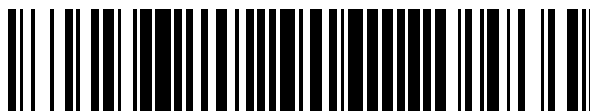


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 177**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2011** **PCT/US2011/032062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011** **WO11130232**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2011** **E 11715370 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 2558092**

54 Título: **Combinación que comprende un inhibidor de cinasa 4 dependiente de ciclina o cinasa dependiente de ciclina (CDK4/6) y un inhibidor de mTOR para tratar cáncer**

30 Prioridad:

13.04.2010 US 323541 P

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

08.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BORLAND, MARIA;
BRAIN, CHRISTOPHER THOMAS;
DOSHI, SHIVANG;
KIM, SUNKYU;
MA, JIANGUO;
MURTIE, JOSH y
ZHANG, HONG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 689 177 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 que comprende un inhibidor de cinasa 4 dependiente de ciclina o cinasa dependiente de ciclina (CDK4/6) y un inhibidor de mTOR para tratar cáncer.

Campo de la invención

- 5 Una combinación de un inhibidor del objetivo mamífero de rapamicina (mTOR) y un inhibidor de cinasa 4/6 dependiente de ciclina (CDK4/6) para el tratamiento de tumores sólidos y malignidades hematológicas. Esta invención también se refiere al uso de la combinación de los mismos, en el manejo de enfermedades hiperproliferativas como el cáncer.

Antecedentes de la invención

- 10 El desarrollo de tumor está cercanamente asociado con la alteración genética y desregulación de las CDKs y sus reguladores, lo que sugiere que los inhibidores de las CDKs podrían ser agentes terapéuticos anti-cáncer útiles. En efecto, los resultados iniciales sugieren que las células transformadas y normales difieren en sus requerimientos para, por ejemplo, ciclina D/CDK4/6 y que puede ser posible desarrollar agentes anti-neoplásicos novedosos carentes de la toxicidad general al hospedero observada con los fármacos citotóxicos y citostáticos convencionales.

- 15 La función de las CDKs es fosforilar y por lo tanto activar o desactivar ciertas proteínas, incluyendo por ejemplo proteínas de retinoblastoma, laminas, histona H1 y componentes del husillo mitótico. El paso catalítico mediado por las CDKs implica una reacción de fosfo-transferencia desde el ATP hacia el sustrato de la enzima macromolecular. Se ha encontrado que varios grupos de compuestos (revisados, por ejemplo, en Fischer, P. M. Curr. Opin. Drug Discovery Dev. 2001, 4, 623-634) poseen propiedades anti-proliferativas en virtud del antagonismo de ATP
20 específico de CDK.

A un nivel molecular, la mediación de la actividad del complejo CDK/ciclina requiere una serie de eventos de fosforilación estimuladora o inhibidora o desfosforilación. La fosforilación de CDK se realiza por un grupo de cinasas activadoras de CDK (CAKs) y/o cinasas, tales como wee1, Myt1 y Mik1. La desfosforilación se realiza por fosfatasas tales como cdc25(a y c), pp2a o KAP.

- 25 La actividad del complejo CDK/ciclina también puede regularse por dos familias de inhibidores proteínicos celulares endógenos: la familia Kip/Cip o la familia INK. Las proteínas INK se unen específicamente a CDK4 y CDK6. p16^{ink4} (también conocida como MTS1) es un gen supresor de tumor potencial que está mutado o suprimido, en un gran número de cánceres primarios. La familia Kip/Cip contiene proteínas, tales como p21^{Cip1,Waf1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, en las cuales p21 está inducida por p53 y es capaz de inactivar al complejo CDK2/ciclina(E/A). Se han observado
30 niveles atípicamente bajos de expresión de p27 en cánceres de mama, colon y próstata. Por el contrario, se ha demostrado que la sobre-expresión de ciclina E en tumores sólidos se correlaciona con prognosis pobre del paciente. La sobreexpresión de ciclina D1 se ha asociado con carcinomas de esófago, de mama, de pulmón de célula escamosa y de pulmón de célula no pequeña.

- 35 Los papeles fundamentales de las CDKs y sus proteínas asociadas, en la coordinación y control del ciclo celular en células proliferantes se han señalado anteriormente. Algunas de las rutas bioquímicas en las cuales las CDKs juegan un papel clave también han sido descritas. Por lo tanto, el desarrollo de monoterapias para el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cánceres, utilizando agentes terapéuticos genéricamente dirigidos a las CDKs o a CDKs específicas, es potencialmente altamente deseable. Por lo tanto, existe una necesidad continua de encontrar nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades humanas.

- 40 mTOR es una proteína cinasa encontrada predominantemente en el citoplasma de la célula. Esta actúa como un regulador central de muchos procesos biológicos relacionados con la proliferación celular, angiogénesis y metabolismo celular. mTOR ejerce sus efectos principalmente encendiendo y apagando la maquinaria de traducción de la célula, la cual incluye los ribosomas y es responsable de la síntesis de proteínas. mTOR es un punto intracelular clave de convergencia para un número de rutas de señalización celular. mTOR realiza su función
45 reguladora en respuesta a señales activadoras o inhibitoras transmitidas a través de estas rutas, las cuales están localizadas corriente arriba de mTOR en la célula. Estas diversas rutas de señalización se activan por una variedad de factores de crecimiento (incluyendo los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1)), hormonas (estrógeno, progesterona), y la presencia o ausencia de nutrientes (glucosa, aminoácidos) u oxígeno. Una
50 o más de estas rutas de señalización podrían estar anormalmente activadas en pacientes con muchos tipos diferentes de cáncer, lo que resulta en proliferación celular desregulada, angiogénesis de tumor y metabolismo celular anormal.

El documento US 2005/222163 divulga un método para tratar el crecimiento celular anormal, en particular cáncer, usando una combinación de un CDK / inhibidor y un inhibidor de mTOR. Liu Q. et al., Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 2009, vol. 6, n.º 2, 47-55 es un artículo de revisión que se centra en el desarrollo de inhibidores competitivos de ATP de molécula pequeña de mTOR y sus posibles usos terapéuticos. Goy A, Current Oncology Reports 2007, vol. 9, no. 5, 391-398 discute la evolución de los enfoques para el tratamiento del linfoma de células del manto. Estos incluyen inhibidores de mTOR y Bcl-2, nuevos anticuerpos y nuevos agentes citotóxicos.

Breve resumen de la invención

La invención provee una combinación que comprende un primer agente que inhibe la ruta de CDK4/6 y un segundo agente que inhibe mTOR, es decir la actividad de cinasa de mTOR y sus efectores corriente abajo como se describe en las reivindicaciones. La invención proporciona una combinación que comprende un primer agente que es una cinasa 4 dependiente de ciclina o un inhibidor de cinasa 6 dependiente de ciclina (CDK4/6), y un segundo agente que es un inhibidor de mTOR, en el cual el primer agente es dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable y el segundo agente es everolimus. La invención también proporciona esta combinación para uso en el tratamiento de cáncer y esta combinación para uso en el tratamiento del cáncer como se describe en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención proporciona combinaciones que incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente que inhibe CDK4/6, un segundo agente que inhibe la actividad de cinasa de mTOR y los efectores corriente abajo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el cual el primer agente es dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable y el segundo agente es everolimus.

Asimismo, la presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación que comprende un primer agente que inhibe la ruta de CDK4/6 y un segundo agente que inhibe la actividad de cinasa de mTOR y los efectores corriente abajo, o una sal farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica de los mismos, en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, en el cual el primer agente es dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable y el segundo agente es everolimus.

La presente invención tiene un uso terapéutico en el tratamiento de cáncer, particularmente cánceres positivos a la proteína de retinoblastoma (proteína supresora de tumor retinoblastoma o pRb). Los tipos de tales cánceres incluyen linfoma de célula del manto, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de colon, cáncer del esófago y liposarcoma.

Las combinaciones y composiciones anteriores pueden administrarse a un sistema que comprende células o tejidos, así como a un paciente humano o un individuo animal.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra inhibiciones de crecimiento incrementadas por combinaciones de inhibidores de CDK4/6 y de mTOR. Se utilizan células de linfoma de célula de manto Jeko-1 para evaluar los efectos sobre el crecimiento celular. Se muestra el % de crecimiento en comparación con el control (100%). El compuesto A1 es un inhibidor de CDK4/6 y el Compuesto B1 es un inhibidor de mTOR. Las combinaciones de A1+B1 son inhibiciones de crecimiento observadas cuando las células Jeko-1 se tratan conjuntamente con los compuestos A1 y B1 al mismo tiempo. Las concentraciones reales utilizadas se muestran en las gráficas.

La Figura 2 es un análisis de isoblograma de una combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR en una línea de célula de linfoma de célula de manto Jeko-1. Los compuestos A1 y B1 son inhibidores de CDK4/6 y mTOR, respectivamente. La gráfica mostrada se construyó utilizando las concentraciones que producen 50% de inhibiciones de crecimiento. La línea punteada 1 representa las inhibiciones de crecimiento predichas para una aditividad sencilla cuando se combinan los efectos de A1 y B1. La línea 2 es las inhibiciones de crecimiento observadas, que indica que la combinación de A1/B1 da como resultado inhibición de crecimiento sinérgica fuerte.

La Figura 3 es un análisis de isoblograma de una combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR en una línea de células de cáncer de mama MDA-MB453. Los compuestos A1 y B1 son inhibidores de CDK4/6 y de mTOR, respectivamente. Similar a la Figura 2 anterior, la gráfica mostrada se construyó utilizando las concentraciones que producen 50% de inhibiciones de crecimiento, en la que la línea punteada 1 representa las inhibiciones de crecimiento predichas para una aditividad sencilla. La línea 2 es las inhibiciones de crecimiento observadas, que indica que la combinación de A1/B1 da como resultado inhibición de crecimiento sinérgica fuerte.

La Figura 4 muestra que una combinación del compuesto A1 con el compuesto B1 incrementa el retraso del crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de linfoma de célula de manto Jeko-1. La dosificación se detiene

35 días después del inicio del tratamiento (56 días después de la implantación) y se deja que los tumores vuelvan a crecer. El grupo de dosis de combinación tiene retraso de crecimiento de tumor incrementado significativamente (20 días).

- 5 Las Figuras 5 es una una combinación de compuesto A1 con el compuesto B1 que incrementa el retraso del crecimiento del tumor e inhibición del crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de carcinoma pancreático PANC-1, para volumen de tumor (Figura 5A) y porcentaje vivo (Figura 5B). La dosificación se detiene 22 días después del inicio del tratamiento y se deja que los tumores vuelvan a crecer. El grupo de dosis de combinación tiene retraso crecimiento del tumor significativamente incrementado (18 días).
- 10 La Figura 6 ilustra, cuando la combinación de Compuesto A1 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B1 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 15 La Figura 7 ilustra, cuando la combinación de compuesto A1 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B2 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 20 La Figura 8 ilustra, cuando la combinación del compuesto A4 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B1 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- La Figura 9 ilustra, cuando la combinación de compuesto A2 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B1 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 25 La Figura 10 ilustra, cuando la combinación de compuesto A3 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B1 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 30 La Figura 11 ilustra, cuando la combinación de compuesto A6 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B1 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 35 La Figura 12 ilustra, cuando la combinación de compuesto A5 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B1 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 40 La Figura 13 ilustra, cuando la combinación del compuesto A4 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B2 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- La Figura 14 ilustra, cuando la combinación de compuesto A2 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B2 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 45 La Figura 15 ilustra, cuando la combinación de compuesto A3 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B2 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.
- 50 La Figura 16 ilustra, cuando la combinación de compuesto A6 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B2 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.

La Figura 17 ilustra, cuando la combinación de compuesto A5 inhibidor de CDK4/6 y compuesto B2 inhibidor de mTOR, se utiliza para tratar células Jeko-1, los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas.

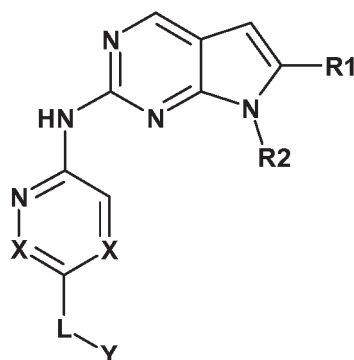
5 Descripción detallada de la invención

El progreso del ciclo celular de mamífero es un proceso estrictamente controlado en el cual las transiciones a través de las diferentes fases se conducen en una manera altamente ordenada y guardada por múltiples puntos de inspección. La proteína de retinoblastoma (pRb) es la proteína de punto de inspección para la transición de fase de G1 a S, la cual se asocia con una familia de factores de transcripción E2F para evitar su actividad en ausencia de estímulos de crecimiento apropiados. Después de estimulación con mitógeno, las células inactivas comienzan su entrada a la fase S sintetizando nuevamente D-ciclinas, las cuales son los activadores de las cinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4/6). Una vez ligada por las ciclinas, CDK4/6 desactiva la proteína pRb a través de fosforilación y esto libera E2F para dirigir la transcripción de los genes requeridos para la fase S. La desactivación total de pRb requiere fosforilaciones por parte tanto de ciclina D-CDK4/6 como de ciclina E-CDK2, en las cuales se ha demostrado que las fosforilaciones por CDK4/6 en sitios específicos de pRb (Ser780, Ser795) son un pre-requisito para la fosforilación de ciclina E-CDK2. Además de las D-ciclinas, la actividad de CDK4/6 es regulada por p16, codificada por el gen INK4a, la cual inhibe la actividad de cinasa. Las proteínas CIP/KIP, las cuales son los inhibidores de ciclina E-CDK2, también se unen al complejo ciclina D-CDK4/6, y esto da como resultado activación adicional de CDK2 mediante secuestro de CIP/KIP lejos de su objetivo. Por lo tanto, el complejo ciclina D-CDK4/6 es un complejo de enzima clave que regula la transición de fase de G1 a S.

La ruta D-ciclina-CDK4/6-INK4a-pRb está universalmente alterada para favorecer la proliferación celular en cáncer. En la mayoría de los casos (~80%), los cánceres mantienen una pRb funcional y utilizan diferentes mecanismos para incrementar la actividad de cinasa CDK4/6. Uno de los eventos más comunes es la inactivación de p16 a través de mutaciones, deleciones y silenciamiento epigenético. En efecto, la ausencia funcional de p16 se observa frecuentemente en porciones grandes de cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer pancreático y mesotelioma. Acoplado con la observación de que se ha demostrado que una mutación específica del gen de CDK4 (CDKR24C), que confiere resistencia a la unión a p16, juega un papel causal en un melanoma familiar, la ventaja de crecimiento provista por la actividad de CDK 4/6 no inspeccionada parece ser uno de los elementos clave asociados con el desarrollo de un tumor.

Otro mecanismo para incrementar la actividad de cinasa es incrementar la abundancia de D-ciclinas y esto se logra mediante translocación, amplificación y sobreexpresión del gen. El gen de ciclina D1 está translocalizado hacia la cadena pesada de inmunoglobulina en una mayoría de linfoma de células de manto y esta aberración conduce a la expresión constitutiva del gen lo que da como resultado una proliferación celular no inspeccionada. La translocación también se observa en muchos casos de mieloma múltiple. El ejemplo de la amplificación del gen se observa en cáncer del esófago de célula escamosa, en el cual se ha reportado que aproximadamente 50% de los casos alojan amplificaciones de ciclina D1. Esto sugiere que una porción grande del cáncer de esófago puede ser altamente dependiente de las cinasas activadas para su crecimiento. La amplificación de ciclina D1 con frecuencia también se detecta en cánceres de mama. Además de los defectos genéticos dirigidos relacionados con el gen de ciclina D1, su transcripción también puede elevarse profundamente mediante oncogenes activados que son reguladores corriente arriba del gen. Los oncogenes Ras o Neu activados han demostrado promover el cáncer de mama en ratones principalmente regulando en forma positiva a ciclina D1. La supresión de los niveles de ciclina D1 o la inhibición de la actividad de cinasa fueron capaces de evitar el crecimiento de tumor tanto en las fases de iniciación como de mantenimiento, demostrando que una CDK 4/6 no inspeccionada es el elemento clave en el desarrollo de los cánceres. Otras aberraciones activadoras de rutas de mitógeno tales como V600E B-Raf en MAPK y supresiones de PTEN en PI3K también incrementan las D-ciclinas para lograr proliferaciones aceleradas, lo que sugiere que CDK4/6 también puede ser crucial para los cánceres que portan la. Por último, los genes que codifican para CDK4 y 6 también están amplificados en subconjunto de neoplasmas de humano. El gen de CDK4 está amplificado en el 100% de liposarcomas junto con el gen de MDM2, mientras que CDK6 frecuentemente está amplificada en T-LBL/ALL. Tomado junto, CDK4/6 parece ser una proteína crucial necesaria para la proliferación de numerosos cánceres humanos con una pRb funcional, incluyendo linfoma de célula de manto, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de colon, cáncer de esófago y liposarcoma.

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende un primer agente que es un inhibidor de cinasa 4/6 dependiente de ciclina (CDK4/6) y un segundo agente que es un inhibidor de mTOR, en la cual el primer agente es un compuesto de Fórmula I



I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la cual

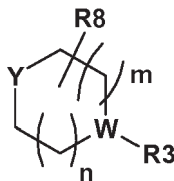
X es CR⁹ o N;

R¹ es alquilo C₁₋₈, CN, C(O)OR⁴ o CONR⁵R⁶, un grupo heteroarilo de 5-14 miembros o un grupo cicloheteroalquilo de 3-14 miembros;

R² es alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₁₄ o un grupo heteroarilo de 5-14 miembros, y en el cual R² puede estar sustituido con uno o más alquilo C₁₋₈ u OH;

L es un enlace, alquilenos C₁₋₈, C(O) o C(O)NR¹⁰, y en el cual L puede estar sustituido o no sustituido;

Y es H, R¹¹, NR¹²R¹³, OH o Y es parte del siguiente grupo



en el cual Y es CR⁹ o N;

en el cual pueden estar presentes 0-3 R⁸, y R⁸ es alquilo C₁₋₈, oxo, halógeno, o dos o más R⁸ pueden formar un grupo alquilo con estructura en puente;

W es CR⁹ o N;

R³ es H, alquilo C₁₋₈, alquil (C₁₋₈)R¹⁴, cicloalquilo C₃₋₁₄, C(O)-alquilo C₁₋₈, halogenoalquilo C₁₋₈, alquil (C₁₋₈)OH, C(O)NR¹⁴R¹⁵, cianoalquilo C₁₋₈, C(O)R¹⁴, alquil (C₀₋₈)-C(O)-alquil (C₀₋₈)-NR¹⁴R¹⁵, alquil (C₀₋₈)-C(O)OR¹⁴, NR¹⁴R¹⁵, SO₂-alquilo C₁₋₈, alquil (C₁₋₈)-cicloalquilo C₃₋₁₄, C(O)-alquil (C₁₋₈)-cicloalquilo C₃₋₁₄, alcoxi C₁₋₈ u OH los cuales pueden estar sustituidos o no sustituidos cuando R³ no es H.

R⁹ es H o halógeno;

R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan cada uno de manera independiente a partir de H, alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₁₄, un grupo cicloheteroalquilo de 3-14 miembros, un grupo arilo C₆₋₁₄, un grupo heteroarilo de 5-14 miembros, alcoxi, C(O)H, C(N)OH, C(N)OCH₃, C(O)-alquilo C₁₋₃, alquil (C₁₋₈)-NH₂, alquil (C₁₋₆)-OH, y en los cuales R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ cuando no son H pueden estar sustituidos o no sustituidos;

m y n son de manera independiente 0-2; y

en los cuales L, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ pueden estar sustituidos con uno o más de alquilo C₁₋₈, alquilenos C₂₋₈, alquilenos C₂₋₈, cicloalquilo C₃₋₁₄, grupo heteroarilo de 5-14 miembros, grupo arilo C₆₋₁₄, un grupo cicloheteroalquilo de 3-14 miembros, OH, (O), CN, alcoxi, halógeno o NH₂.

En una modalidad de la primera modalidad general, la combinación incluye un inhibidor de CDK4/6 de Fórmula I, en la cual R³ es H, alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₁₄, C(O)-alquilo C₁₋₈, alquil C₁₋₈OH, cianoalquilo C₁₋₈, alquil C₀₋₈-C(O)-alquil C₀₋₈-NR¹⁴R¹⁵, alquil C₀₋₈-C(O)OR¹⁴, NR¹⁴R¹⁵, alquil C₁₋₈-cicloalquilo C₃₋₁₄, C(O)-alquil C₁₋₈-cicloalquilo C₃₋₁₄, alcoxi de C₀₋₈, alquil C₁₋₈R¹⁴, halogenoalquilo C₁₋₈ o C(O)R¹⁴, los cuales pueden estar sustituidos con uno o más de OH, CN, F o NH₂ y en los cuales R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan cada uno de manera independiente a partir de H, alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₁₄, alcoxi, C(O)-alquilo C₁₋₃, alquil C₁₋₈NH₂ o alquil C₁₋₆OH.

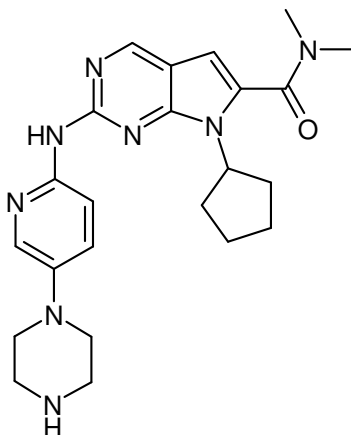
El compuesto de Fórmula I presente en la combinación de la presente invención es

Dimetilamida del ácido 7-cilopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

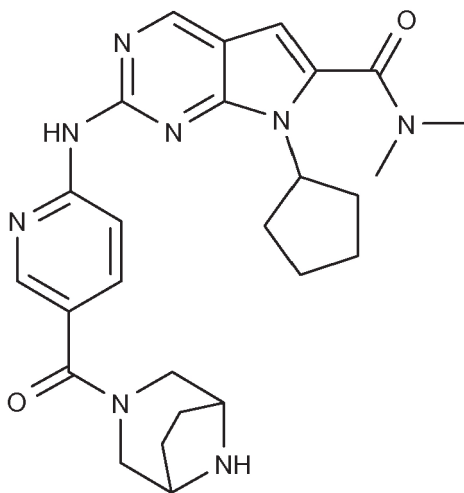
Los compuestos de Fórmula (I) se describen general y específicamente en la solicitud de patente PCT publicada WO2010/020675.

Los ejemplos específicos de inhibidores de cinasa dependientes de ciclina 4/6 (CDK4/6) incluyen, pero no se limitan a:

- 5 Compuesto A1: Dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, el cual tiene la siguiente estructura química

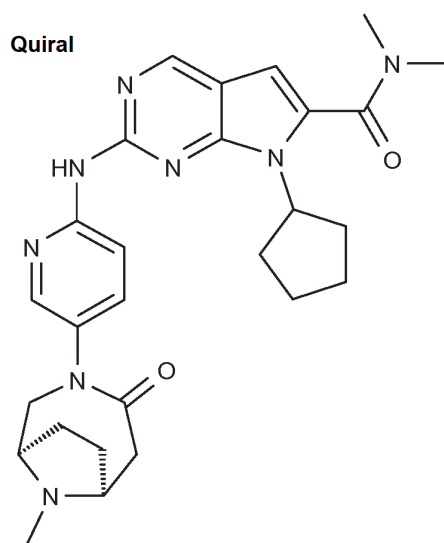


Compuesto A2: Dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-[5-(3,8-diaza-biciclo[3,2,1]octan-3-carbonil)-piridin-2-ilamino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, el cual tiene la siguiente estructura química:

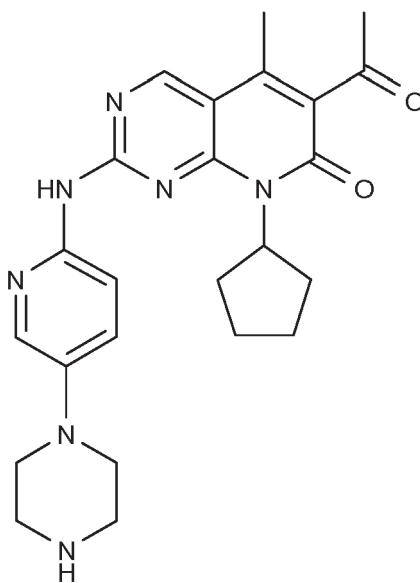


10

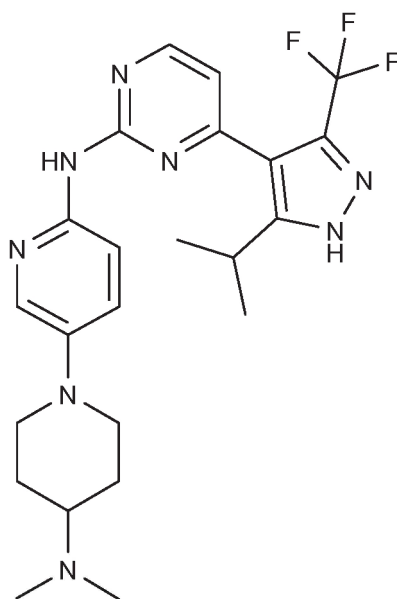
Compuesto A3: Dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-[5-((1R,6S)-9-metil-4-oxo-3,9-diaza-biciclo[4,2,1]non-3-il)-piridin-2-ilamino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, el cual tiene la siguiente estructura química:



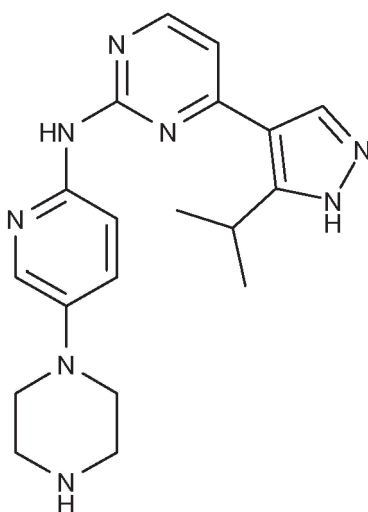
Compuesto A4: 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, el cual tiene la siguiente estructura química:



5 Compuesto A5: N*6*-[4-(5-isopropil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-il)-pirimidin-2-il]-N*4*,N*4*-dimetil-3,4,5,6-tetrahydro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina, el cual tiene la siguiente estructura química:

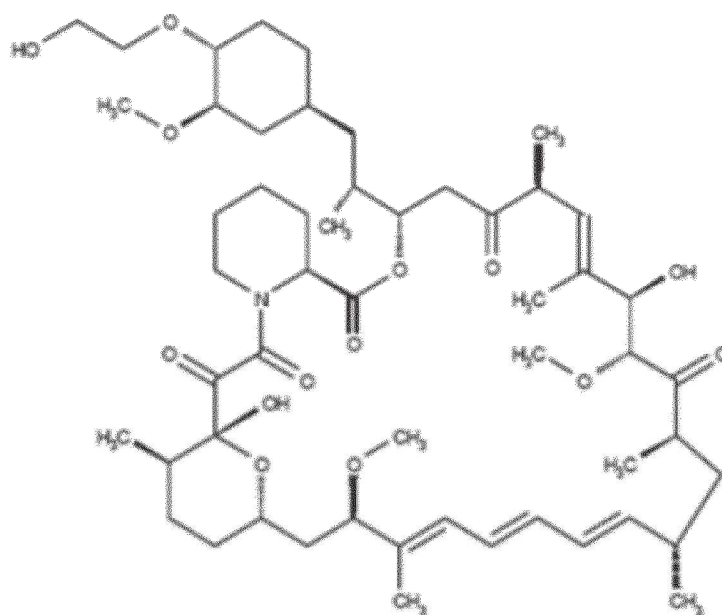


Compuesto A6: [4-(5-isopropil-1H-pirazol-4-il)-pirimidin-2-il]-(5-piperazin-1-il-piridin-2-il)-amina, el cual tiene la siguiente estructura química:

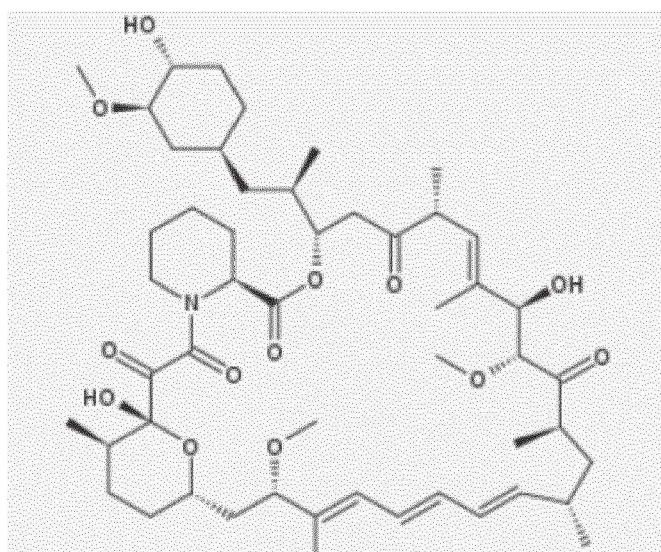


5 El inhibidor de mTOR en la combinación de la presente invención es Everolimus (RAD001, Novartis).

Everolimus, el cual es el Compuesto B1, tiene el nombre químico ((1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-((1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-metoxyciclohexil]-1-metiletil)-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30,3.1,04,9] hexatriaconta-16,24, 26,28-tetraen-2,3,10,14,20-pentaona). Everolimus y sus análogos se describen en la Patente US n.º 5,665,772, en la columna 1, línea 39 hasta columna 3, línea 11. Everolimus se describe mediante la siguiente estructura:



Rapamicina, la cual es el Compuesto B2, es un inhibidor de mTOR y tiene el nombre químico (3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S, 26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-hexadecahidro-9,27-dihidroxi-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil]-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-23,27-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]-oxa-azaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-pentona. Esta se describe mediante la siguiente estructura:



En otra modalidad, la presente invención incluye un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa, de preferencia cáncer, dependiente de CDK4/6 o mTOR, el método comprende administrar a un paciente en necesidad de lo mismo una combinación de la presente invención. Los cánceres dependientes de CDK4/6 generalmente también están marcados por una proteína Rb hiperfosforilada (retinoblastoma). Un cáncer es dependiente de una ruta si la inhibición o bloqueo de esa ruta desacelera o altera el crecimiento de dicho cáncer. Los ejemplos de cánceres dependientes de la ruta de CDK4 o CDK6 incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de colon, cáncer de esófago, liposarcoma, linfoma de célula del manto, mieloma múltiple, leucemia de célula T, carcinoma de célula renal, cáncer gástrico y cáncer pancreático. Los ejemplos de cánceres dependientes de la ruta de mTOR incluyen cáncer de mama, cáncer pancreático, carcinoma de célula renal, linfoma de célula del manto, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y cáncer de colon. La correlación de los cánceres con la ruta de CDK4/6 con la ruta de mTOR ha sido establecida en la técnica. Por ejemplo, véase Shapiro, Journal of Clinical Oncology, Vol. 24, n.º 11 (2006) pp. 1770-1783 o Fasolo, Expert Opin. Investig. Drugs Vol. 17, n.º 11 (2008) pp. 1717-1734.

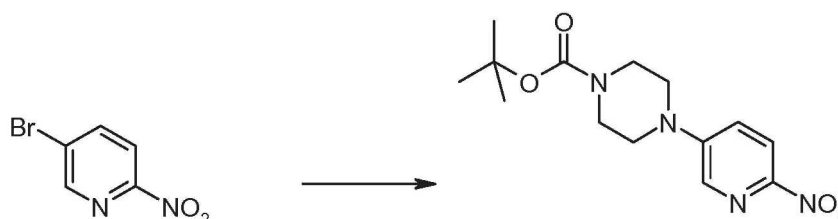
- Por lo tanto, en una modalidad de la invención es una combinación de un inhibidor de CDK4/6 y una inhibición de mTOR para uso en el tratamiento de cáncer, mediante fabricación en un medicamento, el cual se puede comercializar como cualquiera de una forma de dosificación combinada o separada o un método para tratar el cáncer administrando la combinación a un paciente en necesidad de lo mismo. El cáncer puede ser un cáncer de tumor sólido o un linfoma. Los cánceres preferidos incluyen cáncer pancreático, cáncer de mama, linfoma de célula del manto, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de colon, cáncer de esófago, liposarcoma, mieloma múltiple, leucemia de célula T, carcinoma de célula renal, cáncer gástrico, carcinoma de célula renal, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de pulmón o cáncer de colon.
- La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen una reacción alérgica o reacción adversa similar, tal como irritación gástrica, mareo y similares, cuando se administran a un humano. De preferencia, como se utiliza en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno Federal o estatal o que está listado en la farmacopea US u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y de manera más particular en humanos.
- El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos provenientes del petróleo, de animales, de vegetales o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua o soluciones salinas en solución acuosa y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol de preferencia se utilizan como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos apropiados se describen en “Remington's Pharmaceutical Sciences” de E. W. Martin.
- La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se utiliza en el presente documento para decir una cantidad suficiente para reducir en por lo menos aproximadamente 15 por ciento, de preferencia en por lo menos 50 por ciento, de manera más preferida en por lo menos 90 por ciento, y de manera incluso más preferida evitar, una deficiencia clínicamente significativa en la actividad, función y respuesta del hospedero. De manera alternativa, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para provocar una mejora en una condición/síntoma clínicamente significativo en el hospedero.
- “Agente” se refiere a todos los materiales que se pueden utilizar para preparar composiciones farmacéuticas y de diagnóstico, o que pueden ser compuestos, ácidos nucleicos, polipéptidos, fragmentos, isoformas, variantes u otros materiales que se pueden utilizar de manera independiente para dichos propósitos, todos de conformidad con la presente invención.
- “Análogo” tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto orgánico pequeño, un nucleótido, una proteína o un polipéptido que posee actividad o función o funciones similares o idénticas a las del compuesto, nucleótido, proteína o polipéptido o compuesto que tiene la actividad deseada y efecto terapéutico de la presente invención. (por ejemplo, inhibición del crecimiento del tumor), pero que no necesita comprender necesariamente una secuencia o estructura que sea similar o idéntica a la secuencia o estructura de la modalidad preferida.
- La presente invención incluye todos los compuestos de la invención marcados isotópicamente farmacéuticamente aceptables, es decir compuestos de Fórmula (I), en los cuales uno o más átomos están reemplazados con átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa usualmente encontrado en la naturaleza.
- Los ejemplos de isótopos apropiados para inclusión en los compuestos de la invención comprenden isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H , carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , cloro, tal como ^{36}Cl , flúor, tal como ^{18}F , yodo, tales como ^{123}I y ^{125}I , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , fósforo, tal como ^{32}P y azufre, tal como ^{35}S .
- Algunos compuestos de la fórmula (I) marcados isotópicamente, por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radioactivo, son útiles en estudios de distribución tisular del fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio, es decir ^3H y carbono-14, es decir ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios de detección disponibles.
- La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir ^2H , puede permitir ciertas ventajas terapéuticas que resultan de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, tiempo de vida media *in vivo* incrementado o requerimientos de dosificación reducidos, y por lo tanto podrían ser preferidos en algunas circunstancias.
- La sustitución con isótopos emisores de positrón, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en estudios de Topografía por Emisión de Positrón (PET) para examinar la ocupación del receptor del sustrato.

Los compuestos de la fórmula (I) marcados isotópicamente se pueden preparar en términos generales mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o utilizando procedimientos análogos a aquellos descritos en los Ejemplos y Preparaciones acompañantes utilizando reactivos marcados isotópicamente apropiados en lugar de los reactivos no marcados previamente utilizados.

5 Ejemplos

Los ejemplos 1-3 ilustran el procedimiento general que se puede utilizar para elaborar la dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico (Compuesto A1). Los métodos adicionales para elaborar los inhibidores de CDK4/6 descritos en el presente documento se pueden encontrar en la solicitud WO n.º PCT/EP09/060793, publicada como WO 2010/020675.

10 Ejemplo de referencia 1



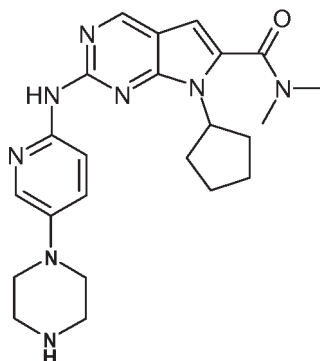
Los análogos de nitrilo se pueden elaborar mediante lo siguiente. A una solución agitada de 5-bromo-2-nitropiridina (4,93 g, 24,3 mmol) y éster *tert*-butílico del ácido piperazin-1-carboxílico (4,97 g, 26,7 mmol) en CH₃CN (60 ml) se le añade DIPEA (4,65 ml, 26,7 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 72 horas, después se enfría hasta temperatura ambiente y el producto precipitado se recolecta mediante filtración. El filtrado se concentra y purifica mediante cromatografía de vaporización instantánea en columna eluyendo con EtOAc al 30%/petróleo. Los productos combinados se recrystalizan con EtOAc/petróleo para obtener éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-nitro-piridin-3-il)-piperazin-1-carboxílico, (4,50 g, 80% de rendimiento). EM(IEN) m/z 308 (M+H)⁺.

Ejemplo de referencia 2

Una mezcla de 5-[4-(2,2,2-trifluoro-etil)-piperazin-1-il]-piridin-2-ilamina (158 mg, 0,607 mmol), dimetilamida del ácido 2-cloro-7-ciclopentil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico (118 mg, 0,405 mmol), Pd₂(dba)₃ (18,5 mg, 0,020 mmol), BINAP (25 mg, 0,040 mmol) y *tert*-butóxido de sodio (70 mg, 0,728 mmol) en dioxano (3,5 ml) se desgasifica y calienta a 100°C durante 1 hora en un microondas CEM Discover. La mezcla de reacción se particiona entre diclorometano y solución saturada de NaHCO₃. Se separa la capa orgánica y la capa acuosa se extrae con diclorometano adicional. Los orgánicos combinados se lavan con salmuera, se secan (MgSO₄), se filtran y se concentran. El producto en bruto se purifica utilizando cromatografía en gel de sílice (0 a 10% de metanol/diclorometano) para obtener la dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-{5-[4-(2,2,2-trifluoro-etil)-piperazin-1-il]-piridin-2-ilamino}-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico, la cual se purifica adicionalmente mediante trituración con acetonitrilo (115 mg, 55%).
EM(IEN) m/z 517,2 (M+H)⁺ (método A).
RMN ¹H (400 MHz, Me-d₃-OD): 8,72 (1H, s), 8,24 (1H, d), 7,98 (1H, d), 7,50 (1H, dd), 6,62 (1H, s), 4,81-4,72 (1H, m), 3,27-3,09 (12H, m), 2,89 (4H, t), 2,61-2,49 (2H, m), 2,16-2,01 (4H, m), 1,81-1,69 (2H, m).

Ejemplo de referencia 3

Dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico



5 Siguiendo el método Buchwald del Ejemplo 2, después el Procedimiento General del Ejemplo 1, dimetilamida del ácido 2-cloro-7-ciclopentil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico (300 mg, 1,02 mmol) y 5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamina (314 mg, 1,13 mmol) dio dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico (142 mg, 36%). EM(IEN) m/z 435,3 (M+H)⁺.

Ejemplo 4

La prueba de viabilidad celular Cell Titec-Glo Luminscent (Promega# G7572) genera una señal luminiscente que es proporcional al número de células metabólicamente activas presentes en una reacción, tomando como base la cuantificación del ATP. El reactivo Cell Titec-Glo se prepara descongelando un frasco de solución amortiguadora Cell Titec-Glo en un baño de agua a 37°C. Después se agrega la botella completa de solución amortiguadora a la botella de sustrato Cell Titec-Glo liofilizado provisto en el estuche. Se deja que el sustrato liofilizado se disuelva; la solución se mezcla después mediante inversión y está lista para ser utilizada. Las células Jeko-1 se diluyen hasta una densidad de 200.000 células/ml y se cultivan en matraces T250. Antes del tratamiento (tiempo 0), se retiran 3 alícuotas de 100 microlitros y se colocan en una placa de 96 cavidades de color negro con fondo transparente (Costar#3904). Se agregan 50 ul de reactivo CTG a cada cavidad. La placa se coloca en un agitador Orbital, se protege de la luz y se incuba utilizando el ajuste 4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa después se lee utilizando el luminómetro Envision y se exportan los resultados. Las células que permanecen en los matraces T250 se dejan ya sea sin tratar o se tratan con agentes individuales o en combinaciones. La concentración utilizada de inhibidor de CDK4/6 es de 100 nM y las del inhibidor de mTOR utilizadas son 1, 2,5 y 5 nM. Las placas se dejan incubar durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de 72 horas, se retiran 3 alícuotas de 100 ul y se someten a CTG como se describió anteriormente. Los resultados se exportan y se analizan utilizando Microsoft Excel. El porcentaje de células viables en comparación con el crecimiento de control se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Si } A > B, \text{ entonces } 100 \times ((A-B)/(C-B)), \text{ si no entonces } 100 \times (A-B/B)$$

25 en la cual:

- A es la lectura de CTG en la condición de tratamiento
- B es la lectura de CTG para células al tiempo 0
- C es la lectura de CTG para las células no tratadas a las 72 horas

Ejemplo 5

30 Para evaluar si la combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR conduce a inhibición de crecimiento más pronunciada en comparación con las inhibiciones de crecimiento observadas con los agentes individuales, células de linfoma de células de manto Jeko-1 se tratan con 100 nM de inhibidor de CDK4/6, 1, 2,5 y 5 nM de inhibidor de mTOR y las combinaciones de los dos inhibidores, como se muestra en la Figura 1. Las inhibiciones de crecimiento se miden utilizando el estuche CellTitec-Glo del Ejemplo 4. Se obtiene el % de crecimiento de las células tratadas, en comparación con el control de vehículo. Como se muestra en la figura 1, el tratamiento con 100 nM del inhibidor de CDK4/6 conduce a 70% de crecimiento celular en comparación con el control de vehículo, mientras que los tratamientos con inhibidor de mTOR por sí solo conducen a 30% de crecimiento aproximadamente en todas las tres concentraciones analizadas. De manera notable, las combinaciones de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR conducen a inhibiciones de crecimiento mucho más pronunciadas en todas las combinaciones analizadas. Por ejemplo, se observa menos de 10% de crecimiento celular para la combinación 100 nM/5 nM de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR. Esto demuestra que la combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR induce cantidades más altas de inhibiciones de crecimiento celular, cuando se evalúa contra las actividades de agente individual del compuesto individual.

Ejemplo 6

Para determinar si las combinaciones de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR dan como resultado inhibiciones de crecimiento sinergistas, se generan isoblogramas, en los cuales se comparan los valores de inhibición de crecimiento reales en las combinaciones, con las inhibiciones de 25, 50 y 75% de crecimiento predichas para aditividad (Tallarida RJ (2006) An overview of drug combination analysis with isoblograms. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; 319 (1):1-7). Brevemente, se determinan 9 puntos de concentración de titulación incluyendo 0 nM que producen valores de inhibición del crecimiento que varían de 0 a 100% como agentes individuales para inhibidor tanto de CDK4/6 como de mTOR. En una placa de 96 cavidades, se mezclan los 9 puntos de concentración para cada agente en un formato de matriz, generando 81 combinaciones. Esta placa se utiliza para tratar células Jeko-1, y los valores de inhibición de crecimiento resultantes se utilizan para generar los valores de CI_{50} para los agentes individuales y las combinaciones. La gráfica se genera con las concentraciones de inhibidor de CDK4/6 mostradas en el eje de las "y" y las concentraciones de inhibidor de mTOR mostradas en el eje de las "x". Una línea recta que conecta los valores de CI_{50} del inhibidor de CDK4/6 y del inhibidor de mTOR representa las inhibiciones de crecimiento que fueron estrictamente aditivas para las combinaciones. Los trazos colocados debajo de la línea de aditividad (más inhibición de crecimiento) representan inhibiciones de crecimiento sinergistas, mientras que los trazos encima de la línea de aditividad (menos inhibición de crecimiento) representan inhibiciones de crecimiento antagonistas.

Ejemplo 7

Para evaluar si la inhibición de crecimiento celular por parte de la combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR es sinergista, se miden las actividades de agente individual y combinación en células Jeko-1 y se analizan utilizando el análisis de isoblogograma preparado de conformidad con el Ejemplo 6. Brevemente, se miden las actividades de agente individual de los inhibidores de CDK4/6 y de mTOR para determinar 9 puntos de concentración de titulación que podrían producir 0 a 100% de inhibiciones de crecimiento para cada agente. En un formato de matriz, se coadministran todas las posibles combinaciones para los 9 puntos de concentración de cada inhibidor a las células Jeko-1 y se registran las inhibiciones de crecimiento observadas. Después se calculan las concentraciones que producen 50% de inhibiciones de crecimiento para cada compuesto y las combinaciones y se utilizan para generar la gráfica mostrada en la figura 2. El eje de las X y de las Y representan las concentraciones de inhibidor de mTOR y de CDK4/6, respectivamente. La línea 1 representan las inhibiciones de crecimiento predichas para aditividad, cuando se consideran inhibiciones de crecimiento de 50%. La línea 2 es el trazo generado para las concentraciones de combinaciones observadas que producen 50% de inhibiciones de crecimiento, y está profundamente colocada debajo de la línea de aditividad, lo que sugiere una sinergia fuerte para la inhibición de crecimiento. En resumen, la combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR inhibe el crecimiento celular en una manera sinergista en células de linfoma de células de manto Jeko-1.

Ejemplo 8

También se analiza el efecto sinergista en una línea de células de cáncer de mama MDA-MB453 mediante la combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR utilizando un análisis de isoblogograma como se describió en el Ejemplo 7 anterior. También de conformidad con el ejemplo 7, la combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR inhibe el crecimiento celular en una manera sinergista en células de cáncer de mama MDA-MB453.

Ejemplo 9

Se utiliza un modelo de xenoinjerto Jeko-1 para medir la actividad anti-tumor en un periodo de tratamiento de 35 días de Compuesto A1, Compuesto B1, y la combinación de los Compuestos A1 y B1. Se observa actividad anti-tumor significativa. Cuando se detiene la dosificación y se deja que los tumores vuelvan a crecer, la combinación de los Compuestos A1 y B1 retrasa significativamente el crecimiento de tumor en 20 días. En este modelo, tanto el Compuesto A1 con el Compuesto B1 tienen actividad anti-tumor. Sin embargo, la combinación de los Compuestos A1 y B1 extiende significativamente el retraso del crecimiento del tumor cuando se detiene el tratamiento. Véase Figura 4.

Ejemplo 10

Los carcinomas pancreáticos PANC-1 utilizados para la implantación se mantienen mediante injertos en serie en ratones desnudos. Para iniciar el crecimiento del tumor, se implanta por vía subcutánea un fragmento de 1 mm³ en el flanco derecho de cada animal de prueba. Los tumores se monitorean dos veces por semana y después diariamente a medida que su volumen promedio se aproxima a 100-150 mm³. Veintidós días después de la implantación de la célula de tumor, en el D1 del estudio, los animales se sortean en cuatro grupos de 10 ratones, con tamaños de tumor individual de 108-221 mm³ y tamaños de tumor promedio por grupo de 150-153 mm³. El tamaño de tumor, en mm³, se calcula a partir de:

$$\text{Volumen del tumor} = (w^2 \times l)/2$$

en la cual w = anchura y l = longitud, en mm, del tumor. El peso del tumor se puede estimar con la suposición de que 1 mg es equivalente a 1 mm³ del volumen del tumor.

Los ratones del grupo 1 reciben vehículos del Compuesto A1 y del Compuesto B1 y sirven como controles para todos los análisis. Los grupos 2 y 3 reciben monoterapias con 250 mg/kg qd, po x 21 días de Compuesto A1 o 10 mg/kg qd, po x 21 días de Compuesto B1. El grupo 4 recibe la terapia de combinación de Compuesto A1 y Compuesto B1.

Cada animal se somete a eutanasia cuando el volumen de tumor llega a 1,200 mm³ o en el último día del estudio (D55). Para cada animal cuyo tumor alcanza el volumen de punto final, el tiempo para punto final (TTE) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{TTE} = (\log_{10} (\text{volumen de punto final}) - b)/m$$

En la cual TTE se expresa en días, el volumen de punto final está en mm³, b es la ordenada al origen, y m es la pendiente de la línea obtenida mediante regresión lineal de un conjunto de datos de crecimiento de tumor en escala logarítmica. El conjunto de datos está constituido por la primera observación que excede el volumen de punto final del estudio y las tres observaciones consecutivas que preceden inmediatamente la obtención del volumen de punto final. El TTE calculado por lo general es menor que el día en el cual el animal se somete a eutanasia por tamaño del tumor. Un animal con un tumor que no alcanza el punto final se le asigna un valor de TTE igual al último día. Un animal clasificado como fallecido por causas de TR o metástasis no relacionada con el tratamiento (NTRm) se le asigna un valor de TTE igual al día del deceso. Un animal clasificado como fallecido por causas NTR se excluye de los cálculos de TTE.

La eficacia del tratamiento se determina a partir del retraso de crecimiento del tumor (TGD), del cual se define como el incremento en la mediana de TTE para un grupo de tratamiento comparado con el grupo de control: $\text{TGD} = T - C$, expresado en días o como un porcentaje de la mediana de TTE del grupo de control: $\% \text{TGD} = [(T - C)/C] \times 100$, en la cual: T = mediana de TTE para un grupo de tratamiento, C = mediana de TTE para el grupo de control designado.

Estos estudios demuestran que ni el Compuesto A1 ni el Compuesto B1 tienen actividad anti-tumor significativa en el modelo de xenoinjerto PANC-1. Sin embargo, la combinación de los Compuestos A1 y B1 da como resultado estasis del tumor (Figura 5A) y recrecimiento del tumor con un retraso significativo de 18 días (Figura 5B)

Ejemplo 11

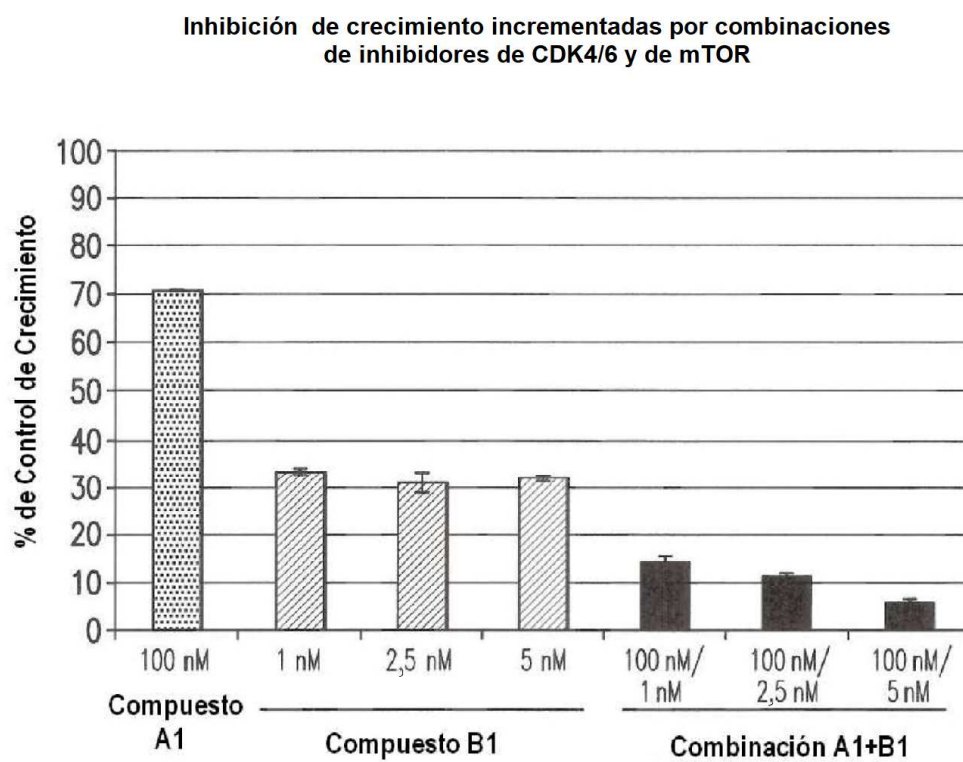
Se evalúan las interacciones sinergistas potenciales entre las combinaciones de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR con relación al modelo de aditividad de Loewe utilizando el software CHALICE, a través de una calificación de sinergia calculada a partir de las diferencias entre los valores observados y los valores del modelo de Loewe a través de la matriz de respuesta. Brevemente, se utilizan 9 concentraciones de titulación que varían de 10 uM diluido en serie 3 veces para los inhibidores de CDK4/6 y 0,1 uM diluido en serie 3 veces para los inhibidores mTOR, incluyendo 0 uM. En una placa de 96 cavidades, los 9 puntos de concentración para cada agente se mezclan en un formato de matriz, generando 81 combinaciones. Esta placa se utiliza para tratar células Jeko-1, y los valores de inhibición resultantes son utilizados por el software CHALICE para generar las matrices de Inhibición y de Inhibición en Exceso por Aditividad, así como los isobologramas. Una explicación más detallada de la técnica y los cálculos se puede encontrar en Lehar et al. "Synergistic drug combinations improve therapeutic selectivity", *Nat. Biotechnol.* 2009, Julio; 27(7), 659-666. La matriz de inhibición muestra la inhibición real observada mediante la prueba CTG a las concentraciones respectivas de los compuestos. La inhibición de exceso agregado muestra la inhibición en exceso observada con respecto a la inhibición de dicha por el modelo de aditividad de Loewe. Además de las matrices, se pueden utilizar isobologramas para observar la sinergia. El nivel de inhibición para cada isoblograma se elige manualmente para observar mejores efectos sinergistas. El isoblograma se genera con las concentraciones de inhibidor de CDK4/6 mostradas en el eje de las "y" y las concentraciones de inhibidor de mTOR mostradas en el eje de las "x". Una línea recta que conecta las concentraciones de inhibidor de CDK 4/6 y del inhibidor de mTOR que producen el nivel elegido de inhibición representa inhibiciones de crecimiento que fueron estrictamente aditivas para las combinaciones. Los trazos colocados debajo de la línea de aditividad (más inhibición del crecimiento) representan inhibiciones de crecimiento sinergistas, mientras que los trazos encima de la línea de aditividad (menos inhibición del crecimiento) representan inhibiciones de crecimiento antagonistas.

Se estudia la interacción sinergista entre los siguientes pares de combinación de inhibidor de CDK4/6 y del inhibidor de mTOR, las calificaciones de sinergia y las ilustraciones de figuras correspondientes se listan a continuación. La combinación del Compuesto A1 con el Compuesto B1 está dentro de la definición de la presente traducción. Otras combinaciones que se describen a continuación son los ejemplos de referencia.

inhibidor de CDK4/6	Inhibidor de mTOR	Calificación de sinergia	Figura
Compuesto A1	Compuesto B1	4,92	6
Compuesto A1	Compuesto B2	7,77	7
Compuesto A4	Compuesto B1	7,16	8
Compuesto A2	Compuesto B1	3,76	9
Compuesto A3	Compuesto B1	7,1	10
Compuesto A6	Compuesto B1	6,41	11
Compuesto A5	Compuesto B1	4,04	12
Compuesto A4	Compuesto B2	5,73	13
Compuesto A2	Compuesto B2	4,57	14
Compuesto A3	Compuesto B2	6,85	15
Compuesto A6	Compuesto B2	3,24	16
Compuesto A5	Compuesto B2	5,86	17

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende un primer agente que es un inhibidor de cinasa 4 dependiente de ciclina o cinasa 6 dependiente de ciclina (CDK4/6) y un segundo agente que es un inhibidor de mTOR, en la cual el primer agente es dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el segundo agente es everolimus.
2. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de cáncer.
3. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el cáncer depende de la ruta de CDK4, CDK6 o mTOR.
4. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el cáncer es un cáncer de tumor sólido.
5. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de mama, linfoma de célula del manto, cáncer de pulmón de célula no pequeña, melanoma, cáncer de colon, cáncer de esófago, liposarcoma, mieloma múltiple, leucemia de célula T, carcinoma de célula renal, cáncer gástrico, carcinoma de célula renal, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de pulmón o cáncer de colon.
6. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de mama o linfoma de célula del manto.
7. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el cáncer es un linfoma.
8. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el primer agente y el segundo agente están presentes en una forma de dosificación combinada.
9. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el primer agente y el segundo agente están presentes en forma de dosificación separadas.

**FIGURA 1**

Combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR
Isobograma en CI_{50}
Células LCM Jeko-1

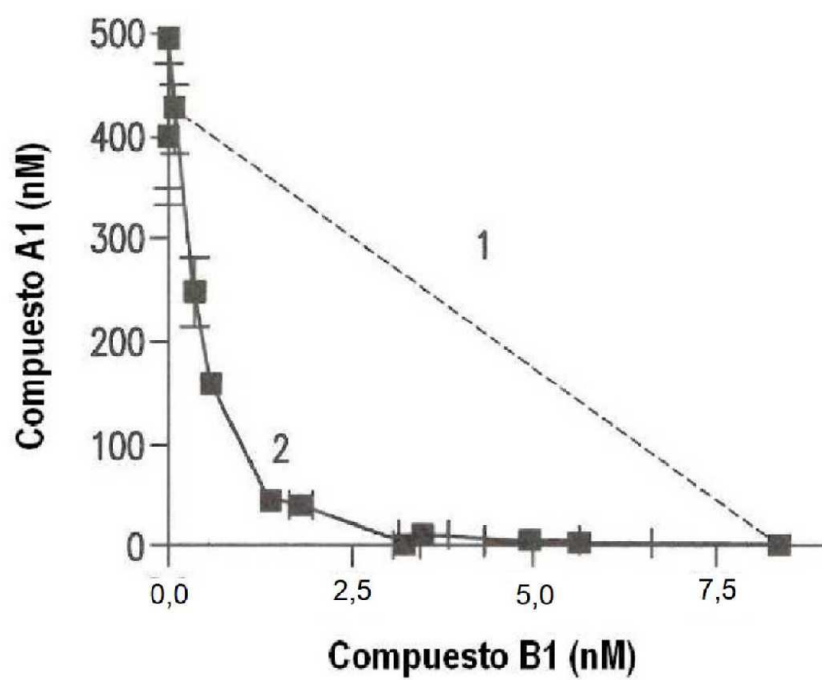


FIGURA 2

**Combinación de inhibidor de CDK4/6 y de mTOR
Isoblograma en CI_{75}
Células de cáncer de mama MDA-MB453**

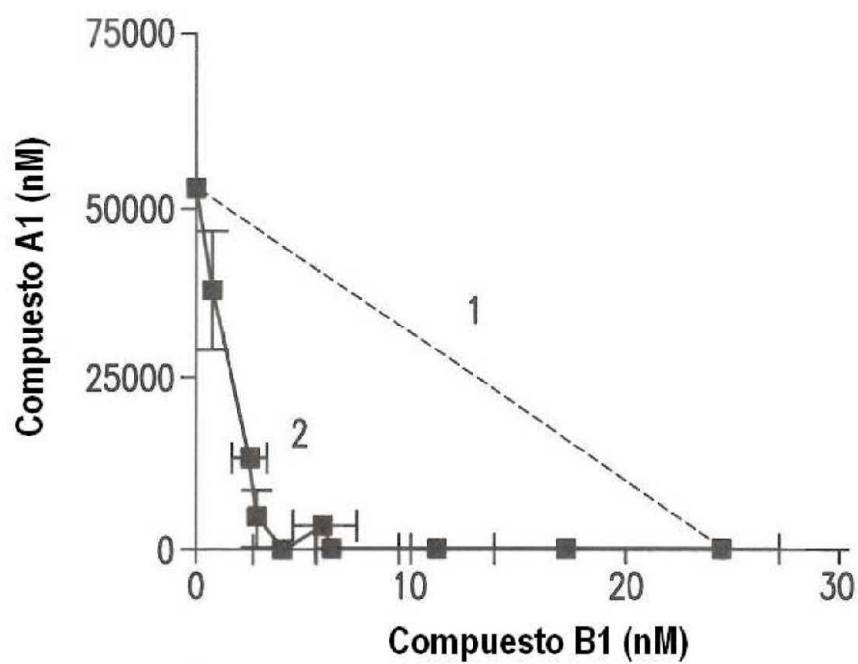
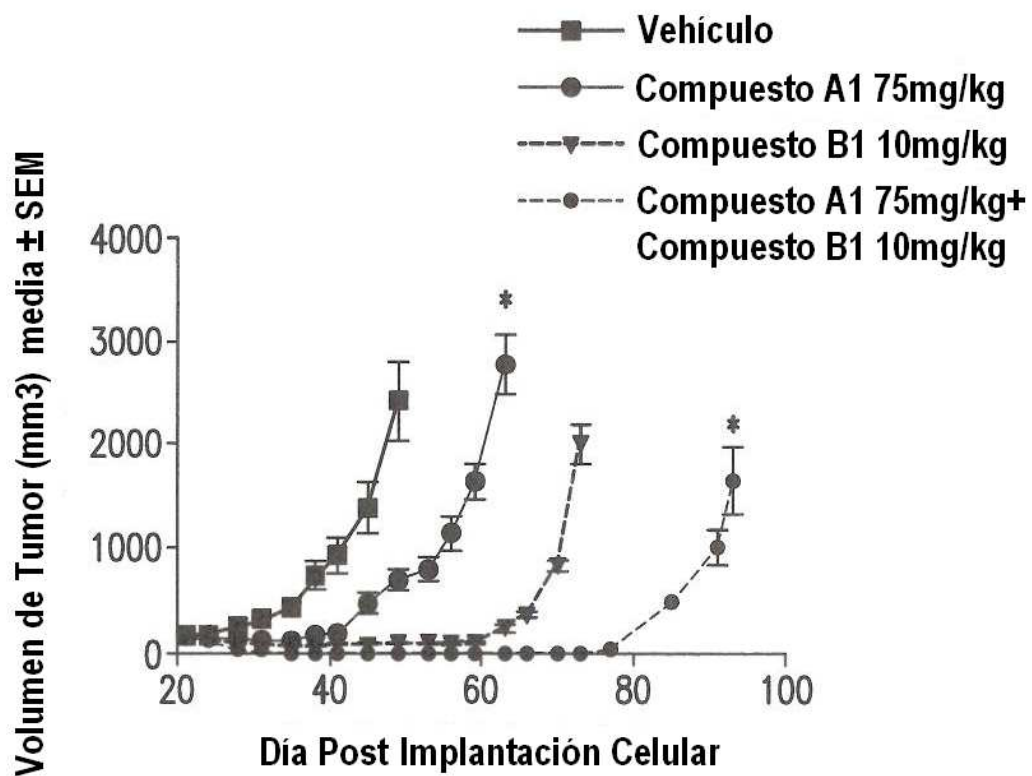


FIGURA 3

**FIGURA 4**

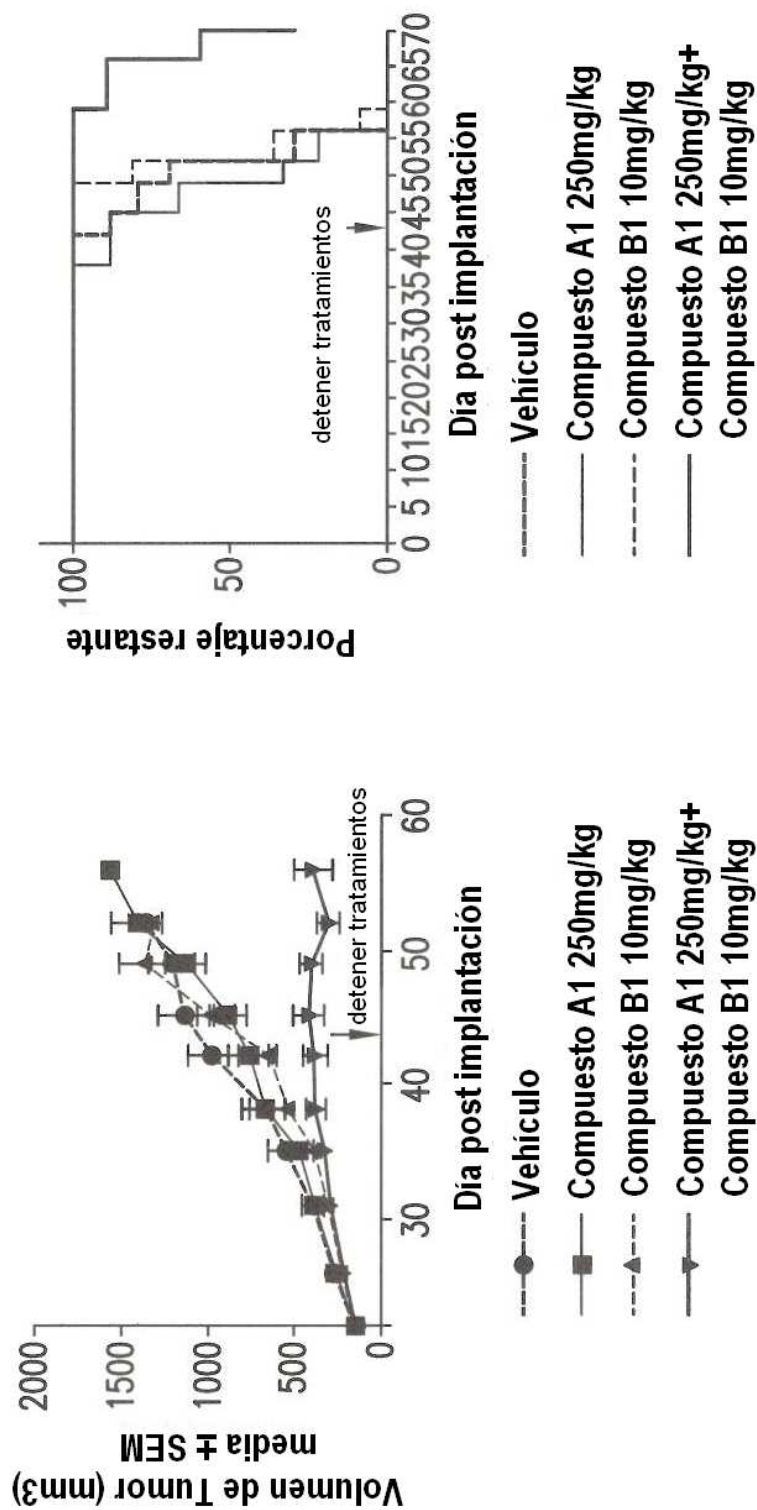
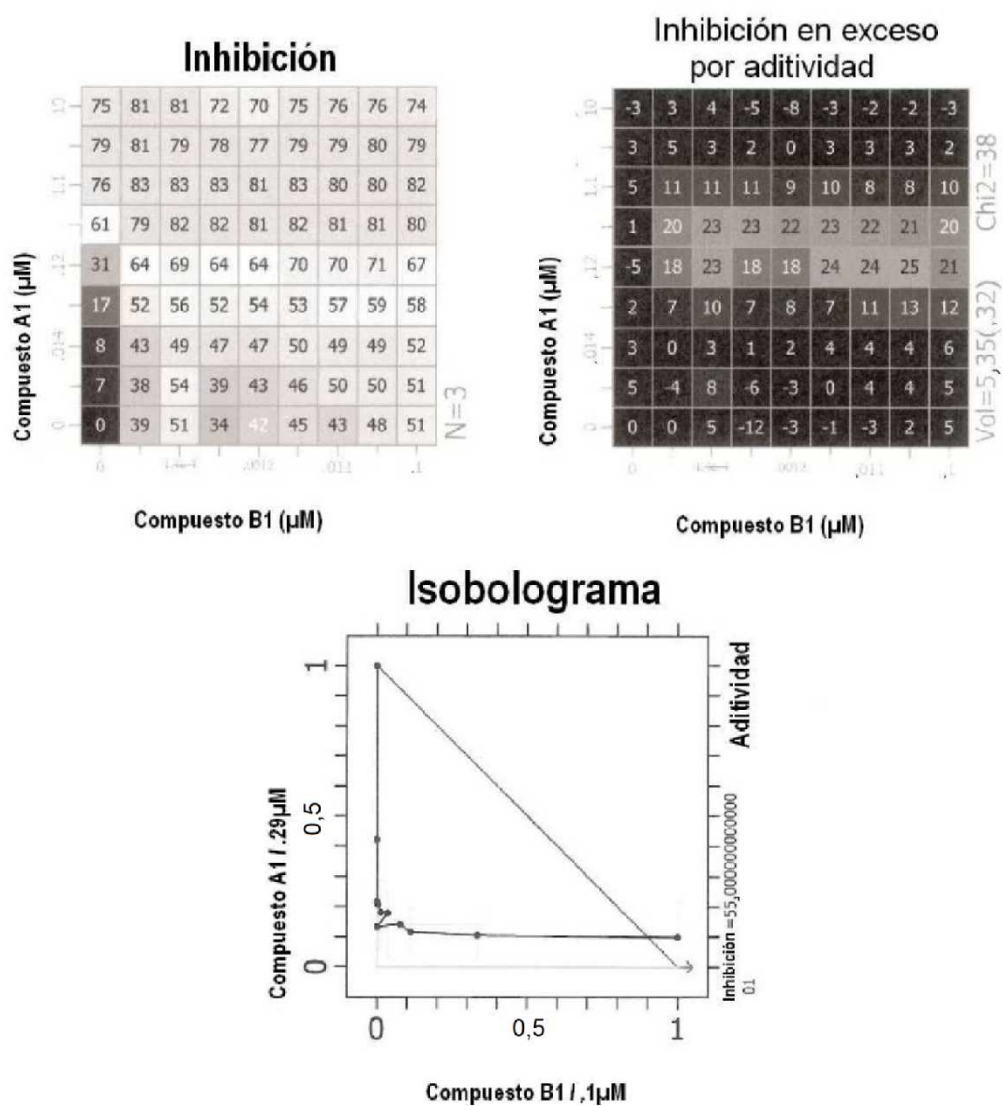
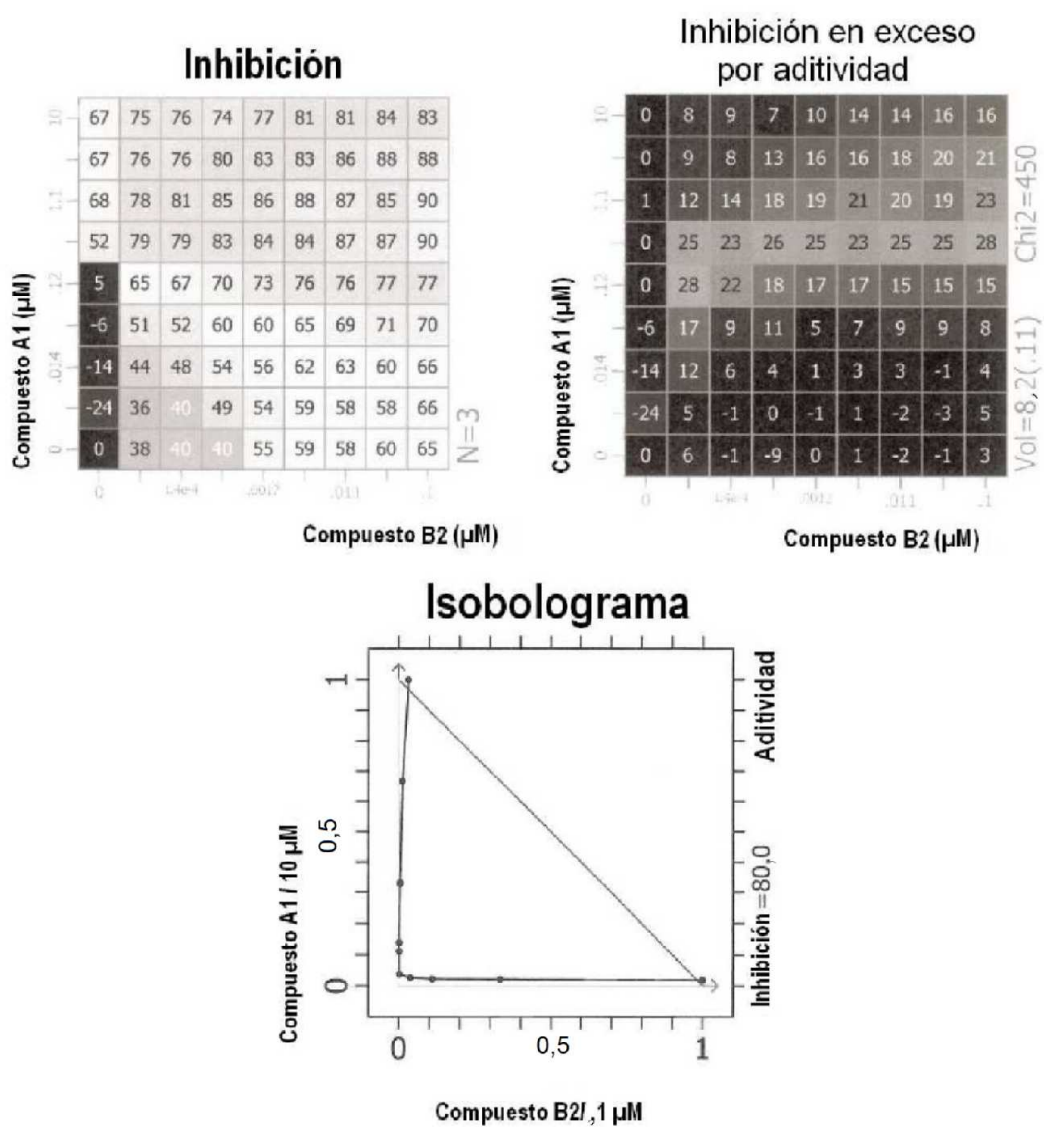


FIGURA 5A

FIGURA 5B





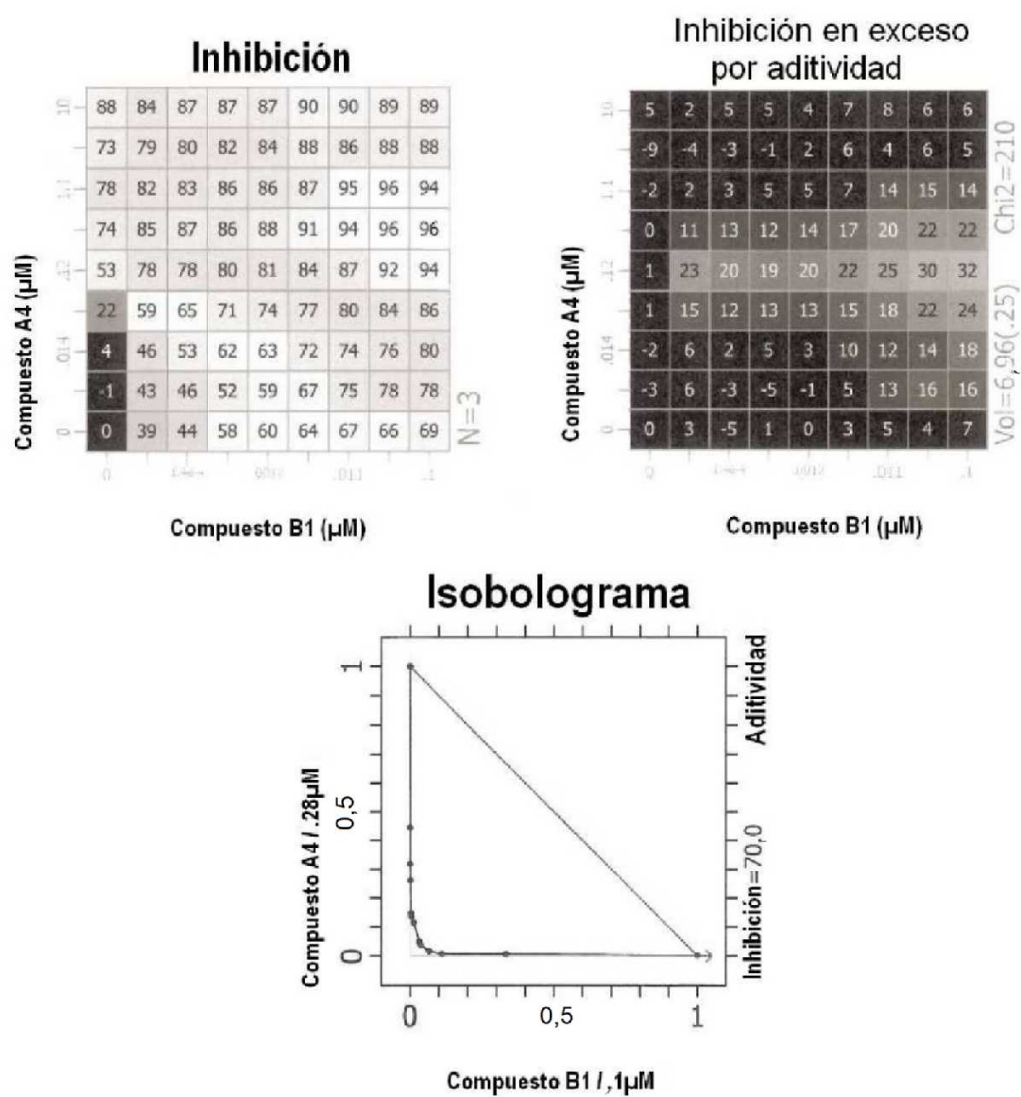


FIGURA 8

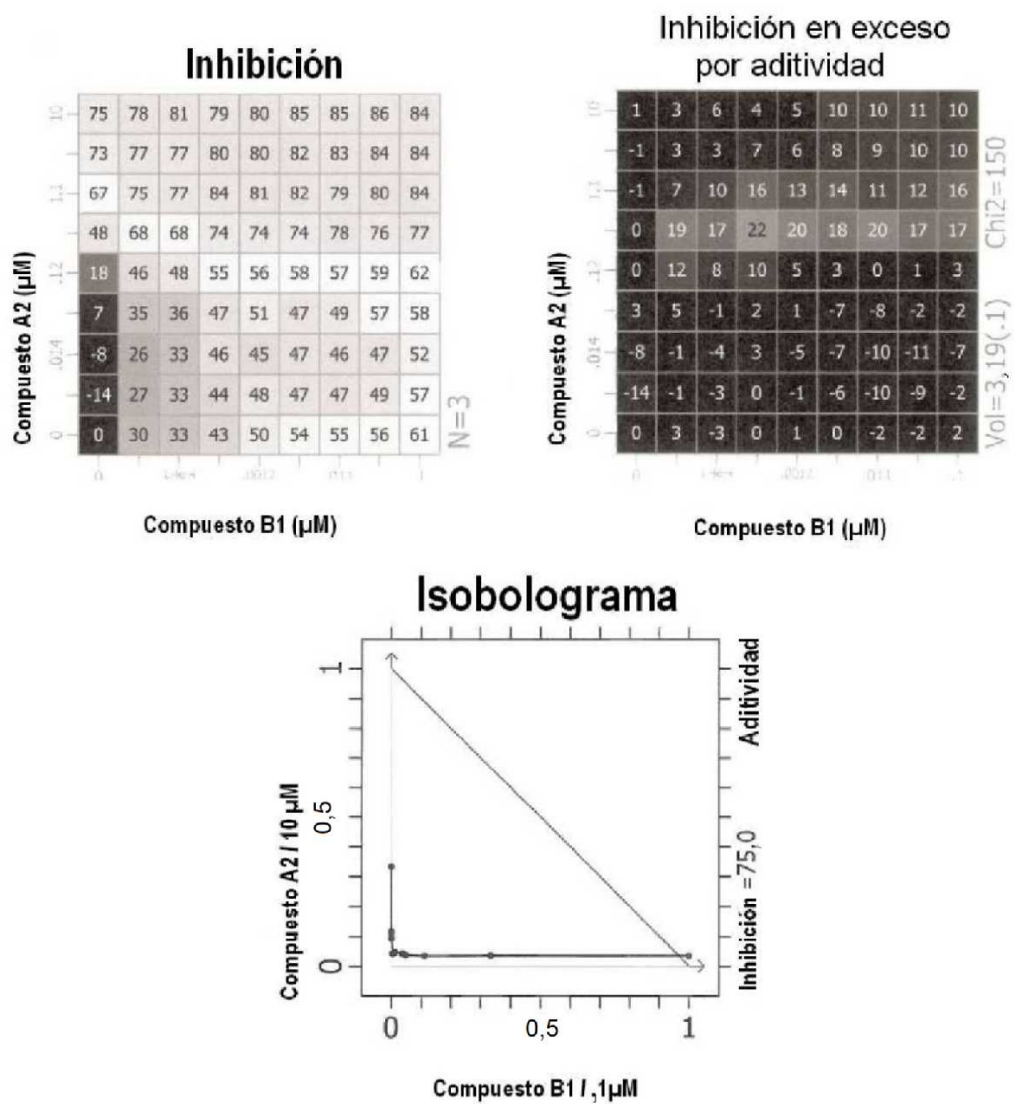


FIGURA 9

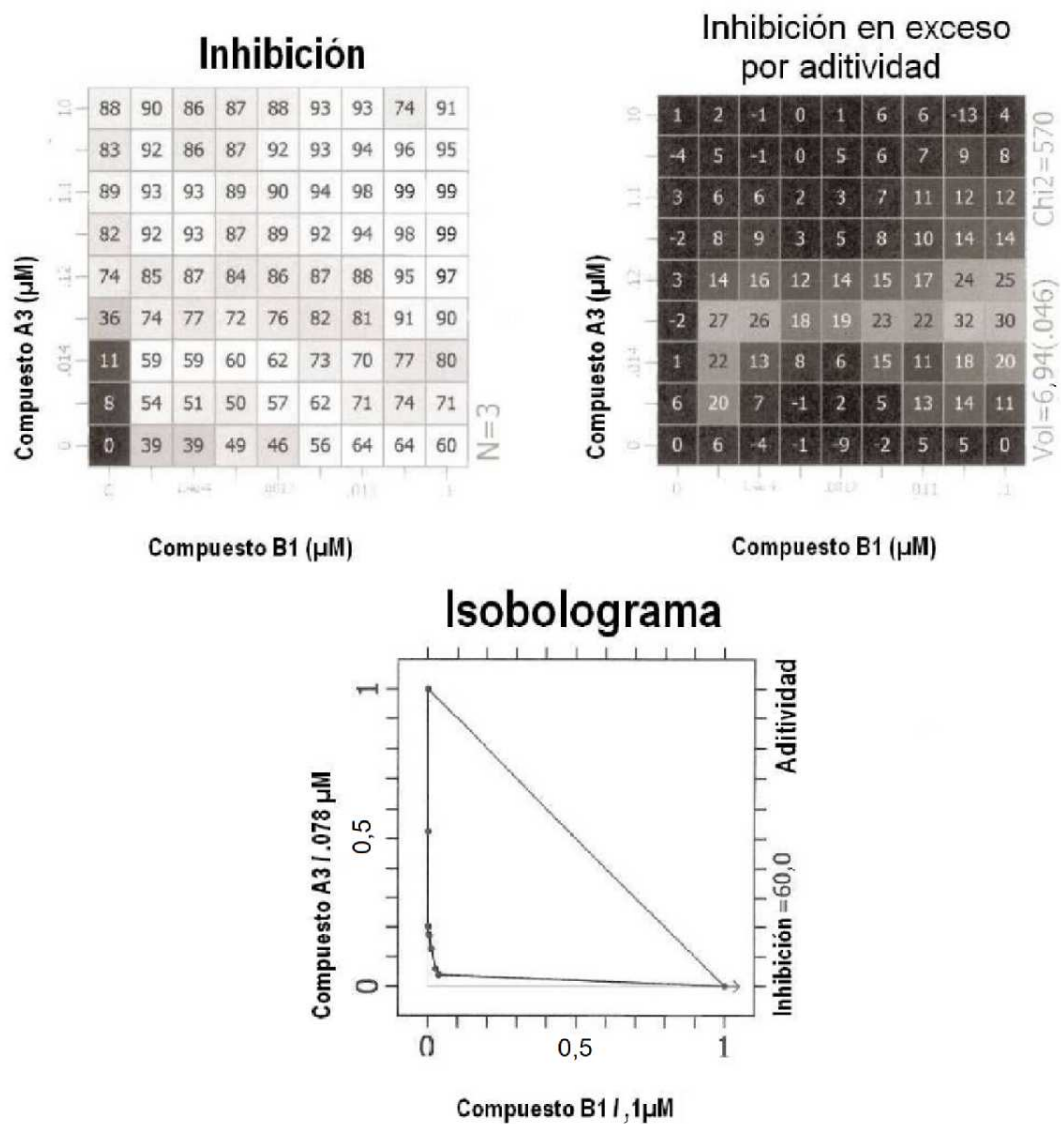


FIGURA 10

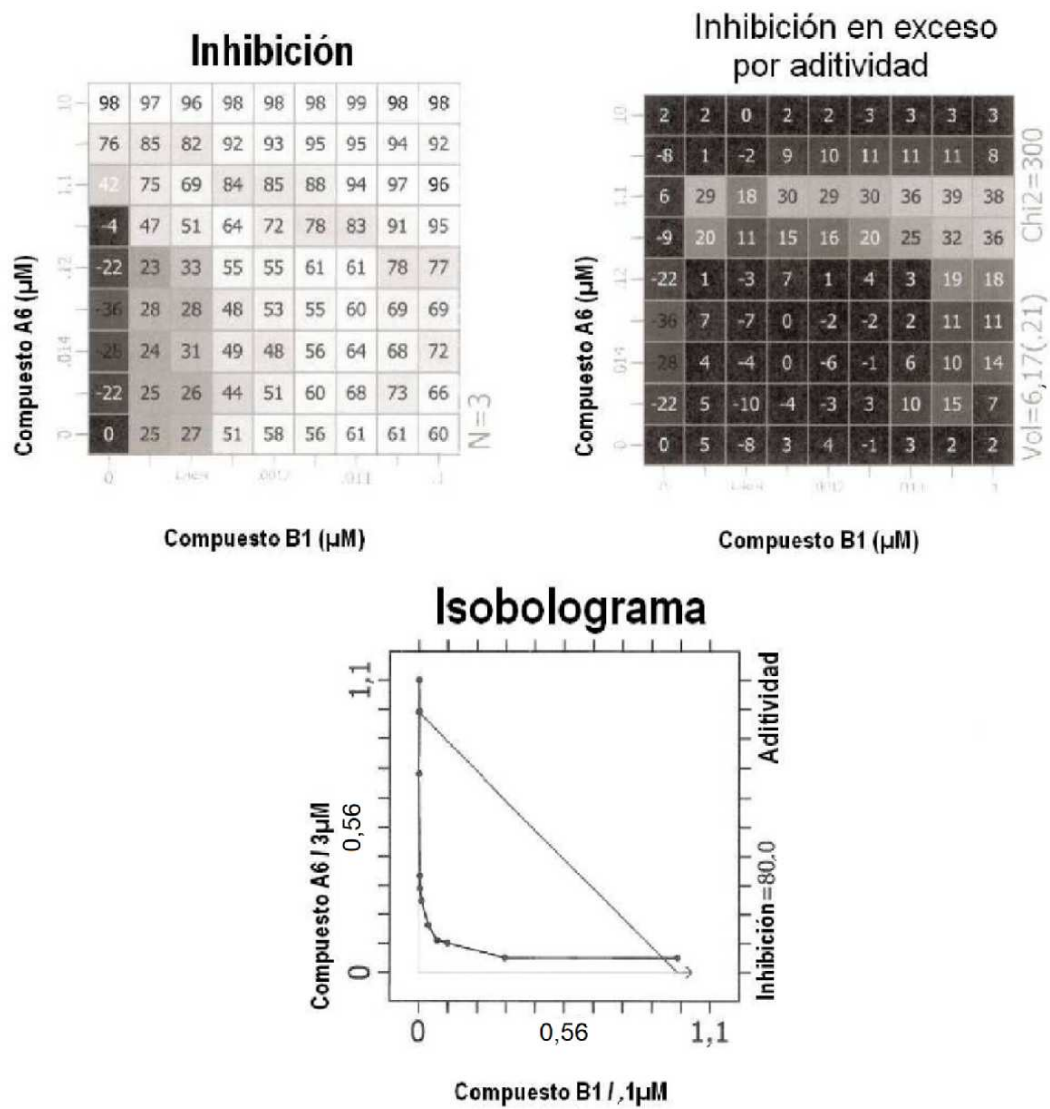


FIGURA 11

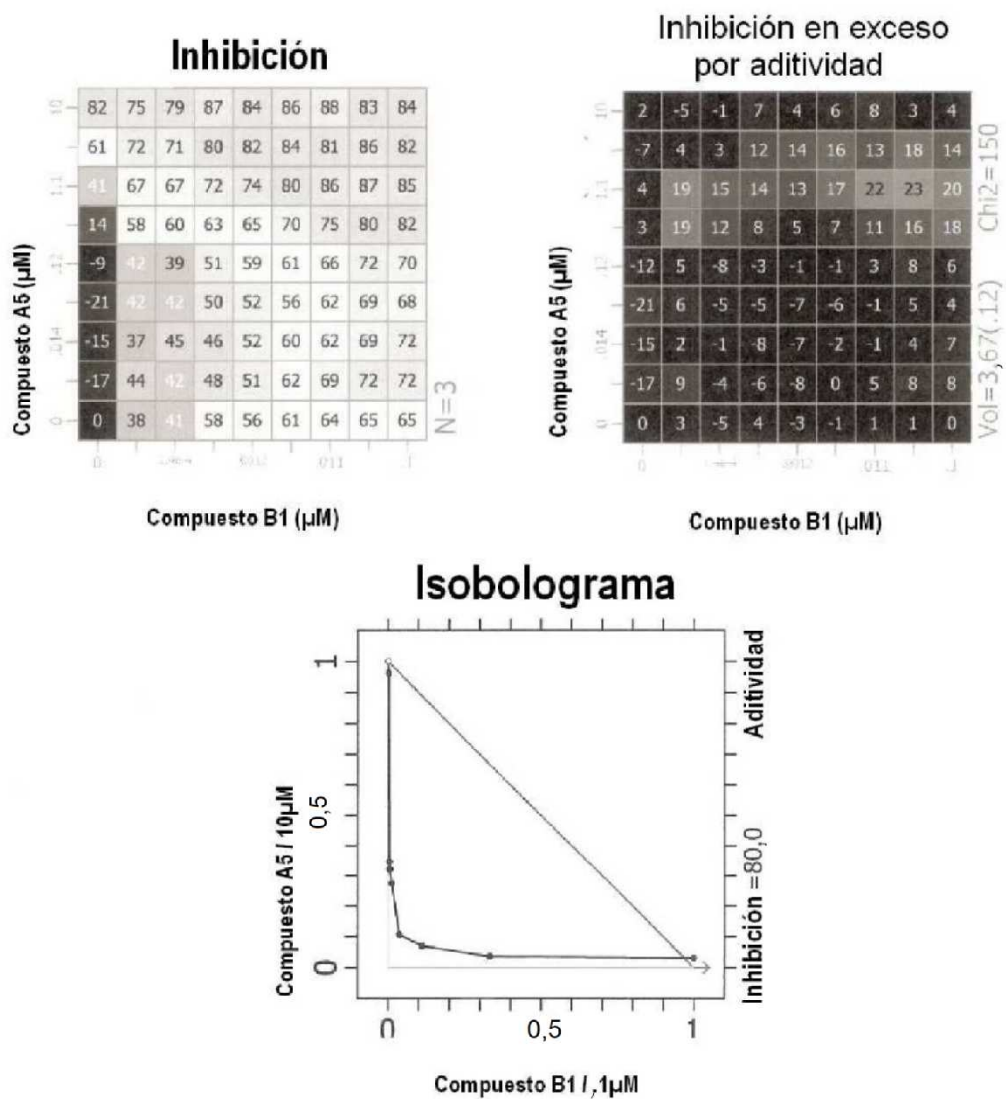


FIGURA 12

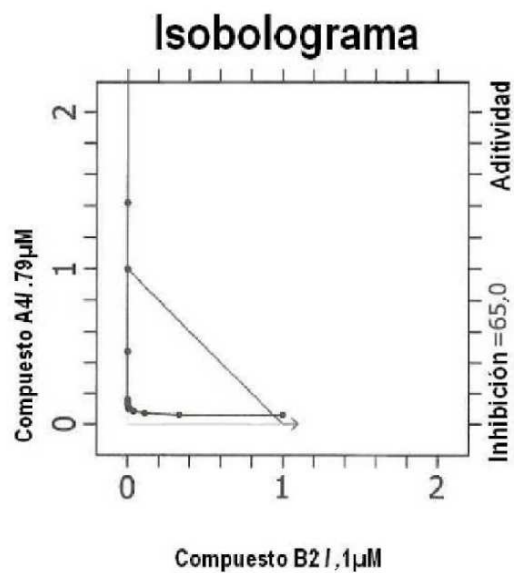
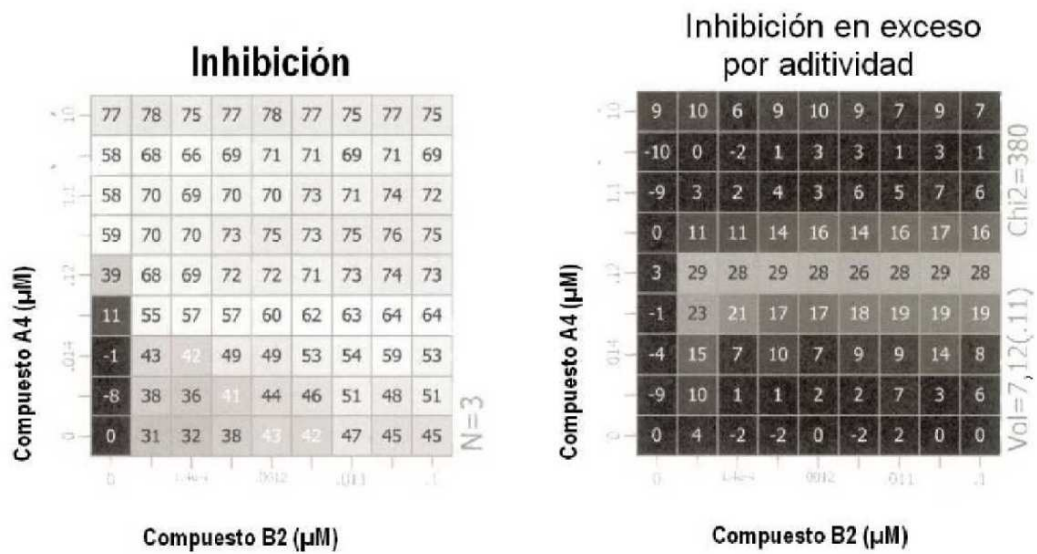


FIGURA 13

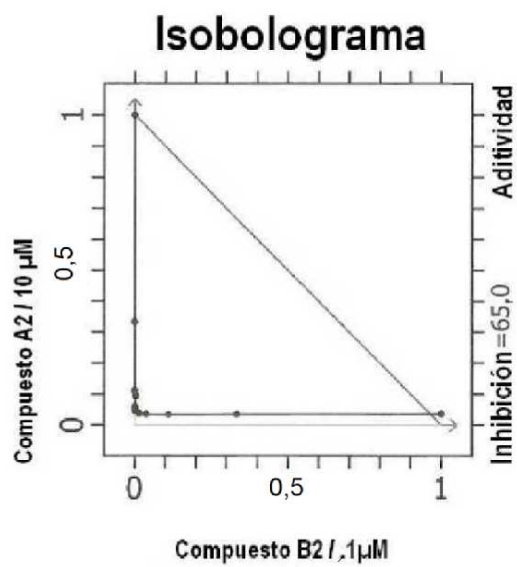
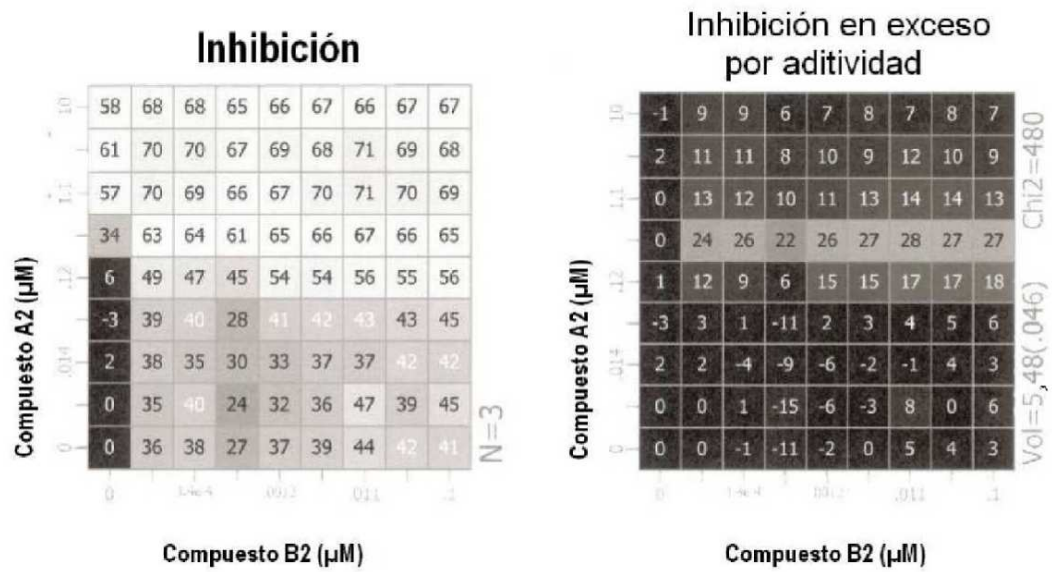


FIGURA 14

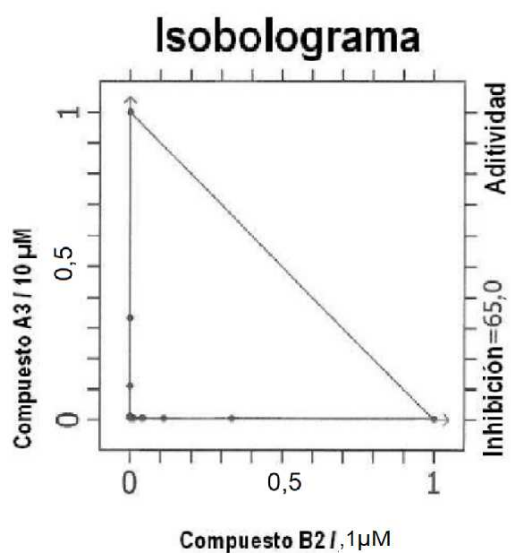
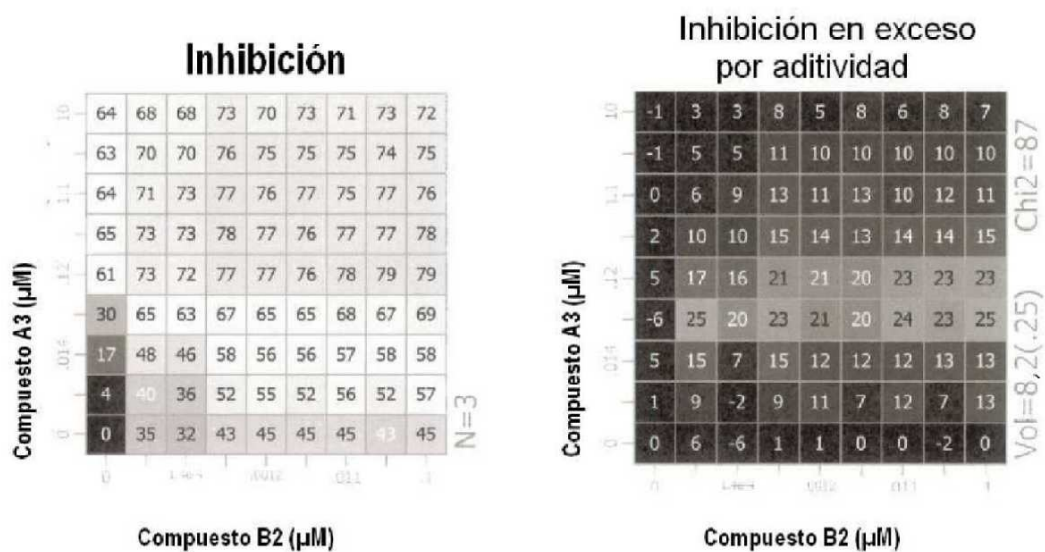


FIGURA 15

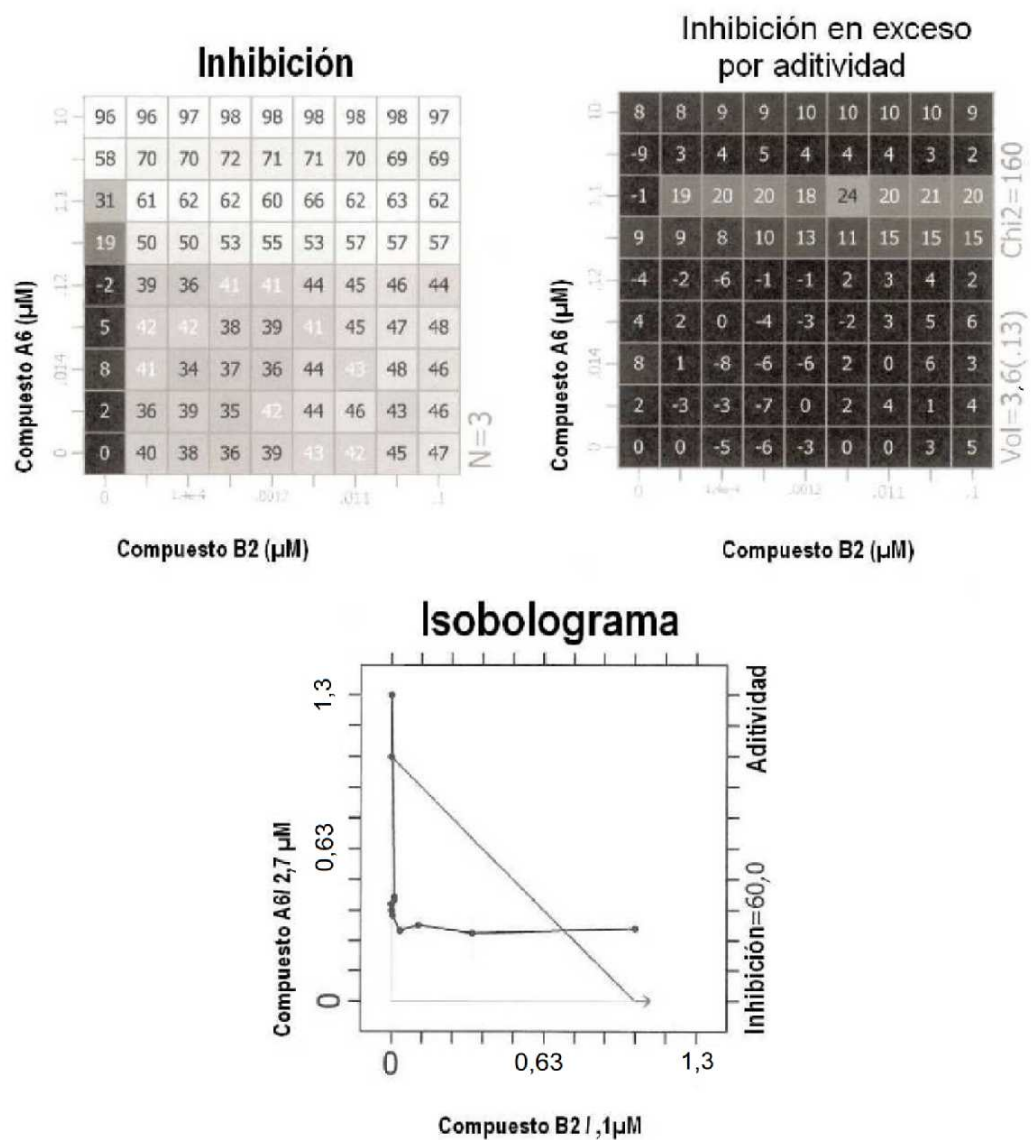


FIGURA 16

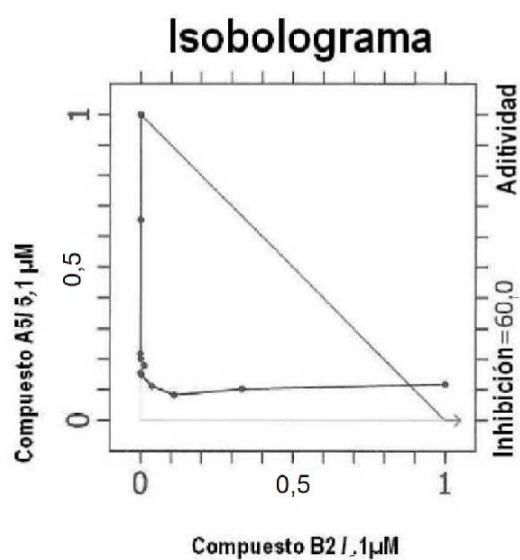
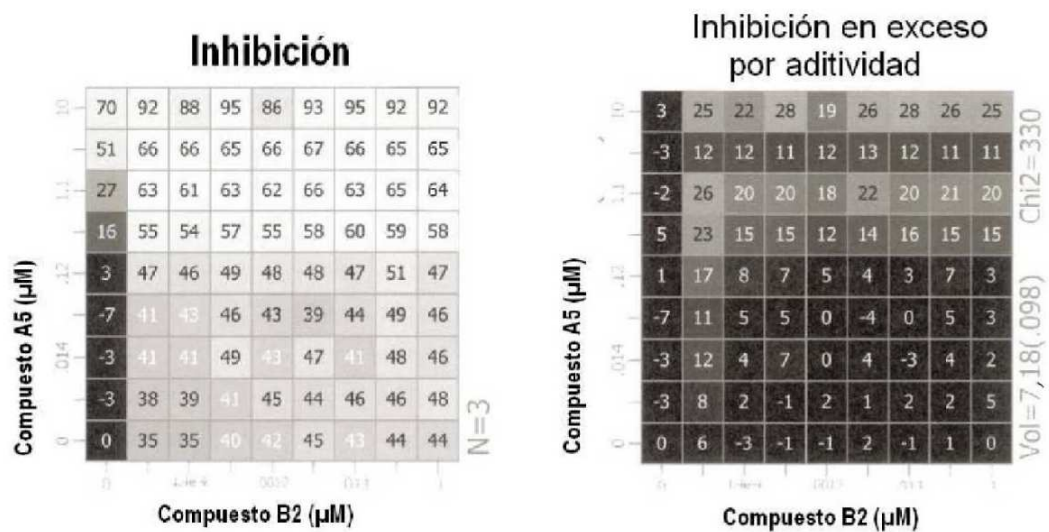


FIGURA 17