoral fuerte para el tratamiento de cáncer.

- 40 En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende (a) Compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (b) un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol para su uso en el tratamiento de un cáncer.

- Cánceres adecuados que se pueden tratar con la combinación de la presente invención incluyen, de modo no limitativo, sarcoma, linfomas, cáncer de pulmón, bronquios, próstata, mama (que incluye cánceres de mama esporádicos y padecientes de la enfermedad de Cowden), páncreas, gastrointestinal, colon, recto, colon, adenoma colorrectal, tiroides, hígado, ducto biliar intrahepático, hepatocelular, glándula adrenal, estómago, gástrico, glioma, glioblastoma, endometrio, melanoma, riñón, pelvis renal, vejiga urinaria, cuerpo uterino, cuello uterino, vagina, ovario, mieloma múltiple, esófago, una leucemia, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica, leucemia mieloide, cerebro, un carcinoma del cerebro, cavidad oral y faringe, laringe, intestino delgado, linfoma no Hodgkin, melanoma, adenoma de colon veloso, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, un carcinoma mamario, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, queratosis actínica, enfermedades tumorales (que incluyen tumores sólidos), un tumor de cuello o cabeza, policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis con metaplasia mieloide, y enfermedad de Waldenstroem. Cuando se menciona un cáncer, un tumor, una enfermedad tumoral, sarcoma o un cáncer, se implica también metástasis en el órgano o tejido original y/o en cualquier otra ubicación alternativa o adicionalmente, sea la ubicación del tumor y/o metástasis que fuera.

- La combinación de la presente invención es particularmente útil para el tratamiento de un cáncer mediado por fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), particularmente la subunidad alfa de PI3K. Las enfermedades proliferativas pueden incluir aquellas que muestran la sobreexpresión o amplificación de la mutación de PI3K alfa, mutación somática de PIK3CA o mutaciones de línea germinal o mutación somática de PTEN o mutaciones y traslocación de p85 α que sirve para regular por aumento el complejo p85-p110. En una realización preferida, el cáncer es un crecimiento tumoral y/o canceroso mediado por la isoforma alfa de PI3K. La enfermedad puede incluir las que muestran la sobreexpresión o amplificación de la isoforma alfa de PI3K y/o mutación somática de PIK3CA.
- La combinación de la presente invención también es particularmente útil para el tratamiento de cánceres positivos para el receptor de hormonas y/o sensible a hormonas. Los cánceres sensibles a hormonas pueden incluir, de modo no limitativo, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, y/o cáncer de cuello uterino. Los cánceres positivos para el receptor de hormonas pueden incluir cánceres positivos para el receptor de estrógenos (es decir, cáncer que crece en la respuesta a la hormona estrógeno) o cánceres positivos para el receptor de progesterona (es decir, cáncer que crece como respuesta a la hormona progesterona). Preferiblemente, el cáncer positivo para el receptor de hormona es cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno.
- En una realización, el cáncer es un tumor sólido.
- En una realización adicional, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, endometrio, ovario y cuello uterino.
- En una realización adicional, el cáncer es un cáncer que muestra (a) sobreexpresión o amplificación de la isoforma alfa de PI3K y/o mutación somática de PIK3CA, y (b) estado de positivo para el receptor de hormonas.
- En una realización adicional, el cáncer es cáncer de mama. Preferiblemente, el cáncer es un cáncer de mama que es positivo para el receptor de hormonas, tiene una mutación en PIK3CA o una combinación de estos. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de mama positivo (+) para el receptor de estrógeno.
- En una realización adicional, el cáncer es un cáncer de mama positivo (+) para el receptor de hormonas resistente a tratamiento con terapia hormonal (por ejemplo, estrógeno o progesterona). Un cáncer "resistente a tratamiento con terapia hormonal" se refiere a un cáncer o tumor que falla al responder favorablemente al tratamiento con terapia hormonal previa, o de manera alternativa, reaparece o recae luego de responder favorablemente a la terapia hormonal. Se entiende que dicha terapia hormonal está en ausencia de un inhibidor de PI3K. El cáncer o tumor puede ser resistente o refractario al comienzo del tratamiento o puede tornarse resistente o refractario durante el tratamiento.
- Para detectar un cáncer resistente a terapia hormonal, un paciente sometido a tratamiento inicial se puede monitorear cuidadosamente para detectar signos de resistencia, falta de respuesta o tumores recurrentes. Esto se puede lograr monitoreando la respuesta del tumor de paciente al tratamiento inicial con la terapia hormonal. La respuesta, falta de respuesta o recidiva del tumor al tumor inicial se puede determinar mediante cualquier método adecuado de práctica en la técnica. Por ejemplo, esto se puede lograr evaluando el tamaño del tumor y su cantidad. Un aumento en el tamaño del tumor, o, de manera alternativa, la cantidad de cáncer o tumor, indica que el tumor no está respondiendo a la terapia hormonal o que ha ocurrido una recidiva. La determinación se puede realizar de acuerdo con los criterios "RECIST" como se describe en detalle en Therasse et ál, J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216 (2000).
- Para demostrar que la combinación de la presente invención es particularmente adecuada para el tratamiento eficaz de un cáncer con buen margen terapéutico y otras ventajas, el o los experimentos preclínicos descritos en los Ejemplos 1 y 2 de la presente los puede realizar un experto en la técnica. La observación de la sinergia o actividad antiproliferativa en una especie o modelo de tumor puede predecir el efecto en otra especie (por ejemplo, humanos). Las correlaciones establecidas entre modelos de tumor y efectos observados en hombres sugieren que la sinergia en animales puede, por ejemplo, demostrarse en el modelo celular de carcinoma de mama humano MCF7/Aro como se describe en los Ejemplos a continuación.
- De manera alternativa, las pruebas clínicas se pueden realizar de forma conocida por el experto en la técnica. Los estudios clínicos adecuados son, por ejemplo, estudios abiertos, de aumento de dosis en pacientes con cáncer. Estos estudios prueban en particular la sinergia de los ingredientes activos de la combinación de la invención. Los efectos beneficiosos se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios que son conocidos por el experto en la técnica. Estos estudios son, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia que utiliza ingredientes activos y una combinación de la invención. Preferiblemente, la dosis del ingrediente activo (a) se aumenta hasta alcanzar la máxima dosis tolerada y el ingrediente activo (b) se administra con una dosis fija. Alternativamente, el ingrediente activo (a) se administra en una dosis fija y la dosis del ingrediente activo (b) se aumenta. Cada paciente recibe dosis del ingrediente activo (a) ya sea diariamente o de forma intermitente. La eficacia del tratamiento se puede determinar en dichos estudios, por ejemplo, después de 12, 18 o 24 semanas mediante la evaluación de la puntuación de síntomas cada 6 semanas.
- La administración de una combinación de la invención se espera que dé como resultado no solo un efecto beneficioso, por ejemplo un efecto terapéutico sinérgico, por ejemplo con respecto a aliviar, retrasar el avance o inhibir los síntomas, sino que también otros efectos beneficiosos sorprendentes, por ejemplo menores efectos secundarios, una calidad de vida mejorada o una menor morbilidad, en comparación con una monoterapia aplicando uno solo del ingrediente activo

(a) o ingrediente activo (b) utilizado en la combinación de la invención.

Otro beneficio esperado es que se pueden utilizar menores dosis de los ingredientes activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que las dosificaciones no solo serán más pequeñas, sino que también se aplicarán con menos frecuencia, lo que puede disminuir la incidencia o la gravedad de los efectos secundarios. Estos dependerán del criterio y las necesidades de los pacientes que se tratarán.

En un aspecto, la presente invención proporciona una combinación sinérgica para administración humana que comprende (a) un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (b) un inhibidor de aromataasa que es exemestano o letrozol, en un intervalo de combinación (p/p) que corresponde a los intervalos observados en un modelo de tumor, por ejemplo, un modelo de tumor descrito en los Ejemplos 1 o 2, usado para identificar una reacción sinérgica. De forma adecuada, el intervalo de relación en humanos corresponde a un intervalo no humano que se selecciona entre 70:1 a 1:20, 70:1 a 1:12, 70:1 a 1:10, 12:1 a 1:12, 10:1 a 1:10, 7:1 a 1:6, 70:1 a 1:1, y 1:1 a 12:1.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de aromataasa que es exemestano o letrozol, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer.

En un aspecto, la presente invención se refiere además a un método para el tratamiento de un cáncer que comprende administrar una cantidad de (a) un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromataasa que es exemestano o letrozol, que es terapéuticamente eficaz de forma conjunta, a un animal de sangre caliente, preferiblemente un humano, que lo necesita. De acuerdo con la presente invención, el compuesto de fórmula (I) y el inhibidor de aromataasa se puede administrar como una composición farmacéutica simple, como composiciones separadas o secuencialmente.

Se entiende que realizaciones alternativas para métodos de tratamiento de la presente invención incluyen aquellos cánceres específicos descritos anteriormente para la combinación farmacéutica de la invención para el uso de tratamiento de cáncer, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda una cantidad, que es terapéuticamente eficaz de forma conjunta para la dirigirse o prevenir un cáncer, de cada agente terapéutico (a) y (b) de la invención. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de aromataasa que es exemestano o letrozol. En una realización, dicha composición farmacéutica de la presente invención es para su uso en el tratamiento de un cáncer.

De acuerdo con la presente invención, el agente terapéutico (a) y el agente terapéutico (b) se pueden administrar juntos en una composición farmacéutica simple, por separado en dos o más formas de dosificación unitaria separadas, o secuencialmente. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas para administración separada de agente terapéutico (a) y agente terapéutico (b) o para la administración en una combinación fija (es decir, una composición galénica simple que comprende al menos dos agentes terapéuticos (a) y (b)) de acuerdo con la invención se pueden preparar de forma conocida per se y son los adecuados para administración entérica, tal como oral, rectal, tópica y parenteral a sujetos, incluidos mamíferos (animales de sangre caliente) tales como humanos. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico solo, por ejemplo, como se indica anteriormente, o en combinación con uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para aplicación entérica o parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas contienen, por ejemplo, entre aproximadamente el 0.1% y aproximadamente el 99.9%, preferiblemente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 60%, de los ingredientes activos.

Las composiciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración entérica o parenteral son, por ejemplo, aquellas en forma de dosificación unitaria, como comprimidos cubiertos con azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, ampollitas, soluciones inyectables o suspensiones inyectables. La administración tópica es por ejemplo a la piel o al ojo, por ejemplo, en la forma de lociones, geles, ungüentos o cremas, o en una forma nasal o de supositorio. Si no se indica lo contrario, estas se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo a través de procesos convencionales de mezclado, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario del agente terapéutico (a) o agente terapéutico (b) presente en una dosis individual de cada forma de dosificación unitaria no necesita constituir por sí mismo una cantidad eficaz, ya que la cantidad eficaz necesaria se puede alcanzar mediante la administración de diversas unidades de dosificación.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables y se pueden fabricar de forma convencional mezclando uno o ambos compañeros de combinación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen de

modo no limitativo lactosa, dextrosa, manitol, y/o glicerol, y/o lubricantes y/o polietilenglicol. Ejemplos de aglutinantes farmacéuticamente aceptables incluyen de modo no limitativo, silicato de aluminio y magnesio, almidones, tales como almidón de trigo, maíz o arroz, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, y, si se desea, los desintegrantes farmacéuticamente aceptables incluyen de modo no limitativo, almidones, agar, ácido algínico o una sal de estos, tales como alginato de sodio, y/o mezclas efervescentes, o adsorbentes, tintes, saborizantes y endulzantes. También es posible usar los compuestos de la presente invención en la forma de composiciones administrables parenteralmente o en la forma de soluciones de infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden estar esterilizadas y/o pueden comprender excipientes, por ejemplo, conservantes, estabilizantes, compuestos humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o reguladores.

En particular, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los compañeros de combinación de la combinación de la invención 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 un cáncer de acuerdo con la invención puede comprender: (i) la administración del primer agente terapéutico (a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable; y (ii) la administración de un agente terapéutico (b) en forma libre o de una sal farmacéuticamente aceptable, simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, en cantidades conjuntamente terapéuticamente eficaces, preferiblemente en cantidades sinérgicamente eficaces, por ejemplo en dosificaciones diarias o intermitentes que corresponden a las cantidades descritas aquí. Los compañeros de combinación individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el transcurso de la terapia o de forma concurrente en formas de combinación divididas o únicas. Además, el término "administrar" también comprende el uso de un profármaco de un compañero de combinación que se convierte in vivo en el compañero de combinación como tal. Por lo tanto, se debe entender que la presente invención comprende todos estos regímenes de tratamiento simultáneo o alternativo y el término "administrar" se interpretará en consecuencia.

La dosificación eficaz de cada uno del agente terapéutico (a) o agente terapéutico (b) empleados en la combinación de la invención puede variar según el compuesto particular o la composición farmacéutica empleada, el modo de administración, la afección que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando. Por lo tanto, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente, la gravedad de la afección que se va a tratar, la vía de administración, la función renal o hepática del paciente y el compuesto particular que se emplea. Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz del agente terapéutico requerido para prevenir, contrarrestar o detener el avance de la afección. La precisión óptima al alcanzar la concentración de agente terapéutico dentro del intervalo que proporciona eficacia requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del agente terapéutico para dirigirse a sitios. Esto implica una consideración de la distribución, equilibrio, y eliminación de un agente terapéutico.

Con los fines de la presente invención, una dosis terapéuticamente eficaz generalmente será una dosis diaria total administrada a un hospedero en dosis simples o divididas.

El compuesto de fórmula (I) se puede administrar a un hospedero en un intervalo de dosificación diario de, por ejemplo, de alrededor de 0.05 a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal del receptor, preferiblemente alrededor de 0.1-25 mg/kg de peso corporal del receptor, más preferiblemente de alrededor de 0.5 a 10 mg/kg de peso corporal del receptor. Para la administración a una persona de 70 kg, el intervalo de dosificación del compuesto de fórmula (I) sería alrededor de 35-700 mg diario, y preferiblemente alrededor de 40-100 mg diario.

Letrozol se puede administrar oralmente a un humano en un intervalo de dosificación que varía de 0.5 a 5 mg/día, preferiblemente de 0.5 a 4 mg/día, más preferiblemente de 1 a 2.5 mg/día. Ejemplos de composiciones que contienen letrozol son conocidos en la técnica, por ejemplo, Physicians' Desk Reference Copyright © 2001 (Medical Economics Company Inc).

Exemestano se puede administrar oralmente a un humano en un intervalo de dosificación que varía de 5 a 200 mg/día, preferiblemente de 10 a 25 mg/día, o parenteralmente de 50 a 500 mg/día más preferiblemente de 100 a 250 mg/día. Si el agente terapéutico se administra en una composición farmacéutica separada, se puede administrar en la forma descrita en GB 2,177,700.

Formestano se puede administrar parenteralmente a un humano en un intervalo de dosificación que varía de 100 a 500 mg/día, preferiblemente de 250 a 300 mg/día.

Otro beneficio es que se pueden utilizar menores dosis de los ingredientes activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que las dosificaciones no solo serán más pequeñas, sino que también se aplicarán con menos frecuencia, o se pueden usar para disminuir la incidencia de los efectos secundarios. Estos dependerán del criterio y las necesidades de los pacientes que se tratarán.

La combinación del compuesto de fórmula (I) y un inhibidor de aromataza que es exemestano o letrozol se pueden combinar en la misma preparación farmacéutica o en la forma de preparaciones combinadas "kits de partes" en el

sentido de que los compañeros de combinación se pueden dosificar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas, es decir, simultáneamente o en momentos diferentes. Las partes del kit de partes luego se pueden, por ejemplo, administrar simultáneamente o escalonar cronológicamente, esto es en diferentes momentos y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes.

5 La presente invención se refiere además a un kit que comprende un compuesto de fórmula (I), particularmente 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)- pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol, y un prospecto del paquete u otra etiqueta que incluye instrucciones para tratar un cáncer.

10 La presente divulgación se refiere además a un kit que comprende un compuesto de fórmula (I), que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)- pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un prospecto del paquete u otra etiqueta que incluye instrucciones para tratar un cáncer administrando conjuntamente un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende (a) Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y (b) letrozol para su uso en el tratamiento de cáncer, particularmente cáncer de mama.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende (a) Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y (b) exemestano para su uso en el tratamiento de cáncer, particularmente cáncer de mama.

20 • La presente invención también proporciona el Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable de estos en combinación con un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol para uso en el tratamiento de cáncer de mama positivo para el receptor de hormonas, especialmente en pacientes que han adquirido resistencia a terapia hormonal.

25 • También se describe un método para el tratamiento de cáncer de mama positivo para el receptor de hormonas que comprende administrar una cantidad de (a) el Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y (b) un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol, que es terapéuticamente eficaz de forma conjunta, a un animal de sangre caliente que lo necesita.

30 • La presente invención también proporciona una combinación sinérgica para administración humana que comprende (a) Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (b) un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol, en un intervalo de combinación p/p que corresponde a un intervalo de combinación sinérgica de 70:1 a 1:20 partes en peso de células de carcinoma de mama humano MCF7/Aro.

Los efectos beneficiosos de la combinación farmacéutica de la presente invención también se pueden determinar a través de otros modelos de prueba conocidos por los expertos en la técnica pertinente.

Ejemplo 1

35 El siguiente procedimiento experimental se realiza para demostrar la eficacia y actividad antiproliferativa del Compuesto A en combinación con exemestano en el tratamiento de cáncer de mama.

Preparación de soluciones de compuestos:

El Compuesto A de fármaco (10 mM, en la forma de su sal monoclóhidrato) y exemestano (Sigma, 10 mM) se disuelven en DMSO y se almacenan en alícuotas a -20 °C.

Cultivo celular:

40 Las células de carcinoma de mama humano MCF7/Aro se transfectan de forma estable con el vector de expresión de aromatasa que presenta gen con resistencia a neomicina (G418). Aromatasa convierte el androstenodiona precursor ($\Delta 4A$) en 17β -estradiol (E2), que se requiere para la proliferación de la línea celular del hospedero. Salvo que se mencione de otro modo, todos los reactivos de cultivo celular se obtienen de Invitrogen. Las células se mantienen en MEM (# 11095-080) complementado con 10 % v/v de suero bovino fetal (FBS, #10099-141), 1 mM de piruvato de sodio (#11360-070), 0.5 mg/ml G418 (#10131-035) y 1% v/v de aminoácidos no esenciales (#11140-050) en un incubador humidificado 37 °C en 5 % de CO₂. Las células se pasaron dos veces a la semana y se cambia el medio cada 2 a 3 días. Para evaluar la proliferación celular inducida por estrógeno o androstenodiona, se agota el medio de esteroides. El medio agotado en esteroides (SD), MEM (#51200-038, sin rojo de fenol y sin glutamina) se complementa con FBS tratado con carbón (#12676-029) y se usa Glutamax (#35050-061). TryPLE Express (12604-013, sin rojo de fenol) se usa para disociación celular durante tratamiento con SD.

Se retiraron los esteroides de las células MCF7/Aro durante 3 días antes de tratarse con tripsina usando TryPLE Express (#12604-013, sin rojo de fenol) y se siembran 1500 células/pocillo en placas negras de fondo transparente de 384 pocillos (Greiner, #781091) en triplicado con 30 μ L/pocillo de medio de cultivo, las células se dejaron unir durante

la noche y siguieron 72 horas de incubación con 10 nM de $\Delta 4A$ y varias concentraciones de agentes terapéuticos (o agentes terapéuticos (10 μ l/pocillo), y luego incubación con otra dosis igual de fármaco fresco o combinaciones de fármaco durante 48 horas más. Al final del tratamiento con fármaco, 30 μ l /pocillo del reactivo CellTiter-Glo se agregan a cada pocillo para lisar las células, y las señales de luminiscencia se registran usando un lector de placas Envision.

5 Cálculo del efecto de las combinaciones:

Para evaluar el efecto de la combinación de Compuesto A y exemestano en una forma sin sesgo y para identificar el efecto sinérgico en todas las concentraciones posibles, los estudios de combinación se dirigen con una "matriz de dosis", donde se analiza una combinación en diferentes permutaciones de Compuesto A y exemestano diluidos en serie. En todos los ensayos de combinación, los compuestos se aplican simultáneamente. Esta "matriz de dosis" se realiza de la siguiente manera: El Compuesto A se somete a una dilución en serie 3X de 6 dosis con la mayor dosis a 3 μ M y la dosis mínima a alrededor de 12.3 nM, y exemestano se somete a una dilución en serie 3X de 7 dosis con la mayor dosis a 10 μ M y dosis mínima a alrededor de 13.7 nM. La interacción sinérgica se analiza usando software Chalice (CombinatoRx, Cambridge MA). La sinergia se calcula comparando la respuesta de la combinación con la de sus agentes solos, contra el modelo de referencia de aditividad de dosis de fármaco consigo mismo. Se evalúan las desviaciones de las aditividades de las dosis numéricamente con un índice de combinación para cuantificar la fuerza general de los efectos de combinación: que es esencialmente un valor de volumen $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{datos} - I_{HSA})$. También, el Índice de Combinación se calcula además entre los datos y la superficie de agente único más elevada, normalizado para factores de dilución de agente simple f_x, f_y (Lehar et ál, Nature Biotechnology 27: 659-666 (2009).)

Análisis de datos:

20 Se llevó a cabo la evaluación de datos y la generación de gráficas utilizando el software Microsoft Excel, el software GraphPad Prism5 y el software Chalice.

Efecto del Compuesto A y exemestano sobre proliferación celular de MCF7/Aro inducida por $\Delta 4A$:

El Compuesto A y exemestano se evalúan como agentes simples y como combinación para determinar su efecto sobre la proliferación celular de MCF7/Aro inducida por $\Delta 4A$. Para un estudio de agente simple, las células MCF7/Aro se sembraron a 1500 células por pocillo en placas de 384 pocillos, y posteriormente se trataron con concentraciones crecientes de Compuesto A y exemestano durante 5 días, se midió la luminiscencia CellTiter-Glo y se calculó la cantidad de células viables relativas para cada tratamiento. El efecto de cada agente sobre la proliferación celular de MCF7/Aro inducida por $\Delta 4A$ se evalúa comparando el porcentaje de células viables para poblaciones celulares tratadas y células de control tratadas con DMSO. La reducción dependiente de la dosis en la proliferación celular se mide en comparación con células de control tratadas con DMSO.

Para investigar la actividad de una combinación del Compuesto A y exemestano sobre la proliferación celular e las células MCF7/Aro que expresan aromatasa, se realiza un ensayo de proliferación con células MCF7/Aro estimuladas con 10 nM $\Delta 4A$. Para evaluar el efecto de la combinación en una forma sin sesgo y para identificar el efecto sinérgico en todas las concentraciones posibles, el estudio se dirige con una "matriz de dosis", donde se analiza una combinación en diferentes permutaciones de Compuesto A y exemestano diluidos en serie. La "matriz" usada en este estudio es de la siguiente manera: Las células MCF7/Aro se tratan en un formato de 384 pocillos durante 5 días con Compuesto A y/o exemestano en presencia de $\Delta 4A$. El Compuesto A se somete a una dilución en serie 3X de 6 dosis con la mayor dosis a 3 μ M y la dosis mínima a alrededor de 12.3 nM, y exemestano se somete a una dilución en serie 3X de 7 dosis con la mayor dosis a 10 μ M y dosis mínima a alrededor de 13.7 nM. La viabilidad celular se mide usando el ensayo CellTiter-Glo y el porcentaje de inhibición se evalúa en toda la rejilla de dosis. El efecto de la combinación sobre la proliferación celular desencadenado por $\Delta 4A$ se demuestra en comparación con cada agente simple a través del intervalo de concentración analizado para ambos compuestos.

La interacción sinérgica también se evalúa de forma numérica con un Índice de Combinación que cuantifica la fuerza general de los efectos de combinación sobre la superficie total. Dicho modelo compara la respuesta de la combinación con la de sus agentes simples, contra el modelo de referencia de aditividad de dosis de fármaco consigo mismo, y cualquier valor positivo indicaría mejor que aditividad de dosis o sinergia. El efecto general de la interacción sinérgica será representado por Valor de Sinergia.

Resultados

Luego de este procedimiento experimental, el Compuesto A y exemestano como agente simple muestran una actividad antiproliferativa dependiente de la concentración sobre proliferación celular desencadenada por $\Delta 4A$, con el máximo nivel de inhibición en 33% para exemestano y 61% para Compuesto A. Cuando el Compuesto A y exemestano se usan en combinación, la inhibición de la proliferación celular aumenta en comparación con cada agente simple a través de un amplio intervalo de concentraciones para ambos compuestos. El nivel máximo de inhibición aumenta hasta aproximadamente 75% sobre una gran área de intervalos de dosis para ambos compuestos (0.12 μ M-10 μ M para exemestano y 0.11 μ M -3 μ M para Compuesto A).

Para la combinación del Compuesto A y exemestano, la interacción sinérgica también se evalúa de forma numérica con un Índice de Combinación que cuantifica la fuerza general de los efectos de combinación sobre la superficie total.

Dicho modelo compara la respuesta de combinación con sus agentes simples, contra el fármaco consigo mismo del modelo de referencia de aditividad de dosis, y cualquier valor positivo indica mejor que aditividad de dosis o sinergia. El Índice de Combinación o Valor de Sinergia se calcula a partir de este estudio como 2.1, que indica firmemente que la interacción entre el Compuesto A y exemestano es sinérgica. La Figura 1 muestra la matriz de dosis y el isoblograma para este estudio de combinación de Compuesto A y exemestano.

Ejemplo 2

El siguiente procedimiento experimental se realiza para demostrar la eficacia y actividad antiproliferativa del Compuesto A en combinación con letrozol en el tratamiento de cáncer de mama.

Preparación de soluciones de compuestos:

- 10 El Compuesto A de fármaco (10 mM, en la forma de su sal monoclóhidrato) y letrozol (Sigma, 5 mM) se disuelven en etanol y se almacenan en alícuotas a -20°C.

Cultivo celular:

- 15 Las células de carcinoma de mama humano MCF7/Aro se transfectan de forma estable con el vector de expresión de aromatasa que presenta gen con resistencia a neomicina (G418). Aromatasa convierte el androstenediona precursor ($\Delta 4A$) en 17β -estradiol (E2), que se requiere para la proliferación de la línea celular de hospedero. Salvo que se mencione de otro modo, todos los reactivos de cultivo celular se obtienen de Invitrogen. Las células se mantienen en MEM (# 11095-080) complementado con 10 % v/v de suero bovino fetal (FBS, #10099-141), 1 mM de piruvato de sodio (#11360-070), 0.5 mg/ml G418 (#10131-035) y 1% v/v de aminoácidos no esenciales (#11140-050) en un incubador humidificado 37 °C en 5 % de CO₂. Las células se pasaron dos veces a la semana y se cambia el medio cada 2 a 3 días. Para evaluar la proliferación celular inducida por estrógeno o androstenediona, se agota el medio de esteroides. El medio agotado en esteroides (SD), MEM (#51200-038, sin rojo de fenol y sin glutamina) se complementa con FBS tratado con carbón (#12676-029) y se usa Glutamax (#35050-061). TryPLE Express (12604-013, sin rojo de fenol) se usa para disociación celular durante tratamiento con SD.

- 25 Se retiraron los esteroides de las células MCF7/Aro durante 3 días antes de tratarse con tripsina usando TryPLE Express (#12604-013, sin rojo de fenol) y se sembraron 1500 células/pocillo en placas negras de fondo transparente de 384 pocillos (Greiner, #781091) en triplicado con 30 μ L/pocillo de medio de cultivo), las células se dejaron unir durante la noche y siguieron 72 horas de incubación con 10 nM de $\Delta 4A$ y varias concentraciones de fármacos o combinaciones (10 μ L/pocillo), y luego incubación con otra dosis igual de fármaco fresco o combinaciones de fármaco durante 48 horas más. Al final del tratamiento con fármaco, 100 μ L/pocillo del reactivo CellTiter-Glo se agregan a cada pocillo para lisar las células, y las señales de luminiscencia se registran usando un lector de placas Envision.

Cálculo del efecto de las combinaciones:

- 35 Para evaluar el efecto de la combinación de Compuesto A y letrozol en una forma sin sesgo y para identificar el efecto sinérgico en todas las concentraciones posibles, los estudios de combinación se dirigen con una "matriz de dosis", donde se analiza una combinación en diferentes permutaciones de Compuesto A y letrozol diluidos en serie. En todos los ensayos de combinación, los compuestos se aplican simultáneamente. Esta "matriz de dosis" se realiza de la siguiente manera: El Compuesto A se somete a una dilución en serie 3X de 6 dosis con la mayor dosis a 3 μ M y la dosis mínima a alrededor de 12.3 nM, y letrozol se somete a una dilución en serie 3X de 7 dosis con la mayor dosis a 10 μ M y dosis mínima a alrededor de 13.7 nM. La interacción sinérgica se analiza usando software Chalice (CombinatoRx, Cambridge MA). La sinergia se calcula comparando la respuesta de la combinación con la de sus agentes simples, contra el modelo de referencia de aditividad de dosis del fármaco consigo mismo. Se evalúan las desviaciones de las aditividades de dosis numéricamente con un índice de combinación para cuantificar la fuerza general de los efectos de combinación: que es esencialmente un valor de volumen $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{datos} - I_{HSA})$. También, el Índice de Combinación se calcula además entre los datos y la superficie de agente único más elevada, normalizado para factores de dilución de agente simple $f_{x,y}$ (Lehar et ál, Nature Biotechnology 27: 659-666 (2009)).

- 45 Análisis de datos:

Se llevó a cabo la evaluación de datos y la generación de gráficas utilizando el software Microsoft Excel, el software GraphPad Prism5 y el software Chalice.

Efecto del Compuesto A y letrozol sobre proliferación celular de MCF7/Aro inducida por $\Delta 4A$:

- 50 El Compuesto A y letrozol se evalúan como agentes simples y como combinación para determinar su efecto sobre la proliferación celular de MCF7/Aro inducida por $\Delta 4A$. Para un estudio de agente simple, las células MCF7/Aro se sembraron a 1500 células por pocillo en placas de 384 pocillos, y posteriormente se trataron con concentraciones crecientes de Compuesto A y letrozol durante 5 días, se midió la luminiscencia CellTiter-Glo y se calculó la cantidad de células viables relativas para cada tratamiento. El efecto de cada agente sobre la proliferación celular de MCF7/Aro inducida por $\Delta 4A$ se evalúa comparando el porcentaje de células viables para poblaciones celulares tratadas y células de control tratadas con DMSO. La reducción dependiente de la dosis en la proliferación celular se mide en comparación

con células de control tratadas con DMSO.

5 Para investigar la actividad de una combinación del Compuesto A y letrozol sobre la proliferación celular e las células MCF7/Aro que expresan aromatasa, se realiza un ensayo de proliferación con células MCF7/Aro estimuladas con 10 nM Δ 4A. Para evaluar el efecto de la combinación en una forma sin sesgo y para identificar el efecto sinérgico en todas las concentraciones posibles, el estudio se dirige con una "matriz de dosis", donde se analiza una combinación en diferentes permutaciones de Compuesto A y letrozol diluidos en serie. La "matriz" usada en este estudio es de la siguiente manera: Las células MCF7/Aro se tratan en un formato de 384 pocillos durante 5 días con Compuesto A y/o letrozol en presencia de Δ 4A. El Compuesto A se somete a una dilución en serie 3X de 6 dosis con la mayor dosis a 3 μ M y la dosis mínima a alrededor de 12.3 nM, y letrozol se somete a una dilución en serie 3X de 7 dosis con la mayor dosis a 10 μ M y dosis mínima a alrededor de 13.7 nM. La viabilidad celular se mide usando el ensayo CellTiter-Glo y el porcentaje de inhibición se evalúa en toda la rejilla de dosis. El efecto de la combinación sobre la proliferación celular desencadenado por Δ 4A se demuestra en comparación con cada agente simple a través del intervalo de concentración analizado para ambos compuestos.

15 La interacción sinérgica también se evalúa de forma numérica con un Índice de Combinación que cuantifica la fuerza general de los efectos de combinación sobre la superficie total. Dicho modelo compara la respuesta de la combinación con la de sus agentes simples, contra el modelo de referencia de aditividad de dosis de fármaco consigo mismo, y cualquier valor positivo indicaría mejor que aditividad de la dosis o sinergia. El efecto general de la interacción sinérgica será representado por Valor de Sinergia.

Resultados

20 Luego de este procedimiento experimental, el Compuesto A y letrozol como agente simple muestran una actividad antiproliferativa dependiente de la concentración sobre proliferación celular desencadenada por Δ 4A, con el máximo nivel de inhibición en 53% para letrozol y 61% para Compuesto A. Cuando el Compuesto A y letrozol se usan en combinación, la inhibición de la proliferación celular aumenta en comparación con cada agente simple a través de un amplio intervalo de concentraciones para ambos compuestos. El nivel máximo de inhibición aumenta hasta aproximadamente 85% sobre una gran área de intervalos de dosis para ambos compuestos (0.18 μ M-5 μ M para letrozol y 0.11 μ M-3 μ M para Compuesto A).

30 Para la combinación del Compuesto A y letrozol, la interacción sinérgica también se evalúa de forma numérica con un Índice de Combinación que cuantifica la fuerza general de los efectos de combinación sobre la superficie total. Dicho modelo compara una respuesta de combinación a los de sus agentes simples, en comparación con el modelo de referencia de aumento de dosis de fármaco solo, y cualquier valor positivo indica mejor que el aumento de dosis o sinergia. El Índice de Combinación o Valor de Sinergia se calcula a partir de este estudio como 4.6, que indica firmemente que la interacción entre el Compuesto A y letrozol es altamente sinérgica. La Figura 2 muestra la matriz de dosis y el isoblograma para este estudio de combinación de Compuesto A y letrozol.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende:
 - (a) un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico
 - 5 o una sal farmacéuticamente aceptable de este; y
 - (b) un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol.
2. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de aromatasa es exemestano.
3. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de aromatasa es letrozol.
- 10 4. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de un cáncer.
5. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento del cáncer, en donde el método de administración del compuesto de fórmula (I) y el inhibidor de aromatasa es simultáneo, separado o secuencial.
- 15 6. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el cáncer es cáncer de mama.
7. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el cáncer es un cáncer de mama que tiene receptor de hormona positivo, una mutación en PIK3CA o una combinación de los mismos.
- 20 8. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el cáncer es cáncer de mama positivo (+) al receptor de estrógeno.
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromatasa que es exemestano o letrozol para uso en el tratamiento del cáncer de mama.
- 25 10. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el inhibidor de aromatasa es exemestano.
11. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el inhibidor de aromatasa es letrozol.
- 30 12. Una combinación sinérgica para administración humana que comprende (a) un compuesto de fórmula (I) que es 2-amida 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un inhibidor de aromatasa que es letrozol o exemestano, en un intervalo de combinación p/p que corresponde a un intervalo de combinación sinérgica de 70:1 a 1:20 partes en peso de células de carcinoma de mama humano MCF7/Aro.
- 35 13. Una combinación sinérgica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el inhibidor de aromatasa es exemestano.
14. Una combinación sinérgica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el inhibidor de aromatasa es letrozol.
15. Una combinación sinérgica de acuerdo con la reivindicación 12, la reivindicación 13 o la reivindicación 14, para uso en el tratamiento del cáncer de mama.

Figura 1

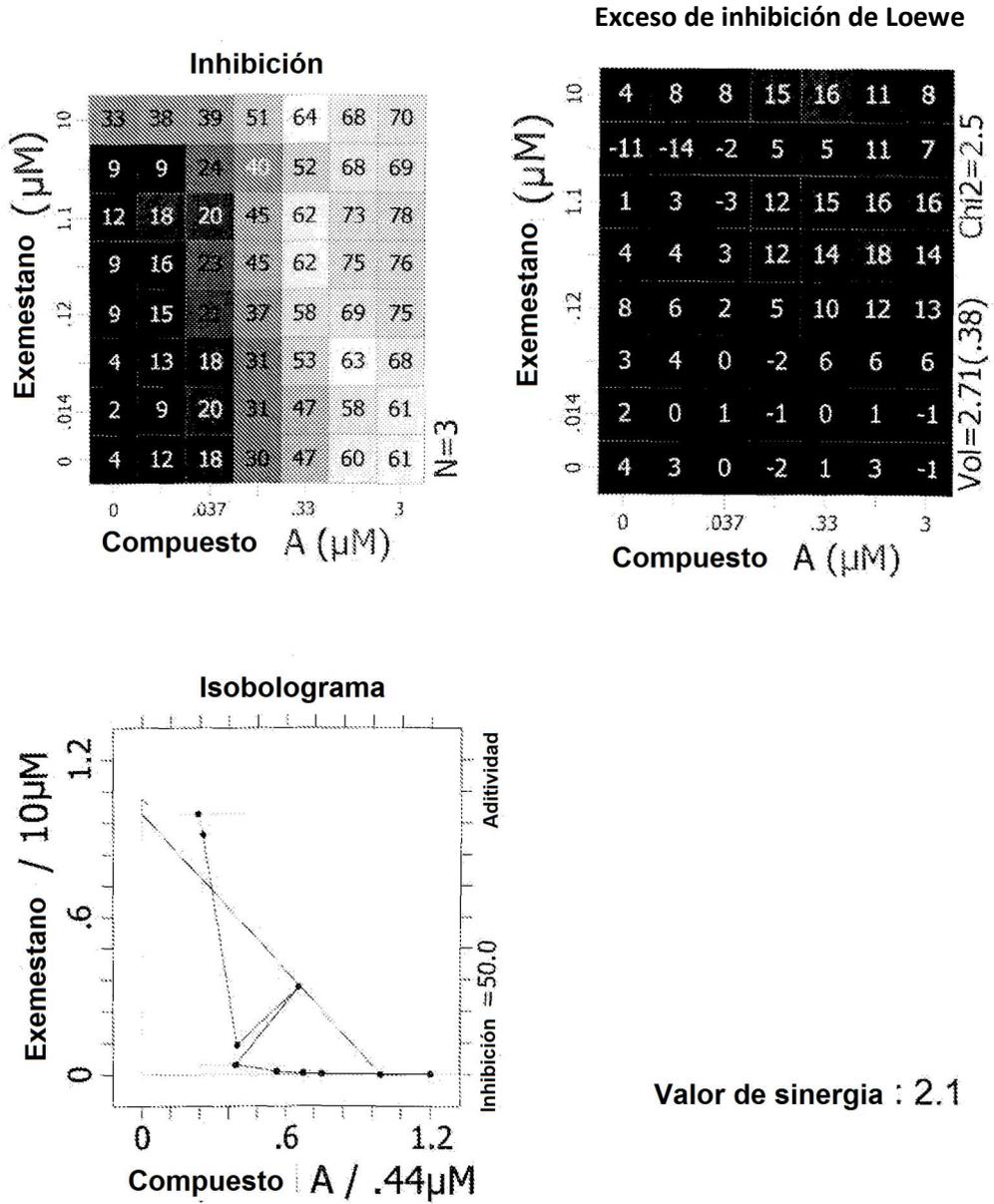


Figura 2

