

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 578 191**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/397 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2010 E 10832068 (0)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2501379**

(54) Título: **Combinación**

(30) Prioridad:

17.11.2009 US 261813 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2016

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**GILMER, TONA;
KUMAR, RAKESH y
LAQUERRE, SYLVIE**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 578 191 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).

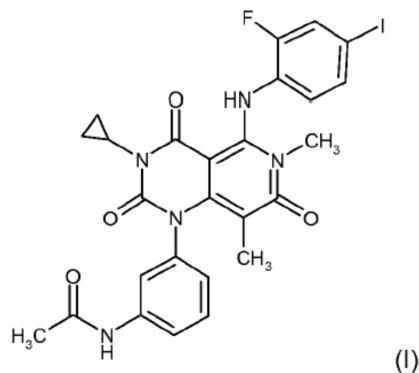
DESCRIPCIÓN

Combinación

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con un método de tratamiento del cáncer en un mamífero y con combinaciones útiles en tal tratamiento. En particular, el método se relaciona con una combinación novedosa que comprende el inhibidor de MEK: N-(3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil)acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, con un inhibidor de mTOR, composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo, y los métodos de uso de tales combinaciones en el tratamiento de cáncer.
- 10 Antecedentes de la invención
- El tratamiento efectivo de los trastornos hiperproliferativos que incluyen el cáncer es un objetivo continuo en el campo de la oncología. En general, el cáncer se origina de la desregulación de los procesos normales que controlan la división celular, la diferenciación y la muerte celular apoptosis. La apoptosis (muerte celular programada) desempeña una función esencial en el desarrollo embrionario y en la patogénesis de diversas enfermedades, tales como las enfermedades neuronales degenerativas, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Una de las rutas más comúnmente estudiadas, que implica la regulación de la cinasa en la apoptosis, es la señalización celular de los receptores del factor de crecimiento en la superficie celular al núcleo (Crews and Erikson, Cell, 74:215-17, 1993).
- 15 Se sabe que la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP)/cinasa extracelular regulada por señal (ERK) (en adelante referida como MEK) está implicada en la regulación de la proliferación celular como una cinasa que media la ruta de transducción de señal Raf-MEK-ERK, y que la familia Raf (B-Raf, C-Raf, etc.) activa la familia MEK (MEK-1, MEK-2, etc.), y la familia MEK activa la familia ERK (ERK-1 y ERK-2).
- 20 La activación de la ruta de transducción de señal Raf-MEK-ERK en cáncer, particularmente cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama y similares, ha sido observada frecuentemente.
- 25 Además, ya que las señales producidas por moléculas de señalización tales como el factor de crecimiento, citosina y similares convergen a la activación de MEK-ERK, los inhibidores de estas funciones son considerados como supresores más eficaces de la transducción de señal Raf-MEK-ERK que la supresión de la función de cinasas en la dirección 5' como RTK, Ras, y Raf.
- 30 Más aun, también es sabido que un compuesto que tiene actividad inhibitoria de MEK induce eficazmente la inhibición de la actividad de ERK1/2 y la supresión de la proliferación celular (The Journal of Biological Chemistry, vol 276, No. 4, pp. 2686-2692, 2001), y se espera que el compuesto muestre efectos en las enfermedades causadas por proliferación celular indeseada, como génesis de tumor y/o cáncer.
- 35 La diana mamífera de rapamicina (mTOR) también conocida como proteína q asociada a proteína 12 de rapamicina de unión a FK506 (FRAP1) es una proteína que en humanos es codificada por el gen FRAP1. mTOR es una proteína cinasa de serina/treonina que regula el crecimiento celular, la proliferación celular, la motilidad celular, supervivencia celular, síntesis de proteínas, y la transcripción.
- 40 La investigación actual indica que mTOR integra la entrada de Múltiples rutas en dirección 5' incluyendo insulina, factores de crecimiento (tales como IGF-1 e IGF-2), y mitógenos. mTOR también funciona como un sensor de nutrientes celulares y niveles de energía y estado redox. La desregulación de la ruta mTOR está implicada como un factor que contribuye a diversos procesos de enfermedades humanas, especialmente diversos tipos de cáncer. La rapamicina es un producto natural bacteriano que puede inhibir a mTOR por la asociación con su receptor intracelular FKBP12. El complejo de FKBP12-rapamicina se une directamente al dominio de Unión de FKBP12-Rapamicina (FRB) del mTOR.
- 45 mTOR ha mostrado funcionar como la subunidad catalítica de dos complejos moleculares distintos en las células, mTORC1 y mTORC2. Los inhibidores de mTOR ya son utilizados en el tratamiento de rechazo de trasplante. También se han comenzado a utilizar para el tratamiento de cáncer. Los inhibidores de mTOR también pueden ser útiles para tratar muchas enfermedades asociadas con la edad.
- Sería útil proveer una terapia novedosa que provéase un tratamiento más eficaz o mejorado a un individuo que padece los efectos del cáncer.
- Resumen de la invención
- 50 Los presentes inventores han identificado combinaciones de agentes quimioterapéuticos que proporcionan una actividad aumentada sobre la monoterapia. En particular las combinaciones de fármaco que incluyen al inhibidor de

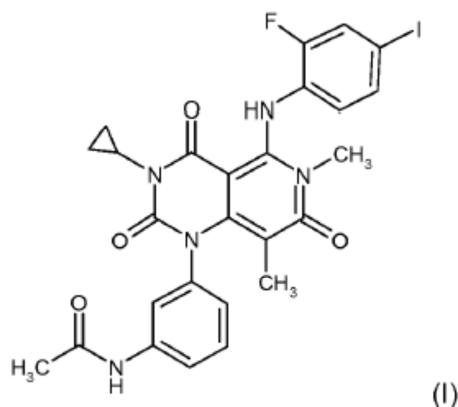
MEK: N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, un compuesto de estructura (I)



- 5 en combinación con un inhibidor de mTOR.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende:

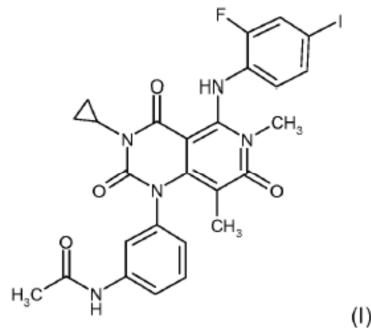
(i) N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida (un compuesto de estructura (I)):



- 10 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo del mismo (en lo siguiente el solvato de sulfóxido de dimetilo del compuesto de estructura (I) es también referido como Compuesto A, y la forma libre o no solvatada del compuesto de estructura (I) también es referido como Compuesto C); everolimus.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende:

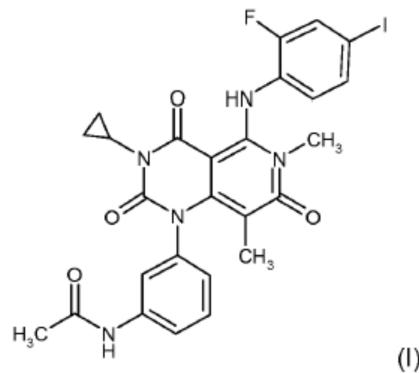
- 15 (i) un compuesto de estructura (I):



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo del mismo; y everolimus para uso en terapia

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende:

(i) un compuesto de estructura (I):

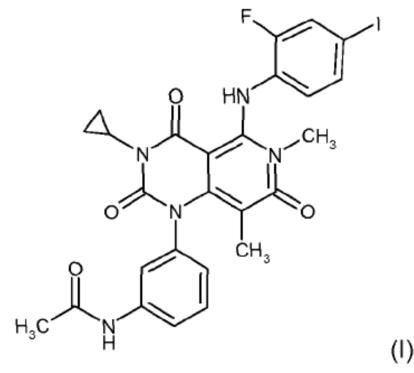


5

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo del mismo; y everolimus para uso en el tratamiento del cáncer.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende:

(i) un compuesto de estructura (I):

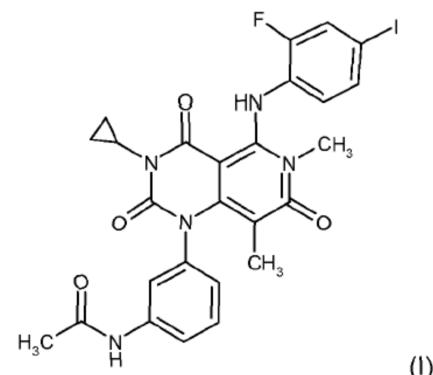


10

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo del mismo; y everolimus junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable

En un quinto aspecto se proporciona el uso de una combinación que comprende:

(i) un compuesto de estructura (I):

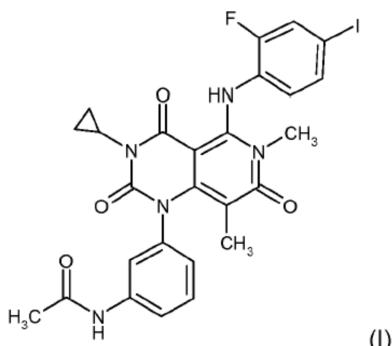


15

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo del mismo; y everolimus en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

En un sexto aspecto se proporciona un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero:

- 5 (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I):



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo del mismo; y everolimus.

10 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para tratar cáncer en un mamífero en necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la invención en donde los compuestos de la combinación son administrados dentro de un período específico y por una duración de tiempo.

15 En un aspecto adicional de esta invención se proporciona un método para tratar cáncer en un mamífero en necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la invención en donde los compuestos de la combinación son administrados secuencialmente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa las curvas de respuesta de inhibición de crecimiento de célula-dosis para las líneas celulares A427, A549, Calu6 y H2122.

La figura 2 representa las curvas de actividad de caspasa 3/7 para las líneas celulares A427, A549, Calu6 y H2122.

20 La figura 3 representa el IC50 de crecimiento (glC50) de los inhibidores de MEK y mTOR solos y en combinación contra líneas celulares de cáncer.

La figura 4 representa el valor logarítmico del índice de combinación de los inhibidores de MEK y mTOR en líneas celulares de cáncer. .

25 La figura 5 representa el efecto del inhibidor de MEK, el inhibidor de mTOR y su combinación en el crecimiento de la línea celular de cáncer de pulmón A549.

La figura 6 representa la respuesta celular al inhibidor de MEK, el inhibidor de mTOR y su combinación en líneas celulares de cáncer.

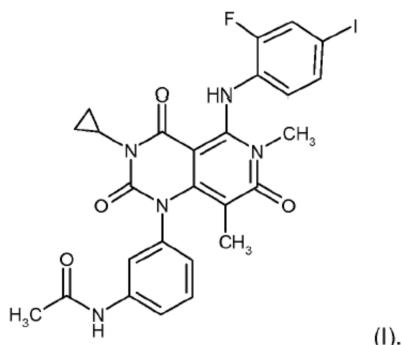
Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere a combinaciones que presentan actividad antiproliferativa. Convenientemente, el método se relaciona a métodos para tratar cáncer por coadministración de:

un inhibidor de mTOR;

y N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6.8-dimetil-2.4.7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, convenientemente el solvato de sulfóxido de dimetilo, del mismo,

35 dicho compuesto es representado por la Estructura I:



(II).

El Compuesto C es divulgado y reivindicado, junto con las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, como siendo útil como un inhibidor de la actividad de MEK, especialmente en el tratamiento de cáncer, en la Solicitud Internacional No. PCT/JP2005/011082, que tiene una fecha de presentación internacional del 10 de junio de 2005; número de Publicación Internacional WO 2005/121142 y una fecha de Publicación Internacional del 22 de diciembre de 2005. El Compuesto B es el compuesto del Ejemplo 4-1. El Compuesto C puede ser preparado como se describió en la Solicitud Internacional No. PCT/JP2005/011082. El Compuesto C puede ser preparado como se describió en la Publicación de Patente de EEUU No. 2006/0014768, publicada el 19 de enero de 2006, cuya divulgación completa es incorporada en la presente como referencia.

- 5 Convenientemente, el Compuesto C está en la forma de un solvato de sulfóxido de dimetilo, que es el Compuesto A. Convenientemente el Compuesto C está en la forma de una sal de sodio. Convenientemente el Compuesto C está en la forma de un hidrato o solvato seleccionado de ácido acético, etanol, nitrometano, clorobenceno, 1-pentanci, alcohol isopropílico, etilen glicol y 3-metil-1-butanol. Estas formas de solvatos y sales pueden ser preparadas por un experto en la técnica partir de la descripción en la Solicitud Internacional No. PCT/JP2005/011082 o de la publicación de EEUU No. 2006/0014768.

10 Para uso en la presente, el termino inhibidor de mTOR, mTOR y derivados es everolimus.

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las combinaciones de la invención es ventajosa sobre los compuestos de componentes individuales, ya que las combinaciones proveen una o más de las siguientes propiedades mejoradas en comparación con la administración individual de una cantidad terapéuticamente eficaz de 20 un compuesto componente: i) un efecto anticáncero mayor que el agente más activo solo, ii) actividad sinérgica o sumamente sinérgica anticáncero, iii) un protocolo de dosis que proporciona una actividad anticáncero aumentada con un perfil reducido de efectos secundarios, iv) una reducción en el perfil de efectos tóxicos, v) un aumento en la ventana terapéutica, vi) un aumento en la biodisponibilidad de uno o de ambos de los compuestos de componente, o vii) un aumento en la apoptosis sobre los compuestos de componentes individuales.

25 Los compuestos de la invención pueden contener uno o más átomos quirales, o de otra manera pueden ser capaces de existir como dos enantiómeros. Por consiguiente, los compuestos de esta invención incluyen mezclas de enantiómeros, así como también enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente enriquecidas. También, se entiende que todos los tautómeros y mezclas de tautómeros están incluidos dentro del alcance del Compuesto A y las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR y las sales 30 farmacéuticamente aceptables del mismo.

35 Los compuestos de la invención pueden formar un solvato, que se entiende que es un complejo de estequiométria variable formado por un soluto (en esta invención el Compuesto A o una sal del mismo, y/o un inhibidor de mTOR o una sal del mismo) y un solvente. Tales solventes para el propósito de la invención no pueden intervenir con la actividad biológica del soluto. Los ejemplos de solventes adecuados incluyen, sin limitación, agua, metanol, sulfóxido de dimetilo, etanol y ácido acético. Convenientemente el solvente utilizado es un solvente farmacéuticamente aceptable. Convenientemente el solvente utilizado no es agua.

40 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención pueden ser preparadas fácilmente por los expertos en la materia.

45 También se contempla aquí un método del tratamiento del cáncer usando una combinación de la invención en donde un compuesto de mTORA, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o el Compuesto C o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran como profármaco. Los profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención pueden ser preparados fácilmente por los expertos en la materia.

Al hacerse referencia a un protocolo de dosis, los términos "día", "por día", etc., se refieren a un tiempo dentro de un día de calendario que empieza en la medianoche y termina la medianoche siguiente.

Por el término "tratamiento" y derivados del mismo, como se usa aquí, se entiende terapia terapéutica. Con respecto a una afección particular, tratamiento significa: (1) mejorar o prevenir la condición de una o más de las manifestaciones biológicas de la condición, (2) interferir con (a) uno o más puntos en la cascada biológica que lleva a o es responsable de la condición o (b) una o más de las manifestaciones biológicas de la condición, (3) aliviar uno o más de los síntomas, efectos o efectos secundarios asociados con la condición o el tratamiento del mismo, o (4) desacelerar la progresión de la condición o de una o más de las manifestaciones biológicas de la condición. También se contempla la terapia profiláctica. El experto en la materia apreciará que "prevención" no es un término absoluto. En medicina, se entiende que "prevención" se refiere a la administración profiláctica de un fármaco para disminuir sustancialmente la probabilidad o severidad de una afección o manifestación biológica de la misma, o para retrasar el inicio de dicha afección o manifestación biológica de la misma. La terapia profiláctica es apropiada, por ejemplo, cuando se considera que un sujeto está en alto riesgo de desarrollar cáncer, por ejemplo cuando el sujeto tiene una fuerte historia de cáncer familiar, o cuando el sujeto ha estado expuesto a un carcinógeno.

Como se usa aquí, el término "cantidad eficaz" significa aquella cantidad de fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal, o humano, que es buscada, por ejemplo, por un investigador o médico. Adicionalmente, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa cualquier cantidad que, en comparación con un correspondiente sujeto que no ha recibido tal cantidad, tiene como resultado tratamiento mejorado, la curación, la prevención, o la mejora de una enfermedad, trastorno, o del efecto secundario, o una disminución en la tasa de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal.

Como se usa aquí, el término "combinación", y derivados del mismo, significa la administración simultánea o cualquier clase de administración secuencial separada de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor de mTOR y un Compuesto C o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Preferiblemente, si la administración no es simultánea, los compuestos se administran en un tiempo muy cercano uno de otro. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma de dosificación, por ejemplo un compuesto se puede administrar tópicamente y el otro compuesto se puede administrar oralmente. Convenientemente, ambos compuestos se administran oralmente.

Como se usa aquí, el término "kit de combinación" significa la composición o composiciones farmacéuticas que se usan para administrar el compuesto inhibidor de mTOR, y el Compuesto C o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la invención. Cuando ambos compuestos se administran simultáneamente, el kit de combinación puede contener el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en una sola composición farmacéutica, tal como por ejemplo una tableta, o en composiciones farmacéuticas separadas. Cuando los compuestos no se administran simultáneamente, el kit de combinación contendrá el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en composiciones farmacéuticas separadas. El kit de combinación puede comprender el compuesto inhibidor de mTOR y el compuesto C o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en composiciones farmacéuticas separadas en un solo envase, o en composiciones farmacéuticas separadas en envases separados.

En un aspecto se proporciona un kit de combinación que comprende los componentes:

40 un compuesto inhibidor de mTOR en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable y el Compuesto C, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención el kit de combinación comprende los componentes siguientes:

45 un compuesto inhibidor de mTOR en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable y el Compuesto C, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

en donde los componentes son proporcionados en una forma que es propia de la administración secuencial, separada y/o simultánea.

En una realización el kit de combinación comprende:

50 un primer recipiente que comprende un compuesto inhibidor de mTOR en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable y

un segundo recipiente que comprende el Compuesto C, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable, y medios de recipiente para contener dicho primer y segundo recipiente.

El "kit de combinación" también se puede proveer con instructivo, por ejemplo con instrucciones de dosificación y administración. Tales instrucciones de dosificación y administración pueden ser del tipo provisto a un doctor, por ejemplo una etiqueta del producto de fármaco, o pueden ser del tipo provisto por un doctor, tal como por ejemplo las instrucciones para el paciente.

5 Como es utilizado en la presente el término "neoplasma" se refiere a un crecimiento anormal de las células o tejido y se entiende que incluye crecimientos benignos, es decir, no cancerosos, y malignos, es decir, crecimientos cancerosos. El término "neoplásico" significa de o relacionado a un neoplasma.

Como es utilizado en la presente el término "agente" se entiende que significa una sustancia que produce un efecto deseado en un tejido, sistema, animal, humano, u otro sujeto. En consecuencia, el término "agente anti-neoplásico" 10 se entiende que significa una sustancia que produce un efecto anti-neoplásico en un tejido, sistema, animal, mamífero, humano, u otro sujeto. También se entenderá que un "agente" puede ser un solo compuesto o una combinación o composición de dos o más compuestos.

15 Los compuestos de las combinaciones actualmente inventadas pueden tener la capacidad de cristalizar en más de una forma, una característica que es conocida como polimorfismo, y se entiende que dichas formas polimórficas ("polimorfos") están dentro del alcance de los compuestos de las combinaciones actualmente inventadas. El polimorfismo generalmente puede ocurrir en respuesta a cambios en temperatura o presión o ambos y puede también ser resultado de variaciones en el proceso de cristalización. Los polimorfos pueden ser distinguidos por varias características físicas conocidas en la técnica, tales como patrones de difracción de rayos x, solubilidad, y punto de fusión.

20 A menos que se defina de otra manera, en todos los protocolos de administración descritos en la presente, el régimen de los compuestos administrados no tiene que comenzar con el inicio del tratamiento y terminar con el fin del tratamiento, solamente se requiere que el número de días consecutivos en los que ambos compuestos se administran y el número opcional de días consecutivos en las que se administra solo uno de los compuestos componentes, o el protocolo de administración indicado -que incluye la cantidad de compuesto administrado, ocurra 25 en algún punto durante el curso del tratamiento.

Como es utilizado en la presente el término "Compuesto C²" significa ---Compuesto C, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo---.

30 Como se usa aquí, se entenderá que el término "dosis de carga" significa una sola dosis o régimen de corta duración de un compuesto inhibidor de mTOR o Compuesto C², con una dosificación más alta que la dosis de mantenimiento administrada al sujeto, para aumentar rápidamente la concentración del fármaco en la sangre. Convenientemente, un régimen de corta duración para usarse en la presente será de: 1 a 14 días; convenientemente de 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente durante tres días; convenientemente durante dos días; convenientemente durante un día. En algunas realizaciones, la "dosis de carga" puede aumentar la concentración del fármaco en la sangre hasta un nivel terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la "dosis de carga" puede 35 aumentar la concentración del fármaco en la sangre a un nivel terapéuticamente eficaz en conjunto con una dosis de mantenimiento del fármaco. La "dosis de carga" se pueda administrar una vez al día o más de una vez al día (por ejemplo hasta 4 veces al día). Convenientemente, la "dosis de carga" se administrará una vez por día. Convenientemente, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces; convenientemente de 2 a 5 veces; convenientemente 2 veces; 40 convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente, la dosis de carga se administrará durante 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente por un día; convenientemente por 2 días; convenientemente por 3 días, seguidos por un protocolo de dosis de mantenimiento.

45 Como se usa aquí, se entenderá que el término "dosis de mantenimiento" significa una dosis que se administra en serie (por ejemplo, por lo menos dos veces) y que tiene la intención de elevar lentamente la concentración del compuesto en la sangre a un nivel terapéuticamente eficaz, o mantener dicho nivel terapéuticamente eficaz. La dosis de mantenimiento generalmente se administra una vez al día y la dosis diaria de mantenimiento es menor que la dosis diaria total de la dosis de carga.

Convenientemente, las combinaciones de esta invención se administran dentro de un "periodo especificado".

50 Por el término "periodo especificado" y los derivados del mismo, como es utilizado en la presente se entiende el intervalo de tiempo entre la administración de uno del compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² y el otro del compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C². A menos que se defina de otra manera, el periodo especificado puede incluir la administración simultánea. Cuando ambos compuestos de la invención son administrados una vez al día el periodo especificado se refiere a la programación de la administración del compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² durante un día único. Cuando uno o los dos compuestos de la invención se administran más de una vez al día, el periodo especificado se calcula basándose en la primera administración de cada compuesto en un día

especifico. Cuando se calcula el periodo específico no se consideran todas las administraciones de un compuesto de la invención que son subsiguientes a la primera durante un día específico.

- Convenientemente, si los compuestos no son administrados simultáneamente, los dos son administrados dentro de aproximadamente 24 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será aproximadamente 24 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 12 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será aproximadamente 12 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 11 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 11 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 10 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 9 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 9 horas; convenientemente los dos serán administrado dentro de aproximadamente 8 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 8 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 7 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 7 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 6 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 6 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 5 horas uno del otro – en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 5 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 4 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 4 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 3 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 3 horas; convenientemente serán administrados dentro de aproximadamente 2 horas uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 2 horas; convenientemente los dos serán administrados dentro de aproximadamente 1 hora uno del otro - en este caso, el periodo especificado será de aproximadamente 1 hora. Como es utilizado en la presente, la administración del compuesto inhibidor de mTOR y Compuesto C² en menos que aproximadamente 45 minutos de diferencia es considerada administración simultánea.
- Convenientemente, cuando la combinación de la invención es administrada por un "periodo especificado", los compuestos serán coadministrados por una "duración de tiempo".

Como se usa aquí, el término "duración de tiempo" y sus derivados, significa que los dos compuestos de la invención se administran dentro de un "periodo especificado" durante el número indicado de días consecutivos, seguidos opcionalmente por un número de días consecutivos en donde se administra solo uno de los compuestos componentes.

Con respecto a la administración en un "periodo especificado":

- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por un día - seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 1 día - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos dos días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 1 día, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por dos días - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 3 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 1 día, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 3 días - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 4 días; convenientemente, durante el curse del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 1 día, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 4 días - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 5 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 1 día, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 5 días - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 6 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 1 día, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 6 días - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 7 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 1 día, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 7 días - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 8 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 2 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 1 día - en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 3 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 2 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 2 días consecutivos- en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 4 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 2 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 3 días consecutivos- en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 5 días; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 2 días consecutivos, seguido

durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 14 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 7 días consecutivos- en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 21 días consecutivos; convenientemente, durante el curse del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por lo menos por 30 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por lo menos por 7 días consecutivos- en este caso, la duración de tiempo será por lo menos 37 días consecutivos; convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado 1 a 3 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo de 3 a 7 días consecutivos. Convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado 3 a 6 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo de 1 a 4 días consecutivos. Convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado por 5 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo por 2 días consecutivos. Convenientemente, durante el curso del tratamiento, ambos compuestos serán administrados dentro de un periodo especificado de 2 días consecutivos, seguido por la administración del compuesto inhibidor de mTOR solo de 3 a 7 días consecutivos.

Además, con respecto a la administración en un "periodo especificado":

Además, con respecto a la administración en un "periodo especificado":

60 Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado de 1 a 3 días sobre un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días el compuesto inhibidor de mTOR será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.

- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado de 1 a 3 días sobre un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el Compuesto C² será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado durante 3 días sobre un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el compuesto inhibidor de mTOR será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado durante 3 días sobre un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el Compuesto C² será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado durante 2 días sobre un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el compuesto inhibidor de mTOR será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado durante 2 días sobre un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el Compuesto C² será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado por 1 día durante un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el compuesto inhibidor de mTOR será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado por 1 día durante un periodo de 7 días, y durante los otros días del periodo de 7 días, el Compuesto C² será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 7 días se repite en 2 ciclos o por 14 días; convenientemente en 4 ciclos o 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado de 1 a 5 días sobre un periodo de 14 días, y durante los otros 14 días del periodo el compuesto inhibidor de mTOR será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 14 días se repite en 2 ciclos o por 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, durante el curso del tratamiento, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² serán administrados dentro de un periodo especificado de 1 a 5 días sobre un periodo de 14 días, y durante los otros días del periodo de 14 días, el Compuesto C² será administrado solo. Convenientemente, este protocolo de 14 días se repite en 2 ciclos o por 28 días; convenientemente en administración continua.
- Convenientemente, si los compuestos no se administran durante un "periodo especificado", se administran secuencialmente. Por el término "administración secuencial", y derivados del mismo, como es utilizado en la presente se entiende que uno de un compuesto inhibidor de mTOR y Compuesto C² es administrado por uno o más días consecutivos y el otro de un compuesto inhibidor de mTOR y Compuesto C² es administrado subsiguentemente por uno o más días consecutivos. También, en la presente se contempla un descanso del fármaco utilizado entre la administración secuencial de uno de un compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² y el otro del compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C². Como es utilizado en la presente, un descanso del fármaco es un periodo de días después de la administración secuencial de uno del compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² y antes de la administración del otro del compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C² donde ni el compuesto inhibidor de mTOR ni el Compuesto C² es administrado. Convenientemente, el descanso del fármaco será un periodo de días seleccionado de: 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días y 14 días.
- Con respecto a la administración secuencial:

Se entiende que un "periodo especificado" de administración y una administración "secuencial" pueden ir seguidas por dosificaciones repetidas, o pueden ir seguidas por un protocolo de dosis alternante, y que un intervalo de descanso puede preceder la dosificación repetida o el protocolo de dosis alternante.

5 Convenientemente, la cantidad de Compuesto C² administrada como parte de la combinación según la invención presente será una cantidad seleccionada de cerca de 0.125 mg a aproximadamente 10 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de cerca de 0.25 mg a aproximadamente 9 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de cerca de 0.25 mg a aproximadamente 8 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de cerca de 0.5 mg a aproximadamente 8 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de cerca de 0.5 mg a aproximadamente 7 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 7 mg; convenientemente, la cantidad será aproximadamente 5 mg. Por consiguiente, la cantidad de Compuesto C² administrada como parte de la combinación según la invención presente será una cantidad seleccionada de cerca de 0.125 mg a aproximadamente 10 mg. Por ejemplo, la cantidad de Compuesto C² administrada como parte de la combinación según la invención presente puede ser 0.125 mg, 0.25 mg, 0.5 mg, 0.75 mg, 1 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7 mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg, 10 mg. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto C² es administrada dos veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de Compuesto C² es administrada una vez al día. Convenientemente, la administración de Compuesto C² empezara como una dosis de carga. Convenientemente, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces; convenientemente de 2 a 5 veces; convenientemente 2 veces; convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente, la dosis de carga se administrará por 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente por 1 día; convenientemente por 2 días; convenientemente por 3 días, seguido por un protocolo de dosis de mantenimiento.

La cantidad de inhibidor de mTOR finalmente dependerá del agente particular utilizado.

25 Convenientemente, la cantidad de everolimus administrada como parte de la combinación según la invención presente será una cantidad seleccionada de aproximadamente 1.25mg a aproximadamente 20mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 15 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de aproximadamente 2.5 mg a aproximadamente 10 mg; convenientemente, la cantidad de everolimus administrada como parte de la combinación según la invención presente será una cantidad seleccionada de aproximadamente 1.25 mg a aproximadamente 20 mg. Por ejemplo, la cantidad de everolimus administrada como parte de la combinación según la invención presente puede ser 1.25 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7 mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg.

35 Convenientemente, la cantidad seleccionada de everolimus es administrada dos veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de everolimus es administrada una vez al día. Convenientemente, la administración de everolimus empezara como una dosis de carga. Convenientemente, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces; convenientemente de 2 a 5 veces; convenientemente 2 veces; convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente, la dosis de carga se administrará por 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente por 1 día; convenientemente por 2 días; convenientemente por 3 días, seguido por un protocolo de dosis de mantenimiento.

45 Convenientemente, la cantidad de temsirolimus administrada como parte de la combinación según la invención presente será una cantidad infundida por un periodo de 30 a 60 minutos, donde la cantidad es seleccionada de aproximadamente 5 mg a cerca de 50mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg; convenientemente, la cantidad será seleccionada de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg. En consecuencia, la cantidad de temsirolimus administrada como parte de la combinación según la invención presente será una cantidad seleccionada de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg. Por ejemplo, la cantidad de temsirolimus administrada como parte de la combinación según la invención presente puede ser 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 0 mg. Convenientemente, la cantidad seleccionada de temsirolimus es administrada dos veces al día. Convenientemente, la cantidad seleccionada de temsirolimus es administrada una vez al día. Convenientemente, la administración de temsirolimus empezara como una dosis de carga. Convenientemente, la dosis de carga será una cantidad de 2 a 100 veces la dosis de mantenimiento; convenientemente de 2 a 10 veces, convenientemente de 2 a 5 veces, convenientemente 2 veces; convenientemente 3 veces; convenientemente 4 veces; convenientemente 5 veces. Convenientemente la dosis de carga será administrada de 1 a 7 días; convenientemente de 1 a 5 días; convenientemente de 1 a 3 días; convenientemente por 1 día; convenientemente por 2 días; convenientemente por 3 días, seguido por un protocolo de dosis de mantenimiento.

55 Como es utilizado en la presente, todas las cantidades especificadas para un compuesto de las combinaciones actualmente inventadas, convenientemente el Compuesto C², son indicadas como la cantidad de compuesto libre o sin sal y sin solvatar.

Método de tratamiento

Se considera que las combinaciones de la invención tienen utilidad en trastornos donde la inhibición de MEK y/o mTOR es beneficiosa.

5 El método de la presente invención puede también ser empleado con otros métodos terapéuticos de tratamiento de cáncer.

10 La combinación de la invención puede ser utilizada sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. La invención así proporciona en un aspecto adicional una combinación adicional que comprende una combinación de la invención con un agente o agentes terapéuticos adicionales, composiciones y medicamentos que comprenden la combinación y uso de la combinación adicional, composiciones y medicamentos en terapia, en particular en el tratamiento de enfermedades susceptibles a la inhibición de MEK y/o mTOR.

15 En una realización, la combinación de la invención puede ser empleada con otros métodos terapéuticos de tratamiento de cáncer. En particular, en la terapia anti-neoplásica, terapia de combinación con otros quimioterapéuticos, hormonal, agentes de anticuerpos, así como tratamientos quirúrgicos y/o de radiación diferentes de esos mencionados antes son contemplados. Las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención entonces incluyen la administración del Compuesto C² y un compuesto inhibidor de mTOR así como el uso opcional de otros agentes terapéuticos incluyendo otros agentes anti-neoplásicos. Dicha combinación de agentes puede ser administrada conjuntamente por separado y, cuando se administra por separado esto puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden, ambas cerca o lejos en tiempo. En una realización, la combinación farmacéutica incluye el Compuesto C² y un compuesto inhibidor de mTOR, y opcionalmente por lo 20 menos un agente anti-neoplásico adicional.

25 Como se indicó, las cantidades terapéuticamente eficaces del Compuesto C² y un compuesto inhibidor de mTOR son discutidas en lo anterior. La cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes terapéuticos adicionales de la presente invención dependerá de un número de factores incluyendo, por ejemplo, la edad y peso del mamífero, la condición precisa que requiere tratamiento, la gravedad de la condición, la naturaleza de la formulación, y la ruta de administración. Finalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz estará a discreción del médico o veterinario responsable. Las programaciones relativas de la administración serán seleccionadas para lograr el efecto terapéutico combinado deseado.

En una realización, la terapia anti-cáncer adicional es quirúrgica y/o radioterapia.

En una realización, la terapia anti-cáncer adicional es por lo menos un agente anti-neoplásico adicional.

30 Cualquier agente anti-neoplásico que tiene actividad contra un tumor susceptible que es tratado puede utilizarse en la combinación. Agentes anti-neoplásicos típicos útiles incluyen, pero no se limitan a, agentes anti-microtúbulos como diterpenoides y alcaloides vinca; complejos de coordinación de platino; agentes de alquilación tales como mostazas de nitrógeno, oxazafosforinas, alquilsulfonatos, nitrosoureas, y triazenos, agentes antibióticos como antraciclinas, actinomicinas y bleomicinas; inhibidores de topoisomerasa II tal como epipodofilotoxinas, anti-metabolitos como análogos de purina y pirimidina y compuestos anti-folato; inhibidores de topoisomerasa I como camptotecinas; hormonas y análogos hormonales; inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores no receptores de angiogénesis de tirosina, agentes inmunoterapéuticos, agentes proapoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.

Agentes anti-microtúbulos o anti-micóticos

40 Los agentes anti-microtúbulos o anti-micóticos son agentes específicos de fase activas contra los microtúbulos de células de tumor durante la fase M o la mitosis del ciclo celular. Ejemplos de agentes anti-microtúbulos incluyen, pero no se limitan a, diterpenoides y alcaloides vinca.

45 Los diterpenoides que son derivados de fuentes naturales, son agentes anti-cáncer específicos de fase que operan en las fases G2/M del ciclo celular. Se cree que los diterpenoides estabilizan la subunidad β-tubulina de los microtúbulos, al unirse con esta proteína. El desensamblaje de la proteína parece ser inhibida entonces con la mitosis que es detenida sigue la muerte celular. Ejemplos de diterpenoides incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel y su análogo docetaxel.

50 Paclitaxel, 5β,20-epoxi-1,2α,4,7 β, 10 β, 13α -hexa-hidroxitax-11-en- 9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-ester con (2R,3S)-N-benzoil-3- fenilisoserina; es un producto natural diterpeno aislado del árbol tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* y está disponible comercialmente como una solución inyectable TAXOL®. Es un miembro de la familia del taxano de terpenos. El paclitaxel ha sido aprobado para uso clínico en el tratamiento de cáncer de ovario refractario en los Estados Unidos (Markman et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intern. Med., 111:273, 1989) y para el tratamiento del cáncer de mama (Holmes et al., J. Nat. Cancer Inst., 83: 1797, 1991.) Es un candidato potencial para tratamiento de neoplasias en la piel (Einzig et. al., Proc. Am. Soc. Clin.

Oneal., 20:46) y carcinomas de cabeza y cuello (Forastire et. al., Sem. Oneal., 20:56, 1990). El compuesto También muestra potencial para el tratamiento de enfermedad poliquística del riñón (Woo et. al., Nature, 368:750. 1994), cáncer de pulmón y malaria. El tratamiento de los pacientes con paclitaxel da como resultado supresión de médula ósea (Múltiple cell lineages, Ignoff, R.J. et. al, Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998) en relación con la duración de la dosificación por encima de una concentración umbral (50nM) (Kearns, C.M. et. al., Seminars in Oncology, 3(6) p.16-23, 1995).

5 Docetaxel, (2R,3S)- N-carboxi-3-fenilisoserina,N-ter -butil éster, 13-ester con 5 β -20-epoxi-1,2 α ,4,7 β , 1 α β ,13 α -hexahidroxita-11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, trihidrato; está disponible comercialmente como una solución inyectable como TAXOTERE®. El Docetaxel es indicado para el tratamiento de cáncer de mama. El Docetaxel es un derivado semisintético de paclitaxel q.v., preparado utilizando un precursor natural, 10-deacetil-baccatin III, extraído de las agujas del árbol Tejo Europeo.

10 Los alcaloides vincas son agentes anti-neoplásicos específicos de fase derivados de la planta vincapervinca. Los alcaloides vinca actúan en la fase M (mitosis) del ciclo celular al unirse específicamente a la tubulina. En consecuencia, la molécula de tubulina unida no es capaz de polimerizar en microtúbulos. Se cree que la mitosis es detenida en la metafase con la siguiente muerte celular. Ejemplos de alcaloides vinca incluyen, pero no se limitan a, vinblastina, vincristina, y vinorelbina.

15 Vinblastina, sulfato de vincaleucoblastina, está disponible comercialmente como VELBAN® como una solución inyectable. Aunque, tiene una posible indicación como una terapia de segunda línea de diversos tumores sólidos, es principalmente indicada en el tratamiento de cáncer testicular y diversos linfomas incluyendo enfermedad de 20 Hodgkin; e informas linfocíticos e histiocíticos. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la vinblastina.

25 Vincristina, vincaleucoblastina, 22-oxo-, sulfato, está disponible comercialmente como ONCOVIN® como una solución inyectable. La vincristina es indicada para el tratamiento de leucemias agudas y también ha encontrado utilidad en los regímenes de tratamiento de los linfomas malignos de Hodgkin y no de Hodgkin. Alopecia y efectos neurológicos son los efectos secundarios más comunes de la vincristina y en un menor grado la mielosupresión y pueden ocurrir efectos de mucositis gastrointestinal.

30 Vinorelbina, 3',4'-didehidro-4'-desoxi-C'-norvincalucoblastina [R- (R*,R*)-2,3-dihidroxibutanodioato (1:2)(sal)], comercialmente disponible como una solución inyectable de vinorelbina tartrato (NAVELBINE®}, es un alcaloide vinca semisintético. La vinorelbina es indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes 35 quimioterapéuticos, como cisplatina, en el tratamiento de diversos tumores sólidos, particularmente cánceres de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama avanzado, y de próstata refractario hormonal. La mielosupresión es el efecto secundario más común limitante de dosis de la vinorelbina.

Complejos de coordinación de platino

35 Los complejos de coordinación de platino son agentes anti- cáncer no específicos de fase, que son interactivos con ADN. Los complejos de coordinación de platino entran a las células de tumor, se someten a humectación y forman entrelazamientos intra y entre cadenas con el ADN causando efectos biológicos adversos al tumor. Ejemplos de complejos de coordinación de platino incluyen, pero no se limitan a, oxaliplatina, cisplatina y carboplatina.

40 Cisplatina, cis-diamindicloroplatino, está disponible comercialmente como PLATINOL® como una solución inyectable. La cisplatina es principalmente indicada en el tratamiento de cáncer testicular metastásico y de ovario y cáncer avanzado de vejiga.

45 Carboplatina, platino, diamina [1,1-ciclobutano-dicarboxilato(2-)-0,0'], está disponible comercialmente como PARAPLATIN® como una solución inyectable. La carboplatina es principalmente indicada en el tratamiento de primera y segunda línea de carcinoma avanzado de ovario.

Agentes alquilantes

50 Los agentes alquilantes son agentes anti-cáncer no específicos de fase y electrófilos fuertes. Típicamente, los agentes alquilantes forman enlaces covalentes, por alquilación, a ADN a través de unidades estructurales nucleofílicas de la molécula de ADN como grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo, e imidazol. Dicha alquilación interrumpe la función del ácido nucleico llevando a la muerte celular. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, mostazas de nitrógeno como ciclofosfamida, melfalan, y clorambucil; sulfonatos de alquilo como busulfan; nitrosoureas como carmustina; y triazenos como dacarbazine.

55 Ciclofosfamida, 2-[bis(2-cloroethyl)amino]tetrahidro-2H-1,3,2- oxazafosforina 2-óxido monohidrato, está comercialmente disponible como una solución inyectable o tabletas como CYTOXAN®. La ciclofosfamida es indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, en el tratamiento de linfomas malignos, mieloma Múltiple, y leucemias.

Melfalan, 4-[bis(2-cloroethyl)amino]-L-fenilalanina, está comercialmente disponible como una solución inyectable o tabletas como ALKERAN®. El melfalan es indicado para el tratamiento paliativo de mieloma Múltiple y carcinoma epitelial no resectable del ovario. La supresión de medula ósea es el efecto secundario limitante de dosis más común del melfalan.

- 5 Clorambucil, ácido 4-[bis(2-cloroethyl)amino]bencenobutanoico, está comercialmente disponible como LEUKERAN® tabletas. El Clorambucil es indicado para el tratamiento paliativo de leucemia linfática crónica, y linfomas malignos como linfosarcoma, linfoma folicular gigante, y enfermedad de Hodgkin.

Busulfan, 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, está comercialmente disponible como MYLERAN® tabletas. El Busulfan es indicado para el tratamiento paliativo de leucemia mielógena crónica.

- 10 Carmustina, 1,3-[bis(2-cloroethyl)-1-nitrosourea, está comercialmente disponible como frascos simples de material liofilizado como BiCNU®. La Carmustina es indicada para el tratamiento paliativo como un solo agente o en combinación con otros agentes para tumores de cerebro, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, y linfomas no de Hodgkin.

- 15 Dacarbazina, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida, está comercialmente disponible como frascos simples de material como DTIC- Dome®. La Dacarbazina es indicada para el tratamiento de melanoma maligno metastásico y en combinación con otros agentes para el tratamiento de segunda línea de la enfermedad de Hodgkin.

Antibióticos anti-neoplásicos

- 20 Los antibióticos anti-neoplásicos son agentes no específicos de fase, que se unen o intercalan con el ADN. Típicamente, tal acción resulta en complejos de AND estables o rompimiento de la cadena, lo que interrumpe la función ordinaria de los ácidos nucleicos llevando a la muerte celular. Ejemplos de agentes antibióticos anti-neoplásicos incluyen, pero no se limitan a, actinomicinas como dactinomicina, antrociclinas como daunorubicina y doxorubicina; y bleomicinas.

Dactinomicina, también conocida como Actinomicina D, está disponible comercialmente en forma inyectable como COSMEGEN®. La Dactinomicina es indicada para el tratamiento de tumor de Wilm y rhabdomiosarcoma.

- 25 Daunorubicina, clorhidrato de (8S-cis)-8-acetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9, 10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5, 12 naftacendiona, está disponible comercialmente como una forma liposomal inyectable como DAUNOXOME® o como un inyectable como CERUBIDINE®. La Daunorubicina es indicada para la inducción de remisión en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda y sarcoma de Kaposi avanzado asociado a VIH.

- 30 Doxorubicina, clorhidrato de (8S, 10S)-10-[(3-amino-2,3,6- trideoxi- α -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicololil, 7,8,9,10-tetrahidro-6,8, 11-trihidroxi-1-metoxi-5,12 naftacendiona, está disponible comercialmente como una forma inyectable como RUBEX® o ADRIAMYCIN RDF®. La Doxorubicina es principalmente indicada para el tratamiento de leucemia mieloblástica aguda, pero también es un componente útil en el tratamiento de algunos tumores sólidos y linfomas.

- 35 Bleomicina, una mezcla de antibióticos citotóxicos de glicopéptido aislados de una cepa de *Streptomyces verticillus*, está disponible comercialmente como BLENOXANE®. La Bleomicina es indicada como un tratamiento paliativo, como un agente solo o en combinación con otros agentes, de carcinoma de células escamosas, linfomas, y carcinoma testicular.

Inhibidores de Topoisomerasa II:

Los inhibidores de topoisomerasa II incluyen, pero no se limitan a, epipodofilotoxinas.

- 40 Las Epipodofilotoxinas son agentes anti-neoplásicos específicos de fase derivados de la planta mandrágora. Las Epipodofilotoxinas típicamente afectan las células en las fases S y G2 del ciclo celular al formar un complejo ternario con la topoisomerasa II y ADN causando que se rompa la cadena de ADN. Este rompimiento de cadena se acumula y sigue la muerte celular. Ejemplos de epipodofilotoxinass incluyen, pero no se limitan a, etopósido y tenipósido.

- 45 Etopósido, 4'-demetil-epi podofilotoxina 9[4,6-0-(R)-etiliden- β -D- glucopiranosido], está disponible comercialmente como una solución inyectable o como cápsulas como VePESIO® y es comúnmente conocido como VP-16. El Etopósido es indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de cánceres testicular y de pulmón de células no pequeñas.

- 50 Tenipósido, 4'-demetil-epipodofilotoxina 9[4,6-0-(R)-teniliden- β -D-glucopiranosido], está disponible comercialmente como una solución inyectable como VUMON® y es comúnmente conocido como VM-26. El Tenipósido es indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en leucemia aguda en niños.

Agentes neoplásicos antimetabolito:

Los agentes neoplásicos antimetabolito son agentes anti- neoplásicos específicos de fase que actúan en la fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular al inhibir la síntesis de ADN o al inhibir la síntesis de la base purina o pirimidina y así limitar la síntesis de ADN. En consecuencia, la fase S no procede y sigue la muerte celular. Ejemplos de agentes neoplásicos antimetabolito incluyen, pero no se limitan a, fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mecaptoperina, tioguanina, y gemcitabina.

5-fluorouracilo, 5-fluoro-2,4-(1H,3H) pirimidindiona, está disponible comercialmente como fluorouracilo. La administración de 5- fluorouracilo lleva a la inhibición de la síntesis de timidato y también es incorporado tanto en el ARN como el ADN. Normalmente el resultado es la muerte celular. El 5-fluorouracilo es indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de carcinomas de mama, colon, recto, estómago y páncreas. Otros análogos de fluoropirimidina incluyen 5-fluoro desoxiuridina (floxuridina) y 5-fluorodesoxiuridina monofosfato.

10 Citarabina, 4-amino-1-β-D-arabinofuranosil-2 (1H)-pirimidinona, está comercialmente disponible como CYTOSAR-U® y es comúnmente conocida como Ara-C. Se cree que la citarabina exhibe especificidad de fase celular en la fase S al inhibir el alargamiento de la cadena de ADN por la incorporación terminal de citarabina en la cadena de crecimiento de ADN. La Citarabina es indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de leucemia aguda. Otros análogos de citidina incluyen 5-azacitidina y 2',2'-difluorodeoxicitidina (gemcitabina).

15 Mercaptopurina, 1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona monohidrato, está disponible comercialmente como PURINETHOL®. La Mercaptopurina exhibe especificidad de fase celular en la fase S al inhibir la síntesis de ADN por un mecanismo aun no especificado. La Mercaptopurina es indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de leucemia aguda. Un análogo útil de mercaptopurina es azatioprina.

20 Tioguanina, 2-amino-1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona, está disponible comercialmente como TABLOID®. La Tioguanina exhibe especificidad de fase celular en la fase S al inhibir la síntesis de ADN por un mecanismo aún desconocido. La Tioguanina es indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de leucemia aguda. Otros análogos de purina incluyen pentostatina, eritrohidroxinoniladenina, fludarabina fosfato, y cladribina.

25 Gemcitabina, 2'-deoxi-2',2'-difluorocitidina monoclórrhidrato (β -isómero), está disponible comercialmente como GEMZAR®. La Gemcitabina exhibe especificidad de fase celular en la fase S y al bloquear la progresión de células per la barrera G1/S. La Gemcitabina es indicada en combinación con cisplatina en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado y solo en el tratamiento de cáncer pancreático localmente avanzado.

30 Metotrexato, ácido N-[4][(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino)benzoil]-L-glutámico, está disponible comercialmente como metotrexato sódico. El Metotrexato exhibe efectos en fase celular específicamente en la fase S al inhibir la síntesis de ADN, reparación y/o replicación por la inhibición del ácido dihidrofólico reductasa que es requerido para la síntesis de los nucleótidos purina y timidato. El Metotrexato es indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de coriocarcinoma, leucemia meningeal, linfoma no de Hodgkin, y carcinomas de mama, cabeza, cuello, ovario y vejiga.

Inhibidores de topoisomerasa I

35 Camptotecinas, incluyendo, camptotecina y derivados de camptotecina están disponibles o bajo desarrollo como inhibidores de Topoisomerasa I. La actividad citotóxica de las Camptotecinas se considera relacionada a su actividad inhibidora de Topoisomerasa I. Ejemplos de camptotecinas incluyen, pero no se limitan a irinotecan, topotecan, y las varias formas ópticas de 7-(4-metilpiperazino-metilen)-10, 11-etilendioxi-20- camptotecina descritas en lo siguiente.

40 Irinotecan HCl, clorhidrato de (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4- piperidinopiperidino) carbonilo]-1 H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin- 3,14(4H,12H)-diona, está disponible comercialmente como la solución inyectable CAMPTOSAR®. El Irinotecan es un derivado de la camptotecina que se une, junto con su metabolito activo SN-38, al complejo topoisomerasa I - ADN. Se cree que la citotoxicidad ocurre como resultado de rompimientos irreparables de la doble cadena causados por la interacción del complejo ternario topoisomerasa I : ADN: irinotecan o SN-38 con las enzimas de replicación. El Irinotecan es indicado para el tratamiento de cáncer metastásico del colon o recto.

45 Topotecan HCl, monoclorhidrato de (S)-10-[(dimetilamino)metil]- 4-etil-4,9-dihidroxi-1 H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3, 14-(4H,12H)- diona, está disponible comercialmente como la solución inyectable HYCAMTIN®. El Topotecan es un derivado de la camptotecina que se une al complejo topoisomerasa I - ADN y previene la religación de rompimientos de cadena sencilla causados por la Topoisomerasa I en respuesta al

esfuerzo de torsión de la molécula de ADN. El Topotecan es indicado para tratamiento de segunda línea del carcinoma metastásico del ovario y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Hormonas y análogos hormonales

- 5 Las hormonas y análogos hormonales son compuestos útiles en el tratamiento de cánceres en los que existe una relación entre la hormona(s) y el crecimiento y/o la falta de crecimiento del cáncer. Ejemplos de hormonas y análogos hormonales útiles en el tratamiento de cáncer incluyen, pero no se limitan a, adrenocorticosteroides como prednisona y prednisolona que son útiles en el tratamiento de linfoma maligno y leucemia maligna en niños; aminoglutetimida y otros inhibidores de aromatasa como anastrozol, letrozol, vorazol, y exemestano útiles en el tratamiento de carcinoma adrenocortical y carcinoma de mama dependiente de hormonas que contienen receptores de estrógeno; progestinas como acetato de megestrol útil en el tratamiento de cáncer de mama dependiente de hormonas y carcinoma endometrial; estrógenos, andrógenos, y anti-andrógeno como flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona y 5 α -reductasas como finasteride y dutasteride, útiles en el tratamiento de carcinoma prostático e hipertrofia prostática benigna; anti-estrógenos tales como tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, así como moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMS) tales como esos descritos en la Patente de EEUU Nos. 5,681,835, 5,877,219, y 6,207,716, útiles en el tratamiento de carcinoma de mama dependiente de hormonas y otros cánceres susceptibles; y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y análogos de los mismos que estimulan la liberación de la hormona leutinizante (LH) y/o la hormona de estimulación folicular (FSH) para el tratamiento de carcinoma prostático, por ejemplo, agonistas y antagonistas de LHRH como acetato de goserelina y luprolido.
- 10
- 15
- 20 Inhibidores de la ruta de transducción de señal

- Los inhibidores de la ruta de transducción de señal son esos inhibidores que bloquean o inhiben un proceso químico que evoca un cambio intracelular. Como es utilizado en la presente, este cambio es proliferación o diferenciación celular. Los inhibidores de transducción de señal útiles en la presente invención incluyen inhibidores del receptor de tirosina cinasas, no receptor de tirosina cinasas, bloqueadores del dominio SH2/SI3, serina/treonina cinasas, fosfatidil inositol-3 cinasas, señalización mio-inositol, y oncogenes Ras.
- 25

Varias proteínas tirosina cinasas catalizan la fosforilación de residuos específicos de tirosil en diversas proteínas implicadas en la regulación del crecimiento celular. Tales proteínas tirosina cinasas pueden ser ampliamente clasificadas como cinasas de receptor o de no receptor.

- 30 Las tirosina cinasas de receptor son proteínas de transmembrana que tienen un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio de transmembrana, y un dominio de tirosina cinasa. Las tirosina cinasas de receptor están implicadas en la regulación del crecimiento celular y en general son denominadas receptores de factor de crecimiento. La activación inadecuada o descontrolada de muchas de estas cinasas, es decir, actividad aberrante del receptor de factor de crecimiento de cinasa, por ejemplo por sobre-expresión o mutación, ha demostrado resultar en un crecimiento celular descontrolado. En consecuencia, la actividad aberrante de tales cinasas ha sido ligada al crecimiento de tejido maligno. En consecuencia, los inhibidores de tales cinasas pueden proporcionar métodos de tratamiento de cáncer. Los receptores del factor de crecimiento incluyen, por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr), erbB2, erbB4, ret, receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFr), tirosina cinasa con dominios de homología de factor de crecimiento epidermal y similar a inmunoglobulina (TIE-2), receptor del factor de crecimiento de insulina -I (IGFI), factor estimulante de colonia de macrófagos (cfms), BTK, ckit, cmet, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), receptores de Trk (TrkA, TrkB, y TrkC), receptores de efrin (eph), y el protooncogen RET. Muchos inhibidores de receptores de crecimiento están bajo desarrollo e incluyen antagonistas de ligando, anticuerpos, inhibidores de tirosina cinasa y oligonucleótidos anti-sentido. Los receptores del factor de crecimiento y agentes que inhiben la función del receptor del factor de crecimiento son descritos, por ejemplo, en Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, No. 2 February 1997; y Loftis, F. J. et al, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, Landres.
- 35
- 40
- 45

- 50 Las tirosina cinasas, que no son cinasas de receptor de factor de crecimiento son denominadas tirosina cinasas de no receptor. Las tirosina cinasas de no receptor útiles en la presente invención, que son dianas potenciales de fármaco anti-cáncer, incluyen cSrc, Lek, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (cinasa de adhesión Focal), tirosina cinasa de Brutons, y Bcr-Abl. Tales tirosina cinasas de no receptor y agentes que inhiben la función de la tirosina cinasa de no receptor son descritas en Sinh, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematology and Stem Cell Research 8 (5): 465 - 80; y Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404.

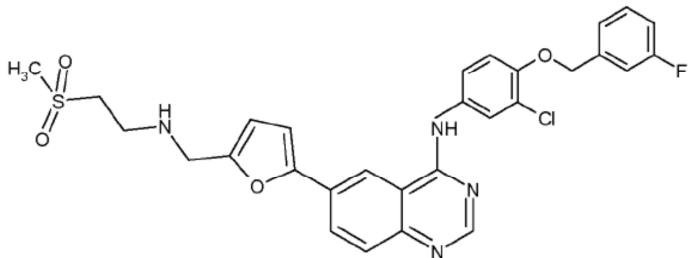
- 55 Los bloqueadores de dominio SH2/SI3 son agentes que interrumpen el dominio de unión SH2 o SI3 en una variedad de enzimas o proteínas adaptadoras incluyendo, subunidad PI3-K p85, familia de cinasas Src, moléculas adaptadoras (Shc, Crk, Nck, Grb2) y Ras-GAP. Los dominios SH2/SI3 como dianas para fármaco anti-cáncer son discutidos en Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125- 15 32.

- Los inhibidores de Serina/Treonina Cinasas incluyendo los bloqueadores de la cascada MAP cinasa que incluyen bloqueadores de Raf cinasas (rafk), Cinasa de Mitógeno o Regulada Extracelular (MEKs), y Cinasas Reguladas Extracelulares (ERKs); y bloqueadores de la familia de Proteína cinasa C incluyendo bloqueadores de PKCs (alfa, beta, gama, epsilon, mu, lambda, iota, zeta). Familia de I kB cinasa (IKKa, IKKb), familia de cinasas PKB, miembros de la familia akt cinasa, y cinasas de receptor beta TGF. Tales Serina/Treonina cinasas e inhibidores de las mismas son descritas en Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P, Samani, A., and Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60, 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A., and Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27, Lackey, K. et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; U.S. Patent No. 6,268,391; and Martinez-Iacaci, L., et al, Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52.
- 5 Los inhibidores de los miembros de la familia Fosfatidil inositol-3 Cinasa incluyendo bloqueadores de PI3-cinasa, ATM, DNA-PK, y Ku son también útiles en la presente invención. Tales cinasas son discutidas en Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29'(7):935-8; y Zhong, H. et al, Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545.
- 10 También útiles en la presente invención son los inhibidores de señalización de Mio-inositol como bloqueadores de fosfolipasa C y análogos de Mioinositol. Tales inhibidores de señal son descritos en Powis, G., and Kozikowski A., (1994) New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, Londres.
- 15 20 Otro grupo de inhibidores de la ruta de transducción de señal son los inhibidores de Oncogen Ras. Tales inhibidores incluyen inhibidores de farnesiltransferasa, geranil-geranilo transferasa, y CAAX proteasas así como oligonucleótidos anti-sentido, ribozimas e inmunoterapia. Tales inhibidores han mostrado bloquear la activación de ras en células que contienen ras mutante del tipo silvestre, actuando así como agentes antiproliferación. La inhibición de oncógeno Ras es discutida en Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4) 292-8; Ashby, M.N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99 - 102; y BioChim. Biophys. Acta, (19899) 1423(3):19-30.
- 25 30 Como se mencionó antes, las antagonistas de anticuerpos a la unión del ligando del receptor de cinasa puede también servir como inhibidores de la transducción de señal. Este grupo de inhibidores de la ruta de transducción de señal incluye el uso de anticuerpos humanizados al dominio de unión del ligando extracelular de tirosina cinasas de receptor. Por ejemplo, Imclone anticuerpo específico C225 EGFR (véase Green, M.C. et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4), 269-286); anticuerpo Herceptin ® erbB2 (véase Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183); y anticuerpo específico 2CB VEGFR2 (véase Brekken, R.A. et al, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124).
- 35 40 45 Agentes anti-angiogénicos:
- Los agentes anti-angiogénicos incluyendo inhibidores de angiogénesis de MEK de no receptor también pueden ser útiles. Los agentes anti-angiogénicos como esos que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo el anticuerpo anti-factor de crecimiento celular vascular endotelial bevacizumab [Avastin™], y compuestos que trabajan por otros mecanismos (por ejemplo linomido, inhibidores de la función avβ3 de la integrina, endostatina y angiostatina).
- Agentes inmunoterapéuticos
- Los agentes utilizados en regímenes inmunoterapéuticos también pueden ser útiles en combinación con los compuestos de formula (I). Los enfoques de inmunoterapia, incluyendo por ejemplo enfoques ex vivo e in vivo para aumentar la inmunogenicidad de células de tumor de pacientes, tal como transfección con citosinas como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonia de macrófago de granulocitos, se enfocan a reducir la energía de las células T, se enfocan utilizando células inmunes transfectadas como células dendríticas transfectadas de citosina, se enfocan utilizando líneas celulares de tumor transfectadas con citosina y se enfocan utilizando anticuerpos anti-idiotípicos.
- Agentes proapoptóticos
- 50 55 Los agentes utilizados en regímenes inmunoterapéticos también pueden ser útiles en combinación con los compuestos de fórmula (I). Los enfoques de inmunoterapia, incluyendo por ejemplo enfoques ex vivo e in vivo para aumentar la inmunogenicidad de células de tumor de pacientes, tal como transfección con citosinas como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonia de macrófago de granulocitos, se enfocan a reducir la energía de las células T, se enfocan utilizando células inmunes transfectadas como células dendríticas transfectadas de citosina, se enfocan utilizando líneas celulares de tumor transfectadas con citosina y se enfocan utilizando anticuerpos anti-idiotípicos.

Los agentes utilizados en los regímenes proapoptóticos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido bcl-2) también pueden ser utilizados en la combinación de la presente invención.

Inhibidores de la señalización del ciclo celular

- 5 Los inhibidores de señal del ciclo celular inhiben moléculas implicadas en el control del ciclo celular. Una familia de proteína cinasas denominada cinasas dependientes de ciclina (CDKs) y su interacción con una familia de proteínas denominada ciclinas controla la progresión a través del ciclo celular eucariótico. La activación y desactivación coordinada de diferentes complejos de ciclina/CDK es necesaria para la progresión normal a través del ciclo celular. Varios inhibidores de la señalización del ciclo celular están bajo desarrollo. Por ejemplo, ejemplos de cinasas dependientes de ciclina incluyendo CDK2, CDK4 y CDK6 e inhibidores de las mismos son descritos en, por ejemplo 10 Rosania et al, Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(2):215-230.
- 15 En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o solvato del mismo y por lo menos un agente anti-neoplásico seleccionado de agentes anti-microtúbulos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa I, hormonas y análogos hormonales, inhibidores de la ruta de transducción de señal, inhibidores de la angiogénesis de MEK de tirosina no de receptor, agentes inmunoterapéuticos, agentes proapoptóticos, e inhibidores de la señalización del ciclo celular.
- 20 En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o solvato del mismo y por lo menos un agente anti-neoplásico que es un agente anti-microtúbulos seleccionado de diterpenoides y alcaloides vinca.
- En una realización adicional, el por lo menos un agente anti- neoplásico es un diterpenoide.
- En una realización adicional, el por lo menos un agente anti- neoplásico es un alcaloide vinca.
- 25 En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o solvato del mismo y por lo menos un agente anti-neoplásico, que es un complejo de coordinación de platino.
- En una realización adicional, el por lo menos un agente anti- neoplásico es paclitaxel, carboplatina, o vinorelbina.
- En una realización adicional, el por lo menos un agente anti- neoplásico es carboplatina.
- En una realización adicional, el por lo menos un agente anti- neoplásico es vinorelbina.
- 30 En una realización adicional, el por lo menos un agente anti- neoplásico es paclitaxel.
- En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o solvato del mismo y por lo menos un agente anti-neoplásico que es un inhibidor de la transducción de señal.
- 35 En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señal es un inhibidor de una cinasa de receptor de factor de crecimiento VEGFR2, TIE2, PDGFR, BTK, erbB2, EGFr, IGFR-1, TrkA, TrkB, TrkC, o c-fms.
- En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señal es un inhibidor de serina/treonina cinasa rafk, akt, o PKG-zeta.
- 40 En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señales un inhibidor de una tirosina cinasa no de receptor seleccionado de la familia de cinasas src.
- En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señal es un inhibidor de c-src.
- En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señales es un inhibidor de oncogen Ras seleccionado de inhibidores de farnesil transferasa y geranilgeranilo.
- En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señal es un inhibidor de serina/treonina cinasa seleccionado del grupo que consiste de PI3K.
- En una realización adicional, el inhibidor de la transducción de señales es un inhibidor doble EGFr/erbB2, por ejemplo N-{3-Cloro-4-[{(3-fluorobencil) oxi]fenil}-6-[5-({[2-(metanosulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4- quinazolinamina (estructura siguiente):



En una realización, la combinación de la presente invención comprende un compuesto de fórmula I o una sal o solvato del mismo y por lo menos un agente anti-neoplásico que es un inhibidor de la señalización del ciclo celular.

En una realización adicional, el inhibidor de la señalización del ciclo celular es un inhibidor de CDK2, CDK4 o CDK6.

- 5 En una realización el mamífero en los métodos y usos de la presente invención es un humano.

Aunque es posible que, para uso en terapia, las cantidades terapéuticamente eficaces de las combinaciones de la presente invención sean administradas como la sustancia química en bruto, es preferible presentar las combinaciones como una composición o composiciones farmacéuticas. En consecuencia, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que incluyen el Compuesto C² y/o un compuesto inhibidor de mTOR, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las combinaciones de la presente invención son como se describieron antes. Los portadores deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación, capaces de formulación farmacéutica, y no dañinos para el recipiente de la misma. De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye mezclar un Compuesto C² y/o un compuesto inhibidor de mTOR con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Como se indicó antes, tales elementos de la combinación farmacéutica utilizados pueden presentarse en composiciones farmacéuticas separadas o formuladas juntas en una formulación farmacéutica.

20 Las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada del ingrediente activo por dosis unitaria. Como es conocido para los expertos en la materia, la cantidad del ingrediente activo por dosis dependerá de la afección tratada, la vía de administración y la edad, peso y condición del paciente. Las formulaciones de dosificaciones unitarias preferidas son las que contienen una dosis o subdosis diaria, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. Además, tales formulaciones farmacéuticas se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en las ciencias farmacéuticas.

25 El Compuesto C² y un compuesto inhibidor de mTOR pueden ser administrados por alguna ruta apropiada. Las rutas adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), vaginal y parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Se apreciará que la ruta preferida puede variar, por ejemplo, con la condición del receptor de la combinación y el cáncer por tratar. También será apreciado que cada uno de los agentes administrados puede ser administrado por las mismas rutas o diferentes y que el 30 Compuesto C² y un compuesto inhibidor de mTOR pueden ser compuestos en conjunto en una composición/formulación farmacéutica. Convenientemente, el compuesto inhibidor de mTOR y el Compuesto C son administrados en composiciones farmacéuticas, orales y separadas.

35 Los compuestos o combinaciones de la presente invención se incorporan en formas de dosificación convenientes, tales como cápsulas, tabletas o preparados inyectables. Se utilizan vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidratado, caolín, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesia y ácido esteárico. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuate, aceite de oliva, solución salina y agua. Similarmente, el vehículo puede incluir un material de liberación prolongada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera. La cantidad de vehículo sólido varía ampliamente pero preferiblemente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g por dosificación unitaria. Cuando se usa un vehículo líquido, el preparado estará convenientemente en forma de un jarabe, elixir, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril, tal como una ampolla, o una suspensión líquida acuosa o no acuosa.

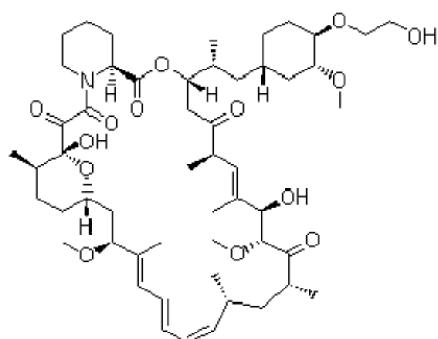
40 Por ejemplo para la administración oral en forma de una tableta o cápsula, el componente activo de fármaco puede ser combinado con un portador inerte, farmacéuticamente aceptable, no tóxico y oral como el etanol, el glicerol, el agua y similares. Los polvos se preparan moliendo el compuesto a un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico molido similarmente, tal como un carbohidrato comestible, tal como por ejemplo almidón o manitol. También pueden estar presentes agentes saborizantes, conservadores, dispersantes y colorantes.

Se debe entender que, además de los ingredientes anteriormente mencionados, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales tomando en cuenta el tipo de formulación en cuestión; por ejemplo, las que son adecuadas para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

- 5 Como se indicó, las cantidades terapéuticamente efectivas de las combinaciones de la invención (Compuesto C² en combinación con un compuesto inhibidor de mTOR) son administradas a un humano. Normalmente la cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes administrados de la presente invención dependerá de varios factores que incluyen, por ejemplo, la edad y peso del sujeto, la afección precisa que requiere tratamiento, la severidad de la afección, la naturaleza de la formulación y la vía de administración. Finalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz será a criterio del médico a cargo.
- 10 Las combinaciones de la presente invención se analizan para determinar su eficacia, ventajas y propiedades sinérgicas de acuerdo con los procedimientos conocidos.
- Convenientemente, las combinaciones de la invención son probadas para la eficacia, propiedades ventajosas y sinérgicas generalmente según los ensayos siguientes de proliferación de célula de combinación. Las células son colocadas en placas de 384 pozos a 500 células/pozo en medio de cultivo apropiado para cada tipo de célula, suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina, e incubadas por la noche a 37 °C, % de CO₂. Las células son tratadas en una manera a cuadricula con dilución del Compuesto A² (20 diluciones, sin incluir un compuesto, de diluciones de 2 veces que comienzan de 1-20 µM que depende del compuesto) de la izquierda a la derecha en el placa de 384 pozos y también tratadas con el Compuesto B² (20 diluciones, sin incluir un compuesto, de diluciones de 2 veces que comienzan de 1-20 µM que depende del compuesto) de la parte superior al fondo en la placa de 384 pozos e incubadas como en lo anterior por otras 72 horas. En algunos casos los compuestos se agregan de manera escalonada y el tiempo de incubación se puede prolongar hasta 7 días. El crecimiento celular se mide usando el reactivo CellTiter-Glo® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y las señales se leen en una lectora PerkinElmer EnVision™ puesta en modo de luminiscencia, con una lectura de 0.5 segundos. Los datos se analizan como se describe más abajo.
- 15
- 20
- 25 Los resultados se expresan como el porcentaje del valor de t=0 y se grafican contra la concentración del compuesto. El valor de t=0 se normaliza a 100% y representa el número de células presentes en el momento de la adición del compuesto. La respuesta celular es determinada para cada compuesto y/o combinación de compuestos que utilizan un ajuste de curva de 4- o 6 parámetros de la viabilidad celular contra la concentración utilizando el IDBS Xlfit enchufable para el software de Microsoft Excel y determinar la concentración requerida para el 50% de inhibición del crecimiento celular (IC₅₀). La corrección de fondo se hace por substracción de los valores de los pozos que no contienen células. Para cada combinación de fármaco se calcula un índice de Combinación (CI), Exceso Mas Alto Sobre el Agente Solo (EOHSA) y Exceso Sobre Bliss (EOBliss), de acuerdo con los métodos conocidos, como los descritos por Chou y Talalay (1984), Advances in Enzyme Regulation, 22, 37 a 55; y Berenbaum, MC (1981) Adv. Cancer Research, 35, 269-335.
- 30
- 35 Ensayo 1

En el ensayo 1, y correspondientes Figuras 1 y 2, el compuesto inhibidor de MEK utilizado es el Compuesto A, como se define en la presente, y el compuesto inhibidor de mTOR utilizado es everolimus, que tiene la estructura indicada a continuación y que es el Compuesto B en el ensayo 1.

Everolimus:



40

Inhibición de crecimiento celular *in vitro* e inducción de apoptosis por el compuesto A y el compuesto B (everolimus) en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón.

Métodos

Líneas celulares y condiciones de crecimiento

Líneas celulares de tumor humano, A427, A549, Calu1, Calu3, Calu6, COR-L23, HOP62, MV522, NCI-H1155, NCI-H1299, NCI-H1355, NCI-H1395, NCI-H157, NCI-H1573, NCI-H1666, NCI-1755, NCI-H1792, NCI-2009, NCI-H2030,

5 NCI-H2122, NCI-H2291, NCI-H23, NCI-H2347, NCI-H358, NCI-H441, NCI-H460, NCI-H650, NCI-H727, SW1573 y SW900 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 que contenía 10 % de suero bovino fetal (FBS). Los datos de mutación de la línea celular fueron colectados para el estado de los genes RAS y RAF. La fuente de datos son los datos de investigación de mutación de línea celular publicados como parte del Catálogo de Mutaciones Somáticas en la base de datos de Cáncer (COSMIC) (Bamford S. et al. Br. J. Cancer. 2004. 91:355-58) y/o en secuenciamiento de ADN local.

10 Ensayo de inhibición de crecimiento celular y análisis de datos de combinación

Las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos de cultivo de tejido (NUNC 136102) de medio RPMI contenido 10% de FBS para todas las células a 500-2,000 células por pozo. Aproximadamente 24 horas después de la colocación en placas, las células fueron expuestas a diez diluciones seriales de dos veces o tres veces del compuesto A o B o la combinación de los dos agentes en una proporción constante molar a molar de 10:1

15 (Compuestos A y B, respectivamente). El intervalo de concentración de dosificación final para el Compuesto A fue 2-1000 nM y fue 0.2-100 nM para el Compuesto B. Las células se incubaron en presencia de los compuestos durante 3 días. Los niveles de ATP se determinaron agregando Cell Titer Glo® (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se agregó a cada placa Cell Titer Glo®, se incubó 20 minutos y después se leyó la señal luminiscente en la lectora de placas SpectraMax L con un tiempo de integración de 0.5 segundos. Todos los

20 ensayos fueron ejecutados al menos por duplicado.

La inhibición del crecimiento celular se calculó después del tratamiento con el compuesto o combinación de compuestos durante tres días. y se comparó con la señal de células tratadas con vehículo (DMSO). El crecimiento celular se calculó con respecto a los pozos de control tratados con vehículo (DMSO). La concentración del compuesto que inhibe 50% del crecimiento celular de control (IC_{50}) fue retro-interpolada utilizando regresión no lineal cuando $y = 50\%$ con la ecuación:

$$y = \frac{A + (B - A)}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

donde A es la respuesta mínima (y_{min}), B es la respuesta máxima (y_{max}). C es el punto de inflexión de la curva (EC_{50}) y D es el coeficiente de Hill.

30 Los efectos de la combinación en la potencia fueron evaluados utilizando el Índice de Combinación (CI) que fue calculado con los valores de IC_{50} retro-interpolados y la ecuación mutuamente no exclusiva derivada por Chou y Talalay (Chou TC, Talalay P. Adv Enzyme Regul.1984;22:27-55):

$$CI = Da/IC_{50}(a) + Db/IC_{50}(b) + (Da \times Db)/(IC_{50}(a) \times IC_{50}(b))$$

35 donde el $IC_{50}(a)$ es el IC_{50} del Compuesto A; $IC_{50}(b)$ es el IC_{50} para el Compuesto B; Da es la concentración del Compuesto A en combinación con el Compuesto B que inhibió el 50 % del crecimiento celular; y Db es la concentración del Compuesto B en combinación con el Compuesto A que inhibió el 50% del crecimiento celular. En general, un valor de CI <0.9, entre 0.9 y 1.1, o >1.1 indica sinergia, aditividad y antagonismo, respectivamente. En general, mientras más pequeño sea el número de CI, mayor será la fuerza de la sinergia.

40 Los efectos de la combinación en la escala de respuesta fueron cuantificados por EOHSATD y Exceso Sobre Agente Único más Alto a la Dosis Total (EOHSATD). Este último basado en el concepto de mezcla no lineal como se describió en detalle (Peterson & Novick SJ. J Recept Signal Transduct Res 2007. 27:125-46; Peterson J. Frontiers of Bioscience S2, 483- 03. 2010). En este estudio los valores de EOHSATD se definen como incrementos en el mejoramiento (medidos como diferencia de "puntos de porcentaje" (ppts)), producidos por la combinación sobre el mejor agente solo a su nivel de dosis de componente y a la misma dosis total como para la combinación, respectivamente. Entonces EOHSATD es una medida de "sinergia" más fuerte que EOHSATD que compara la combinación en su dosis de componente (un solo fármaco) más que para la dosis total. Métodos específicos para calcular EOHSATD se describieron previamente. Para una combinación dada (a la dosis total D), la sinergia de EOHSATD es lograda si la respuesta media para la combinación a la dosis total D es significativamente mejor que cualquier fármaco a la dosis D o el fármaco 2 a la dosis D. Como para comparaciones con EOHSATD, las comparaciones de EOHSATD fueron realizadas ajustando las curvas de respuesta de dosis a proporción fija de

dosis y las curvas del componente solo. Las interacciones entre los Compuestos A y B son consideradas sinérgicas cuando EOHSATD > 0.

En este estudio, la coadministración de los Compuestos A y B exhibe una interacción sinérgica en una línea celular específica a la potencia o en la escala de respuesta, si el CI <0.9 o el EOHSATD >0 ppt.

5 Ensayo de apoptosis celular-activación de caspasa 3/7

Para la investigación de la inducción de apoptosis, las líneas celulares fueron colocadas en placas a 5,000 células por pozo en una placa de cultivo de tejido de 96 pozos y se dejó unir por aproximadamente 24 horas. Las células fueron luego tratadas con los compuestos como se describió antes. 24 horas después del tratamiento del compuesto, los niveles de-caspasa 3 y caspasa 7 activa fueron determinados con Caspase Glo™ 3/7 (Promega, cat G8093) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

10 Resultados

Efecto de la inhibición del crecimiento celular y apoptosis en líneas celulares de tumor de pulmón por la combinación de Compuesto A y Compuesto B

15 El efecto de la inhibición de crecimiento celular por un inhibidor de proteína activada por mitógeno/ERK-cinasa (MEK) Compuesto A, un inhibidor de mTOR Compuesto B (everolimus) y su combinación fue determinado en un panel de 29 líneas celulares de tumor de pulmón humano. Las IC₅₀ medias (de por lo menos dos experimentos independientes) y los efectos de combinación a los IC₅₀ se resumen en La Tabla 1 con el estado de mutación de RAS y RAF.

20 Haciendo referencia a la Tabla 1, 17 de 29 líneas mostraron sensibilidad al Compuesto A con los IC₅₀ < 100 nM, mientras 2 de 29 líneas fueron sensibles a everolimus (IC₅₀s < 100 nM). La combinación de Compuesto A y Compuesto B fue sinérgica con los valores de CI de 0.19 y 0.62 en las líneas A549 y H2122 respectivamente y con los valores de EOHSATD entre 4 y 25 ppts en 27 de 29 líneas. Además, la combinación de Compuesto A y Compuesto B también mostró mejora de la inhibición de crecimiento celular con valores de EOHSATD entre 5 y 40 ppts en las 29 líneas. Nota, los valores de CI no pudieron ser calculados por lo tanto no aplicaron cuando los valores de agente individual estuvieron fuera del intervalo probado. De interés, la administración combinada de Compuesto A y Compuesto B en las líneas de tumor de pulmón mostraron un efecto sinérgico demostrado por los valores de CI <0.9, y EOHSATD > 0, o resultó en valores mucho más reducidos de IC₅₀ (1-22 nM para el Compuesto A y 0.1-2 nM para el Compuesto B en 25 de 29 líneas) en comparación con el del Compuesto A o Compuesto B, administrado solo, donde por lo menos uno de los agentes solos no resultó en 50% de inhibición dentro de! intervalo probado. Las curvas representativas de respuesta a dosis de la inhibición del crecimiento celular por los agentes solos Compuesto A y Compuesto B y su combinación se muestran para las líneas celulares A427, A549, Calu6 y H2122 en la Figura 1.

25 Estas líneas celulares de tumor de pulmón fueron evaluadas por la capacidad del Compuesto A, Compuesto B o la combinación de Compuesto A y Compuesto B para inducir apoptosis como se determina por las actividades de caspasa 3/7. La activación de caspasa 3 es una marca de inducción de apoptosis. Las líneas celulares A427, A549, Calu6, H2122, H1755, H2347, H727 y SW900 mostraron mejora de apoptosis por tratamiento combinado con el Compuesto A y Compuesto B con relación a tratamiento con agente solo de Compuesto A o Compuesto B. Las curvas representativas de actividad de caspasa 3/7 para las líneas celulares A427, A549, Calu6 y H2122 se proporcionan en la Figura 2.

Tabla 1. Inhibición de crecimiento celular por el Compuesto A, Compuesto B y su combinación en líneas celulares de tumor de pulmón humano

Líneas celulares	Estado de mutación RAS/RAF	Valores IC ₅₀ en micromolar (media std)				Efectos de combinación a IC ₅₀	
		Agente solo		Combinación A:B = relación molar 10:1		EOHSAT D (ppt)	EOHSA (ppt)
		Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B		
MV522	BRAF_V600E	0.001 ± 0.000	>0.1	0.001 ± 0.000	0.0001 ± 0.0000	NA	5 ± 1
NCI-H727	KRAS_G12V	0.003 ± 0.001	>0.1	0.002 ± 0.000	0.0002 ± 0.0000	9 ± 8	12 ± 8
NCI-H650	KRAS_Q61L	0.004 ± 0.002	>0.1	0.002 ± 0.001	0.0002 ± 0.0001	20 ± 0	23 ± 0
NCI-H2291	KRAS_G12F	0.004 ± 0.000	>0.1	0.002 ± 0.001	0.0002 ± 0.0001	11 ± 5	14 ± 5
NCI-H2122*	KRAS_G12C	0.005 ± 0.001	0.097 ± 0.037	0.003 ± 0.000	0.0003 ± 0.0000	13 ± 5	15 ± 5
Calu6	KRAS_Q61K	0.005 ± 0.000	>0.1	0.003 ± 0.001	0.0003 ± 0.0001	9 ± 3	11 ± 3
NCI-H2347	RAS_H,N,Q61R	0.007 ± 0.002	>0.1	0.002 ± 0.000	0.0002 ± 0.0000	10 ± 4	17 ± 4
NCI-H23	KRAS_G12C	0.031 ± 0.002	>0.1	0.005 ± 0.001	0.0005 ± 0.0001	18 ± 4	18 ± 2
NCI-H358	KRAS_G12C	0.031 ± 0.010	>0.1	0.008 ± 0.001	0.0008 ± 0.0001	16 ± 0	18 ± 2
A549*	KRAS_G12S	0.032 ± 0.009	0.003 ± 0.003	0.002 ± 0.000	0.0002 ± 0.0000	NA	14 ± 27
NCI-H460	KRAS_Q61H	0.037 ± 0.011	>0.07	0.002 ± 0.002	0.0002 ± 0.0002	5 ± 3	40 ± 4
NCI-H 1666	BRAF_G466V	0.044 ± 0.046	>0.1	0.014 ± 0.008	0.0014 60.0008	8 ± 5	10 ± 2
NCI-H 1755	BRAF_G469A	0.045 ± 0.006	>0.1	0.006 ± 0.000	0.0006 ± 0.0000	11 ± 0	22 ± 3
NCI-H 1792	KRAS_G12C	0.059 ± 0.023	>0.1	0.014 ± 0.002	0.0014 ± 0.0002	13 ± 1	15 ± 2
NCI-H 1355	KRAS_G13C	0.067 ± 0.024	>0.1	0.004 ± 0.000	0.0004 ± 0.0000	7 ± 2	16 ± 5
NCI-H 1573	KRAS_G12A	0.082 ± 0.011	>0.1	0.012 ± 0.003	0.0012 ± 0.0003	14 ± 5	15 ± 6
A427	KRAS_G12D	0.095 ± 0.068	>0.1	0.005 ± 0.001	0.0005 ± 0.0001	22 ± 5	23 ± 4
SW900	KRAS_G12V	0.141 ± 0.002	>0.1	0.022 ± 0.002	0.0022 ± 0.0002	20 ± 5	20 ± 2
NCI-H2009	KRAS_G12A	0.204 ± 0.078	>0.1	0.020 ± 0.003	0.0020 ± 0.0003	21 ± 7	21 ± 1
NCI-H 1299	NRAS_Q61K	0.277 ± 0.092	>0.1	0.015 ± 0.002	0.0015 ± 0.0002	16 ± 1	17 ± 2
CORL23	KRAS_G12V	0.989 ± 0.086	>0.1	0.019 ± 0.008	0.0019 60.0008	12 ± 5	12 617
NCI-H2030	KRAS_G12C	>1	>0.01	0.006 ± 0.001	0.0006 ± 0.0001	4 ± 3	14 ± 2
NCI-H 157	KRAS_G12R	>1	>0.1	0.006 ± 0.000	0.0006 ± 0.0000	12 ± 3	16 ± 1
NCI-H 1155	KRAS_Q61H	>1	>0.1	0.012 ± 0.001	0.0012 ± 0.0001	15 ± 1	21 ± 6

Líneas celulares	Estado de mutación RAS/RAF	Valores IC ₅₀ en micromolar (media std)				Efectos de combinación a IC ₅₀	
		Agente solo		Combinación A:B = relación molar 10:1			
		Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B		
HOP62	KRAS_G12C	>1	>0.1	0.014 ± 0.004	0.0014 ± 0.0004	25 ± 3	
NCI-H1395	BRAF_G469A	>1	>0.1	0.085 ± 0.075	0.0085 ± 0.0075	14 ± 8	
NCI-H441	KRAS_G12V	>1	>0.1	0.177 ± 0.073	0.0177 ± 0.0073	14 ± #	
SW1573	KRAS_G12C	>1	>0.1	0.255 ± 0.350	0.0255 ± 0.0350	20 ± #	
Calu1	KRAS_G12C	>1	>0.1	0.890 ± 1.226	0.0890 ± 0.1226	21 ± 5	
Total:							

Tabla clave:

IC₅₀: la concentración del Compuesto que reduce el crecimiento celular por 50%;
 *valores de índice de combinación (CI), CI en H2122 = 0.62 ± 0.11; CI en A549 = 0.19 ± 0.11

* NA = no logrado

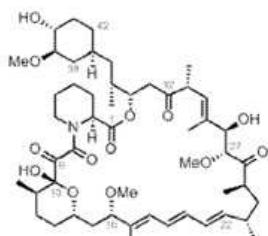
EOHSATD: Exceso sobre valor más alto de agente solo a la dosis total, medido como un porcentaje

EOHSA: Exceso sobre valor más alto de agente solo, medido como un porcentaje.

Ensayo 2

En el Ensayo 2 el compuesto inhibidor de MEK utilizado como Compuesto A, como se define en la presente, y el compuesto inhibidor de mTOR utilizado es Rapamicina, que tienen la estructura indicada a continuación.

- 5 Rapamicina:



Rapamicina

Combinación de inhibidores de MEK (Compuesto A) y mTOR (Rapamicina) en líneas celulares de cáncer

- 95 líneas celulares de cáncer fueron tratadas con inhibidor de MEK (Compuesto A) o inhibidor de mTOR (mTORi, Rapamicina) solo o en combinación con ambos agentes a una relación de 1:2 (MEKi:mTORi) y la proliferación/muerte celular fue medida después de 3 días de exposición al fármaco. Brevemente, las células fueron colocadas en placas de 384 pozos a 500 células/pozo en medio de cultivo adecuado para cada tipo celular, suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina, e incubado durante la noche a 37°C, 5% CO₂. Las células fueron tratadas con inhibidor de MEK (diluciones a dos veces variando de 7.3 uM- 0.014 nM) o con inhibidor de mTOR (diluciones a dos veces variando de 14.6 uM - 0.112 nM) o en combinación con ambos compuestos e incubado por 72 horas. El crecimiento celular fue medido utilizando el reactivo CellTiterGlo (CTG) (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los datos fueron analizados utilizando la herramienta Xlfit (IDBS Ltd.) de ajuste de curvas para Microsoft Excel. Los valores de crecimiento IC₅₀ (glC₅₀) y Ymin fueron generados utilizando un algoritmo de ajuste de curvas de cuatro parámetros (XLFit algorithm #205).
- 10 Los resultados fueron expresados como un porcentaje de t=0 y graficado contra la concentración del compuesto. El valor T=0 es normalizado a 100% y representa el número de células al momento de adición del compuesto. La respuesta celular fue determinada para cada compuesto al ajustar la respuesta a la concentración con un ajuste de curva de 4 o 6 parámetros utilizando el software Xlfit y determinando la concentración que inhibió el 50% del crecimiento celular (glC₅₀) así como el mínima valor de Y (Ymin) a cualquier concentración del compuesto. La fórmula siguiente fue utilizada para calcular el índice de combinación mutuamente exclusivo (CI). Los datos fueron reportados como logCI, donde el valor de logaritmo de CI fue calculado.
- 15 20 25

$$CI = IC_{50} \text{ de } a+b / IC_{50} \text{ de } a + IC_{50} \text{ de } b+a / IC_{50} \text{ de } b$$

Donde a=MEKi y b=mTORi

- 30 Sinergia se define como CI<1, aditivamente como CI=1 y antagonismo como CI>1. Considerando la variabilidad de estos ensayos de proliferación arbitrariamente se definió logCI>0.1 como antagonismo, entre - 0.1 y 0.1 como ningún efecto significativo y <-0.1 como sinergia.

- 35 40 Los análisis de glC₅₀ demostraron que para la mayoría de las líneas celulares, la combinación de ambos inhibidores es beneficiosa, reduciendo el glC₅₀ medido en comparación con el de cada inhibidor solo. El IC₅₀ de crecimiento (glC₅₀) de los inhibidores de MEK y mTOR solo y en combinación contra líneas celulares de cáncer con gráficamente representados en la Figura 3. Para la representación gráfica, un glC₅₀>7.3uM para MEKi y >14.6uM para mTORi fueron graficados como 7.3uM y 14.6 uM, respectivamente. El índice de combinación (CI) fue calculado como se describió antes y sus valores logarítmicos son graficados y representados en la Figura 4. Estos datos demuestran que la combinación entre MEKi y mTORi fue sinérgica en la mayoría de las líneas celulares probadas (74/95 líneas celulares, 77.9%), mientras esta combinación fue antagonista en pocas líneas celulares probadas (8/95 líneas celulares, 8.4%).
- La figura 5 demuestra que para algunas líneas celulares, mientras la combinación de inhibidor de MEK y mTOR afecta ligeramente el glC₅₀, la diferencia principal observada cae en la Ymin (máxima inhibición observada), definida como el menor valor de Y a cualquier concentración de compuesto. En este ejemplo, la Ymin del inhibidor de mTOR

solo, el inhibidor de MEK solo y la combinación de ambos fármacos son 487%, 257% y -73% respectivamente. Un análisis similar fue realizado para todas las líneas celulares y los resultados de Y_{min} se describen en la Figura 6. Estos datos demuestran que la combinación de ambos fármacos causó un mayor porcentaje de células experimentando la muerte (debajo de la línea azul, citotóxico, 44.2%) que cada fármaco solo ($mTORi= 9.5\%$ y $MEKi= 20\%$).

Un análisis similar fue realizado al agrupar las células por estado mutacional con base en el KRAS y PI3K. Los datos representados en la Tabla 2 demuestran que el $mTORi$ solo causa la muerte celular (citotóxico) solo en un pequeño subconjunto de población probada de línea celular de cáncer, independiente del estado mutacional de KRAS o PI3K. Sin embargo, mientras el $MEKi$ es causante de la muerte de un número considerable de líneas celulares independiente del estado de KRAS (>20%), demostró menor actividad contra PI3K mutante en comparación a las líneas celulares PI3K de tipo silvestre (WT). La combinación de ambos fármacos es activa en más líneas celulares en todos los subgrupos mutacionales, en comparación con el agente solo.

Tabla 2: Porcentaje de líneas celulares de cáncer tratadas con combinación de inhibidores MEK y $mTOR$ experimentando muerte con base en el estado mutacional de KRAS y PI3K

% de células con respuesta citotóxica				
	KRAS TS	KRAS mutante	PI3K TS	PI3K mutante
$mTORi$ solo	10	8	8	12
$MEKi$ solo	23	21	29	4
$mTORi + MEKi$	45	46	51	25

El análisis de la capacidad de cada compuesto solo o en combinación para causar la muerte celular con base en el estado mutacional de KRAS y PI3K es simultáneamente descrito en La Tabla 3. Mientras $mTORi$ como un solo agente causó la muerte de pocas líneas celulares (:511%), el $MEKi$ solo, indujo la muerte celular en 30% de las líneas celulares con el genotipo KRAS mutante/PI3K TS. La combinación de ambos agentes, además de ser superior al número total de líneas celulares que experimentan muerte, es activo no solo contra la población de KRAS mutante/PI3K TS sino en células con KRAS tipo silvestre, así como células que codifican un PI3K mutante.

Tabla 3: Porcentaje de líneas celulares de cáncer tratadas con combinación de inhibidores MEK y $mTOR$ experimentando muerte con base en el estado mutacional de KRAS y PI3K

% de células con respuesta citotóxica			
		PI3K TS	PI3K mutante
$mTORi$	KRAS TS	10	5
	KRAS mutante	11	6
$MEKi$	KRAS TS	7	6
	KRAS mutante	30	0
Combo	KRAS TS	50	33
	KRAS mutante	46	0

En resumen, la combinación de $MEKi$ y $mTORi$ es ventajosa en reducir la concentración de cada compuesto para causar un 50% de inhibición de crecimiento, resultando en un efecto sinérgico en 77.9% de las líneas celulares de cáncer probadas. Además, esta combinación causó muerte celular, medida por el valor de Y_{min} en comparación con el número inicial de células en $T=0$, en más líneas celulares de cáncer que cada agente solo. La combinación de estos agentes mostró ser ventajosa en líneas celulares de cáncer KRAS TS independientes del estado mutacional de PI3K y en líneas celulares de KRAS mutante con PI3K de tipo silvestre.

Como las combinaciones de la presente invención son activas en las pruebas anteriores, presentan utilidad terapéutica ventajosa en el tratamiento del cáncer.

Convenientemente, la invención presente se relaciona a un método para tratar o disminuir la severidad de un cáncer seleccionado de: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, la enfermedad de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos, mama, cáncer de mama inflamatorio, el tumor de Wilm, el sarcoma de Ewing, Rabdomiosarcoma, ependimoma, meduloblastoma, colon, cabeza y cuello,

riñón, pulmón, hígado, el melanoma, ovárico, pancreático, de próstata, el sarcoma, osteosarcoma, tumor de células gigantes de huesos, de tiroides.

5 La leucemia linfoblástica de células T, leucemia mielógena Crónica, leucemia linfocítica Crónica, leucemia de Células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia neutrofílica Crónica, leucemia linfoblástica Aguda de células T, Plasmacitoma, leucemia inmunoblástica de células grandes, leucemia de células de manto, leucemia de mieloma Múltiple Megacarioblástica, mieloma múltiple, leucemia aguda megacariocítica, leucemia promielocítica, Eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de hodgkins, linfoma no de Hodgkins, linfoma linfoblástico de células T, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, Neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, cáncer vulvar, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer renal, mesotelioma, cáncer esofágico, cáncer de glándula salival, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo, cáncer bucal, el cáncer de la boca, el GIST (tumor gastrointestinal estromal) y cáncer testicular.

10 Convenientemente, la invención presente se relaciona a un método para tratar o disminuir la severidad de un cáncer seleccionado de: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, la enfermedad de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos, mama, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, hígado, melanoma, ovárico, pancreático, de próstata, el sarcoma y de tiroides.

15 Convenientemente, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o disminución de la severidad de un cáncer seleccionado de ovárico, mama, pancreático y de la próstata.

20 Convenientemente, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o disminución de la severidad de un cáncer que es ya sea de tipo silvestre o mutante para Ras/Raf y cualquiera de tipo silvestre o mutante para PI3K/Pten. Esto incluye pacientes de tipo silvestre para Ras/Raf y PI3K/PTEN, mutante o para Ras/Raf y PI3K/PTEN, mutante para Ras/Raf y tipo silvestre para PI3K/PTEN y tipo silvestre para Ras/Raf y mutante para PI3K/PTEN.

25 En una realización, la célula tumoral tiene por lo menos una mutación Braf, la mutación Brat incluye: R462I, I463S, G464V, G464E, G466A, G466E, G466V, G469A, G469E, D594V, F595L, G596R, L597V, L597R, T599I, V600E, V600D, V600K, V600R, T119S, y K601 E.

30 El término "tipo silvestre" como se entiende en la técnica, se refiere a una secuencia de polipéptido o polinucleótido que ocurre en una población nativa sin modificación genética. también se entiende que un "mutante" incluye una secuencia de polipéptido o polinucleótido que tiene por lo menos una modificación de un aminoácido o ácido nucleico en comparación con el aminoácido o ácido nucleico correspondiente encontrado en un polipéptido o polinucleótido de tipo silvestre, respectivamente. En el término mutante se incluye el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en donde existe una distinción de un solo par de bases en la secuencia de una cadena de ácido nucleico, en comparación con la cadena de ácido nucleico encontrado más predominantemente (de tipo silvestre).

35 El cáncer que es de tipo silvestre o mutante para Ras/Raf y de tipo silvestre o mutante para PI3K/Pten se identifica mediante los métodos conocidos.

40 Por ejemplo, las células de tumor de Ras/Raf o PI3K/PTEN de tipo silvestre o mutante se pueden identificar por medio de técnicas de amplificación de ADN y secuenciación, técnicas de detección de ADN y ARN que incluyen, sin limitación, transferencia Northern y Southern, respectivamente, y/o diversas técnicas de biochip y arreglo. Los polipéptidos de tipo silvestre y mutantes se pueden detectar mediante una variedad de técnicas que incluyen, sin limitación, técnicas inmunodiagnósticas tales como ELISA, transferencia Western o inmunocitoquímica.

45 La mutación en la línea germinal en serina/treonina cinasa 11 (STK11, también denominada LKB1) resulta en el síndrome de Peutz-Jeghers, caracterizado por hamartomas intestinales e incidencia creciente de cánceres epiteliales. (Hongbin, et al. *Nature* (2007) 448:807-810 y Hearle, et al., *Clin. Cancer Res.* (2006) 12:3209-3215). Las mutaciones somáticas de LKB1 han sido reportadas en algunos adenocarcinomas primarios de pulmón humano y han mostrado modular la diferenciación y metástasis celular en cáncer de pulmón mutado en Kras (Hongbin, et al.).

50 Como es utilizado en la presente "LKB1" es sinónimo con Serina/treonina Cinasa 11 (STK11). El gen humano LKB (símbolo oficial HUGO, STK11) codifica la serina/treonina proteína cinasa que está defectuosa en pacientes con síndrome de Peutz-Jeghers (PJS). PJS es un síndrome autosómico dominante heredado caracterizado por poliposis hamartomatosa del tracto gastrointestinal y pigmentación mucocutánea. A la fecha, 145 diferentes líneas germinales de mutaciones de LKB1 han sido reportadas. La mayoría de las mutaciones llevan a un producto truncado de proteína. Ha sido observado un punto principal mutacional. Una delección de 1-bp y una inserción de 1-bp en la repetición de mononucleótico (repetición de C6, c.837-c.842) entre los codones 279-281 ha sido encontrada en seis y siete familias no relacionadas de PJS, respectivamente. Sin embargo, estas mutaciones cuentan solo para aproximadamente 7% de todas las mutaciones identificadas en las familias de PJS (13/193). Una revisión de la literatura proporciona un total de 40 diferentes mutaciones somáticas de LKB1 en 41 tumores esporádicos y siete líneas celulares de cáncer. Las mutaciones ocurren particularmente en cáncer de pulmón y colorrectal. La mayoría de las mutaciones somáticas de LKB1 resultan en un truncamiento de la proteína. Un punto principal de mutación

parece ser una repetición de C6 que cuenta para 12.5% de todas las mutaciones somáticas (6/48). Estos resultados coinciden con el espectro de mutación de línea germinal. Sin embargo, la proporción de las mutaciones sin sentido parece ser mayor entre las mutaciones somáticas (45%) que entre las mutaciones de línea germinal (21%), y solo siete de las mutaciones son exactamente igual en ambos tipos de mutación. Hum Mutat 26(4), 291-297, 2005.

5 Launonen. *Human Mutation*. 26(4), 291-297, 2005.

El término "proteína Ras" como es utilizado en la presente significa cualquier proteína que es miembro de la subfamilia ras que es una subfamilia de GTPasas implicada en la señalización celular. Como es sabido en la técnica, la activación de Ras causa crecimiento celular, diferenciación y sobrevivencia. Las proteínas Ras incluyen, pero no se limitan a, H-ras, K-ras y N-ras.

- 10 En un aspecto, las células de tumor tienen por lo menos una mutación en por lo menos una proteína Ras o gen que codifica por lo menos una proteína Ras que está en K-ras, N-ras o H-ras. Una mutación Ras en por lo menos un gen que codifica una proteína Ras puede estar en el exón 2 y/o 3. En algunos casos, un gen que codifica por lo menos una proteína Ras tiene una mutación en por lo menos un codón ras seleccionado de: codón 12, 13, 14, 60, 74 y 76. En algunas realizaciones, una mutación Ras es seleccionada de: G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G12R, G13A, G13D, V14I, G60E, T74P, E76G, E76K y E76Q.

15 Las células de tumor tienen una mutación, delección o inserción en LKB1. Por lo menos una mutación sin sentido en LKB1 puede ser seleccionada de: 581A>T que causa cambio en aminoácido D194V; 842C>T que causa cambio en aminoácido P281L; 595G>C que causa cambio en aminoácido E199Q; 1062C>G que causa cambio en aminoácido F354L; 521A>G que causa cambio en aminoácido H174R; 526G>T que causa cambio en aminoácido D176Y; 580G>T que causa cambio en aminoácido D194Y; 580G>A que causa cambio en aminoácido D194N; 166G>T que causa cambio en aminoácido G56W; 167G>T que causa cambio en aminoácido G56V; 587G>T que causa cambio en aminoácido G196Y; 232A>G que causa cambio en aminoácido K78E; 724G>C que causa cambio en aminoácido G242R; 725G>T que causa cambio en aminoácido G242V; 709G>T que causa cambio en aminoácido D237Y; 910C>G que causa cambio en aminoácido R304G; 829G>T que causa cambio en aminoácido D277Y; 923G>T que causa cambio en aminoácido W308L; 854T>A que causa cambio en aminoácido L285Q; 1225C>T que causa cambio en aminoácido R409W; 256C>G que causa cambio en aminoácido R86G; 1062C>G que causa cambio en aminoácido F354L; 816C>T que causa cambio en aminoácido Y272Y; 487G>T que causa cambio en aminoácido G163C; 368A>G que causa cambio en aminoácido Q123R y/o 1276C>T que causa cambio en aminoácido R426W.

20 En otra realización, por lo menos una mutación sin sentido en LKB1 es seleccionada de: 109C>T que causa cambio en aminoácido Q37X; 508C>T que causa cambio en aminoácido Q170X; 206C>A que causa cambio en aminoácido S69X; 358G>T que causa cambio en aminoácido E120X; 180C>G que causa cambio en aminoácido Y60X; 180C>A que causa cambio en aminoácido Y60X; 595G>T que causa cambio en aminoácido E199X; 409C>T que causa cambio en aminoácido Q137X; 493G>T que causa cambio en aminoácido E165X; 571A>T que causa cambio en aminoácido K191X; 658C>T que causa cambio en aminoácido Q220X; 193G>T que causa cambio en aminoácido E05X; 130A>T que causa cambio en aminoácido K44X; 630C>A que causa cambio en aminoácido C210X; 667G>T que causa cambio en aminoácido E223X; 208G>T que causa cambio en aminoácido E70X; 996G>A que causa cambio en aminoácido W332X; 949G>T que causa cambio en aminoácido E317X; 996G>A que causa cambio en aminoácido W332X; 658C>T que causa cambio en aminoácido Q220X y/o 475C>T que causa cambio en aminoácido Q159X.

25 30 35 40 45 50 En otra realización, por lo menos uno de delección, inserción, sustitución o mutación compleja en LKB1 es seleccionado de: 120_130del11; 153delG; 126_149del24; 291_464del174; 291_597del307; 465_597del133; 842delC; 735_862del128; 166_178del13; 431delC; 579delC; 157delG; 810delG; 598_13del22; 544_546delCTG; 827delG; 169delG; 291_378del88; 598delG; 842delC; 465_862del1398; 633delG; 1302del1302; 379_433del55; 128_129delC; 142_143delA; 180delC; 209delA; 227_228delC; 47_651del605; 153_536del384; exón 2-3del; exón 2-3del; exón 2-3del; exón 2-4del; 562_563delG; exón 4del; exón 4del; exón 4del; 610_623del14; 837delC; 464_465del2GGinsTTTGCT; 75-76del2&insT; 125_127insGG; 584_585insT; 704_705insA; 152_153insCT; 842_843insC; 649_650insG; 127_128insGG; 979_980insAG; 165_166insT; exón 6del; y/o 1039_1040ins; 735-2A>T; 5982AT; 465-1G>A; 465-1G>T; 291-2A>T; 921-1G>A; y/o 597+1G>T; 143_144>T; 841842>T; y/o 271272GG>TT.

En otra realización, la delección, inserción, o mutación de LKB1 es en el dominio catalítico de cinasa. La delección, inserción, o mutación de LKB1 puede ser en los codones 50-337.

Esta invención proporciona una combinación que comprende N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus.

55 Esta invención también proporciona una combinación que comprende N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus, para el uso en terapia.

Esta invención también proporciona una combinación que comprende N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus, para uso en el tratamiento de cáncer.

- 5 Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus.
- 10 Esta invención también proporciona un kit de combinación que comprende N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus.
- 15 Esta invención también proporciona el uso de una combinación que comprende N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus, en la fabricación de un medicamento.
- 20 Esta invención también proporciona el uso de una combinación que comprende N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus, en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.
- 25 Esta invención también proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar una combinación de N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto inhibidor de mTOR, convenientemente everolimus, a un sujeto necesitado del mismo.

Los ejemplos siguientes pretenden ser solo ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención en ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Composición de cápsula

- 30 Una forma de dosificación oral para administrar una combinación de la presente invención se produce llenando una cápsula de gelatina dura estándar de dos piezas, con los ingredientes en las proporciones mostradas en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

INGREDIENTES	CANTIDADES
dimetil sulfóxido de N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida (el solvato de dimetil sulfóxido del Compuesto A)	5 mg
Everolimus	5 mg
Manitol	250 mg
Talco	125 mg
Estearato de magnesio	8 mg

- 35 Ejemplo 2 – Composición de cápsula

Una forma de dosificación oral para administrar uno de los compuestos de la presente invención se produce llenando una cápsula de gelatina dura estándar de dos piezas, con los ingredientes en las proporciones mostradas en la Tabla 5 siguiente.

Tabla 5

INGREDIENTES	CANTIDADES
dimetil sulfóxido de N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamida (el solvato de dimetil sulfóxido del Compuesto A)	5 mg

INGREDIENTES	CANTIDADES
Manitol	55 mg
Talco	16 mg
Estearato de magnesio	4 mg

Ejemplo 3 – Composición de cápsula

Una forma de dosificación oral para administrar uno de los compuestos de la presente invención se produce llenando una cápsula de gelatina dura estándar de dos piezas, con los ingredientes en las proporciones mostradas en la Tabla 6 siguiente.

5

Tabla 6

INGREDIENTES	CANTIDADES
Everolimus	5 mg
Manitol	250 mg
Talco	125 mg
Estearato de magnesio	8 mg

Ejemplo 4 – Composición de tableta

10 La sacarosa, celulosa microcristalina y los compuestos de la combinación de la invención, como se muestra más abajo en la Tabla 7, se mezclan y se granulan en las proporciones mostradas con una solución de gelatina al 10%. El granulado húmedo se tamiza, se seca, se mezcla con el almidón, talco y ácido esteárico, y luego se comprime para formar una tableta.

10

Tabla 7

INGREDIENTES	CANTIDADES
dimetil sulfóxido de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo- fenilamino)-6,8-dimetil-2,4, 7-trioxo-3,4 ,6,7-tetrahidro-2H- pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida (el solvato de dimetil sulfóxido del Compuesto A)	5 mg
Everolimus	5 mg
Celulosa microcristalina	300 mg
Sacarosa	16 mg
Almidón	40 mg
Talco	20 mg
Ácido esteárico	5 mg

15 **Ejemplo 5 - Composición de tableta**

La sacarosa, celulosa microcristalina y uno de los compuestos de la combinación de la invención, como se muestra más abajo en la Tabla 8, se mezclan y se granulan en las proporciones mostradas con una solución de gelatina al 10%. El granulado húmedo se tamiza, se seca, se mezcla con el almidón, talco y ácido esteárico, y luego se comprime para formar una tableta.

20

Tabla 8

INGREDIENTES	CANTIDADES
dimetil sulfóxido de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo- fenilamino)-6,8-dimetil-2,4, 7-trioxo-3,4 ,6,7-tetrahidro-2H- pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida (el solvato de dimetil sulfóxido del Compuesto A)	5 mg
Celulosa microcristalina	30 mg
Sacarosa	4 mg
Almidón	2 mg
Talco	1 mg
Ácido esteárico	0.5 mg

Ejemplo 6 - Composición de tableta

La sacarosa, celulosa microcristalina y uno de los compuestos de la combinación de la invención, como se muestra más abajo en la Tabla 9, se mezclan y se granulan en las proporciones mostradas con una solución de gelatina al 10%. El granulado húmedo se tamiza, se seca, se mezcla con el almidón, talco y ácido esteárico, y luego se comprime para formar una tableta.

5

Tabla 9

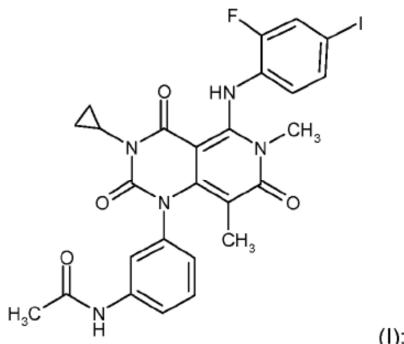
INGREDIENTES	CANTIDADES
Everolimus	5 mg
Celulosa microcristalina	300 mg
Sacarosa	40 mg
Almidón	20 mg
Talco	10 mg
Ácido esteárico	5 mg

Aunque con lo anterior se han ilustrado las realizaciones preferidas de la invención, se entiende que la invención no está limitada a las instrucciones precisas descritas en la presente, y que el derecho a todas las modificaciones que entran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones queda reservado.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende:

(i) N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida (un compuesto de estructura (I)); 4,3-



(I);

5

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) everolimus.

2. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de Estructura (I) está en la forma de un solvato de sulfóxido de dimetilo

10 3. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. Un kit de combinación que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 junto con un vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5. Una combinación como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en terapia.

15 6. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento del cáncer.

7. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en el tratamiento del cáncer, en donde la combinación se administra dentro de un período especificado y en donde la combinación se administra durante una duración de tiempo.

20 8. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la cantidad de sulfóxido de dimetilo N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida se selecciona de aproximadamente 0.25 mg a aproximadamente 9 mg, y esa cantidad se administra una vez al día, y la cantidad de everolimus se selecciona de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 15 mg, y esa cantidad se administra una vez por día.

25 9. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 8 en donde el sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida y everolimus se administran dentro de 12 horas el uno del otro por de 1 a 3 días consecutivos seguido por la administración de sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida por de 3 a 7 días consecutivos, opcionalmente seguido por uno o más ciclos de repetición de dosificación.

30 10. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida y everolimus se administran dentro de 12 horas el uno del otro por de 1 a 3 días consecutivos seguido por la administración de everolimus por de 4 a 6 días consecutivos, opcionalmente seguido por uno o más ciclos de repetición de dosificación.

35 11. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida y everolimus se administran dentro de 12 horas el uno del otro por 2 días sobre un período de 7 días y durante los otros días del período de 7 días: bien sea sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-

yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida; o everolimus, se administra solo, seguido opcionalmente por uno o más ciclos de repetición de dosificación.

- 5 12. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida y everolimus se administran dentro de 12 horas el uno del otro durante al menos 5 días consecutivos
- 10 13. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida y everolimus se administran dentro de 12 horas el uno del otro durante 5 días sobre un período de 14 días, y durante los otros días del período de 14 días: bien sea sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida se administra solo, seguido opcionalmente por uno o más ciclos de repetición de dosificación; o everolimus, se administra solo, seguido opcionalmente por uno o más ciclos de repetición de dosificación.
- 15 14. Una combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el compuesto sulfóxido de dimetilo de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil}acetamida se administra primero en una dosis de carga por de 1 a 3 días, seguido por la administración de dosis de mantenimiento del compuesto, y/o el everolimus compuesto se administra primero en una dosis de carga por de 1 a 3 días, seguido por la administración de dosis de mantenimiento del compuesto.
- 20 15. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en donde el cáncer es ya sea de tipo silvestre o mutante para Ras/Raf y, o bien de tipo silvestre o mutante para PI3K / PTEN.
- 25 16. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en donde el cáncer se selecciona de: cerebro (gliomas), glioblastomas, astrocitomas, glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, la enfermedad de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos, mama, cáncer de mama inflamatorio, el tumor de Wilm, el sarcoma de Ewing, Rabdomiosarcoma, ependimoma, meduloblastoma, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, hígado, melanoma, ovárico, pancreático, de próstata, el sarcoma, osteosarcoma, tumor de células gigantes de hueso, de tiroides, leucemia linfoblástica de células T, leucemia mielógena Crónica, leucemia linfocítica Crónica, leucemia de Células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia neutrofílica Crónica, leucemia linfoblástica aguda de células T, Plasmacitoma, leucemia inmunoblastica de células grandes, leucemia de células de manto, leucemia de mieloma Múltiple, Megacarioblástica, mieloma múltiple, leucemia aguda megacariocítica, leucemia promielocítica, Eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de hodgkins, linfoma no de hodgkins, linfoma linfoblástico de células T, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, neuroblastoma, cáncer de vejiga, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, cáncer vulvar, cáncer cervical, cáncer endometrial, cáncer renal, mesotelioma, cáncer esofágico, cáncer de glándula salival, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo, cáncer bucal, cáncer de la boca, GIST (tumor gastrointestinal estromal) y cáncer testicular.
- 30

Figura 1

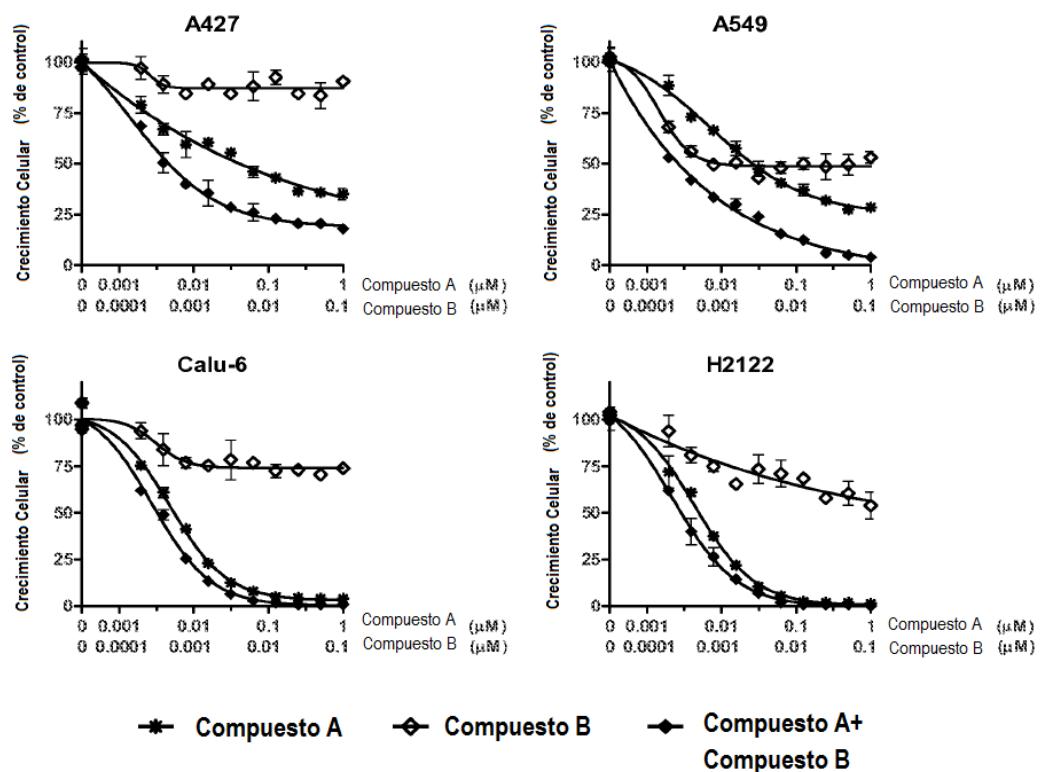


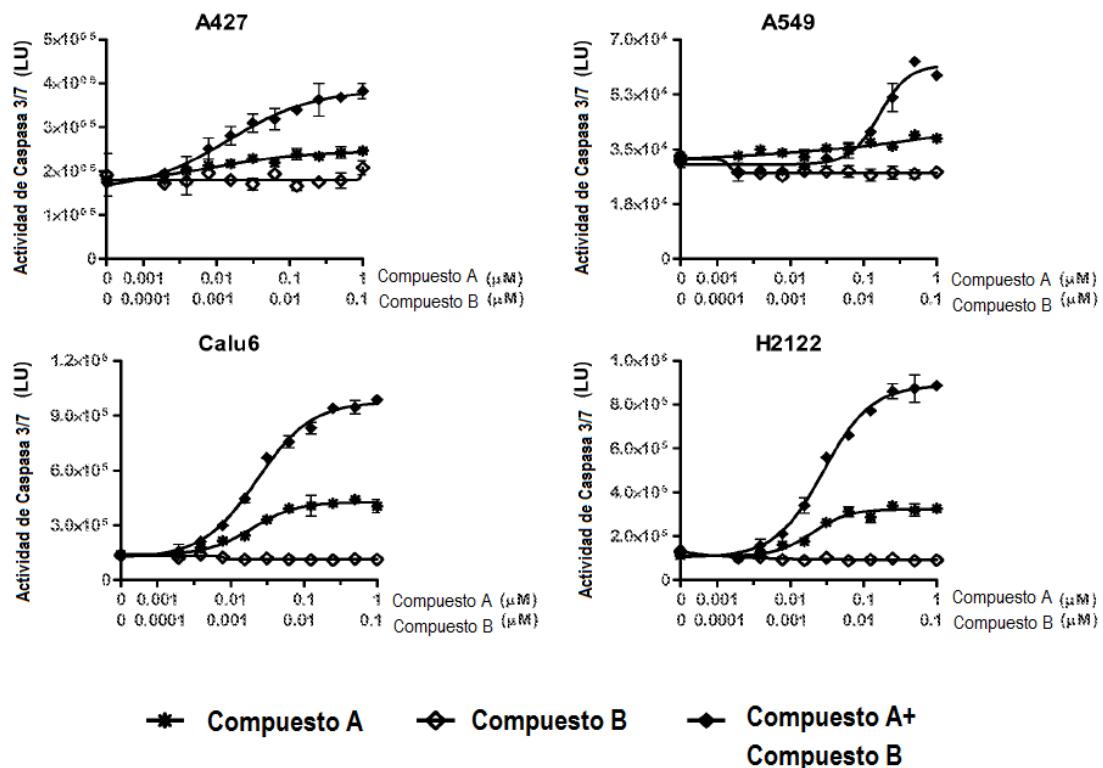
Figura 2

Figura 3

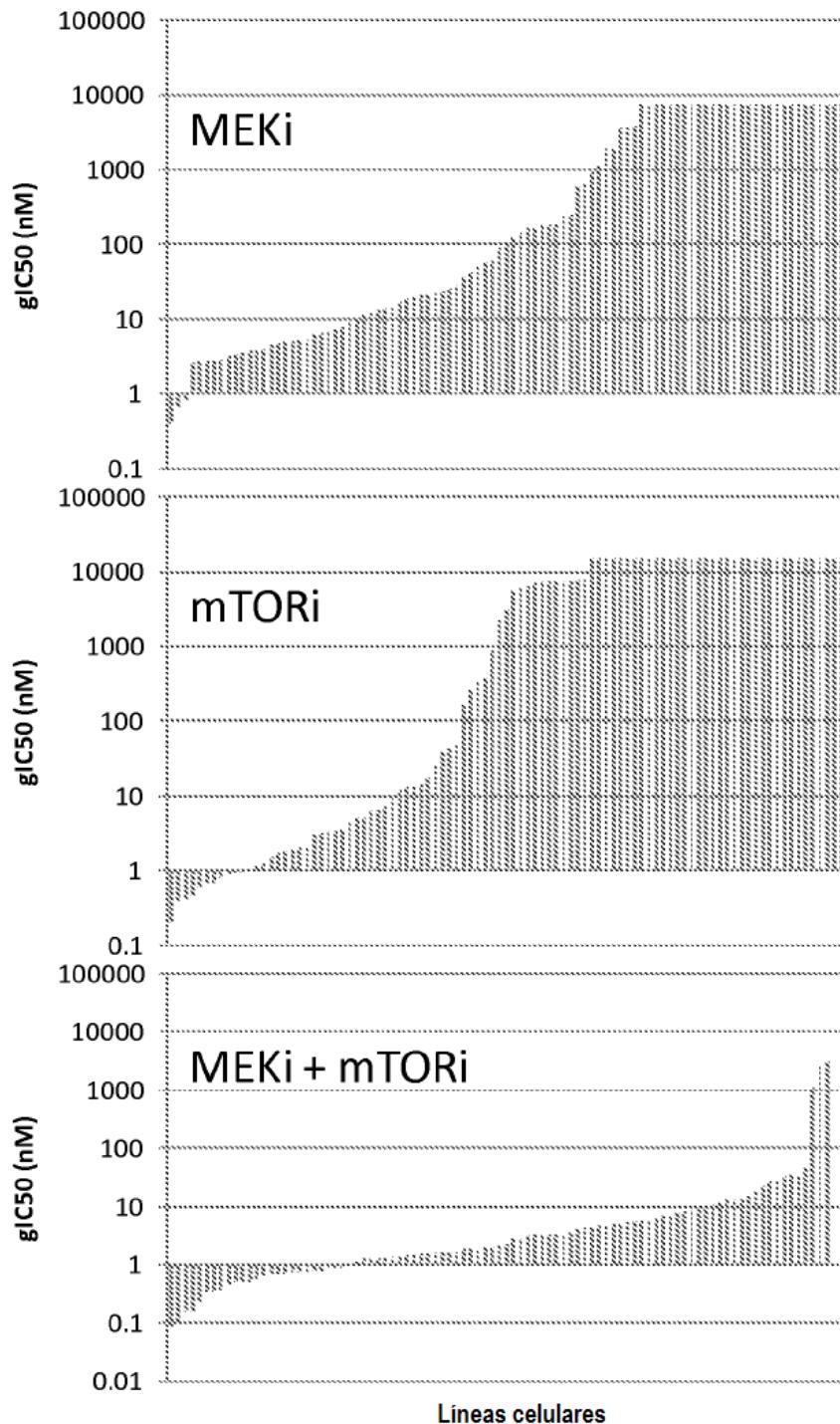


Figura 4

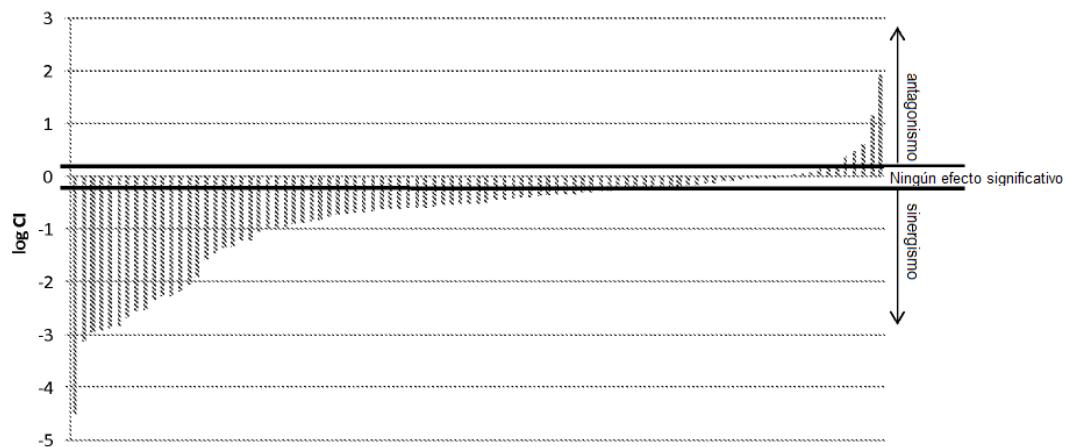


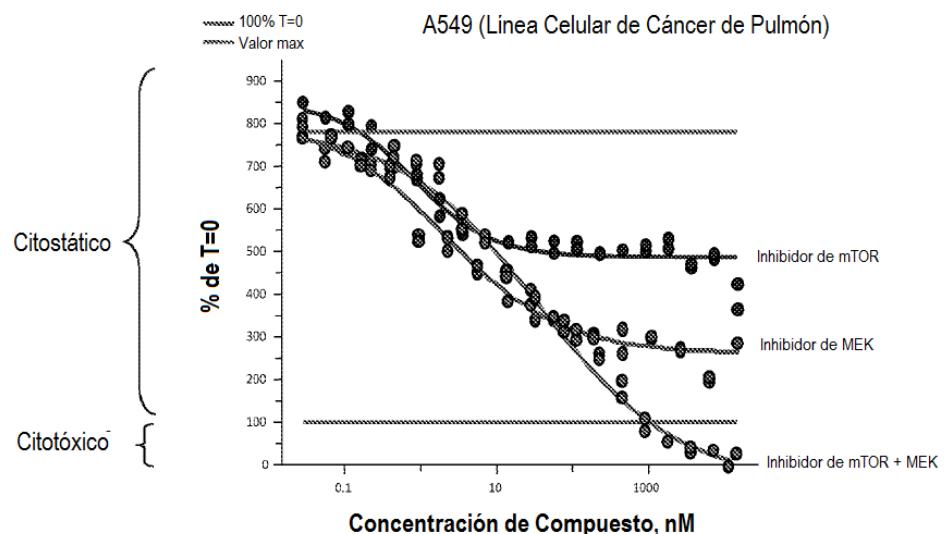
Figura 5

Figura 6