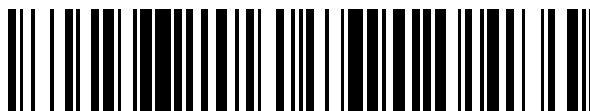


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 361**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2014 PCT/US2014/053244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014 E 14766301 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3038652**

54 Título: **Combinación de un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK para el tratamiento de enfermedades celulares proliferativas**

30 Prioridad:

28.08.2013 US 201361871275 P

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

29.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARRIS, JENNIFER LESLIE;
LI, NANXIN y
SMITH, TIMOTHY R.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 674 361 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK para el tratamiento de enfermedades celulares proliferativas.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK; como se define en las reivindicaciones, para uso en el tratamiento de neuroblastoma

Antecedentes de la invención

Inhibidores de ALK

- 10 La quinasa del linfoma anaplásico (ALK) es un miembro de la superfamilia de receptores de insulina de las tirosina quinasas receptoras. Esta proteína comprende un dominio extracelular, un tramo hidrófobo que corresponde a una región de transmembrana de un solo pase, y un dominio de quinasa intracelular. Este desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebro y ejerce sus efectos sobre neuronas específicas en el sistema nervioso, y normalmente se expresa en el tejido nervioso en desarrollo. Las alteraciones genéticas de ALK han sido implicadas en la oncogénesis en tumores hematopoyéticos y no hematopoyéticos. Se encontró
15 que el gen se ha reordenado, mutado, o amplificado en una serie de tumores incluyendo linfomas anaplásicos de células grandes, neuroblastoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas. La expresión aberrante de proteínas receptoras de ALK de longitud completa se ha reportado en neuroblastomas y glioblastomas; y proteínas de fusión ALK se han producido en linfoma de células grandes anaplásicas. Mientras que los reordenamientos cromosómicos son las alteraciones genéticas más comunes en el gen ALK, la amplificación de ALK se ha mostrado en los cánceres de mama y cánceres esofaríngicos. El desarrollo de compuestos que selectivamente se dirigen a ALK en el tratamiento de tumores positivos para ALK es por lo tanto potencialmente altamente deseable. Unos pocos inhibidores de moléculas pequeñas de la actividad de quinasa de ALK se han descrito en los últimos años, por ejemplo, en el documento WO 2008/073687 A1; algunos de los cuales están actualmente en la fase de evaluación clínica. Crizotinib, un inhibidor de la tirosina quinasa de cMET y AKT ha
20 sido aprobado para pacientes con cáncer pulmonar avanzado de células no pequeñas ALK-positivo; inhibidores de ALK más potentes podrían seguir en breve.

Inhibidores de CDK

- 30 Las quinasas dependientes de ciclina (CDK) es una gran familia de proteínas quinasas. Las CDK regulan la iniciación, progresión, y la finalización del ciclo celular en mamíferos. La función de las CDKs es fosforilar y por lo tanto activar o desactivar ciertas proteínas, incluyendo por ejemplo, proteínas de retinoblastoma, laminas, histona H1, y componentes del huso mitótico. El paso catalítico mediado por CDKs involucra una reacción de transferencia de fosforo desde ATP al sustrato enzimático macromolecular.

- 35 El desarrollo tumoral está estrechamente asociado con alteración genética y desregulación de CDKs y sus reguladores, indicando que los inhibidores de las CDKs pueden ser terapéuticos anti-cáncer útiles. En realidad, los primeros resultados indican que las células transformadas y normales difieren en su requerimiento por ejemplo, ciclina D/CDK4/6 y que es posible desarrollar nuevos agentes antineoplásicos desprovistos de la toxicidad hospedera general observada con fármacos citotóxicos y citostáticos convencionales. Se ha encontrado que varios grupos de compuestos (revisado, por ejemplo, en Fischer, P. M. Curr. Opin. Drug
40 Discovery Dev. 2001, 4, 623-634) poseen propiedades anti-proliferativas en virtud del antagonismo de ATP específico de la CDK. Por lo tanto, el desarrollo de monoterapias para el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cánceres, utilizando terapéuticos dirigidos genéricamente a CDKs, o a CDKs específicos, es potencialmente altamente deseable. Los inhibidores de CDK son conocidos y las solicitudes de patente se han presentado en dichos inhibidores; por ejemplo, WO2007/140222, WO2010/020675, y WO2011/101409.

- 45 Bonvini et al. divulgan en Haematologica, 2009, 84 (7), 944-955 que la combinación del inhibidor de CDK flavopiridol y el inhibidor de molécula pequeña ALK WHI-154 induce una apoptosis rápida en células de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

- 50 Se han hecho intentos por preparar compuestos que inhiben, ya sea la ALK o CDK4/6, y un número de tales compuestos se han divulgado en la técnica. Sin embargo, en vista del número de respuestas patológicas que están mediadas por ALK y CDK4/6, sigue habiendo una necesidad continua de agentes terapéuticos efectivos y seguros y una necesidad de su uso preferente en terapia de combinación. Sorprendentemente, se ha

encontrado que un inhibidor de ALK provoca una fuerte actividad antiproliferativa y una respuesta antitumoral in vivo en combinación con un inhibidor de CDK 4/6. La presente invención se relaciona con la terapia de combinaciones específicas para el tratamiento de enfermedades proliferativas, que son neuroblastomas.

Resumen de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica, por separado o conjuntamente, que comprende (1) un primer agente que es un inhibidor de ALK o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (2) un segundo agente que es un inhibidor de CDK o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La divulgación también se refiere a esta combinación farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa.
- 10 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, por separado o juntos, que comprende (1) un primer agente que es un inhibidor de ALK que es el Compuesto A1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o Compuesto A2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (2) un segundo agente que es un inhibidor de CDK que es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el Compuesto A1, el Compuesto A2 y el Compuesto B son como se define en las reivindicaciones, para usar en el tratamiento del neuroblastoma.
- 15

La presente invención también proporciona realizaciones adicionales como se describe en las reivindicaciones.

- La divulgación también se refiere a un método para tratar una enfermedad proliferativa, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de un primer agente que es un inhibidor de ALK y una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente que es un inhibidor de CDK, en donde el primer y el segundo agente se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.
- 20

Descripción detallada de las figuras

- La figura 1 ilustra con datos hipotéticos cómo las interacciones sinérgicas potenciales en combinaciones de compuestos pueden evaluarse a partir del resultado del software CHALICE basado en el modelo de Aditividad de Loewe. La figura de la izquierda es un gráfico de Matrix de dosis, donde cada bloque individual de la matriz de 7x7 reporta el porcentaje de inhibición (muerte celular) por el tratamiento con fármacos. La inhibición mediante solo el compuesto individual de tratamiento se informó en la columna más a la izquierda para el Agente A y la fila inferior para el agente B; los datos se normalizaron para la inhibición mediante el control de vehículo, que se establece en 0 (el valor donde ambas concentraciones del Agente A y el Agente B son 0). La figura de la derecha es una representación gráfica de la matriz de exceso de Loewe, donde cada bloque individual informa el exceso de inhibición comparando los datos experimentales en la matriz de dosis con un valor de inhibición esperada generado por el modelo de aditividad de Loewe. Desde este punto, la sinergia se define como valores >0, aditivo se define como valores = 0 y el antagonismo se define como valores <0. Los bloques resaltados identifican combinaciones donde se observa sinergia en los datos experimentales.
- 25
- 30

- 35 La figura 2 muestra gráficos de matriz CHALICE demostrando los efectos de la dosis (% de inhibición) del co-tratamiento con el compuesto A1 y el compuesto B (fila superior), el compuesto A1 autocruzado (fila media) y el compuesto B auto-cruzado (fila de abajo) en la inhibición de las células de neuroblastoma humanas LAN-1.

- La figura 3 muestra un diagrama de cuadros que proporciona un resumen visual de las puntuaciones de sinergia de las combinaciones de fármacos en 15 líneas celulares de neuroblastoma de la enfermedad (mutante para alk) y normales (tipo Silvestre) (véanse los datos en las Tablas 2 y 3). En este gráfico, se incluyeron las puntuaciones de sinergia generadas a partir de los inhibidores ALK, Compuestos A1 y A2, pero no el Compuesto A3. Como se utiliza en la presente, un inhibidor de ALK se refiere al Compuesto A1 o Compuesto A2, y el inhibidor de CDK4/6 se refiere al Compuesto B. Cada cuadro representa el rango de puntuaciones de sinergia de un régimen de tratamiento particular, (ALK x CDK, autocruce de ALK, o auto-cruce de CDK); la línea blanca horizontal dentro del cuadro representa la media del grupo y la línea continua vertical representa la desviación estándar de grupo. Los círculos continuos representan los valores atípicos.
- 40
- 45

- Las figuras 4A, 4B y 4C muestran gráficos de dispersión que proporcionan la identificación visual de combinaciones sinérgicas "hit". Los valores de eficacia de combinación máxima se representaron frente a las puntuaciones de sinergia de combinaciones de un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK4/6, inhibidores de ALK se auto-cruzan, e inhibidores de CDK4/6 se autocruza en 15 líneas celulares de neuroblastoma de la enfermedad (mutante para alk) y normales (tipo Silvestre) (véanse los datos en las Tablas 2 y 3). En estos
- 50

gráficos, se representaron sólo los datos generados con los Compuestos A1 y A2; es decir, como se utiliza en la presente, el inhibidor de ALK se refiere al Compuesto A1 o Compuesto A2, y el inhibidor de CDK4/6 se refiere al Compuesto B. La Figura 4A es un gráfico de dispersión de los datos del autocruce de los dos inhibidores de ALK, compuestos A1 y A2 en 15 líneas celulares. El gráfico muestra la eficacia del agente único preferencial para la enfermedad ALK. La figura 4B es el gráfico de dispersión de los datos del autocruce del inhibidor de CDK, el Compuesto B. El gráfico muestra la eficacia o sinergia mínima del agente único. La Figura 4C es el gráfico de dispersión de los datos de combinaciones de cualquiera de los inhibidores de ALK, los compuestos A1 y A2, con el inhibidor de CDK, Compuesto B. El gráfico muestra la interacción que conduce tanto a sinergia como a la eficacia mejorada en cuatro líneas celulares de enfermedad (Lan-5, Kelly, Lan-1, NB-1643, y dos normales (NB-1, SK-N-BE)).

Las figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran ejemplos típicos de gráficos de combinación de fármacos y sus interpretaciones basadas en el teorema del índice de combinación de Chou y Talalay. La figura 5A es un gráfico Fa-CI para la proporción de combinación constante. CI como se define por Chou de acuerdo con la siguiente ecuación: $CI = (D)_i / (D_x)_i + (D)_2 / (D_x)_2$ donde $(D)_i$ y $(D_x)_2$ son las concentraciones de compuestos y D_2 necesarias para producir un determinado nivel de efecto antiproliferativo cuando se utiliza individualmente, mientras que $(D)_i$ y $(D)_2$ son sus concentraciones que producen el mismo efecto antiproliferativo cuando se utilizan en combinación. El índice de combinación es una medida cuantitativa de la interacción de fármacos definida como un efecto aditivo ($CI = 1$), antagonismo ($CI > 1$), o sinergia ($CI < 1$). F_a significa que la fracción afectada se define como la fracción de células afectadas por la concentración dada de los compuestos solos o en combinación. $F_a = 0$ está determinado con base en el control de DMSO mediante la dosis, y $F_a = 1$ es una respuesta completa (no quedo ninguna célula viable). Típicamente, un gráfico Fa-CI, como se usa en la presente, se utiliza para evaluar la sinergia. La figura 5B es un isoblograma clásico en ED_{50} , ED_{75} , ED_{90} y ED_{90} . $(D)_1$ y $(D)_2$ significan la concentración del fármaco 1 y fármaco 2, respectivamente. ED_x se refiere a la dosis en efecto de X%, efecto del 100% significa que no quedan células viables. La Figura 5C es un isoblograma normalizado para combinación en diferentes proporciones. Los términos son como se definen en la figura 5B. La Figura 5D es un gráfico Fa-DRI (Chou y Chou, 1988; Chou y Martin, 2005) donde DRI se refiere al índice de reducción de dosis y está relacionado con CI de acuerdo con la siguiente ecuación: $CI = (D)_i / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 = 1 / (DRI)_1 + 1 / (DRI)_2$. DRI estima en que cantidad la dosis de cada fármaco puede ser reducida cuando los fármacos sinérgicos se administran en combinación, aún logrando el mismo efecto de tamaño a medida que cada medicamento fue administrado individualmente.

Las figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E y 6F muestran los gráficos de combinación de fármacos para las combinaciones de los Compuestos A1 y B, compuesto A y compuesto B en las células NB-1643 (Enfermedad): (6A) gráfico mediana-efecto; (6B) curvas dosis-efecto; isoblograma clásico en ED_{50} , ED_{75} y ED_{90} ; (6C) gráfico Fa-CI; (6D) gráfico Fa logCI; (6E) isoblograma clásico; e (6F) isoblograma conservador. Los gráficos demuestran de manera conjunta que la combinación fue sinérgica en todo el intervalo de concentración ensayado.

Las figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E y 7F muestran los gráficos de combinación de fármacos para las combinaciones de los Compuestos A1 y B, compuesto A1 solo y compuesto B solo en células SH-SY5Y (Enfermedad): (7A) gráfico mediana-efecto; (7B) curvas de dosis-efecto; (7C) gráfico Fa-CI; (7D) gráfico Fa-log (CI); (7E) isoblograma clásico en ED_{50} , ED_{75} , y ED_{90} ; y (7F) isoblograma conservador. Las figuras 7C a 7F muestran que la combinación fue moderadamente sinérgica a baja dosis y aditiva o levemente antagónica a dosis altas.

Las figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E y 8F muestran los gráficos de combinación de fármacos para los Compuestos A1 y B, compuesto A y compuesto B en las células NB1691 (Normales): (7A) gráfico mediana-efecto; (7B) curvas de dosis-efecto; (7C) gráfico Fa-CI; (7D) gráfico Fa-log (CI); (7E) isoblograma clásico en ED_{50} , ED_{75} , y ED_{90} ; y (7F) isoblograma conservador. Las figuras 8C a 8F demuestran que la combinación era fuertemente sinérgica en baja dosis y aditiva en dosis más altas, y antagónica en altas dosis del compuesto A1.

Las figuras 9A, 9B, 9C, 9D, 9E y 9F muestran los gráficos de combinación de fármacos para las combinaciones de Compuestos A1 y B, compuesto A y compuesto B en las células EDC1 (Normales): (9A) gráfico mediana-efecto; (9B) curvas de dosis-efecto; (9C) gráfico Fa-CI; (9D) gráfico Fa-log (CI); (9E) isoblograma clásico en ED_{50} , ED_{75} , y ED_{90} ; y (9F) isoblograma conservador. Las figuras 9C a 9F demuestran que la combinación fue sinérgica en todo el intervalo de concentración ensayado.

Las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D muestran la morfología de las células SH-SY5Y en respuesta a los tratamientos con Compuesto A1, B1 o la combinación de compuestos A1 y B, cada uno a IC_{50} de los respectivos compuestos y 72 horas después del tratamiento: (a) vehículo; (B) tratado con Compuesto A1 solo; (C) tratado con Compuesto B solo, y (d) tratado con combinación de Compuestos A1 y B.

Las figuras 11 A, 11 B y 11C comparan la viabilidad celular con la apoptosis de células NB1643, analizadas mediante el ensayo triplex ApoTox-Glo™, 72 horas después del tratamiento con: (a) Compuesto A1 solo; (b) Compuesto B solo, y (c) combinación de compuestos A1 y B combinados en la proporción equipotente (0, 1/4, 1/2, 1,2, y 4 veces el IC50 de cada uno de los compuestos). Los resultados muestran que el tratamiento con fármaco mejora la muerte celular, pero se observa el mismo nivel de apoptosis con Compuesto A1 solo como con la combinación con Compuesto B.

Las figuras 12A, 12B y 12C muestran la viabilidad de células NB1643, analizada mediante el ensayo CTG, 72 horas después del tratamiento con: (a) Compuesto A1 solo; (b) compuesto B solo, y (c) combinación de compuestos A y B combinados en proporción equipotente. Los resultados confirmaron que el tratamiento de combinación mejora la muerte celular.

Las figuras 13A, 13B y 13C comparan la viabilidad celular con la apoptosis de células SH-SY5Y, analizadas mediante el ensayo triplex ApoTox-Glo™, 72 horas después del tratamiento con: (a) Compuesto A1 solo; (b) compuesto B solo, y (c) combinación de compuestos A1 y B combinados en la proporción equipotente (0,1/4, 1/2, 1,2, y 4 veces el IC50 de cada uno de los compuestos). Los resultados muestran que el co-tratamiento mejora la muerte celular. Las células morían pronto a la concentración más alta, de manera que la apoptosis no era detectable en aquellas concentraciones.

Las figuras 14A, 14B y 14C comparan la viabilidad celular con la apoptosis de células EBC1, analizadas mediante el ensayo triplex ApoTox-Glo™, 72 horas después del tratamiento con: (a) compuesto A1 solo; (b) compuesto B solo, y (c) combinación de compuestos A1 y B combinados en la proporción equipotente (0,1/4, 1/2, 1,2, y 4 veces el IC50 de cada uno de los compuestos). Los datos muestran poca o ninguna mejora de muerte celular o apoptosis con el co-tratamiento.

La figura 15 muestra la inmunoprecipitación western del Rb total y la expresión de pALK en células NB1643, 20 horas después del tratamiento con: vehículo; Compuesto A1 a 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces la dosis IC50; Compuesto B a 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces la dosis IC50; y la combinación de compuestos A1 y B en 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces la dosis IC50 de cada uno de los compuestos. El resultado muestra que el co-tratamiento reduce en gran medida la expresión de proteínas pALK en células NB1643 a partir de 1/16x de dosis de IC50.

La figura 16 muestra la inmunoprecipitación western del Rb total, fosfo-Rb S780 y fosfo-Rb S795, la expresión en células NB1643 20 horas después del tratamiento con: vehículo; Compuesto A1 a 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces la dosis IC50; Compuesto B a 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces la dosis IC50; y la combinación de compuestos A1 y B en 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces la dosis IC50 de cada uno de los compuestos. El resultado muestra que el co-tratamiento reduce la expresión de pRb en células NB1643 a partir de 1/16x de dosis de IC50. La combinación es más efectiva en la reducción de la expresión de pRb S780 que la expresión de pRb S795.

La figura 17 muestra la inmunoprecipitación western de ALK, pALK, Rb total, y fosfo-Rb S795, expresión en células NB1643 20 horas después del tratamiento con: vehículo; Compuesto A1 a 1/4, 1/2, 1 y 4 veces la dosis de IC50; el Compuesto B a 1/4, 1/2, 1 y 4 veces la dosis IC50; y la combinación de compuestos A1 y B en 1/4, 1/2, 1 y 4 veces la dosis IC50 de cada uno de los compuestos. Los resultados muestran que el co-tratamiento es más efectiva en la reducción de la expresión de proteínas pALK y pRb.

La Figura 18 muestra el volumen tumoral relativo de xenoinjertos SH-SY5Y de neuroblastomas humanos en ratones CB17 SCID con tiempo para grupos de tratamiento (1) control de vehículo, (2) compuesto A1 a 50 mg/kg, (3) compuesto B a 187.5 a 250 mg/kg, y (4) combinación del Compuesto A1 en 50 mg/kg y Compuesto B a 187,5 a 250 mg/kg. La dosis para el Compuesto B se inició en 250 mg/kg y se redujo a 187.5 mg/kg en el día 5. Los resultados muestran el tratamiento con el Compuesto A1 solo dio como resultado solamente un ligero retraso del crecimiento tumoral en comparación con el vehículo control. El tratamiento con el Compuesto B solo dio como resultado un crecimiento tumoral más lento. El co-tratamiento redujo efectivamente el tumor existente y logró la remisión total del tumor.

Las figuras 19A, 19B, 19C y 19D muestran la variabilidad del volumen tumoral con la duración del tratamiento (en semanas) para ratones individuales en cada uno de los grupos de tratamiento descritos en la Figura 18 anterior.

La figura 20 muestra la supervivencia de los ratones (en porcentaje) versus la duración del tratamiento (en semanas) en cada uno de los grupos de tratamiento descritos en la Figura 18 anterior. El día 7, dos de los ratones del grupo 4 murieron, y el día 14, un ratón del grupo del compuesto B murió. Los ratones en el grupo control y el grupo del Compuesto A1 fueron sacrificados debido al tamaño de su tumor.

La Figura 21 son gráficos de dispersión de los efectos de fármacos combinatoriales (eficacia frente a la puntuación sinergia) de combinaciones de Compuesto A1 y el Compuesto B, y sus auto-cruces respectivos en 16 líneas celulares de neuroblastoma para enfermedad (ALK mutante) y normales (tipo Silvestre) (véanse los datos en la Tabla 10). Los hits de combinación sinérgica se identificaron por tener una puntuación de sinergia > 2 y una eficacia máxima > 100 (ver las Figuras 4A, 4B y 4C para la interpretación). La gráfica en la parte superior es el autocruzamiento del Compuesto A1 (un inhibidor de ALK), que muestra la eficacia de un único agente preferencial para la Enfermedad de ALK. La gráfica en la parte media es el auto-cruzamiento del Compuesto B (un inhibidor de CDK), que muestra una eficacia mínima de agente único o sinergia. El gráfico en la parte inferior es las combinaciones de los compuestos A1 y B, que muestra la interacción que conduce tanto a la sinergia como a una mayor eficacia en dos líneas celulares de Enfermedad (NB-1691, Lan-5) y una normal (NB-1691).

Las figuras 22A, 22B muestran los efectos de dosificación del co-tratamiento con un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK4/6 en la proliferación de células Kelly de neuroblastoma humano. La figura 22A muestra la matriz de dosis e isoblograma que demuestra los efectos de dosis del co-tratamiento con el Compuesto A1 (un inhibidor de ALK) y Compuesto B (un inhibidor de CDK4/6). La combinación fue moderadamente sinérgica con una puntuación de sinergia de 1.75 y el isoblograma indicó una interacción muy fuerte. La figura 22B muestra la matriz de dosis e isoblograma que demuestra los efectos de dosis del co-tratamiento con el compuesto A2 (un inhibidor de ALK) y Compuesto B. La combinación fue moderadamente sinérgica con una puntuación de sinergia de 1,48 y el isoblograma indicó una interacción muy fuerte.

Las figuras 23A, 23B, 23C y 23D muestran el efecto de dosis del co-tratamiento con un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK4/6 en la proliferación de células de neuroblastoma Kelly y NB-1. La figura 23A muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra los efectos de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A1 (un inhibidor de ALK) y el Compuesto B (un inhibidor de CDK4/6) en células Kelly. La combinación fue sinérgica con una puntuación de sinergia calculada de 2.51. La figura 23B muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra los efectos de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A2 (un inhibidor de ALK) y el Compuesto B en células Kelly. La combinación fue sinérgica con una puntuación de sinergia de 2.29. La figura 23C muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra los efectos de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A2 y el Compuesto B en la proliferación de células de neuroblastoma humano NB-1. La combinación no fue sinérgica. La figura 23D muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra los efectos de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A2 y el Compuesto B en la proliferación de células de neuroblastoma humano NB-1. La combinación no fue sinérgica.

Las figuras 24A, 24B, 24C, 24D, 24E y 24F muestran los efectos de dosis de co-tratamiento con un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK4/6 en células de neuroblastoma NB-1 y SH-SY5Y. La figura 24A muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra los efectos de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A1 (un inhibidor de ALK) y el Compuesto B en la proliferación de células Kelly; la puntuación de sinergia fue de 0.820. La figura 24B muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra el efecto de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A2 (un inhibidor de ALK) y el Compuesto B en células de neuroblastoma humano Kelly; la puntuación de sinergia fue de 1.52. La Figura 24C muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra los efectos de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A1 y el Compuesto B en células de neuroblastoma humano NB-1; la combinación no es sinérgica. La Figura 24D muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra el efecto de dosis de co-tratamiento con el Compuesto A2 y el Compuesto B en células de neuroblastoma humano NB-1; la combinación no es sinérgica. La figura 24E muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de que demuestra el efecto de la dosis de co-tratamiento con el Compuesto A1 y el Compuesto B en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. La figura 24F muestra la matriz de dosis y la matriz de exceso de Loewe que demuestra el efecto de la dosis de co-tratamiento con los compuestos A2 y B en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Descripción detallada de la invención

Definición

Las siguientes definiciones generales se proporcionan para entender mejor la invención:

Los términos "alrededor de" o "aproximadamente" usualmente significa dentro del 20%, más preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente aún dentro de 5% de un valor o rango dado. Alternativamente, especialmente en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un orden de magnitud preferentemente dentro de un factor de dos de un valor dado.

"Inhibidores de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK)" utilizados aquí se relacionan con compuestos que inhiben la actividad quinasa de la enzima. Tales compuestos se denominarán como "inhibidores de ALK".

"Tumor o cáncer resistente a ALK" se refiere a un cáncer o un tumor que, o bien no responde favorablemente al tratamiento con inhibidores de ALK previos, o, alternativamente, presenta recaídas después de responder favorablemente a los inhibidores de ALK. El cáncer o tumor puede ser resistente o refractario al comienzo del tratamiento o pueden llegar a ser resistentes o refractario durante el tratamiento.

"Co-administrar", "co-administración" o "administración combinada" o similares pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un paciente individual, y pretenden incluir los regímenes de tratamiento en los que los agentes no son necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

"Combinación" se refiere a bien sea una combinación fija en una forma de dosificación unitaria, o una combinación no fija (o kit de partes) para la administración combinada en donde un compuesto y un socio de combinación (por ejemplo, otro fármaco como se explica a continuación, también conocido como "agente terapéutico", "agente" o "co-agente") se puede administrar de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los socios de combinación muestren un efecto cooperativo por ejemplo sinérgico. El término "administración combinada" o similares como se utiliza en la presente pretenden abarcar la administración del socio de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesite (ej., un paciente), y pretenden incluir los regímenes de tratamiento en los que los agentes no son necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término "combinación fija" significa que los ingredientes activos, a modo de ejemplo, un compuesto de la fórmula A1 y un socio de combinación, son ambos administrados a un paciente de forma simultánea en la forma de una sola entidad o dosificación. Los términos "combinación no fija" o "kits de partes" significa que los ingredientes activos, ej., un compuesto de la fórmula A1 y un socio de combinación, sean ambos administrados a un paciente como entidades separadas ya sea simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente.

"Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDK)" como se define en la presente se refiere a una pequeña molécula que interactúa con un complejo ciclina-CDK para bloquear la actividad de la quinasa.

"Rango de dosis" se refiere a un límite superior y un límite inferior de una variación aceptable de la cantidad de agente terapéutico especificado. Típicamente, una dosis del agente en cualquier cantidad dentro del intervalo especificado puede ser administrada a los pacientes sometidos a tratamiento.

"Cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva" en referencia a la terapia de combinación significa la cantidad de cada uno de los socios de combinación, que se puede administrar, en conjunto, de forma independiente, al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo apropiados que los socios de combinación ejercen cooperativamente, efectos beneficiosos/terapéuticos para aliviar, retrasar la progresión de o inhibir los síntomas de una enfermedad en un paciente en necesidad del mismo.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, vehículos y/o formas de dosificación que están dentro del alcance del criterio médico, son adecuados para el contacto con los tejidos de mamíferos especialmente humanos, sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y otras complicaciones problemáticas acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

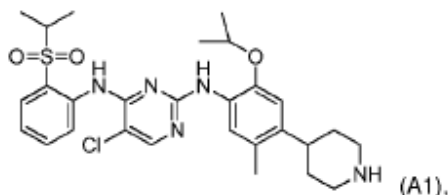
"Preparación farmacéutica" o "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla o solución que contiene al menos un agente terapéutico para ser administrado a un mamífero de sangre caliente, por ejemplo, un ser humano con el fin de prevenir, tratar o controlar una enfermedad o afección particular que afecta al mamífero.

"Sales" (que, lo que se entiende por "o sales de los mismos" o "o una sal del mismo"), pueden estar presentes solas o en mezcla con el compuesto libre, por ejemplo el compuesto de la fórmula (I), y son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales de los compuestos de la fórmula (I) se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos de la fórmula (I) con un átomo de nitrógeno básico. Ácidos inorgánicos adecuados son por ejemplo, ácidos de halógeno, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido fumárico o ácido metanosulfónico. Para fines de aislamiento o purificación también es posible usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, solamente se emplean sales farmacéuticamente aceptables o

- compuestos libres (cuando sea aplicable en la forma de preparaciones farmacéuticas), y estas son por lo tanto preferidas. En vista de la estrecha relación entre los nuevos compuestos en forma libre y aquellos en forma de sus sales, incluyendo aquellas sales que se pueden utilizar como intermedios, por ejemplo en la purificación o identificación de los nuevos compuestos, cualquier referencia a los compuestos libres anteriormente y en lo sucesivo, debe entenderse como refiriéndose también a las sales correspondientes, según sea apropiado y conveniente. Las sales de los compuestos de la fórmula (I) son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables; contra-iones adecuados que forman sales farmacéuticamente aceptables son conocidos en el campo.
- 5 "Composición farmacéutica individual" se refiere a un único portador o vehículo formulado para entregar cantidades eficaces de los dos agentes terapéuticos a un paciente. El vehículo individual está diseñado para proporcionar una cantidad efectiva de cada uno de los agentes, junto con cualquiera de los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el vehículo es un comprimido, cápsula, píldora, o un parche. En otras realizaciones, el vehículo es una solución o una suspensión.
- 10 "Sujeto", "paciente" o "animal de sangre caliente" pretende incluir animales. Ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano, por ejemplo, un humano que padece, está en riesgo de padecer, o potencialmente puede padecer de una enfermedad tumoral cerebral. Particularmente preferido, el sujeto o animal de sangre caliente es humano.
- 15 "Terapéuticamente efectiva" se refiere preferentemente a una cantidad de un agente terapéutico que es terapéuticamente o en un sentido más amplio también profilácticamente efectiva contra la progresión de una enfermedad proliferativa.
- 20 "Tratamiento" incluye el tratamiento profiláctico y terapéutico (incluyendo, pero no limitado a paliativo, de curado, de alivio de síntomas, y reducción de síntomas), así como el retraso de la progresión de una enfermedad o trastorno del cáncer. El término "profiláctico" significa la prevención de la aparición o recurrencia de un cáncer. El término "retraso de la progresión" como se usa en la presente significa administración de la combinación a
- 25 pacientes que están en una pre-etapa o en una fase temprana del cáncer a ser tratado, una pre-forma del cáncer correspondiente se diagnostica y/o en un paciente diagnosticado con una condición bajo la cual es probable que un cáncer correspondiente se desarrolle.

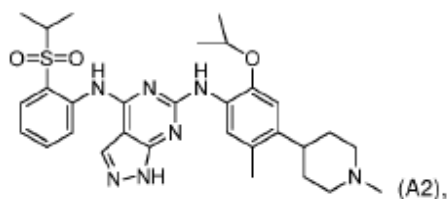
Descripción de las realizaciones preferidas

- 30 La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende, juntos o por separado, (a) un primer agente que es un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un segundo agente que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal combinación puede ser para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de neuroblastoma.
- 35 En una realización preferida de la combinación de la invención, el inhibidor de la ALK es el Compuesto A1, que es 5-cloro-N2-(2-isopropoxi-5-metil-4-(piperidin-4-il)fenil)-N4-[2-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirimidina-2,4-diamina, a continuación:



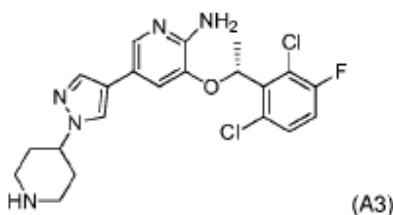
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 40 En otra realización preferida, el inhibidor de ALK es el Compuesto A2, que es N6-(2-isopropoxi 5-metil-4- (1-metilpiperidin-4-il) fenil) N4- (2- (isopropilsulfonyl)fenil) -1H pirazolo[3,4-d] pirimidina-4,6-diamina, a continuación:



o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

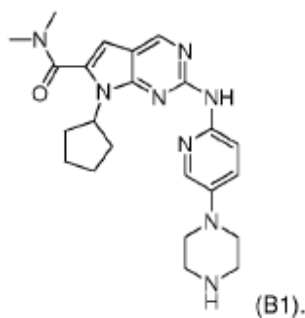
En otro aspecto de la presente divulgación, el inhibidor de ALK es el Compuesto A3, que es (R) -3- (1 - (2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi)-5-(1-(piperidin-4-il)-1 H-pirazol-4-il) piridin-2-amina, conocido comúnmente como Crizotinib y nombre comercial XALKORI® a continuación:



o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En un aspecto de la combinación de la divulgación, el inhibidor de CDK es un inhibidor de CDK4 o CDK6. En una variación, el inhibidor de CDK es un inhibidor de CDK4. En otra variación, el inhibidor de CDK es un inhibidor de CDK6. En aún otra variación, el inhibidor de CDK es un inhibidor dual de CDK4 y CDK6.

En una realización, el inhibidor de CDK es Compuesto B1, que es 7-ciclopentil-N, N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida, descrito por la fórmula siguiente:



Las realizaciones específicas de las combinaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen los siguientes:

(1) Combinación que comprende el Compuesto A1 y el Compuesto B1;

(2) Combinación que comprende el Compuesto A2 y el Compuesto B1.

También se describe la combinación de más de dos ingredientes activos separados como se ha expuesto anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de esta invención podría incluir tres ingredientes activos o más.

A menos que se indique lo contrario, si hay una discrepancia entre la estructura de un compuesto y su nombre químico, la estructura del compuesto prevalece.

Los compuestos A1, A2, y B, se pueden incorporar en la combinación de la presente invención, ya sea en la forma de su base libre o cualquier sal del mismo. Las sales pueden estar presentes solas o en mezcla con el compuesto libre, y son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales de los compuestos se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, con un átomo de nitrógeno básico. Ácidos inorgánicos adecuados son por ejemplo, ácidos de halógeno, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácido succínico, ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido fumárico o ácido metanosulfónico. Para fines de aislamiento o purificación también es posible usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, solamente se emplean sales farmacéuticamente aceptables o compuestos libres (cuando sea aplicable en la forma de preparaciones farmacéuticas), y estas son por lo tanto preferidas.

Se comprenden también las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los racematos correspondientes, diastereoisómeros, enantiómeros, tautómeros, así como las correspondientes modificaciones cristalinas de los compuestos anteriormente descritos cuando están presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, que se describen en la presente. Los compuestos usados como ingredientes activos en las combinaciones de la presente invención pueden prepararse y administrarse como se describe en los documentos citados, respectivamente.

Farmacología y Utilidad

Se observa que los socios individuales de la combinación de la presente invención son compuestos que se sabe tienen la actividad inhibidora. Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la combinación (s) de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables exhiben propiedades terapéuticas de cooperación beneficiosas (por ejemplo, sinérgicas) cuando se prueban in vitro en ensayos de quinasa libres de células y en ensayos celulares, e in vivo en un modelo de ratón de cáncer, y son por lo tanto útiles puesto que las hacen útiles para el tratamiento de enfermedades proliferativas, en especial cánceres. El término "enfermedad proliferativa" incluye, pero no limita a, cáncer, tumor, hiperplasia, reestenosis, hipertrofia cardíaca, trastorno inmune e inflamación.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende, juntos o por separado, (a) un primer agente que es un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un segundo agente que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que es un compuesto (B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de neuroblastoma. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una combinación farmacéutica, por separado o juntos, (a) un primer agente que es un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un segundo agente que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, especialmente cáncer.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere además a un método para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva de una combinación farmacéutica o una composición farmacéutica, que comprende: (a) un primer agente que es un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un segundo agente que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con la presente invención, el primer agente y el segundo agente pueden administrarse ya sea juntos en una única composición farmacéutica, de forma independiente en composiciones farmacéuticas separadas, o secuencialmente.

Preferiblemente, la presente invención es útil para el tratamiento de un mamífero, especialmente seres humanos, que sufren de neuroblastoma.

Ejemplos de una enfermedad proliferativa que puede ser tratada con la combinación de la presente divulgación son por ejemplo cánceres, incluyendo, pero no limitados a, sarcoma, neuroblastoma, linfomas, cáncer de pulmón, bronquios, próstata, mama (incluyendo los cánceres de mama esporádicos y las víctimas de la enfermedad de Cowden), páncreas, gastrointestinal, colon, recto, colon, adenoma colorrectal, de tiroides, hígado, conductos biliares intrahepáticos, hepatocelular, glándula suprarrenal, estómago, gástrico, glioma, glioblastoma, endometrial, melanoma, riñón, pelvis renal, vejiga urinaria, cuerpo uterino, cuello del útero, vagina, ovario, mieloma múltiple, esófago, una leucemia, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica, leucemia mieloide, cerebro, un carcinoma del cerebro, cavidad oral y faringe, laringe,

intestino delgado, linfoma no Hodgkin, melanoma, adenoma vellosa del colon, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, un carcinoma de mama, carcinoma de células basales, linfoma anaplásico de células grandes, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas, queratosis actínica, enfermedades tumorales (incluyendo tumores sólidos), un tumor del cuello o la cabeza, policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis con metaplasia mieloide, cáncer de mama inflamatorio y enfermedad de Waldenstroem.

Ejemplos adicionales incluyen, policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis con metaplasia mieloide, asma, EPOC, SDR, síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica, infestación parasitaria (en particular metazoos) (incluyendo eosinofilia tropical), aspergilosis broncopulmonar, poliarteritis nodosa (incluyendo síndrome de Churg- Strauss), granuloma eosinofílico, trastornos relacionados con eosinófilos que afectan las vías respiratorias ocasionados por reacción a fármacos, psoriasis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, alopecia areata, eritema multiforme, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, vitiligo, hipersensibilidad vasculitis, urticaria, penfigoide ampolloso, lupus eritematoso, pénfigo, epidermólisis bullosa adquirida, trastornos autoinmunes hematológicos (ej., anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia hipoplásica congénita y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis crónica activa, miastenia gravis, síndrome de Steven- Johnson, psoriasis idiopática, enfermedad autoinmune inflamatoria del intestino (ej., colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, alveolitis, neumonitis crónica por hipersensibilidad, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, uveítis (anterior y posterior), fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriática, glomerulonefritis, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, hipertensión, trombosis venosa profunda, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, angina inestable, tromboembolismo, embolia pulmonar, enfermedades trombotológicas, isquemia arterial aguda, oclusiones tromboticas periféricas, y la enfermedad arterial coronaria, lesiones por reperfusión, retinopatía, tales como retinopatía diabética o retinopatía hiperbárica inducida por oxígeno, y enfermedades caracterizadas por la presión intraocular elevada o secreción del humor acuoso ocular, tal como glaucoma.

Donde se menciona un cáncer, un tumor, una enfermedad tumoral, sarcoma, o un cáncer, también se implica la metástasis en el órgano o tejido original y/o en cualquier otra localización, alternativamente o además, cualquiera que sea la ubicación del tumor y/o metástasis.

La combinación de inhibidores de ALK y CDK4/6 de la presente invención es particularmente útil para el tratamiento de cánceres positivos a ALK, es decir, un cáncer mediado por/que depende de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK). Los datos mostrados en la presente muestran que la combinación de la presente invención es efectiva en el tratamiento de cáncer, en particular neuroblastoma, que muestra la sobreexpresión o amplificación y/o mutación somática del gen y/o proteína de ALK.

La combinación de inhibidores de ALK y CDK4/6 de la presente invención también puede ser útil en el tratamiento de tumores o cánceres resistentes a ALK. Un mecanismo de resistencia del tumor cuando se trata con inhibidores ALK es que las mutaciones aparezcan en el gen ALK. Este mecanismo se ha demostrado en un ensayo clínico en pacientes tratados con Crizotinib con tumores positivos para ALK (en su mayoría carcinoma de pulmón de células no pequeñas). Algunas de estas mutaciones de resistencia son similares a las mutaciones encontradas en neuroblastoma. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se planteó la hipótesis de que estas mutaciones de resistencia conducen a la activación de ALK para promover aún más la proliferación del tumor. Por ejemplo, las mutaciones en el área T1151/L1152/C1156 y el área 11171/F1174 de ALK son similares a mutaciones de neuroblastoma. Puesto que las combinaciones del inhibidor de ALK y el inhibidor de CDK de la presente invención son eficaces en los tumores de neuroblastoma que tienen mutaciones de amplificación, las combinaciones serían eficaces en estos tumores resistentes a ALK.

En consecuencia, en una realización, la combinación de la presente invención es útil en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que depende de la amplificación del gen de ALK. En otra realización, la combinación de la presente invención es útil en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que depende de una mutación del gen de ALK. En aún otra realización, la combinación de la presente invención es útil en el tratamiento de una enfermedad proliferativa que depende de una mutación y la amplificación del gen de ALK.

En un aspecto de la divulgación, la enfermedad proliferativa celular se selecciona del linfoma, osteosarcoma, melanoma, un tumor de mama, renal, de próstata, colorrectal, de tiroides, de ovario, de páncreas, neuronal, de pulmón, de útero o tumor gastrointestinal, tumor resistente a ALK, cáncer de mama inflamatorio, linfoma anaplásico de células grandes, carcinoma pulmonar de células no pequeñas y neuroblastoma.

En un aspecto preferido de la divulgación, la enfermedad proliferativa celular es el linfoma anaplásico de células grandes. En otra realización preferida de la divulgación, la enfermedad proliferativa celular es el carcinoma

pulmonar de células grandes. En aún otro aspecto preferido de la divulgación, la enfermedad proliferativa celular es el linfoma anaplásico de células grandes. De acuerdo con la invención, la enfermedad proliferativa celular es neuroblastoma. En una realización preferida, la enfermedad proliferativa celular es un tumor resistente a ALK.

5 Estudios in vitro e in vivo demostraron que la administración de una combinación farmacéutica de la invención dio como resultado un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, con respecto a aliviar, retrasar la progresión o inhibir los síntomas, en comparación con una monoterapia que aplica sólo uno de los agentes (a) o agentes (b) utilizados en la combinación de la invención. El beneficio que pequeñas cantidades de los ingredientes activos se pueden utilizar, por ejemplo, que las dosis pueden ser más pequeñas y/o
10 administradas con menor frecuencia, podría disminuir la incidencia o la gravedad de los efectos secundarios, lo que puede conducir a una mejor calidad de vida o una disminución en morbilidad. Esto está en concordancia con los deseos y requerimientos de los pacientes a ser tratados. El resultado de los estudios in vitro y in vivo se indica en la sección de Ejemplos, abajo.

15 Para demostrar que la combinación de un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK de la presente invención es particularmente adecuada para el tratamiento efectiva de enfermedades proliferativas con buen margen terapéutico y otras ventajas, los ensayos clínicos pueden llevarse a cabo de una manera conocida por la persona experta.

20 Los estudios clínicos adecuados son, por ejemplo, estudios de etiqueta abierta, de escalado de dosis en pacientes con enfermedades proliferativas. Tales estudios prueban en particular el sinergismo de los ingredientes terapéuticos de la combinación de la invención. Los efectos beneficiosos se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios que son conocidos como tales por un experto en la técnica. Tales estudios son, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia utilizando los ingredientes activos y una combinación de la invención. Preferiblemente, la dosis de agente (a) se escala hasta que la Dosis Máxima Tolerada se alcanza, y el agente (b) se administra con una dosis fija. Alternativamente, el agente (a) se administra en una dosis fija y la dosis de agente (b) se escala. Cada paciente
25 recibe dosis del agente (a) bien sea diarias o intermitentes. La eficacia del tratamiento puede determinarse en tales estudios, por ejemplo, después de 12, 18 o 24 semanas mediante evaluación de puntuaciones de síntomas cada 6 semanas.

Composición farmacéutica, administración y dosificación

30 Un objetivo de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que es conjuntamente terapéuticamente efectiva al combatir o prevenir enfermedades proliferativas, de cada agente socio de la combinación (a) y (b) de la invención.

35 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una combinación farmacéutica que comprende, juntos o por separado, (a) un primer agente que es un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) seleccionado del compuesto A1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un compuesto A2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un segundo agente que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) que es un compuesto (B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un excipiente para uso en el tratamiento de neuroblastoma. Inhibidores de ALK e inhibidores de CDK que son adecuados para uso en la combinación de la invención. En
40 una realización de referencia, tal composición farmacéutica de la presente invención es para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. De acuerdo con la presente invención, el agente (a) y el agente (b) se pueden administrar juntos en una sola composición farmacéutica, por separado en forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación unitarias separadas, o secuencialmente. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

45 Las composiciones farmacéuticas para administración separada de agentes o para la administración en una combinación fija (es decir, una única composición galénica que comprende al menos dos socios de combinación (a) y (b)) de acuerdo con la invención pueden ser preparados de una manera conocida per se y son aquellas adecuadas para administración enteral, tal como administración oral o rectal, tópica, y parenteral a sujetos, incluyendo mamíferos (animales de sangre caliente), tales como seres humanos, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un socio de combinación farmacológicamente activo solo, por ejemplo,
50 como se indica anteriormente, o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables o diluyentes, especialmente adecuados para la aplicación enteral o parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas contienen, por ejemplo, entre 0,1% y 99,9% aproximadamente, preferiblemente entre 1% y 60% aproximadamente de los ingredientes activos.

Las composiciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas de dosificación unitaria, tales como tabletas recubiertas de azúcar, tabletas, cápsulas o supositorios, ampollas, soluciones inyectables o suspensiones inyectables. La administración tópica es, por ejemplo a la piel o el ojo, por ejemplo en forma de lociones, geles, ungüentos o cremas, o en una forma nasal o de supositorio. Si no se indica lo contrario, estas se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario de cada agente terapéutico contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita por sí mismo constituir una cantidad efectiva puesto que la cantidad efectiva necesaria puede ser alcanzada por la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticos aceptables y pueden fabricarse de manera convencional mediante la mezcla de uno o ambos socios de combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, manitol, y/o glicerol, y/o lubricantes y/o polietilenglicol. Ejemplos de aglutinantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, silicato de magnesio y aluminio, almidones, tales como almidón de maíz, trigo o arroz, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, y, si se desea, desintegrantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, almidones, agar, ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio, y/o mezclas efervescentes, o adsorbentes, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. También es posible utilizar los compuestos de la presente invención en forma de composiciones parenteralmente administrables o en forma de soluciones de infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas y/o pueden comprender excipientes, por ejemplo conservantes, estabilizantes, compuestos humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o reguladores.

En particular, una cantidad terapéuticamente efectiva de cada socio de combinación de la combinación de la invención se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden, y los componentes pueden administrarse por separado o como una combinación fija. Por ejemplo, el método para prevenir o tratar un cáncer de acuerdo con la invención puede comprender: (i) la administración del primer agente en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) la administración de un segundo agente terapéutico (b) en forma libre o forma de sal farmacéuticamente aceptable, de forma simultánea o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades conjuntamente terapéuticamente eficaces, preferiblemente en cantidades sinérgicamente eficaces, por ejemplo, en dosificaciones diarias o intermitentes correspondientes a las cantidades descritas en la presente. Los socios de combinación individuales de la combinación de la invención pueden administrarse por separado en diferentes momentos durante el curso de la terapia o concurrentemente en formas de combinación divididas o individuales. Además, el término administrar también abarca el uso de un profármaco de un socio de combinación que se convierte in vivo en el socio de combinación como tal. Por lo tanto, se debe entender que la presente invención abarca todos estos regímenes de tratamiento simultáneo o alterno y el término "administrar" se debe interpretar en consecuencia.

La dosificación efectiva de cada uno de los agentes de socio de combinación empleados en la combinación de la invención puede variar dependiendo del compuesto o composición farmacéutica particular empleada, el modo de administración, la afección a tratar, y la gravedad de la afección a tratar. Por lo tanto, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores incluyendo el tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular empleado. Un médico, clínico o veterinario de experiencia normal puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima para lograr la concentración de fármaco dentro del rango que proporcione eficacia requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco a los sitios objetivo. Esto involucra una consideración de la distribución, equilibrio, y eliminación de un fármaco.

Para los fines de la presente invención, una dosis terapéuticamente efectiva será generalmente una dosis diaria total administrada a un huésped en dosis únicas o divididas. El compuesto de la fórmula (I) se puede administrar a un huésped en un intervalo de dosificación diaria de, por ejemplo, entre 0.05 y 50 mg/kg aproximadamente de peso corporal del receptor, preferiblemente entre 0.1 y 25 mg/kg aproximadamente de peso corporal del receptor, más preferiblemente entre 0.5 y 10 mg/kg aproximadamente de peso corporal del receptor. El Agente (b) puede administrarse a un huésped en un intervalo de dosificación diaria de, por ejemplo, entre 0,001 y 1000 mg/kg aproximadamente de peso corporal del receptor, preferiblemente entre 1.0 y 100 mg/kg aproximadamente de peso corporal del receptor, y lo más preferiblemente entre 1.0 y 50 mg/kg de peso corporal del receptor. Las composiciones unitarias de dosificación pueden contener tales cantidades de submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria.

La combinación de ALKi y CDKi de la invención puede utilizarse sola o combinada con al menos otro compuesto farmacéuticamente activo para uso en estas patologías. Estos compuestos activos se pueden combinar en la misma preparación farmacéutica o en la forma de preparaciones combinadas "kit de partes" en el sentido de que los socios de combinación pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los socios de combinación, es decir, simultáneamente o en diferentes puntos de tiempo. Las partes del kit de partes pueden entonces, por ejemplo, administrarse simultáneamente o escalonarse cronológicamente, es decir en diferentes puntos de tiempo y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. Ejemplos no limitantes de compuestos que se pueden citar para uso en combinación con la combinación de ALKi y CDKi de la invención incluyen fármacos de quimioterapia citotóxicos, tales como anastrozol, clorhidrato de doxorrubicina, flutamida, dexametaxona, docetaxel, cisplatino, paclitaxel, etc.

KITS

La presente divulgación se refiere además a un kit que comprende un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en los Compuestos A1 a A3 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y Compuesto B o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y un inserto de paquete u otro etiquetado incluyendo indicaciones para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

La presente divulgación se refiere además a un kit que comprende un primer compuesto seleccionado de los compuestos A1-A3 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y un inserto de paquete o otro etiquetado incluyendo directrices para el tratamiento de una enfermedad proliferativa mediante la co-administración con el Compuesto B o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención descrita aquí. La combinación del Compuesto A1 y el Compuesto B y la combinación del Compuesto A2 y el Compuesto B son parte de la invención reivindicada. Las otras combinaciones en los ejemplos son ejemplos de referencia de la combinación de la divulgación. Los efectos beneficiosos de la combinación farmacéutica de la presente invención también se pueden determinar mediante otros modelos de prueba conocidos por los expertos en la técnica pertinente.

Ejemplo A: Identificar Combinaciones Sinérgicas basadas en el modelo de Aditividad de Loewe con el cribado de alto rendimiento

Se evaluó la interacción sinérgica de las combinaciones de fármacos con base al Modelo de Aditividad de Loewe usando el software Chalice [CombinatoRx, Cambridge MA]. Véase, Lehar J, Krueger AS, Avery W, et al., 2009, en Las combinaciones sinérgicas de fármacos tienden a mejorar la selectividad terapéuticamente relevante, Nat Biotechnol. 27:659-66. El software compara la respuesta (% de inhibición o % de reducción de la viabilidad celular) del tratamiento de fármacos de una combinación de dos agentes a la respuesta de los agentes actuando solos, frente al modelo aditivo de referencia del fármaco con una dosis igual del mismo (el Modelo de Aditividad de Loewe). Las desviaciones de los aditivos de dosis se pueden evaluar numéricamente con una "puntuación de sinergia", que cuantifica la resistencia global del efecto de combinación. Una puntuación sinergia >0 indica una combinación sinérgica. Con el fin de garantizar que solamente se seleccionaron combinaciones fuertemente sinérgicas, los criterios de aceptación se fijaron en un nivel más alto. Las combinaciones totalmente sinérgicas se definieron como aquellas que tienen tanto una puntuación sinérgica >2, una puntuación sinérgica que es dos veces mayor que el modelo de fondo (sin sinergia) predeciría, como una eficacia máxima de >100, un valor equivalente a equilibrio, tal como se determina del cálculo de inhibición del crecimiento.

Veinte líneas celulares de neuroblastoma humano completamente caracterizadas (Tabla 1) abajo se trataron con los Compuestos A1, A2, A3 y B, de forma individual, y con las siguientes combinaciones:

(1) Compuestos A1 y B;

(2) Compuestos A2 y B, y

(3) Compuestos A3 y B. Después del tratamiento, la viabilidad celular (cantidad de células viables) para cada una de las mezclas de ensayo se determinó mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-

Glo® (CTG) (Promega) se describe en la sección de Ensayo, abajo. Quince de 20 de las líneas celulares generaron datos de detección primaria de alta calidad; las otras cinco líneas celulares o bien no crecieron o produjeron datos que eran demasiado ruidosos y por lo tanto no se incluyeron en el análisis. La respuesta al tratamiento (% de reducción de la viabilidad celular) se analizó usando el software de Chalice [CombinatoRx, Cambridge MA]. La evaluación de los datos y generación de gráficos se realizó utilizando el software Microsoft Excel y el software Chalice.

Las puntuaciones de sinergia de las tres combinaciones ensayadas se muestran en la Tabla 2 y la Tabla 3. La sinergia se observó para la combinación de A1 y B en LAN1 (F1 174 L), LAN5 (R1275Q), NB-1643 (R1 275Q), NB-SD (F1 174L), y las células NB-1691 (WT). Se observa que este co-tratamiento era especialmente sinérgico en células LAN-5. Se observó sinergia para la combinación de A2 y B en Kelly (F1 74L), LAN-5 (R1275Q), SK-N-BE (2) (WT), y NB-1691 (WT). La auto-combinación del Compuesto A2 en la línea celular NB-1 (ALK-amplificado) también fue identificada como probablemente sinérgica debido a la potente actividad individual de los agentes individuales de este compuesto en esta línea celular. No se observó sinergia para la combinación de A3 y B en cualquiera de las líneas celulares ensayadas.

Tabla 2. Puntajes de Sinergia de la Combinación A1 x B en Células de Neuroblastoma Humano

Nombre de	Estado de ALK	Comp A1 x Comp B			Autocruce de Compuesto A1			Autocruce de Compuesto B		
		Medio	Error	Efecto Combo Max	Medio	Error	Efecto Combo Max	Medio	Error	Efecto Combo Max
CMP-134	WT	0.357	0.159	50.5	0.223	0.016	26.1	0.388	0.033	52.3
IMR-5	WT	0.715	0.276	79.2	0.884	0.022	79.2	0.788	0.047	82.0
KELLY	F1174L	1.311	0.229	91.8	0.900	0.412	26.1	0.255	0.397	60.5
LAN-1	F1174L	2.259	0.242	153.4	1.011	0.038	114.2	1.321	0.043	142.3
LAN-5	R1275Q	4.073	0.711	115.8	1.731	0.044	166.1	1.161	0.038	99.2
NB-1	WT Amp	1.421	0.579	172.8	1.607	0.054	181.9	1.429	0.036	111.0
NB-1643	R1275Q	2.573	0.444	129.0	1.231	0.046	151.1	0.929	0.030	76.4
BN-1691	WT	2.031	0.402	112.0	0.760	0.034	111.9	1.032	0.051	121.1
NB-SD	F1174L	2.499	0.652	128.2	0.908	0.039	141.5	1.476	0.034	98.6
NGP	WT	0.294	0.087	55.9	0.822	0.016	104.1	0.084	0.011	31.2
NLF	WT	0.202	0.070	41.3	0.152	0.082	27.1	0.122	0.124	43.9
SH-SY5Y	F1174L	1.701	0.379	92.9	0.638	0.451	91.5	0.811	0.813	86.8
SK-N-AS	WT	0.615	0.150	73.1	0.374	0.231	42.4	0.503	0.273	64.7
SK-N-BE(2)	WT	0.430	0.140	77.3	0.246	0.014	25.2	0.628	0.037	64.7
SK-N-FI	WT	1.267	0.193	70.6	1.135	0.022	59.7	0.435	0.036	60.3
Media		1.450			0.841			0.757		
Media		1.311			0.884			0.788		

Los valores en **NEGRILLA** fueron identificados como interacción sinérgica con base en la combinación de una puntuación de Sinergia >2 y un efecto máximo de la combinación >100.

Tabla 3. Puntuaciones de Sinergia de las Combinaciones de A2 x B y A3 x B en Células de Neuroblastoma Humano

Nombre de Linea Celular	Estado de ALK	Comp. A2 x Comp. B			Comp. A3 x Comp. B			Autocruce de Comp. A2			Autocruce de Comp. A3			Autocruce de Comp. B		
		Media	Error	Efecto de Combo Max	Media	Error	Efecto de Combo Max	Media	Error	Efecto de Combo Max	Media	Error	Efecto de Combo Max	Media	Error	Efecto de Combo Max
CHP-134	WT	0.17	0.43	121.50	0.12	0.08	26.50	0.10	0.13	180.10	0.02	0.01	10.05	0.35	0.11	48.76
IMR-5	WT	0.44	0.23	182.35	0.25	0.23	64.48	0.23	0.32	179.71	0.73	0.02	99.95	1.04	0.32	89.02
KELLY	F1174L	3.08	0.10	180.45	0.33	0.18	76.93	0.64	0.11	191.61	0.47	0.04	134.74	0.19	0.10	27.66
LAN-1	F1174L	N/A	N/A	N/A	0.59	0.17	69.42	N/A	N/A	N/A	0.63	0.14	77.73	0.25	0.20	62.78
LAN-5	R1275Q	2.55	0.40	194.16	N/A	N/A	N/A	0.87	0.33	196.81	N/A	N/A	N/A	0.57	0.38	73.59
NB-1	WT_Amp	1.93	0.15	192.87	N/A	N/A	N/A	2.97	0.07	193.34	N/A	N/A	N/A	0.34	0.16	40.57
NB-1691	WT	2.62	0.17	168.26	0.45	0.20	72.66	0.97	0.34	196.56	0.21	0.02	36.53	0.38	0.25	91.57
NB-SD	F1174L	1.96	0.46	164.74	0.85	0.35	85.37	1.38	0.49	195.92	0.84	0.03	75.54	0.97	0.26	61.52
NGP	WT	0.88	0.14	135.01	0.00	0.00	0.00	0.84	0.09	184.04	0.01	0.02	11.39	0.01	0.01	17.05
NLF	WT	1.15	0.23	111.80	0.03	0.09	48.81	0.63	0.31	183.68	0.08	0.19	29.10	0.54	0.21	45.78
SH-SY5Y	F1174L	N/A	N/A	N/A	0.02	0.20	72.34	N/A	N/A	N/A	0.98	0.03	141.61	0.09	0.02	35.37
SK-N-AS	WT	1.59	0.14	79.57	0.03	0.16	46.47	0.20	0.07	61.99	0.19	0.01	55.78	0.48	0.10	42.50
SK-N-BE(2)	WT	2.95	0.49	141.96	0.04	0.08	38.40	0.47	0.20	177.26	0.02	0.00	10.76	1.41	0.50	93.36
SK-N-FI	WT	0.35	0.08	116.21	0.00	0.06	32.80	0.65	0.07	161.68	0.04	0.01	20.37	0.21	0.13	51.25

Los valores en **NEGRILLA** fueron identificados como interacción sinérgica con base en la combinación de una puntuación de Sinergia >2 y un efecto máximo de la combinación >100

El efecto del tratamiento farmacológico se demostró mediante las matrices Chalice. La Figura 2 muestra la matriz de dosis Chalice y exceso de inhibición de Loewe (ADD) para células LAN-1 tratadas con una combinación de Compuestos A1 y B (fila superior), Compuesto A consigo mismo (fila central), y el Compuesto B consigo mismo (fila inferior). El % de inhibición (reducción de la viabilidad celular) por los tratamientos farmacológicos se registraron en el bloque. En la matriz de dosis (izquierda); el tratamiento con un único agente en la columna de la izquierda y la fila inferior, y las combinaciones de los bloques de combinación 6x6 restantes. Las diferencias entre los datos en la matriz de dosis y el valor esperado de inhibición generados por el modelo de Loewe se reportaron en la matriz de Exceso de Loewe. En esta matriz de Inhibición de Exceso, la sinergia se define como valores >0 ; que es la inhibición mayor que lo que se esperaría a partir de una simple interacción aditiva. El antagonismo se define como valores <0 ; que es inhibición mayor que lo que se esperaría de una simple interacción aditiva. La puntuación de sinergia de los tratamientos con fármacos se calculó tomando en cuenta la totalidad de los bloques de combinación 6x6 dentro de la matriz. Las puntuaciones de sinergia resultantes en células Lan-1 para Cpd. A1 x B, Comp A1 x A1 y Cpd. BxB, fueron 2.26, 1.01 y 1.32 respectivamente. La combinación A1 xB fue sinérgica en las células Lan-1.

La variación estadística de las puntuaciones de sinergia tabuladas en las Tablas 2 y 3 se ilustran gráficamente mediante un diagrama de cuadros (Figura 3). Sólo se incluyeron los datos de dos de los tres inhibidores de ALK; tal como se utiliza en esta gráfica, un inhibidor de ALK se refiere al Compuesto A1 o Compuesto A2, y el inhibidor de CDK4/6 se refiere al Compuesto B. En células de la enfermedad de ALK, las combinaciones ALK x CDK4 / 6 fueron fuertemente sinérgicas con una puntuación de de sinergia de 2.26 y derivación estándar de 0.9. Las combinaciones ALK x ALK y CDK4/6 X CDK4/6 son moderadamente sinérgicas con la puntuación de sinergia en 1.01 1 (sd = 0.4) y 1.16 (sd = 0.43), respectivamente. En las células normales de ALK, las combinaciones y los tratamientos de auto-cruzamiento no fueron sinérgicos con puntuación sinérgica de aproximadamente 0.5, pero con desviaciones estándar similarmente grandes.

Para la identificación visual para composiciones fuertemente sinérgicas, los datos de las Tablas 2 y 3 se presentan en gráficos de dispersión (Figuras 4 A-C), donde la eficacia de combinación máxima se representó frente a las puntuaciones de sinergia. Sólo se incluyeron datos de dos de los tres inhibidores de ALK, los compuestos A1 y A2. En un gráfico de dispersión, un desplazamiento vertical implica efecto aditivo; un desplazamiento a la derecha implica interacciones sinérgicas y un desplazamiento en diagonal implica sinergia con un aumento en la eficacia. Los hits de combinación sinérgica son aquellos en el cuadrante superior derecho, donde la puntuación de sinergia es >2 y la eficacia máxima es >100 . Los dos inhibidores de ALK (Compuestos A1 y A2) mostraron una eficacia de un solo agente preferencial para las líneas celulares de la enfermedad ALK sobre las líneas celulares normales de ALK (Figura 4A). El inhibidor de CDK (Compuesto B) mostró una eficacia como agente único (>100) en dos líneas celulares de enfermedades y una línea celular normal (Figura 4B). La combinación de inhibidores ALK y CDK4/6 resultó en una interacción que conduce tanto a la sinergia como a una mayor eficacia en 7 de las 15 líneas celulares probadas y es preferencial en las líneas celulares de la enfermedad de ALK.

Los resultados apoyan el uso de una combinación de un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK para el tratamiento de cánceres positivos a ALK, en particular neuroblastoma.

Ejemplo B: Determinación de Efectos de Fármacos Combinatorios con base en el Modelo de Chou-Talalay

Los efectos de fármacos combinatorios de una combinación de los inhibidores de ALK y de CDK4/6 se cuantificaron utilizando el método del índice de combinación de Chou-Talalay (Trends Pharmacol Sci 4, 450-454) utilizando software CalcuSyn v2 (Biosoft, Cambridge, UK).

Cuatro líneas celulares de neuroblastoma humano completas caracterizadas NB1643 (R1275Q), SHSY5Y (F1 174 L), NB1691 (WT), y EDC1 (WT) se seleccionaron para el estudio. Las líneas celulares se dosificaron por triplicado en combinación utilizando la proporción equipotente constante donde los socios de combinación, el Compuesto A1 y el Compuesto B se combinaron a 4x, 2x, 1x, $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de su dosis individual IC_{50} , y con cada compuesto individualmente. La dependencia de la concentración del efecto de anti-proliferación para ambos socios de combinación, primero solo y luego en combinación se midió utilizando el sistema xCELLigence. CI para cada uno de los tratamientos se calculó mediante el software CalcuSyn v2 (Biosoft, MO).

CI para la línea celular mutante de ALK NB1643 (R1275Q) se reportó en la Tabla 5. Se entiende que un CI de 0-9-1.1 indica interacción aditiva, valores por debajo de 0.9 indican sinergismo, y valores superiores a 1.1 indican antagonismo. Los datos muestran el CI para todas las combinaciones ensayadas, con la excepción de dos,

fueron de menos de 0.9; en consecuencia, las combinaciones de prueba del Compuesto A y el Compuesto B fueron sinérgicas.

Tabla 5. CI para las células NB1643 a partir de los valores experimentales

Cpd A1 (nM)	Cpd B (nM)	Fa	CI
55	187.5	0.51	0.688
55	375	0.53	0.968
55	750	0.69	0.695
55	1500	0.78	0.710
55	3000	0.78	0.710
111	187.5	0.65	0.456
111	375	0.75	0.341
111	750	0.79	0.405
111	1500	0.84	0.462
111	3000	0.85	0.781
222	187.5	0.73	0.436
222	375	0.8	0.326
222	750	0.83	0.359
222	1500	0.86	0.429
222	3000	0.85	0.838
444	187.5	0.78	0.520
444	375	0.83	0.390
888	750	0.93	0.200
888	1500	0.89	0.508
888	3000	0.9	0.642

- 5 El efecto del fármaco de combinación de las combinaciones A1 xB en células NB-1643 se representó en las figuras 6A-D. La interpretación de estos gráficos se puede encontrar en las Figuras 5A-5D, y en la sección de Ensayos abajo. Cada una de las gráficas demuestra visualmente que la combinación del Compuesto A1 y B exhibió efecto sinérgico en las células NB-1643. En particular, los gráficos Fa-CI (Figuras 6C y D) muestran que el CI fue mucho menor que 1 (aditivo) para todas las combinaciones probadas. Adicionalmente, el gráfico de isoblograma (Figura 6E) muestra que las dosis ED₉₀ y ED₇₅ para los co-tratamientos estuvieron muy por debajo de sus respectivos isoblogramas.
- 10

5 Una de las muchas ventajas de la combinación sinérgica es que una cantidad menor de fármaco puede ser usada o dosificación menos frecuente para lograr la misma eficacia con menor efecto secundario. El índice de reducción de la dosis (DRI, Chou y Chou, 1988) puede ser estimado a partir de valores experimentales o a partir de cálculos. Para las células NB1643, el Índice de Reducción de Dosis (DRI) a partir de valores experimentales se reportan en la Tabla 6 y aquellos del cálculo se reportan en la Tabla 7.

Tabla 6. DRI a partir de valores experimentales para el co-tratamiento con Compuesto A1 y B en células NB1643

(DRI)	Fármaco solo		Índice de Reducción de dosis	
Fa	Cpd A1 (nM)	Cpd B (nM)	Cpd A1	Cpd B
0.51	182.6374	841.7031	3.321	4.530
0.75	801.9141	4759.6923	7.224	12.694
0.83	1583.9055	1.056e+004	7.135	14.084
0.9	3723.4705	2.87e+004	8.386	19.160
0.9	3723.4705	2.87e+004	4.193	9.580

Tabla 7. DRI a partir de los cálculos para el co-tratamiento con Compuesto A1 y B de células NB1643.

(DRI)	Fármaco solo		Índice de Reducción de dosis	
Fa	Cpd A1 (nM)	Cpd B (nM)	Cpd A1	Cpd B
0.020	0.7501	1.3507	3.099	1.652
0.050	2.8193	6.3668	3.455	2.310
0.100	8.0106	21.6280	3.764	3.008
0.150	15.2920	46.1139	3.969	3.543
0.200	24.8814	81.5448	4.130	4.007
0.0250	37.1953	130.5781	4.269	4.436
0.300	52.8478	197.0133	4.394	4.849
0.350	72.7063	286.2422	4.510	5.256
0.400	97.9951	406.0079	4.622	5.669

	Fármaco solo		Índice de Reducción de dosis	
(DRI)				
0.450	130.4690	567.6688	4.732	6.095
0.500	172.7061	788.3600	4.842	6.543
0.550	228.6167	1094.8487	4.954	7.024
0.600	304.3766	1530.7866	5.072	7.552
0.650	410.2451	2171.2783	5.198	8.144
0.700	564.4020	3154.6674	5.336	8.829
0.750	801.9141	4759.6923	5.492	9.549
0.800	1198.7842	7621.7203	5.676	10.683
0.850	1950.5238	1.34e+004	5.907	12.083
0.900	3723.4705	2.87e+004	6.229	14.231
0.950	1.058e+004	9.762e+004	6.786	18.536
0.990	1.063e+005	1.455e+006	8.200	33.231

El efecto de la combinación del Compuesto A1 y B en las células SHSY5Y (F1 174L) se reporta en la Tabla 8. Los datos muestran que la combinación fue moderadamente sinérgica a concentraciones bajas a medias y antagónicas a concentración elevada.

5

Tabla 8. CI para las células SHSY5Y a partir de los valores experimentales

Cpd A1 (nM)	Cpd B (nM)	Fa	CI
375	375	0.44	0.810
750	750	0.57	0.815
1500	1500	0.69	1.070
3000	3000	0.91	0.803
6000	6000	0.94	1.268

El efecto de las combinaciones de Compuesto A1 y B en las células SHSY5Y (F1 174 L) se representa en las figuras 7 A-F. Las gráficas demostraron visualmente que las combinaciones fueron ligeramente a moderadamente sinérgicas; los valores CI en la gráfica Fa-CI (Figura 7C) fueron ligeramente inferiores a 1, y la concentración ED₉₀ fue superior al isoblograma ED₉₀.

10

El efecto de las combinaciones de Compuesto A1 y B en células NB1691 (WT) se representa en las figuras 8 A-F. La gráfica Fa-CI (Figura 8C) muestra que el CI fue inferior a 1 cuando la concentración del compuesto fue baja y por encima de 1, cuando la concentración de compuesto fue alta lo que sugiere que la combinación de fármaco es sinérgica a un bajo grado de concentración y aditiva o ligeramente antagonista a mayor rango de concentración. Esta interpretación se apoya en el gráfico de isoblograma (Figura 8E) que demuestra que las combinaciones ED₅₀ y ED₇₅ fueron sinérgicas, pero la combinación ED₉₀ fue antagonista.

El efecto de la combinación del Compuesto A1 y B en las células NBEDC1 (WT) se reporta en la Tabla 9. Los datos muestran que la combinación fue entre moderadamente sinérgica y sinérgica a concentraciones bajas a medias y muy fuertemente sinérgica a una concentración elevada.

Tabla 9. CI para las células NB-EBC1 a partir de los valores experimentales

Cpd A1 (nM)	Cpd B (nM)	Fa	CI
400	325	0.48	0.535
800	650	0.66	0.699
1600	1300	0.85	0.781
3200	2600	0.95	0.799
6400	5200	1	0.002

El efecto de las combinaciones de Compuesto A1 y B en las células NB EDC1 (WT) se grafica en la Figura 9 A-F. La gráfica Fa-CI (Figura 9C) muestra que el CI fueron todos inferiores a 1 lo que sugiere que las combinaciones de fármacos fueron sinérgicas en todo el intervalo de concentración ensayado. Esta interpretación se apoya en la gráfica de isoblograma (Figura 9E) que muestra que las combinaciones ED₅₀, ED₇₅ y ED₉₀ eran todas sinérgicas.

Los datos presentados anteriormente demostraron que la combinación de un inhibidor de ALK (Compuesto A1) y un inhibidor de CDK (Compuesto B) fue sinérgica en células de neuroblastoma con base en el modelo de índice de combinación Chou-Talalay. La sinergia está presente tanto en líneas celulares positivas a ALK como en las líneas celulares tipo silvestre.

Ejemplo C: Efecto del Co-tratamiento sobre la Morfología Celular y la Muerte Celular

El efecto sinérgico antiproliferativo de la combinación de la presente invención se visualizó mediante microscopía óptica. Las células de neuroblastoma humano (F1 174 L) SH-SY5Y se trataron con el Compuesto A1 y el Compuesto B, cada una a concentración del IC₅₀, y la combinación de los compuestos A1 y B, cada compuesto a su concentración de IC₅₀. Setenta y dos horas después del tratamiento, las muestras tratadas se compararon con las muestras sin tratar (vehículo) por microscopía óptica y se registraron en micrografías (Figuras 10 A a D). Comparada con la muestra sin tratar (Figura 10A), la muestra tratada por el Compuesto A1 solo (Figura 10B) mostró una reducción significativa en el número de células intactas. La muestra que se trató con el Compuesto B (Figura 10C) solo muestra un efecto mínimo en el número de células y morfología celular. La muestra tratada por la combinación del Compuesto A1 y el Compuesto B (Figura 10D) casi no muestra células intactas. Estas micrografías demostraron claramente la sinergia de la combinación de la invención en la mejora de la muerte celular en comparación con los tratamientos solamente con el compuesto individual.

Ejemplo D: Efecto del Co-tratamiento sobre la Muerte Celular

La combinación de la invención muestra un efecto sinérgico en el aumento de la muerte celular, pero no en la apoptosis. El efecto del tratamiento con las combinaciones de la invención sobre la viabilidad celular y la apoptosis se evaluó en tres líneas celulares de neuroblastoma humano: NB1643 (R1275Q), SH-SY5Y (F1 de 174 L) y EBC1 (WT) utilizando el ensayo ApoTox-Glo Triplex. Para la confirmación, el efecto del tratamiento sobre la viabilidad celular se evaluó también en NB1643 (R1275Q) utilizando el ensayo de viabilidad celular Luminiscente CellTitre-Glo (CTG). Los ensayos se describieron, abajo.

Las líneas celulares se dosificaron por triplicado con vehículo DMSO, el Compuesto A1 y el Compuesto B, individualmente, a las mismas dosis usadas en la terapia de combinación, y las combinaciones de compuestos A1 y B en una combinación de proporción equipotente constante de 1/4, 1/2, 1, 2, y 4 veces el valor de IC_{50} para cada uno de los agentes. El IC_{50} para el Compuesto A1 y el Compuesto B se determinó previamente como 222 nM y 749.5 nM, respectivamente. Las mezclas de ensayo fueron evaluadas 72 horas después de la dosificación, y los resultados se representan gráficamente en las Figuras 1 1A-C, 12A-C, 13A-C y 14A-C.

Las figuras 11A, 11B, y 11C muestran el efecto del tratamiento sobre la viabilidad y la apoptosis de las células NB1643. La viabilidad celular y la apoptosis se representaron como variación fraccional en el plegamiento frente a la concentración del compuesto(s). Los datos muestran que el Compuesto A1 individual (Figura 11A) o la combinación (Figura 11C) fueron eficaces para producir la muerte celular y la apoptosis, y el Compuesto B individual fue sólo ligeramente efectiva (Figura 11B). Cuando se compara las respuestas a dosis específicas de Compuesto A1 solo y en combinación (Figura 11 C), los datos muestran una mejora significativa de la muerte celular con el co-tratamiento, pero se observó el mismo nivel de apoptosis. .

Este hallazgo de muerte celular mejorada por co-tratamiento fue confirmado por separado por el ensayo CTG de células NB1643 tratadas. En los puntos de dosificación específicos, el tratamiento de combinación (Figura 12C) mejora significativamente la muerte celular, en comparación con el tratamiento con un único agente (Figuras 12A y B).

Las Figuras 13A a C muestran el efecto del tratamiento de células SH-SY5Y (F1 174 L). Una vez más, en comparación con los tratamientos con un solo agente (Figura 13 A y B), el tratamiento de combinación (Figura 13 C) muestra un efecto sinérgico sobre la viabilidad celular, pero el mismo nivel de apoptosis a una concentración baja de compuesto. Se observó que las células estaban muriendo antes a una concentración más alta, por lo que la apoptosis no era detectable, y no se evaluó.

Las Figuras 14A a C muestran el efecto del tratamiento farmacológico para las células EBC1 (WT). Se observó el mismo nivel de muerte celular cuando las células se trataron con el Compuesto A1 solo (Figura 14 A) o con el co-tratamiento (Figura 14 C). La combinación no tuvo ningún efecto sinérgico para células EBC1.

Este estudio demostró que la combinación de la presente invención, en particular, una combinación del Compuesto A1 y el Compuesto B, posee un efecto antiproliferativo sinérgico en células de neuroblastoma positivas a ALK. La combinación de la invención será útil en el tratamiento de enfermedades proliferativas positivas a ALK, en particular, neuroblastoma positivo a ALK.

Ejemplo E: El co-tratamiento reduce en gran medida la expresión de proteínas pALK y pRb

PALK y pRb son biomarcadores para la activación de ALK y CDK, respectivamente. La proteína de retinoblastoma (Rb) es una proteína supresora tumoral que impide el crecimiento excesivo de células mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular. La proliferación celular dependiente de la activación de cdk4 o cdk6 a través de una variedad de mecanismos debería mostrar un aumento de las proteínas Rb fosforiladas (pRB); la inhibición de CDK conduce a la disminución de pRB y la detención del ciclo celular. La inhibición de ALK reduce la expresión de la fosforilación de ALK (pALK); la disminución de pALK conduce a disminución de la proliferación con un eventual punto final de la apoptosis.

La inmunoprecipitación Western se utiliza para someter a ensayo el efecto del tratamiento de fármacos en la cantidad de proteína Rb total y fosforilada y ALK total y fosforilada en células de neuroblastoma de tipo silvestre y ALK+ y correlaciona estos datos con dosis del compuesto en una fracción de la IC_{50} . Una línea celular de ALK+, NB1643 (R1275Q) y una línea celular EBC1 de tipo silvestre se seleccionaron para el estudio.

Las células NB1643 (R1275Q) se trataron con el Compuesto A1 y el Compuesto B individualmente y en combinación en una proporción equipotente constante de 1/16, 1/8, 1/4 y 4 veces de la concentración de IC_{50} de cada uno de los compuestos. Una muestra tratada con vehículo y sin compuesto se preparó y sirvió como control. Se analizaron las mezclas de células 20 horas después del tratamiento.

Las células EBC1 (WT) se trataron con el Compuesto A1 y el Compuesto B individualmente y en combinación en una proporción equipotente constante de 1/4, 1/2, 1, y 4 veces de la concentración IC_{50} de cada uno de los compuestos. Una muestra con vehículo y sin compuesto se preparó y sirvió como control. Las mezclas celulares se analizaron 72 horas después del tratamiento.

La Figura 15 muestra el ALK total (tALK) y el estado pALK de las células NB1643 tratadas. Los datos muestran que el tratamiento por sí solo o en combinación tienen poco efecto sobre el ALK total en el rango de dosificación. El tratamiento ya sea solo o en combinación reduce la cantidad de proteína pALK a 1/16 de la dosis IC₅₀; sin embargo, el tratamiento con la combinación produce un efecto de reducción más pronunciado. Se observa, además, que el grado de reducción depende de la posición de la fosforilación. El pALK fosforilado en el codón de tirosina 1604 muestra una reducción mayor que el pALK fosforilado en el codón de tirosina 1278.

La Figura 16 muestra el estado total de Rb y pRb de células NB1643 tratadas. El tratamiento por cualquier agente solo o la combinación de dos agentes redujo la expresión total de proteínas Rb y pRb. La reducción fue mayor en el tratamiento de combinación. El efecto del tratamiento también depende de la posición de la fosforilación; el efecto del tratamiento fue sustancialmente mayor para pRB S795 que para pRb S780.

La Figura 17 muestra el estado total y de pALK y el estado total y de pRb de células EBC1 (WT) tratadas. La transferencia muestra que el co-tratamiento fue efectiva en la reducción de la expresión de proteínas pALK y pRb.

Los estudios anteriores demostraron de manera concluyente que el co-tratamiento redujo la expresión de proteínas pALK y pRb. El efecto se ha mejorado con el co-tratamiento en comparación con el tratamiento con un único agente. Por consiguiente, las combinaciones de la invención exhiben sinergia en las células ALK+ y de tipo silvestre.

Ejemplo F: Efecto terapéutico mejorado de co-tratamiento contra los tumores de neuroblastoma humano en ratones SCID CB17

La mejora de los estudios de eficacia se llevaron a cabo in vivo en ratones SCID CB17 contra xenoinjertos del neuroblastoma humano SH-SY5Y (que llevan una mutación F1 174L ALK). Los ratones se dividieron en cuatro grupos de estudio:

1) un grupo de control tratado únicamente con vehículo disolvente;

2) un grupo tratado con el Compuesto A1 sólo a 50 mg /kg de dosis a través de vía oral por sonda, sobredosis (se demostró previamente que la dosis era ineficaz en este modelo de ratón);

3) un grupo tratado solamente con el Compuesto B sólo a 250 mg/kg y reducido (con el fin de reducir la toxicidad) a 187.5 mg/kg empezando a partir del día 5. El programa de tratamiento consistió en administración oral, por sonda, sobredosis, y

4) un grupo tratado con la combinación de fármacos (Compuesto A1 a 50 mg/kg y el Compuesto B a 250 mg/kg y se redujo a 187.5 mg/kg el día 5).

El resultado de este estudio se muestra en las Figuras 18, 19A-D y 20.

En los ratones del Grupo 4, que fueron tratados con una combinación de Compuesto A1 y Compuesto B, el volumen del tumor mostró reducción sustancial en relación a los demás grupos (Figura 18). Cuando el volumen del tumor de cada uno de los ratones de prueba en los grupos de prueba se representa frente al tiempo (Figuras 19A a 19D), se muestra que el volumen del tumor disminuyó con el tiempo en los ratones del Grupo 4 (co-tratamiento); mientras que el volumen del tumor aumentó con el tiempo para todos los otros Grupos. La Figura 20 muestra el % de supervivencia de los ratones de prueba con el tiempo. En el Grupo 4, dos de los ratones murieron en el día 7, y el resto sobrevivió a través del período de tratamiento. En el Grupo 3 (tratado solamente con el Compuesto B), uno de los ratones murió el día 14 y el resto sobrevivió a través del período de tratamiento. Para los ratones en los Grupos 1 y 2, el tumor creció demasiado grande, los ratones fueron sacrificados en la semana 1 ½ y 3 respectivamente.

El resultado demostró que la terapia combinada contra xenoinjertos de NB SY5Y humano logró una mayor eficacia que el tratamiento con cada fármaco por separado. Sorprendentemente, el tratamiento de ratones SCID que llevan el tumor SY5Y NB (que se demostró previamente que no es sensible al tratamiento inhibidor de ALK solo) con una dosis farmacológicamente relevante de 50 mg/kg de la combinación de Compuestos A1 y B dio lugar a la contracción del tumor establecido y alcanzó la remisión total del tumor, mientras que el tratamiento con el Compuesto A1 solo en 50 mg/kg dio como resultado solamente un ligero retraso del crecimiento tumoral en comparación con el control de vehículo en este modelo de xenoinjerto SY5Y.

Ejemplo G: Detección de Interacciones Fuertemente Sinérgicas para los Compuestos A1 y B en Células de Neuroblastoma.

Para identificar las composiciones fuertemente sinérgicas en líneas celulares de neuroblastoma, las combinaciones de los compuestos A1 y B se ensayaron frente a un panel de 16 líneas celulares de neuroblastoma, diez de los cuales albergaban ya sea una mutación o amplificación de ALK activadora (Tabla 10). Las combinaciones se ensayaron por duplicado utilizando un bloque de matriz de dosis 7 x 7 en formato de 1536 pozos con una lectura de la proliferación celular como se describe en la sección Ensayo abajo. El Compuesto A1 y B se combinó con ellos mismos para determinar el efecto del ruido de ensayo de los parámetros de evaluación de la sinergia de la interacción aditiva de la dosis que se esperaba. El número/viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto se evaluó del mismo modo y se utilizó para determinar la inhibición máxima del crecimiento observado en el ensayo utilizando el método de NCI para el cálculo.

Todos los cálculos de sinergia se realizaron usando paquete de software CHALICE de Zalicus y potenciales interacciones sinérgicas entre combinaciones de productos fueron evaluadas utilizando la matriz de Inhibición de Exceso 2D de acuerdo con el modelo de Aditividad Loewe y se informaron como puntuación de sinergia (Tabla 10) (Lehar et al). La combinación fuertemente sinérgica se identificó como que tiene tanto (1) una puntuación sinérgica superior a 2, una puntuación sinérgica que es dos veces más grande que lo que el modelo de fondo (sin sinergia) predeciría, y (2) una eficacia máxima de >100, un valor más o menos equivalente al equilibrio, como se determina a partir del cálculo de inhibición del crecimiento. Los efectos de los medicamentos para todas las combinaciones evaluadas se muestran en los gráficos de dispersión (Figura 21). Se observó que el tratamiento con el Compuesto A1 consigo mismo (arriba) dio como resultado una eficacia de agente individual preferencial para el subconjunto de líneas celulares de enfermedades ALK sobre las líneas celulares ALK WT. El tratamiento con el Compuesto B consigo mismo (en el medio) no mostró eficacia de agente individual en cualquiera de las líneas celulares ensayadas. El tratamiento concomitante con Compuestos A1 y B (parte inferior) resultó en una interacción que conduce tanto a la sinergia y el aumento de la eficacia en 3 de las 6 líneas celulares de la prueba 1 y fue preferencial en las líneas celulares de la enfermedad ALK.

Tabla 10. Puntuaciones de sinergia y eficacia máxima de combinación para la Combinación de Compuesto A1 y B entre 16 líneas celulares de neuroblastoma

Línea Celular	ALK	MYCN	P53	Puntuación de Sinergia	Máximo
		amplificado			Eficacia
NB1	Amp ALK ^{del2-3}	Sí	WT	1.22	174
415IMDM	F1174L	Sí	Desconocido	1.68	153
KELLY	F1174L	Sí	WT	1.06	93
LAN1	F1174L	Sí	Mut	0.57	85
NB-SD	F1174L	Sí	Mut	1.76	97
SHSY5Y	F1174L	No	WT	1.16	93
COGN426	F1245C	Desconocido	Desconocido	0.36	56
CHP134	F1245V	Sí	WT	0.10	44
LAN5*	R1275Q	Sí	WT	3.43	116
NB1643*	R1275Q	Sí	WT	2.57	129
IMR5	WT	Sí	WT	0.72	89

NB1691*	WT	Sí	MDM2 Amp	2.08	118
NLF	WT	Sí	Mut	0.14	49
SKNAS	WT	No	Mut	0.36	68
SKNBE(2)	WT	Sí	Mut	0.78	83
SKNFI	WT	No	Mut	0.98	72

* interacción sinérgica.

Ejemplo H: Efectos de dosis de co-tratamiento con un inhibidor de ALK y un inhibidor de CDK4/6 en Células de Neuroblastoma Kelly.

Se investigaron los efectos de dosis de co-tratamiento con un inhibidor de ALK (Compuesto A1 o A2) y un inhibidor de CDK4/6 (Compuesto B) en células de neuroblastoma Kelly. El ensayo se realizó como parte de un cribado más largo. Se obtuvieron las células Kelly de la biblioteca de células de Novartis y se trataron con combinaciones de Compuestos A1 y B y Compuestos A2 y B. El ensayo fue como se describe en la sección abajo del ensayo con la excepción de que una matriz de dosis 9 x 9 se utiliza en su lugar. Las combinaciones se ensayaron por duplicado utilizando un bloque de matriz de dosis 9 x 9. Los agentes individuales se dosificaron en la columna de la izquierda y la fila inferior, y los bloques de combinación 8x8 restantes se dosificaron con los compuestos en una serie de diluciones triples seriadas, donde la concentración de la parte superior de la solución madre fue 1.67 mM, 5 mM y 5 mM de los Compuestos A1, A2 y B, respectivamente. La lectura de la inhibición celular era como se describe en la sección Ensayo abajo. Los análisis de datos se llevaron a cabo por el software Chalice, y se evaluaron posibles interacciones sinérgicas entre combinaciones de sustancias de acuerdo con el Modelo de Loewe de aditividad y se indicaron como puntuación de sinergia. El número/viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto se evaluó del mismo modo y se utilizó para determinar la inhibición máxima del crecimiento observado en el ensayo utilizando el método de NCI para el cálculo. El resultado está tabulado en la Tabla 11 y se demuestra gráficamente en las Figuras 22A y 22B.

Tabla 11 Puntuaciones de sinergia y eficacia máxima de combinación para combinaciones de Compuestos A1 y B y Compuestos A2 y B en células Kelly (ALK⁺ F1 de 174L)

Combinación	Puntuación de Sinergia	Eficacia máxima
A1 + B	1.75	70.7
A2 + B	1.48	74.5

Las combinaciones de cualquiera de los inhibidores de ALK con el inhibidor de CDK fueron eficaces en la inhibición de la proliferación de células Kelly, en particular a concentraciones de compuesto más altas. Las puntuaciones de sinergia fueron moderadas, pero el isoblograma indica una interacción muy fuerte.

Ejemplo I: Efectos de dosis co-tratamiento con inhibidores de la ALK y un inhibidor de CDK4/6 en Kelly y células de neuroblastoma NB-1.

Se investigaron los efectos de dosis de co-tratamiento con un inhibidor de ALK (Compuesto A1 o B) y un inhibidor de CDK4/6 (Compuesto B) en células de neuroblastoma Kelly (ALK⁺, Amp y F1 174L) y NB-1 (ALK⁺, Amp). El ensayo se realizó para confirmar los resultados del Ejemplo H anterior. Las células Kelly y células NB-1 se obtuvieron de la biblioteca de células de Novartis y se trataron con combinaciones de Compuestos A1 y B y Compuestos A2 y B. En este experimento, las combinaciones se ensayaron por duplicado utilizando un bloque de matriz de 9 x 9 dosis donde los bloques de combinación se dosificaron con una serie de diluciones en serie 3 veces. La concentración superior de las soluciones madre utilizadas en las células Kelly era 5 mM para cada uno de los Compuestos A1, A2 y B. La concentración superior de la solución madre utilizada en las células NB-1 fue de 0.56 mM, 0.56 mM, y 5 mM de los Compuestos A1, A2 y B, respectivamente. La lectura de la inhibición celular era como se describe en la sección Ensayo abajo. Los análisis de datos se llevaron a cabo por el software Chalice, y se evaluaron posibles interacciones sinérgicas entre combinaciones de sustancias de acuerdo con el Modelo de Loewe de aditividad y se indicaron como puntuación de sinergia. El número/viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto se evaluó del mismo modo y se utilizó para determinar la inhibición

máxima del crecimiento observado en el ensayo utilizando el método de NCI para el cálculo. Debido a que la transferencia no se hizo a todos los pozos durante la transferencia de compuesto, los resultados en los bloques no dosificados no se introdujeron en el cálculo de las puntuaciones de sinergia y una eficacia de combinación máxima. El resultado está tabulado en la Tabla 12 y las respuestas al tratamiento se demuestra gráficamente en las Figuras 23A, 23B, 23C, 23D.

Tabla 12. Puntajes de sinergia y eficacia máxima de combinación de Combinaciones de Compuestos A1 y B y Compuestos A2 y B en Células Kelly (ALK⁺ F1 174L) y NB-1

Kelly			NB-1	
Combinación	Puntuación de Sinergia	Eficacia máxima	Puntuación Máxima	Eficacia máxima
A1 + B	2.51	165	0.174	98.5
A2 + B	2.29	115	0.194	123

Las combinaciones de cualquiera de los inhibidores de ALK con el inhibidor de CDK fueron eficaces en la inhibición de la proliferación de células Kelly, y la interacción de fármaco fue fuertemente sinérgica.

- 10 Las combinaciones de cualquiera de los inhibidores de ALK con el inhibidor de CDK fueron ineficaces en la inhibición de la proliferación de células NB-1, y las combinaciones no fueron sinérgicas.

Ejemplo J: Efectos de dosis de co-tratamiento con inhibidores de ALK e inhibidores de CDK4/6 en células de neuroblastoma Kelly, NB-1 y SH-SY5Y.

- 15 El experimento para determinar los efectos de dosis de co-tratamiento con un inhibidor de ALK (Compuesto A1 o A2) y un inhibidor de CDK4/6 (Compuesto B) en Kelly (ALK⁺, Amp y F1 174L), NB-1 (ALK⁺, Amp) se repitieron con diferentes concentraciones del compuesto de fármaco; las células de neuroblastoma SH-SY5Y también se incluyeron en el experimento. Las tres líneas celulares se obtuvieron de la biblioteca de células de Novartis o de la ATCC.

- 20 Las células se trataron con combinaciones de Compuestos A1 y B y Compuestos A2 y Compuesto B. En este experimento, las combinaciones se ensayaron por duplicado utilizando un bloque de matriz de 9 x 9 dosis donde los bloques de combinación se dosificaron con una serie de diluciones en serie triples. La concentración superior de la solución madre utilizada en las células Kelly era 2.5 mM para cada uno de los Compuestos A1, A2 y B. La concentración superior de la solución madre utilizada en las células NB-1 fue de 0.28 mM, 0.28 mM, y 2.5 mM de los Compuestos A1, A2 y B, respectivamente. La concentración superior de la solución madre utilizada en las células SH-SY5Y era de 2.5 mM para cada uno de los Compuestos A1, A2 y la lectura de la inhibición de células B fue como se describe en la sección Ensayo abajo. Los análisis de datos se llevaron a cabo por el software Chalice, y se evaluaron posibles interacciones sinérgicas entre combinaciones de sustancias de acuerdo con el modelo de aditividad de Loewe y se indicaron como puntuación de sinergia. El número/viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto se evaluó del mismo modo y se utilizó para determinar la inhibición máxima del crecimiento observado en el ensayo utilizando el método de NCI para el cálculo.

- 35 Se observaron problemas de calidad de datos. La respuesta a la dosis de agente único tanto para A1 y A2 en las células Kelly estaba por debajo de las expectativas en comparación con las del Ejemplo I. Las concentraciones de dosis más bajas pueden haber contribuido a la baja puntuación sinérgica; pero otros factores, tales como la precipitación con sales de los compuestos o la inestabilidad de la línea celular podrían desempeñar un papel. La eficacia máxima de combinación para las combinaciones no se determinó para este experimento. Las calificaciones sinérgicas de Kelly y las líneas celulares NB-1 se tabulan en la Tabla 13 y los efectos de las dosis del tratamiento se demuestran gráficamente en las Figuras 24 A a D. Los problemas de calidad de datos con la línea celular SH-SY5Y fueron más graves, haciendo la interpretación de los datos difíciles (Figuras 24E y 24F). La puntuación de la sinergia no se determinó para esta línea celular.

- 40 Tabla 13. Puntajes de sinergia y eficacia máxima de combinación de las Combinaciones de los Compuestos A1 y B y Compuestos A2 y B en células Kelly (ALK⁺ F1 174L) y NB-1

Kelly			NB-1		
Combinación	Puntuación de Sinergia	de	Eficacia máxima	Puntuación de Sinergia	de Eficacia máxima
A1 + B	0.82		ND	0.142	ND
A2 + B	1.52		ND	0.0.601	ND

ND significa no determinó.

Las puntuaciones de sinergia de las combinaciones de A1 x B y A2 x B estaban entre bajos y moderados, por debajo de los criterios para la combinación fuertemente sinérgica (puntuación de sinergia >2). Las combinaciones de cualquiera de los inhibidores de ALK con el inhibidor de CDK no eran sinérgicos en las células NB-1. Debe entenderse que los datos podrían ser poco fiables debido a los problemas con los datos observados.

5 Ensayos

Preparación de Inhibidores de ALK y CDK

Los compuestos divulgados en este documento pueden ser sintetizados a través de la química de rutina por un experto en la técnica.

- 10 Compuesto A1, 5-cloro-N2- (2-isopropoxi-5-metil-4-(piperidin-4-il) fenil)-N4-[2-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirimidina-2,4-diamina, se describe específicamente en el Ejemplo 66 de WO2010 / 020675, y se prepararon por el procedimiento de síntesis descrito en el mismo.

Compuesto A2, N6-(2-isopropoxi-5-metil-4-(1 -metilpiperidin-4-il)fenil)-N4-(2- (isopropilsulfonyl)fenil)-1 H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4,6-diamina, se describe específicamente en el Ejemplo 231 de WO2010/020675, y se prepararon por el procedimiento de síntesis descrito en el mismo.

- 15 Compuesto A3 (referencia), conocido comúnmente como crizotinib, nombre comercial XALKORI®, es comercializado por Pfizer Corp. y está disponible comercialmente.

El Compuesto B, 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2 -((5-(piperazin-1-il) piridin-2-il)amino)-7H- pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida, se dan a conocer como el Ejemplo 74 de WO2010/020675, y se prepararon mediante el procedimiento de síntesis descrito en el mismo.

20 Líneas celulares y cultivos celulares

- 25 Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron derivadas de neuroblastoma humano y se obtuvieron a partir de la biblioteca celular interna de Novartis, ATCC y/o de los laboratorios del Grupo de referencia de Oncología pediátrica en el Hospital de Niños de Filadelfia (CHoP). Las líneas de células CHoP fueron probadas rutinariamente para la infección por micoplasma, así como fueron genotipadas (kit identificador AmpFLSTR, Life Technologies) para asegurar la integridad y para evitar la contaminación cruzada. Además, las líneas celulares han tenido el estatus de número de copia de ADN completo del genoma determinado sobre el chip Illumina HH550 SNP, y la expresión de todo el genoma den nivel exón determinado en el chip de expresión Illumina. Las líneas de células pueden ser mantenidas de acuerdo con los medios recomendados en condiciones conocidas en la técnica (por ejemplo, Thiele, CJ Neuroblastoma: en (Ed.) Masters, J. Human Cell Culture Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers 1998, Vol 1, p. 21 -53). En particular, las células pueden ser mantenidas en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino con 1% de penicilina / estreptomycin y 1% de L-glutamina en 37 °C y 5% de CO2. Alternativamente, las células pueden almacenarse congeladas y reconstituirse antes de su uso.

- 35 Las líneas celulares fueron elegidas para ser igualmente representativas del estado del blanco ALK en los tejidos primarios: mutación ALK positiva, mutación ALK de amplificación negativa, pero con amplificación genómica y sobreexpresión de ALK de tipo silvestre, y número de copias de la mutación ALK negativa y normal. Las líneas celulares que eran mutación ALK positiva representan tres mutaciones únicas en el dominio tirosina quinasa de la quinasa linfoma anaplásico (ALK). La secuenciación del exoma, con la secuenciación de Sanger, confirmó que las mutaciones estaban en el dominio de la tirosina quinasa de ALK. Además, las líneas celulares se

caracterizan por su estado MYCN, TP53, ALK, TrkA y TrkB, y los resultados se resumen en la Tabla 1 a continuación.

Table 1: Líneas Celulares de neuroblastoma humano y Caracterización

Línea Celular Nombre	MYCN	TP53	ALK	Estado de Trk
415IMDM	Amp	Desconocido	F1174L	
CHLA		Mutado	F1245V	
CHP- 134	Amp	Wt	Wt	TrkA-, TrkB+
COG-N-426		Desconocido	F1245C	
IMR 5	Amp	Wt	Wt	TrkA+, TrkB-
Kelly	Amp	WT	F1174L	
LAN 1	Amp	Mutado	F1174L	
LAN 5	Amp	Wt	R1275Q	
NB 1	Amp	WT	WT Amp	
NB-1643het	Amp	WT	R1275Q	TrkA-, TrkB+
NB- 1691	Amp	MDM2 Amp	WT	
NB- 1771			pALK +	
NB- EBC1	No Amp	WT	WT	
NB- SD	Amp	Mut	F1174L	
NGP	Amp	MDM2 Amp	WT	TrkA-, TrkB-
NLP	Amp	Mut	WT	TrkA-, TrkB-
SK-N-AS	No Amp	Mut	WT	TrkA-, TrkB-
SK-N-BE2C	Amp	Mut	WT	
SK-N-FI	No Amp	Mut	WT	
SH-SY-5Y	No Amp	WT	F1174L	TrkA-, TrkB-

- 5 Se entiende que hay otras líneas de células de neuroblastoma que son adecuadas para las pruebas con las combinaciones de la presente invención. La información sobre estas líneas celulares se puede obtener de: Thiele CJ.; Neuroblastoma: In (Ed.) Masters, J. Human Cell Culture. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers. 1998, Vol 1, p 21 -53.

Ensayo de viabilidad celular

- La viabilidad celular se determinó midiendo el contenido de ATP celular mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (CTG) (Promega). El reactivo de CTG se añadió a las células que habían sido tratadas con el compuesto de ensayo, y la luminiscencia resultante fue leída por un lector de placas (por ejemplo, Viewlux, Perkin Elmer). Los valores reducidos y aumentados de la señal luminiscente (respuestas) se calcularon en relación a las células no tratadas (control), y el valor de señal calculado proporcional fue a la viabilidad celular.
- Identificación de las combinaciones terapéuticas sinérgicas en un cribado de alto rendimiento basado en el Modelo de Aditividad de Loewe
- Se identificaron las combinaciones sinérgicas basado en el Modelo de Aditividad de Loewe. Para medir los efectos de las combinaciones de fármacos en la viabilidad de las células, las células de las 20 líneas celulares enumerados en la Tabla 1 anterior se sembraron en placas de ensayo de 1536 pozos a una densidad de 300 células por pozo en un volumen final 7 µL y se incubaron a 37 °C durante la noche en una incubadora de GNF Systems con un 95% de humedad relativa y 5% de CO₂.
- Se preparó una curva de respuesta a la dosis de seis puntos para los compuestos de ensayo en una placa 384 pozos de fuente compatible con ECHO (Labcyte P-05525) con diluciones triples en serie. Por ejemplo, para una curva de respuesta a la dosis de seis puntos y una concentración del compuesto superior de 5 mM, la concentración de los compuestos en el pozo fuente eran 5 mM, 1.67mM, 0,56 mM, 0,19 mM, 0,06 mM y 0,02 mM.
- Aproximadamente 18 horas después de la siembra, las combinaciones de productos se han generado sobre la marcha mediante la transferencia de 7.5nL del compuesto de las placas de fuentes pre-diluidas utilizando el Labcyte ECHO555 integrado en el sistema ACP-1 con las placas replicadas por línea celular; la concentración final de DMSO por pozo fue de 0,2%. Se observa que el volumen total en los pozos fue 7µL.
- Para evaluar la actividad anti-proliferativa de todas las combinaciones a manera de no-sesgo, así como para identificar el efecto sinérgico en cualquier concentración posible, la dosificación se hizo en una matriz de 7x7 (9x9 en los primeros experimentos) celdas (bloques) que utiliza todas las permutaciones posibles de los agentes de ensayo diluidos en serie en seis (u 8) puntos. Las curvas con un solo agente fueron creadas por la dosificación de los dos agentes por separado en los primeros seis pozos de la primera columna (izquierda) y la primera fila (parte inferior) del bloque de combinación; cada pozo recibió 7,5 nL del compuesto de ensayo y 7,5 nL de DMSO, con la concentración del compuesto progresivamente menor hacia la esquina inferior izquierda. El pozo en la intersección de la primera columna y primera fila que no recibió el compuesto se dosificó con 2x 7.5nL de DMSO y sirvió como control. Las curvas compuestas fueron creadas mediante la dosificación de 7.5nL de cada uno de los dos compuestos en cada pozo a través de su rango de dosis entera, y de nuevo con la concentración del compuesto progresivamente menor hacia la esquina inferior izquierda.
- Después de la adición del compuesto, las placas se devolvieron al incubador durante 120 horas. Los efectos de las combinaciones en la viabilidad celular se evaluaron con la adición de Cell Titer Glo (Promega G7573) usando uno de los dispensadores de válvula de botella GNF en el sistema ACP-1; las placas se incubaron a continuación a temperatura ambiente durante diez minutos y se leyeron en el equipo Viewlux Perkin Elmer integrado (2 segundos de exposición, bin 2x, alta sensibilidad). Los datos en bruto se normalizaron utilizando el control de las células tratadas con DMSO por pozo dentro de cada placa. El número/viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto se evaluó del mismo modo y se utiliza para determinar la inhibición máxima del crecimiento observado en el ensayo utilizando el método de NCI para el cálculo. Véase, Boyd, M. R.; Paull, K. D.; Rubinstein, L. R. In *Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development* Vleriotte, F. A.; Corbett, T. H.; Baker, L. H., Eds.; Kluwer Academic: Hingham, MA, 1992; pp 1 1 -34, and Monks, A.; Scudiero, D. A.; Skehan, P.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Vistica, D. T.; Hose, C.; Langley, J.; Cronice, P.; Vaigro-Wolf, M.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, M. R. JNCI, J. Natl. Cancer Inst. 1991, 83, 757- 766.
- Todos los cálculos de sinergia se realizaron utilizando el software CHALICE de Zalicus. Véase, Lehar J, Krueger AS, Avery W, et al., 2009, in *Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity*, Nat Biotechnol. 27:659-66. Las interacciones sinérgicas entre las posibles combinaciones de los productos se evaluaron utilizando la matriz de inhibición de Exceso 2D de acuerdo con el modelo de aditividad de Loewe y se reportan como puntuación de sinergia.
- Los compuestos se combinan con sí mismos para determinar el efecto del ruido del ensayo de los parámetros de evaluación de la sinergia de la interacción aditiva de la dosis esperada. Los alcances de la combinación sinérgica (fuertemente sinérgica) fueron identificados como si ambos tuviesen una puntuación de sinergia > 2, una puntuación de sinergia que es dos veces más grande que el modelo basal hubiese predicho (no sinergia) y

una eficiencia máxima de > 100 , un valor equivalente a la inmovilización, tal como se determina a partir del cálculo de inhibición del crecimiento.

La interacción sinérgica puede evaluarse visualmente a partir del resultado de la matriz 2D del software CHALICE. La Figura 1 muestra los gráficos de matriz 2D de un experimento hipotético de inhibición del crecimiento. La gráfica de la matriz de dosis (a la izquierda) es la representación de los datos experimentales de CHALICE donde se muestran las curvas de respuesta a la dosis de un único agente en la columna de la izquierda y la fila inferior con la esquina superior derecha del bloque de combinación que representa la mayor concentración de cada agente. La gráfica del exceso de inhibición Loewe (a la derecha) representa la comparación de los datos experimentales anteriores para el modelo Loewe generado a partir de las curvas de un solo agente. El modelo aditivo de la dosis calcula un valor de inhibición esperado para cada bloque en la matriz de combinación. La sinergia se define como valores > 0 en la gráfica del exceso de inhibición; que es la inhibición mayor de lo que se esperaría de una simple interacción aditiva. El antagonismo se define como valores < 0 ; que es la inhibición menor de lo que cabría esperar de una simple interacción aditiva. Otra alternativa común para la presentación visual de los datos de los estudios de combinación de fármacos incluye gráficas de bloques (Figura 3) y gráficos de dispersión (Figuras 4A, 4B y 4C). Se utilizó un diagrama de cuadros para comparar las puntuaciones de sinergia de los regímenes de tratamiento. Los diagramas de dispersión se utilizan para visualizar las tendencias de las interacciones entre los compuestos y para identificar las interacciones fuertemente sinérgicas.

Determinación de los efectos combinacionales de fármacos basados en el Teorema del Índice de combinación de Chou-Talalay

Cultivo de células

Las líneas celulares de neuroblastoma utilizadas en este experimento se describen en la sección de cultivo de células arriba y en la Tabla 1. En particular, las células se mantuvieron en los medios celulares mantenidos en RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino con 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de glutamina L- a 37 °C y 5% de CO₂.

CI₅₀ de crecimiento in vitro con el Compuesto A1 y el Compuesto B en monoterapia

La actividad inhibidora in vitro se determinó en cinco líneas (5) celulares de neuroblastoma con un sistema de 96 pozos de la célula en tiempo real Electronic Sensing xCELLigence (ACEA, San Diego, CA) que mide un "índice celular". El índice celular se deriva de las alteraciones en la impedancia eléctrica a medida que las células interactúan con la superficie de microelectrodos biocompatibles en cada pozo para medir la proliferación del sustrato adherente. En función de la cinética de crecimiento, se colocaron las siguientes densidades de células en las placas por pozo: NB1643: 20.000; SHSY5Y: 6.000; SKBE2C: 10000; NBEC1: 1 1, 000; NB1691: 30.000. Después de 24 horas, las células cultivadas en las placas se trataron por triplicado con el compuesto de ensayo, cada dosis como se indica, o con vehículo de control DMSO. El Compuesto A1 se dosificó a 1 nM a 10.000 nM por pozo, mientras que el compuesto B se dosificó a 0,6 nM a 6000 nM o 1 nM a 10.000 nM por pozo. A las 72 horas después de la exposición al fármaco, se registró el índice celular.

La CI₅₀ se calculó utilizando GraphPad Prism 5.0 de cuatro parámetros de ajuste de pendiente variable. La CI₅₀ del Compuesto A1 y del Compuesto B en las líneas celulares seleccionadas se resume en la Tabla 4 a continuación. Estos valores se utilizaron en el estudio de dosificación de la combinación que sigue.

Estudios de combinación de fármacos in vitro

Los efectos de la combinación de fármacos y la cuantificación de la sinergia se determinaron utilizando el método del índice de combinación de Chou- Talalay (Trends Pharmacol Sci 4, 450-454) y el software CalcuSyn v2 (Biosoft, MO) en cuatro líneas celulares de neuroblastoma. Las células se sembraron y la proliferación in vitro se midió utilizando el sistema de xCELLigence como se describe anteriormente. Las células se dosificaron por triplicado, con combinaciones constantes de medicamentos equipotentes, donde los dos agentes, en, por ejemplo, el Compuesto A1 y el Compuesto B, se combinaron a 4x, 2x, 1x, ½ y ¼ de la dosis de individual CI₅₀, y con cada agente por separado.

La potencia anti-proliferación de cada agente individual fue estimada por el efecto medio de la dosis, D_m. D_m es la concentración del compuesto que resulta en el efecto medio definido como la intersección x en una "gráfica del efecto medio", donde $x = \log(D)$ e $y = \log(f_a/f_u)$ de acuerdo con las siguientes definiciones:

D: dosis del fármaco;

F_a: fracción afectada se define como la fracción de células afectadas por la concentración administrada de los compuestos solos o en combinación.

5 F_a = 0 se determina con base en el control de DMSO por la dosis, y F_a = 1 es una respuesta completa (no hay células viables a la izquierda) y.

F_u: fracción no afectada por dosis en donde fu = 1 - fa.

El D_m del Compuesto A1 y el Compuesto B en líneas celulares seleccionadas se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Resumen de la CI50 y Dm para los Compuestos A1 y B en células seleccionadas de neuroblastoma

Nombre Línea Celular NB	Estado de ALK	Comp A1 IC ₅₀ (nM)	Comp A1 Dm (nM)	Comp B IC ₅₀ (nM)	Comp B Dm (nM)
NB1643het	R1275Q	222	172.7	749.5	788.4
SHSY5Y	WT	963.15	1500	111	1500
NBEB1	WT	1924.7	1662	328	1258.7
NB1691	WT	1933	761.6	314.8	2647.3
SKBE2C	WT	602.7	349.5	145.8	446
SKNAS	WT	2153		4724.5	
SKNFI	WT	3475		>6μM	

10

Se determinó el efecto de la combinación de los efectos de los fármacos utilizando el índice de combinación definido por Chou de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$$

15 donde (D)_i y (D)_x son las concentraciones de compuestos D_i y D₂ necesarias para producir un determinado nivel de efecto antiproliferativo cuando se utiliza de forma individual, mientras que (D)_i y (D)₂ son sus concentraciones que producen el mismo efecto antiproliferativo cuando se utilizan en combinación. El índice de combinación es una medida cuantitativa de la interacción de fármacos definida como un efecto aditivo (IC= 1), antagonismo (CI > 1), o sinergia (CI < 1). Típicamente, se usa un rango de CI, como se utiliza en este documento, para evaluar la sinergia. Un índice de combinación de 0.9-1 0.1 indica la interacción aditiva, valores inferiores a 0,9 indican sinergismo, y valores por encima de 1.1 indican antagonismo. La siguiente es una descripción de los intervalos de la CI:

20

< 0.1 +++++ sinergismo muy fuerte

0.1 -0.3 +++++ sinergismo fuerte

0.3-0.7 +++ sinergismo

25

0.7-.85 ++ sinergismo moderado

0.85-0.90+ sinergismo leve

0.90-1 0.10 ± casi aditivo

1. 10-1 .20 - antagonismo leve

1.20-1 .45- antagonismo moderado

- 5 El índice de combinación se utilizó para evaluar el índice de reducción de la dosis (DRI) (Chou y Chou, 1988), en donde:

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 = 1 / (DRI)_1 + 1 / (DRI)_2$$

El DRI estima la cantidad de la dosis de cada fármaco que se puede reducir cuando los fármacos sinérgicos se administran en combinación, sin dejar de lograr el mismo alcance del efecto, como si cada fármaco fuese administrado individualmente.

- 10 El efecto de la combinación de fármacos se puede demostrar gráficamente. Ejemplos típicos de gráficas de combinación de fármacos basados en el teorema del índice de combinación de Chou y Talalay que incluyen (a) la "gráfica Fa - IC", (b) el isoblograma clásico; (C) el isoblograma normalizado para las combinaciones en diferentes proporciones de combinación, y (d) la gráfica Fa-PRI (Chou y Martin, 2005). La interpretación de las diversas gráficas se resume en las Figuras 5A-D. Para evaluar el efecto sinérgico, son más relevantes la gráfica
- 15 Fa-CI y la gráfica del isoblograma.

Ensayo de viabilidad in vitro y apoptosis mediante caspasa-Glo 3/7

- La viabilidad celular in vitro y la caspasa-Glo 3/7 se analizaron simultáneamente usando el Ensayo Triplex ApoTox-Glo (Promega, CA) en tres líneas celulares de neuroblastoma. A las 24 horas, las células se trataron por triplicado con vehículo DMSO, el Compuesto A1 o el Compuesto B de forma individual a las mismas dosis
- 20 usadas en la terapia de combinación, o con una combinación de relación equipotente constante a las dosis indicadas. Después de 72 horas de exposición al fármaco, se añadió el sustrato fluorogénico GF-AFC. La mezcla de ensayo se incubó durante 10 minutos y la fluorescencia de AFC se midió en 380-400nm de excitación y 505 nm de emisión. GF-AFC emite fluorescencia después de la escisión por una proteasa que es activa cuando se encuentra intracelular y se inactiva cuando se da la pérdida de integridad de la membrana celular,
- 25 por lo tanto la fluorescencia de GF -AFC se correlaciona con la viabilidad celular.

Después de la medición de la fluorescencia de células vivas, se añadió un sustrato luminogénico caspasa-Glo 3/7 y luciferasa a los mismos pozos. La luminiscencia se mide después de un periodo de incubación de 30 minutos. La luciferina se libera después de la escisión del sustrato por la caspasa 3/7, y con ello la señal luminiscente es proporcional a la actividad de la caspasa.

- 30 Inmunotransferencia Western

- Cada línea celular se cultivó a 70 a 80% de confianza, y se trató con el Compuesto A1, el Compuesto B, o en combinación con una relación equipotente durante 20 horas o 72 horas como se indica. Se lavaron dos veces con tampón de fosfato salino enfriado con hielo y se analizaron los lisados de proteínas de células enteras como se describe (Mosse, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene, 2008, Nature Vol 455.) Por inmunotransferencia con anticuerpos para: ALK, 1 :1000; pALK Tyr¹⁶⁰⁴, 1 :1000; pALK Tyr¹²⁷⁸, 1 :2000; RB, 1 :2000; pFtB^{S780}, 1 :2000; pRB^{S795}, 1 :2000; Ciclina D1, 1 :1000; Cyclin D3, 1 :1000 (Señalización celular); CDK4, 1 :2000; y CDK6, 1 :3000; (Santa Cruz).
- 35

Inhibición del crecimiento tumoral in vivo

- Se utilizaron ratones CB17 scid hembra (Taconic Farms) para propagar los tumores de neuroblastoma implantados subcutáneamente. Los diámetros de los tumores se midieron dos veces por semana con calibradores electrónicos, y los volúmenes tumorales se calcularon con la fórmula esférica, $(\pi/6) \times d^3$, donde d representa diámetro medio. Una vez que el volumen del tumor excedió 200 mm³, se aleatorizaron los ratones (n = 10 por brazo) para recibir vehículo, el Compuesto A1 (50 mg / kg por dosis), Compuesto B (150 mg / kg por dosis), o el Compuesto combinado A1 (50 mg / kg por dosis) y el compuesto B (150 mg / kg por dosis)
- 40
- 45 diariamente por sonda oral durante 7 semanas. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió

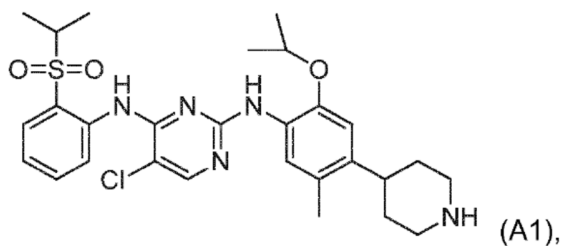
- 5 3.000 mm³ o en la conclusión del estudio a las 7 semanas. Se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos para evaluar el volumen del tumor en el tiempo entre los grupos de tratamiento y el vehículo, controlando por el tamaño del tumor en la inscripción. Las probabilidades de supervivencia libre de eventos se calculan utilizando el método de Kaplan-Meier y las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de log-rank (SAS 9.3 y Stata 12.1). Un evento se define como el tiempo en que el volumen del tumor > 3000 mm³, y los volúmenes tumorales después de la semana 7 fueron censurados. Los ratones se mantuvieron bajo protocolos y condiciones aprobadas por nuestro comité de cuidado de los animales y uso institucional.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende, juntos o por separado,

(a) un primer agente que es

(i) Compuesto A1, descrito por la Fórmula A1 a continuación:

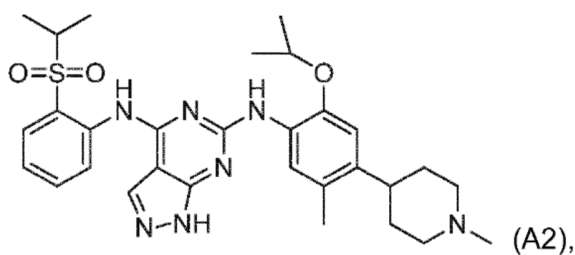


5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

o

(ii) Compuesto A2, descrito por la Fórmula A2 a continuación

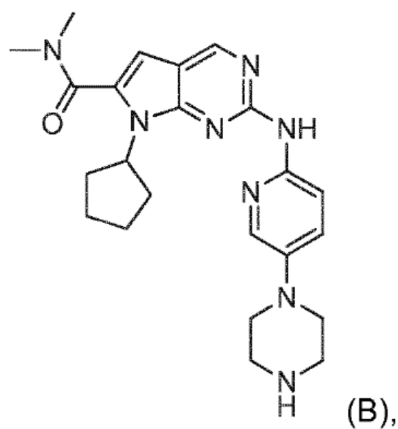


10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

y (b) un segundo agente que es

Compuesto B, descrito por la Fórmula B a continuación



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para uso en el tratamiento de neuroblastoma.

2. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer agente es el Compuesto A1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

5 y el segundo agente es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. La combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer agente es el Compuesto A2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

y el segundo agente es el Compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 4. Una composición farmacéutica que comprende una combinación farmacéutica definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y al menos un excipiente para uso en el tratamiento de neuroblastoma.

5. La combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el neuroblastoma es un cáncer positivo para ALK.

15 6. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 5, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer depende de una mutación del gen ALK.

7. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 5, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer depende de una amplificación del gen ALK.

8. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la mutación del gen ALK es R1275Q.

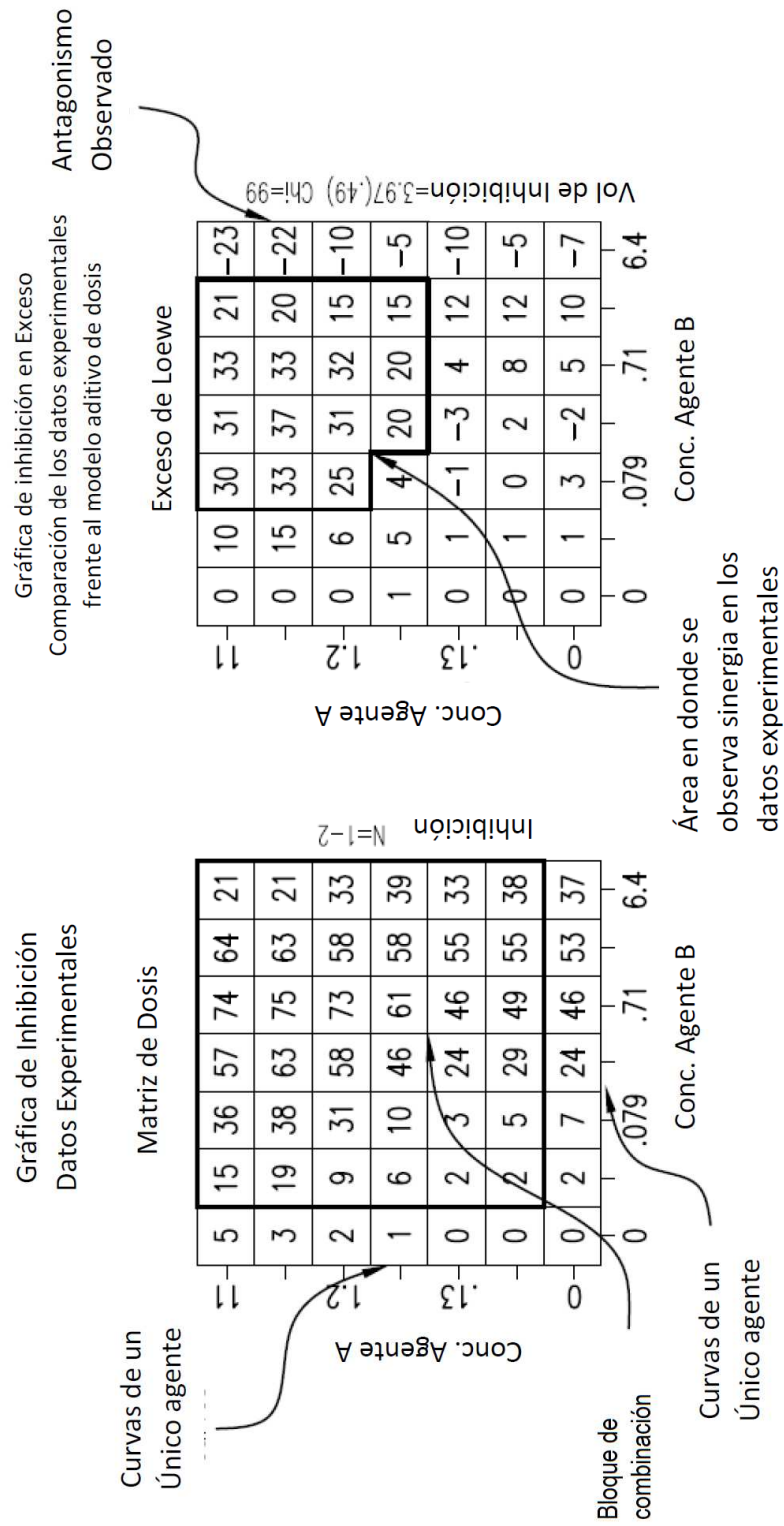


FIG.1

Matriz de Dosis | . |LAN-1|

Compuesto A1 (μM)	5.3	65	67	68	76	76	81	88
		34	44	40	39	54	66	77
	.59	11	27	22	27	45	58	71
		4	25	-1	37	34	34	52
	.066	6	0	11	19	25	45	55
		6	7	37	23	49	43	60
0	0	0	15	-2	18	34	38	49
		0	.066	.59	5.3			
		Compuesto B (μM)						

Exceso de Loewe | . |LAN-1|

Compuesto A1 (μM)	5.3	2	5	6	13	14	18	26
		-3	5	2	-2	10	18	26
	.59	2	15	6	1	9	14	22
		3	21	-11	17	1	-9	4
	.066	6	-3	3	2	-6	3	7
		6	4	29	5	18	1	12
0	0	0	13	-9	1	4	-4	1
		0	.066	.59	5.3			
		Compuesto B (μM)						

Matriz de Dosis | . |LAN-1|

Compuesto A1 (μM)	5.4	65	77	63	68	61	73	77
		34	3	34	48	47	53	67
	.59	15	-22	13	8	20	42	73
		1	-11	-7	29	28	46	62
	.066	6	-15	21	-8	27	25	63
		7	-5	30	-17	21	1	51
0	0	0	7	6	1	15	34	65
		0	.066	.59	5.4			
		Compuesto A1 (μM)						

Exceso de Loewe | . |LAN-1|

Compuesto A1 (μM)	5.4	4	17	2	7	0	11	14
		-5	-37	-6	5	0	-3	5
	.59	5	-33	-1	-8	-7	-6	12
		-1	-13	-9	23	12	3	1
	.066	6	-16	20	-11	13	-15	2
		7	-5	30	-19	9	-39	-9
0	0	0	7	6	-1	5	-5	4
		0	.066	.59	5.4			
		Compuesto A1 (μM)						

Matriz de Dosis | . |LAN-1|

Compuesto B (μM)	5.4	56	63	57	53	47	85	59
		45	14	55	63	36	56	56
	.59	30	19	35	26	42	45	48
		18	36	36	49	32	46	64
	.066	22	18	22	21	42	50	57
		6	23	4	25	24	56	64
0	0	0	6	22	18	30	45	56
		0	.066	.59	5.4			
		Compuesto B (μM)						

Exceso de Loewe | . |LAN-1|

Compuesto B (μM)	5.4	3	11	5	1	-6	32	4
		-1	-32	9	17	-12	6	3
	.59	-5	-16	-1	-12	0	-2	-4
		-4	12	10	19	-6	-1	11
	.066	9	4	4	-5	6	4	4
		0	13	-11	1	-12	10	12
0	0	0	0	9	-4	-5	-1	3
		0	.066	.59	5.4			
		Compuesto B (μM)						

FIG.2

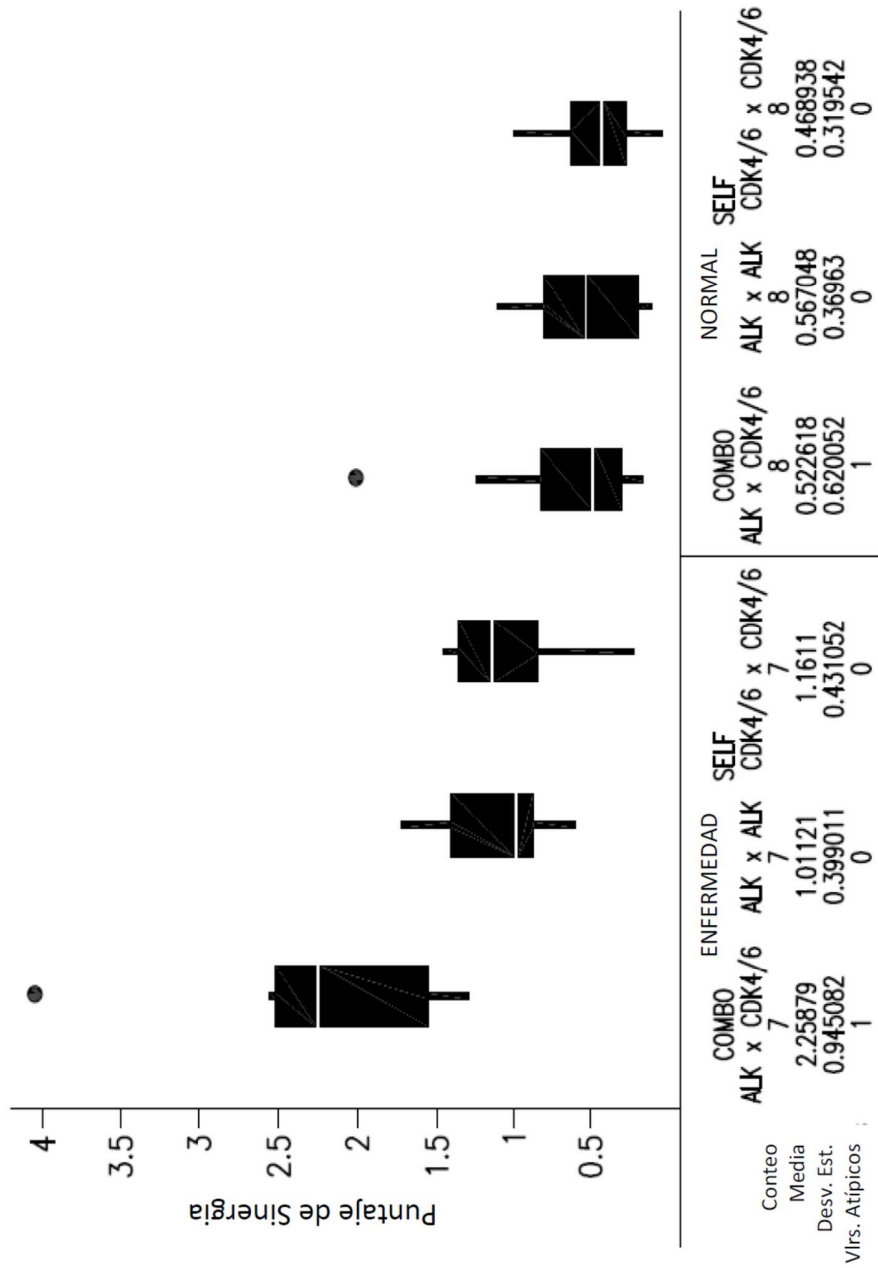
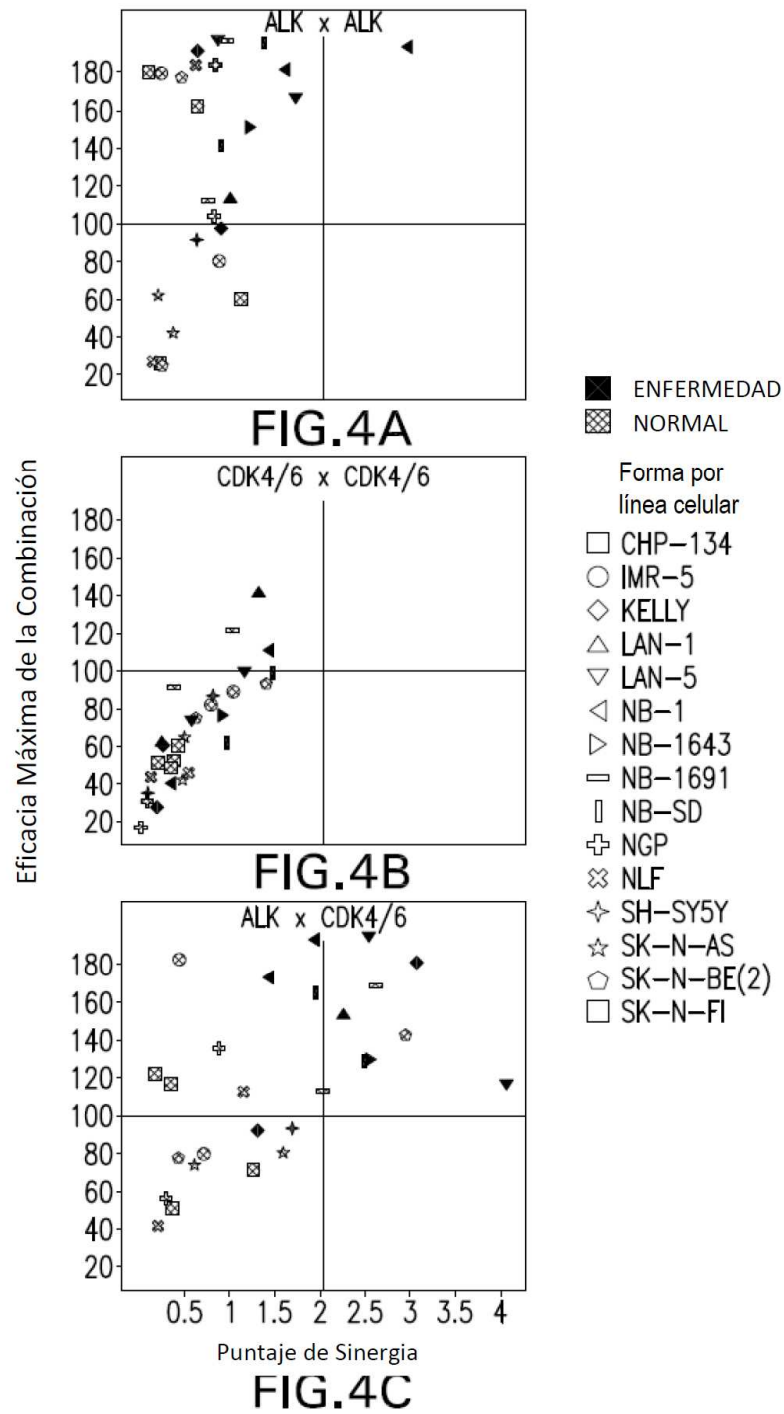
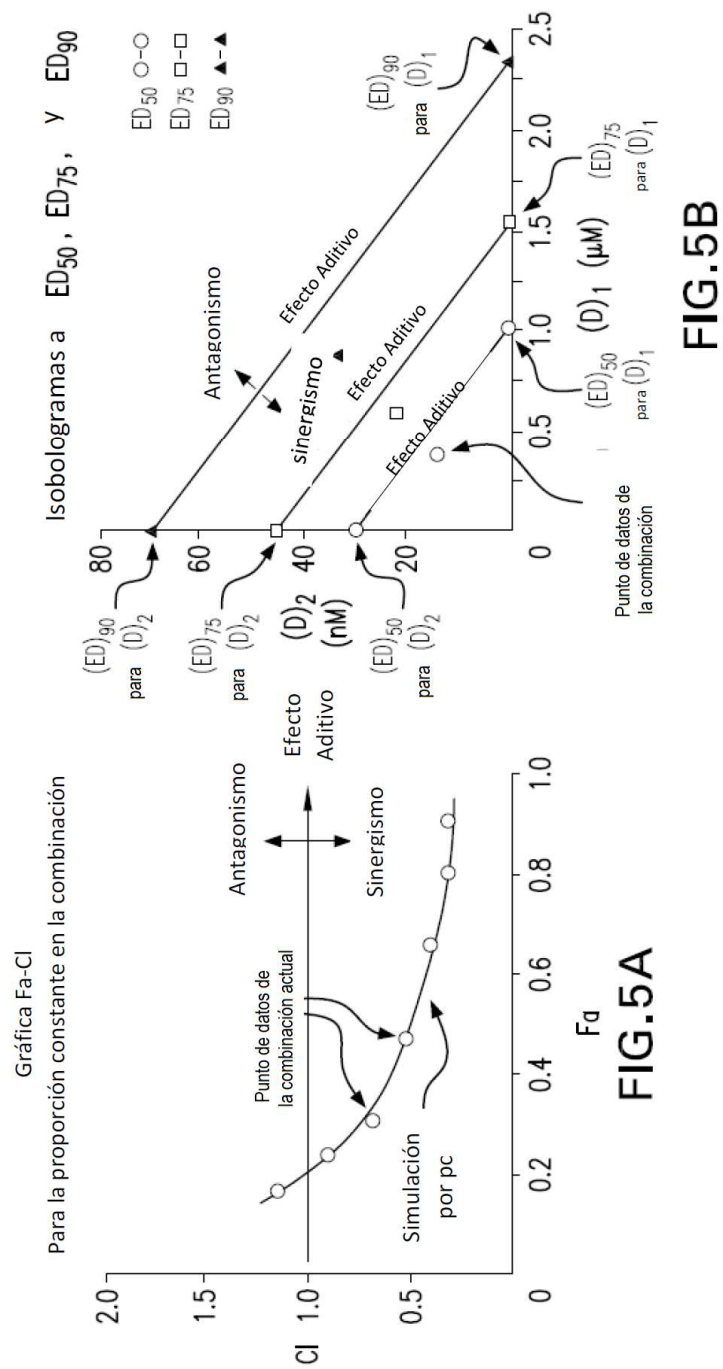


FIG.3





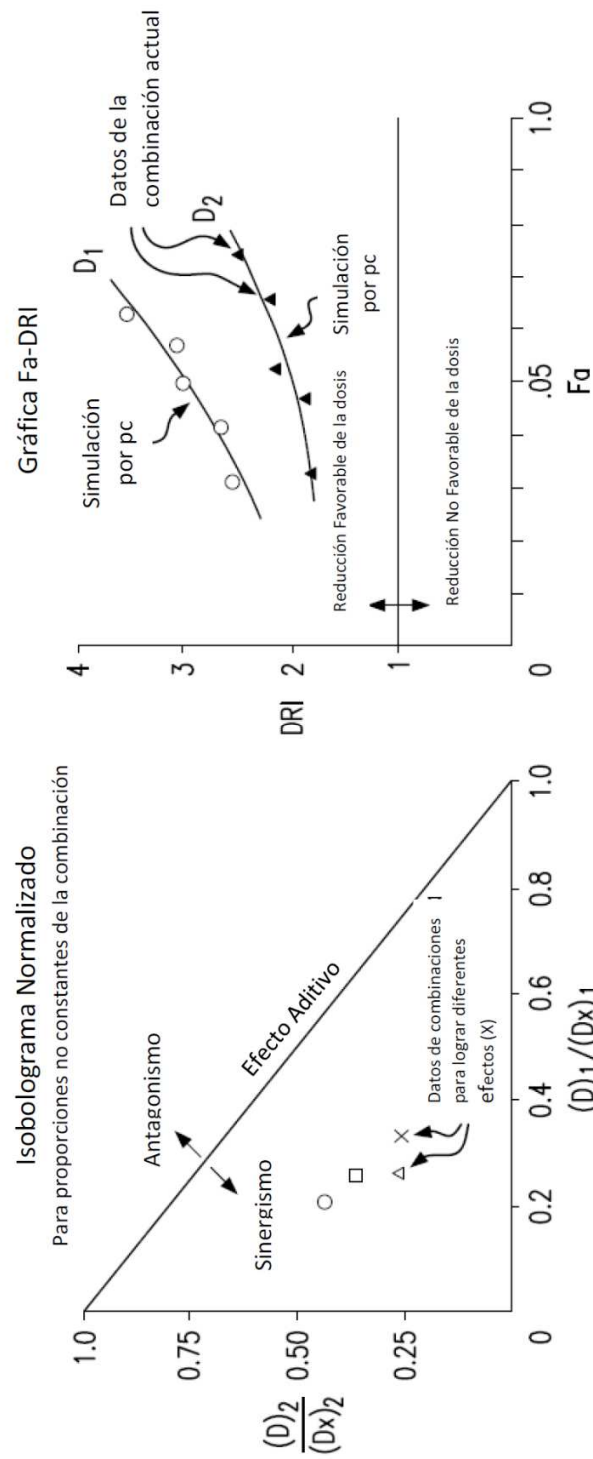
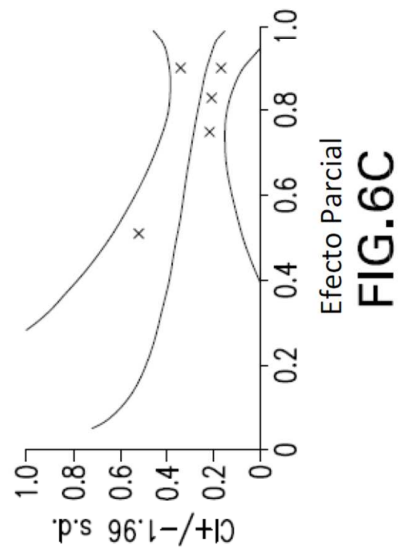
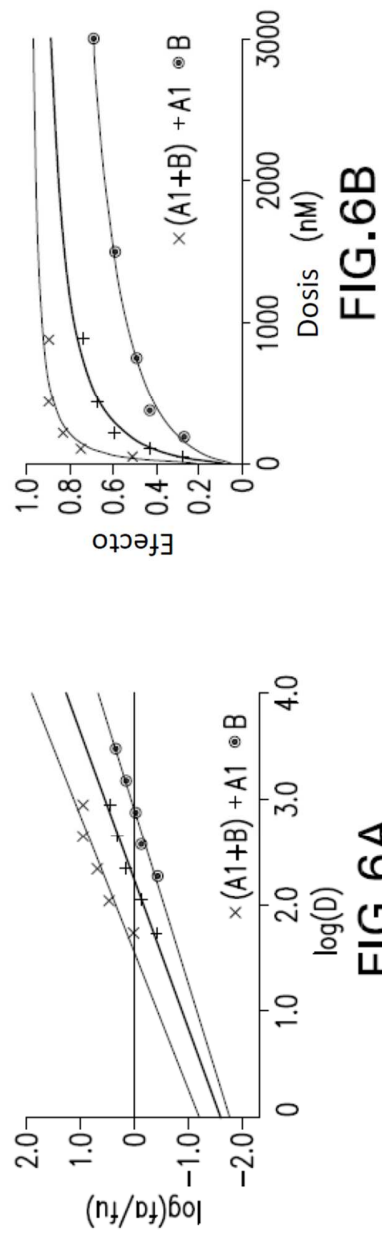
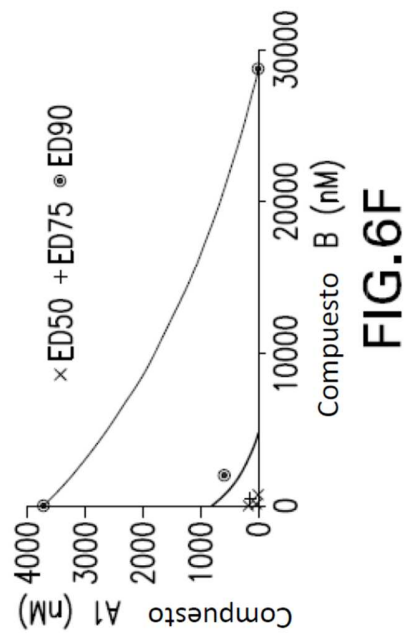
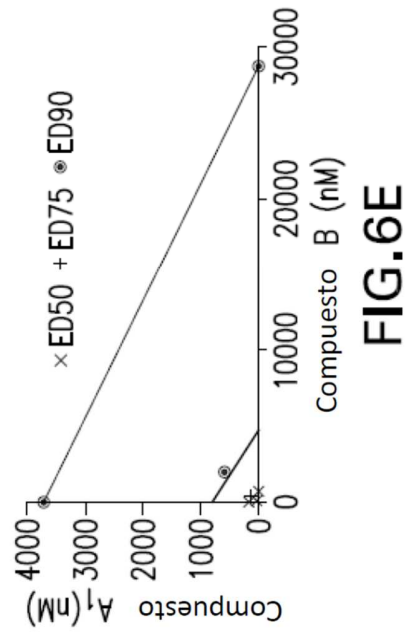
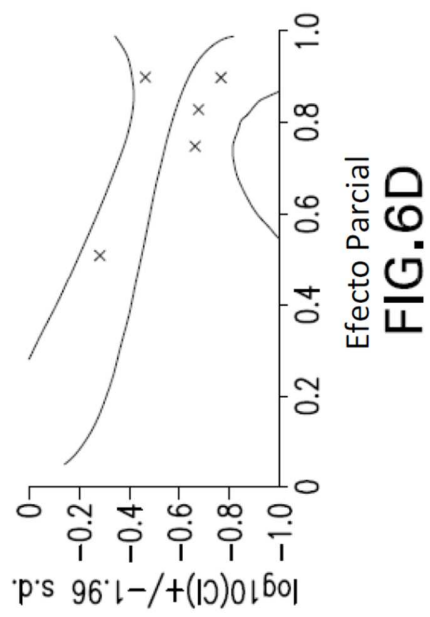


FIG.5D

FIG.5C





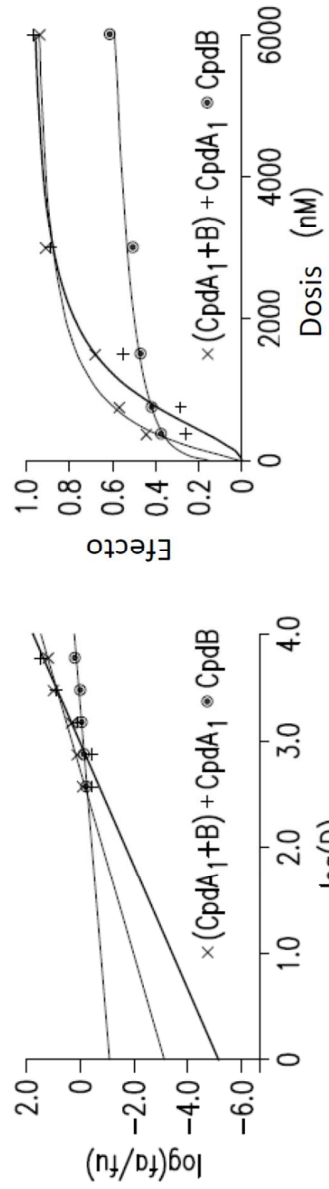


FIG.7A

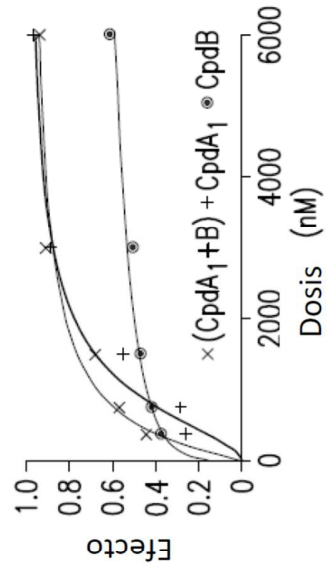


FIG.7B

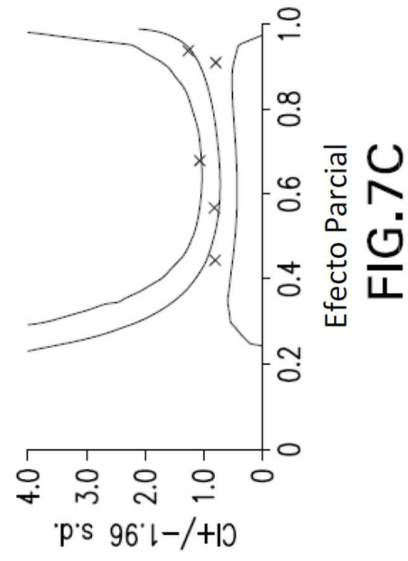
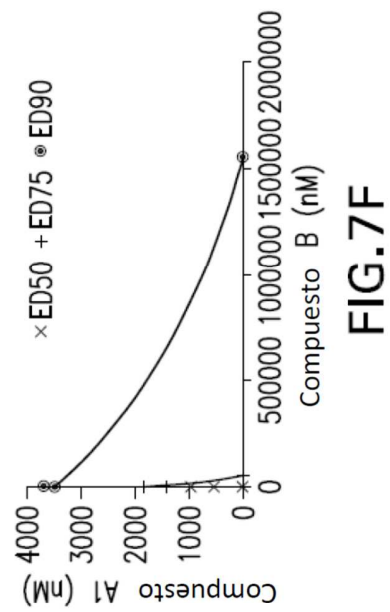
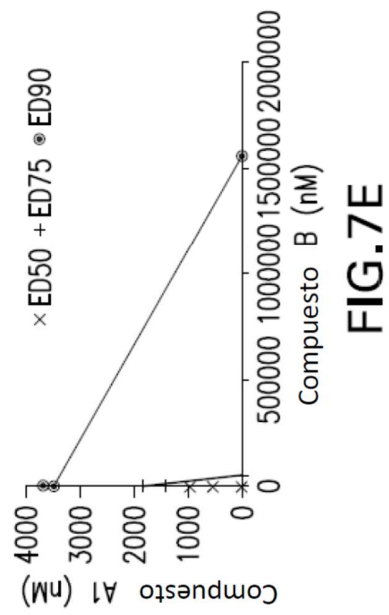
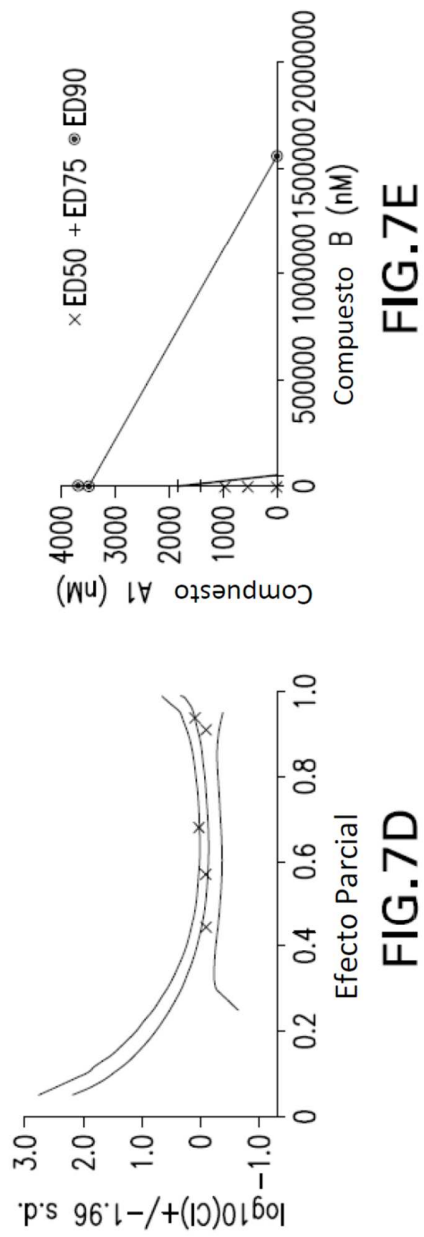


FIG.7C



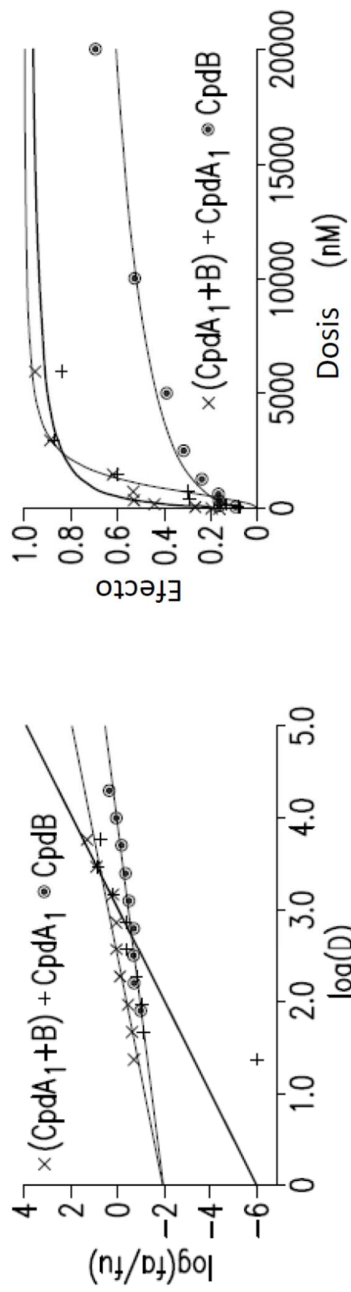


FIG.8A

FIG.8B

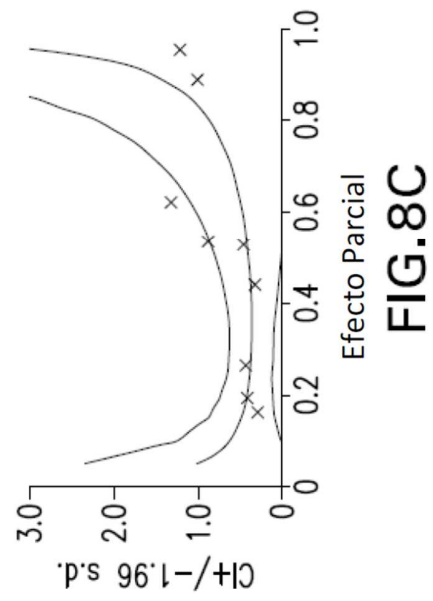
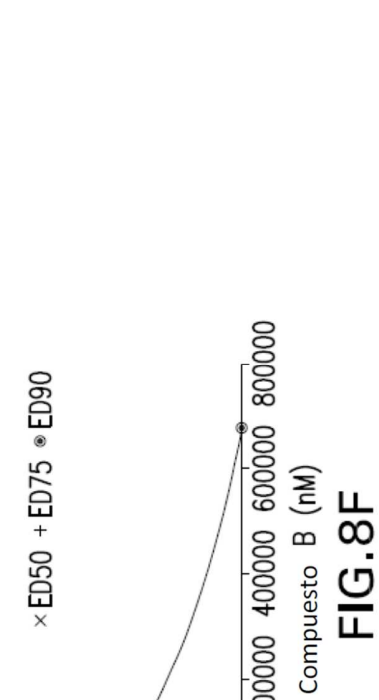
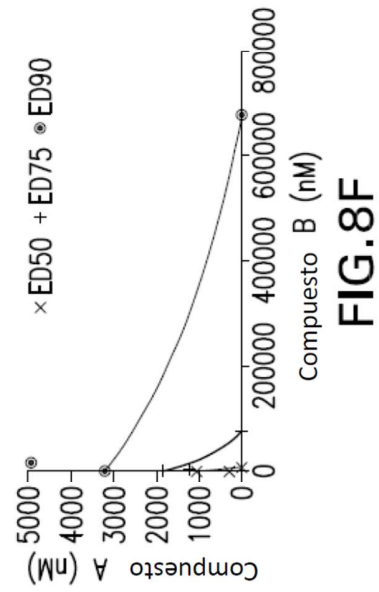
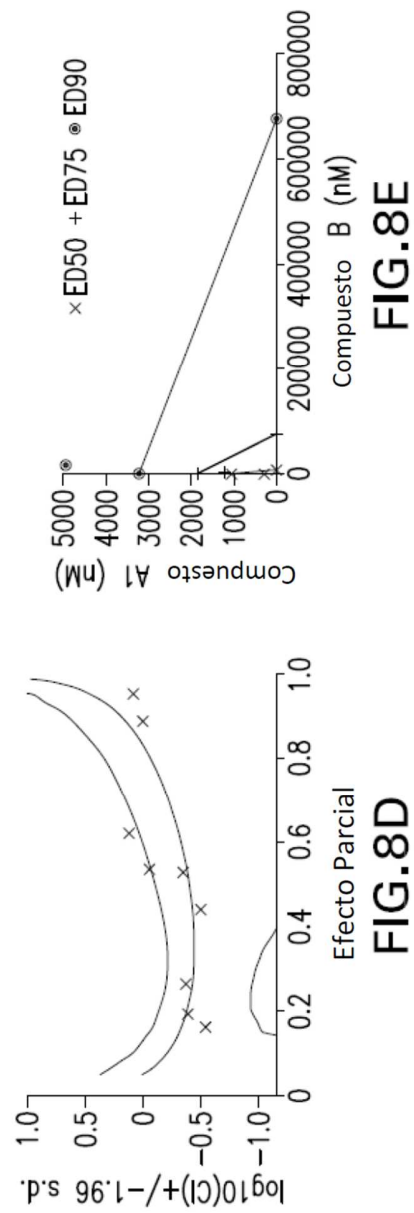
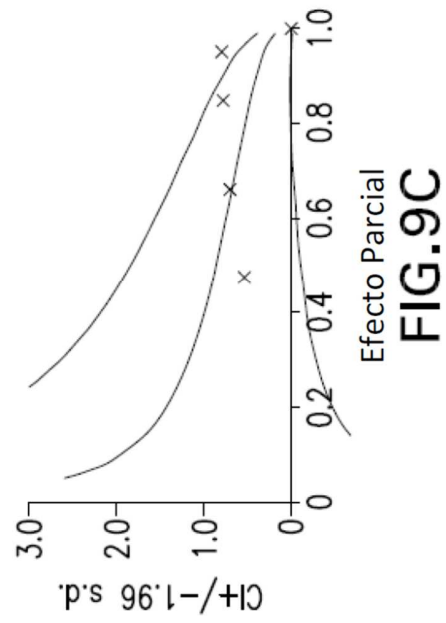
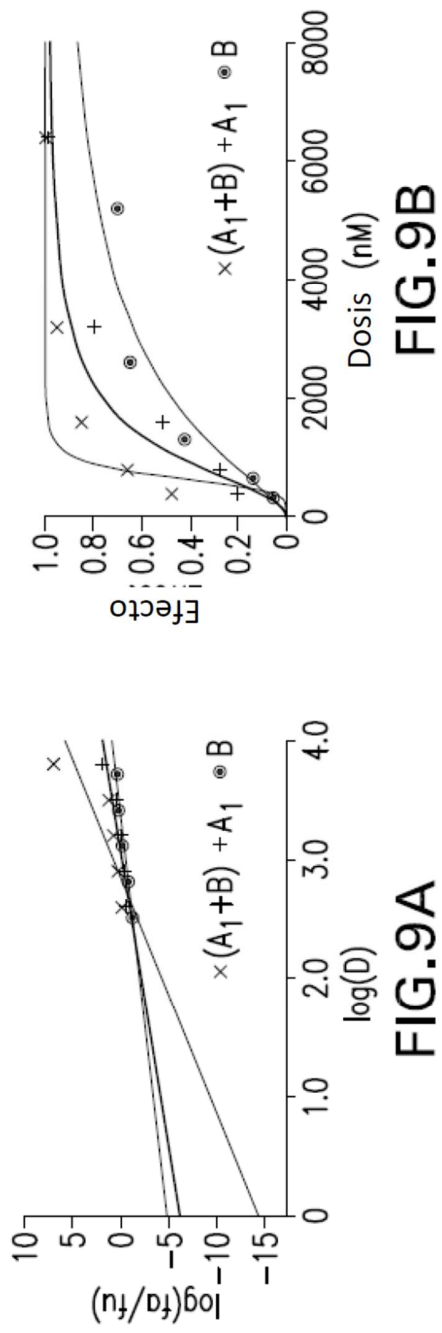
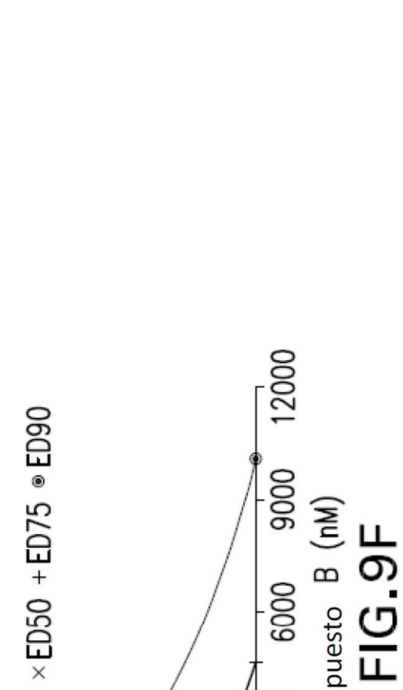
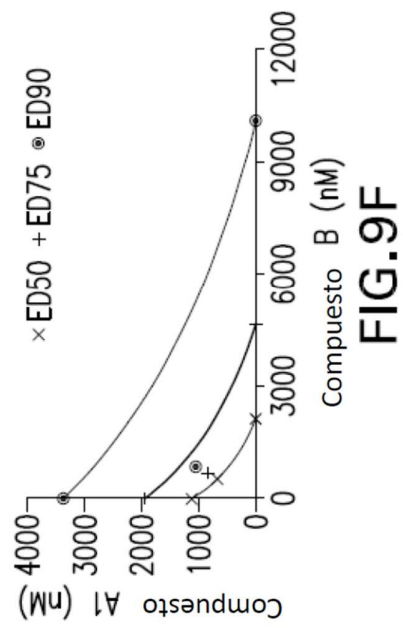
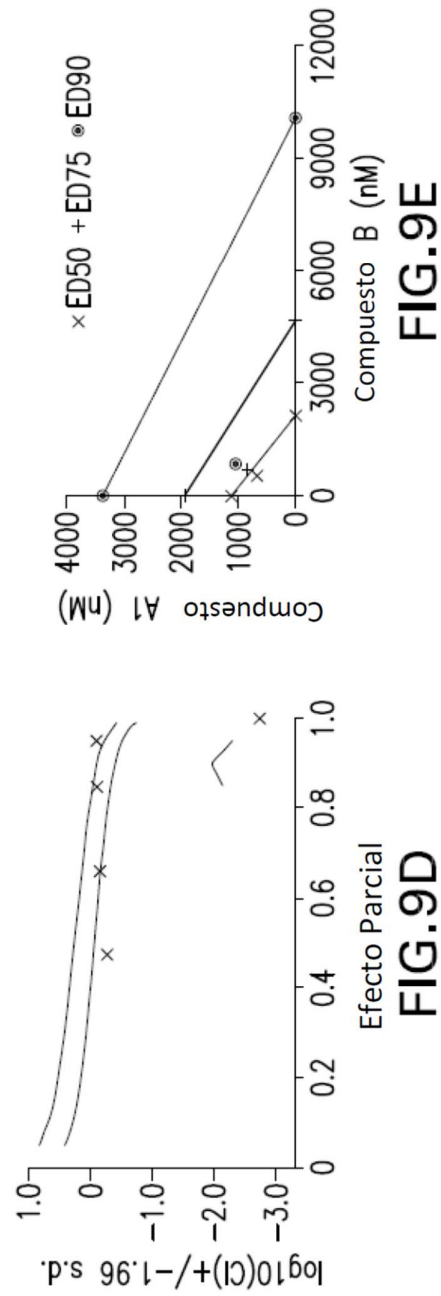


FIG.8C







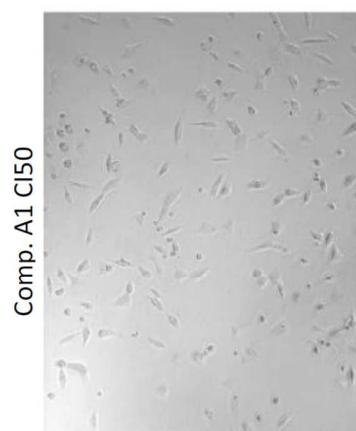


FIG. 10A

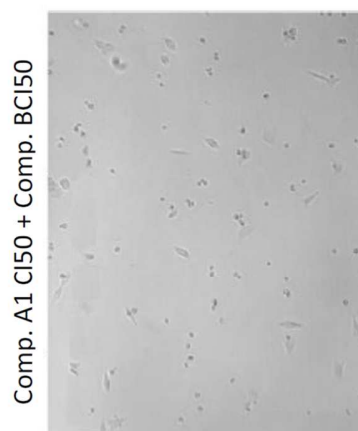


FIG. 10B

Comp. B Cl50

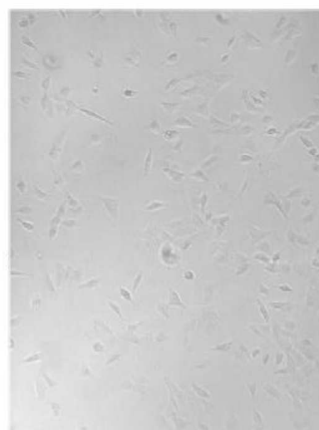


FIG. 10C

FIG. 10D

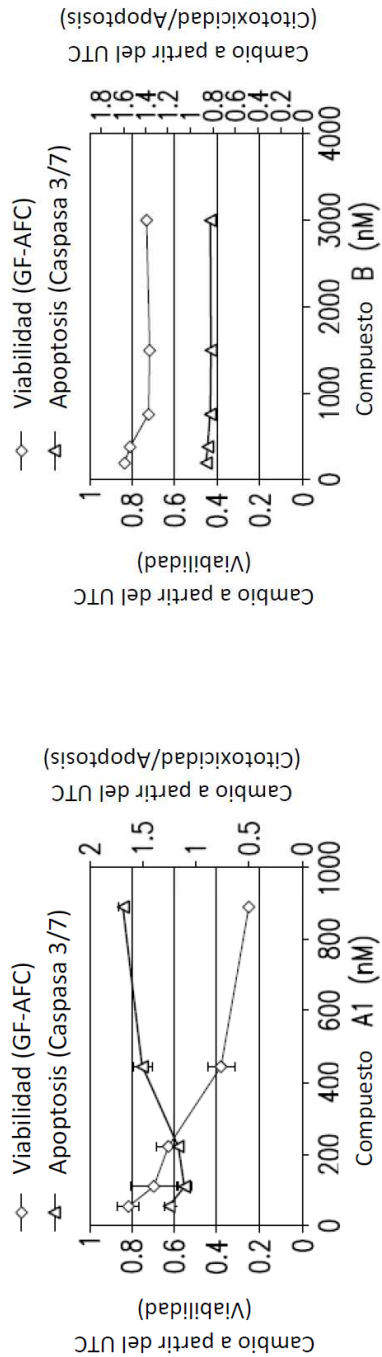


FIG.11A

FIG.11B

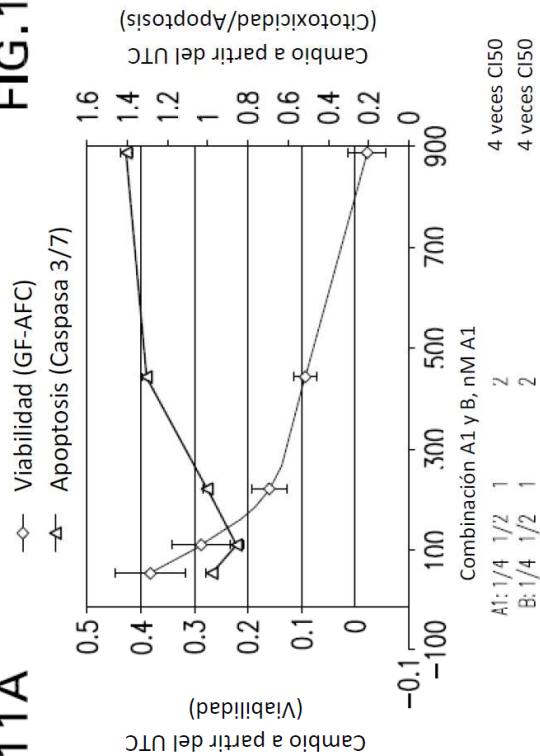
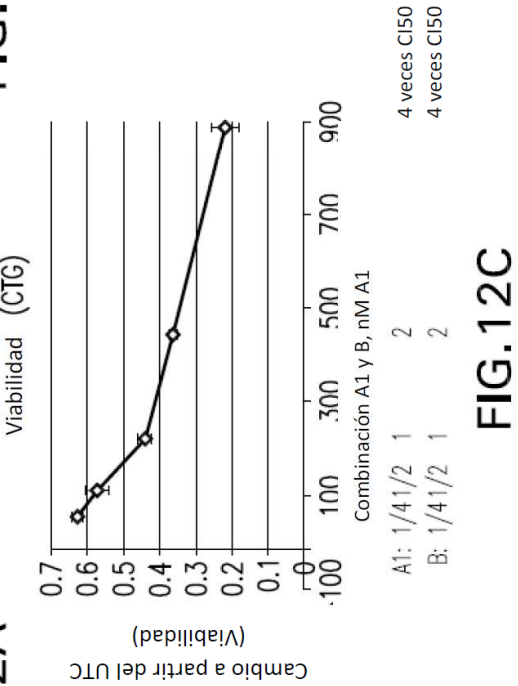
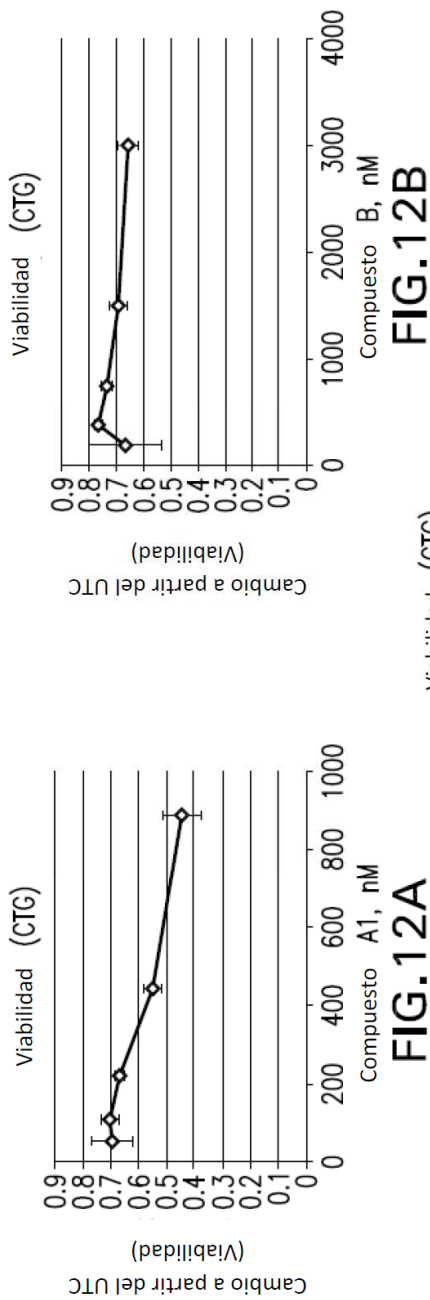


FIG.11C



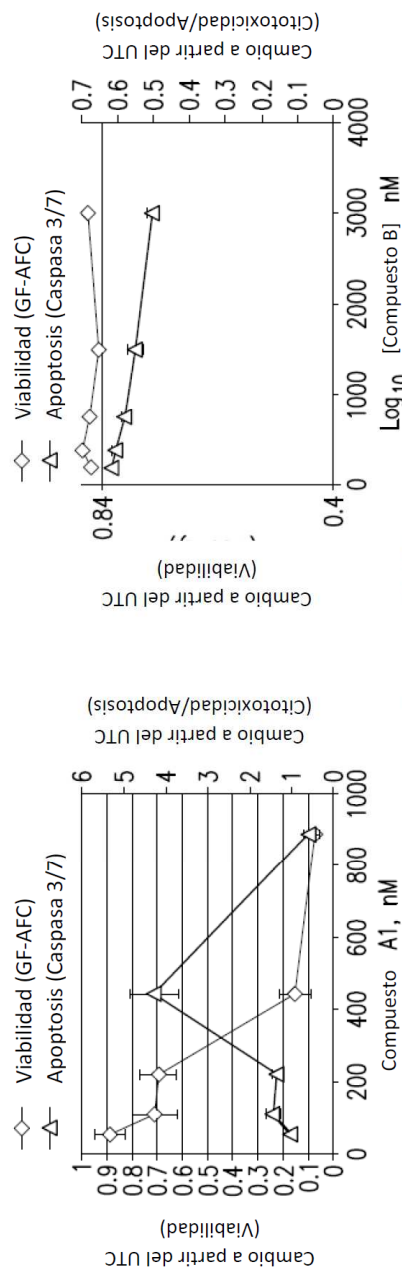


FIG. 13A

FIG. 13B

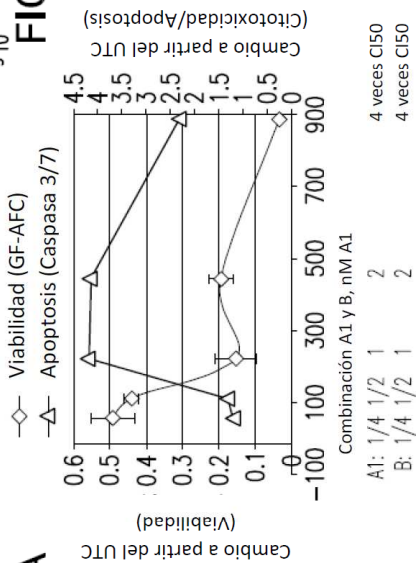


FIG. 13C

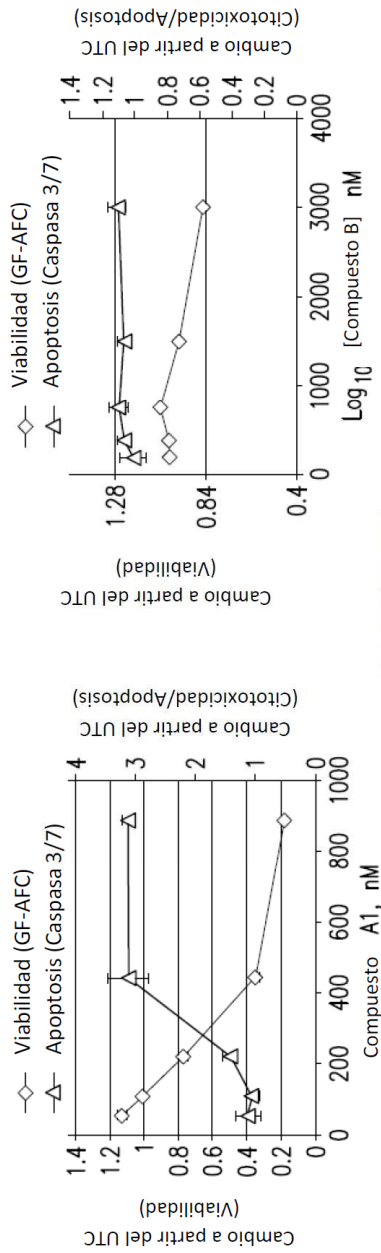


FIG. 14A

FIG. 14B

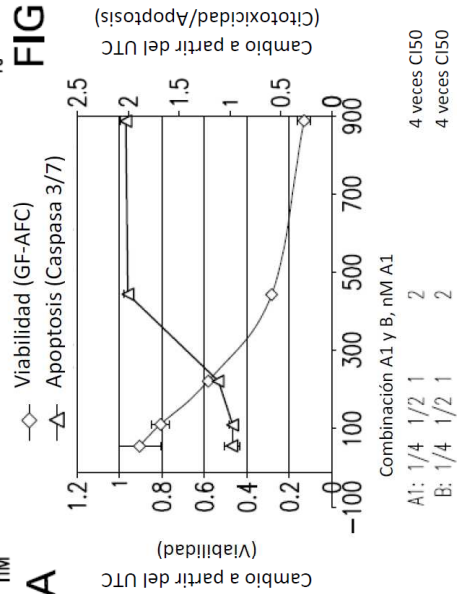


FIG. 14C

Combinación A1 y B, nM A1

A1: 1/4	1/2	1	2
B: 1/4	1/2	1	2

4 veces CI50
4 veces CI50

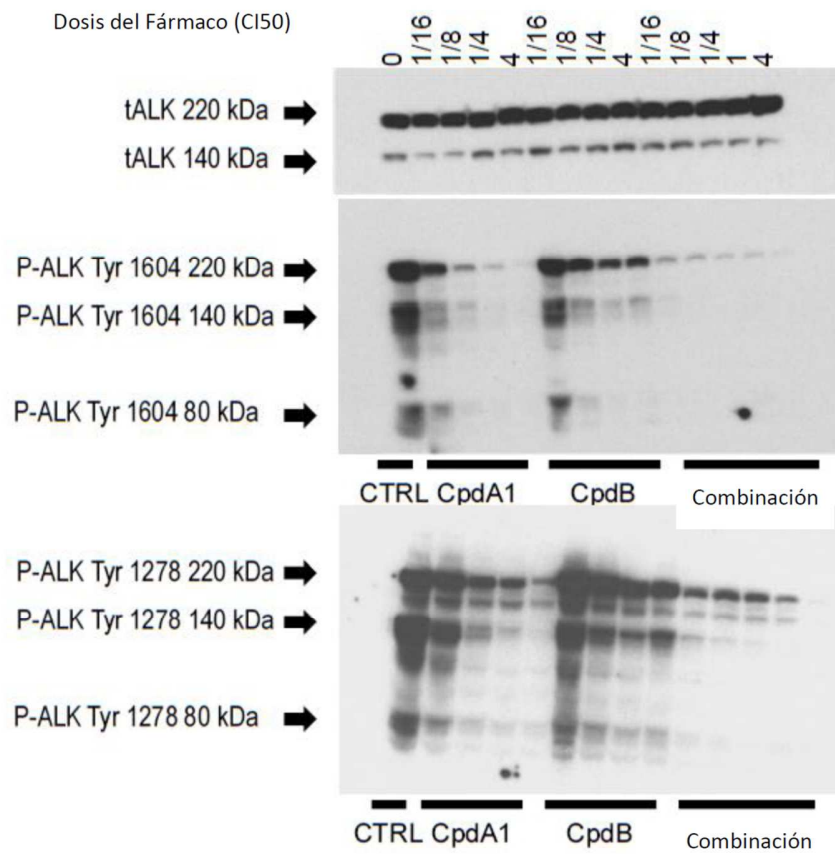


FIG.15

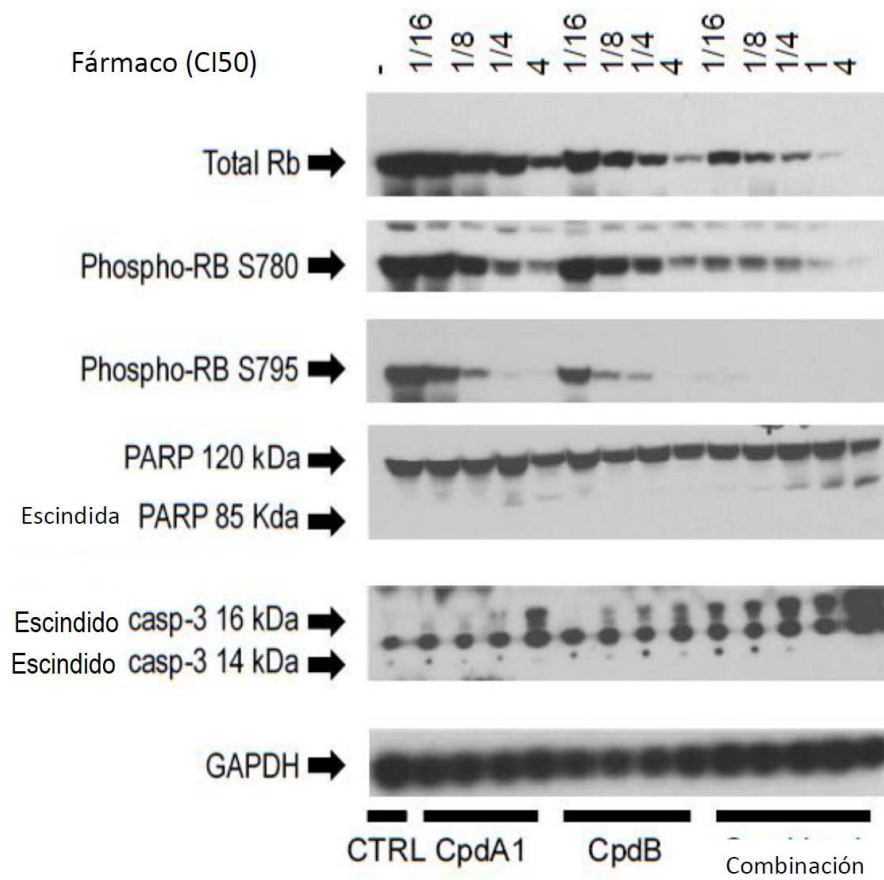


FIG.16

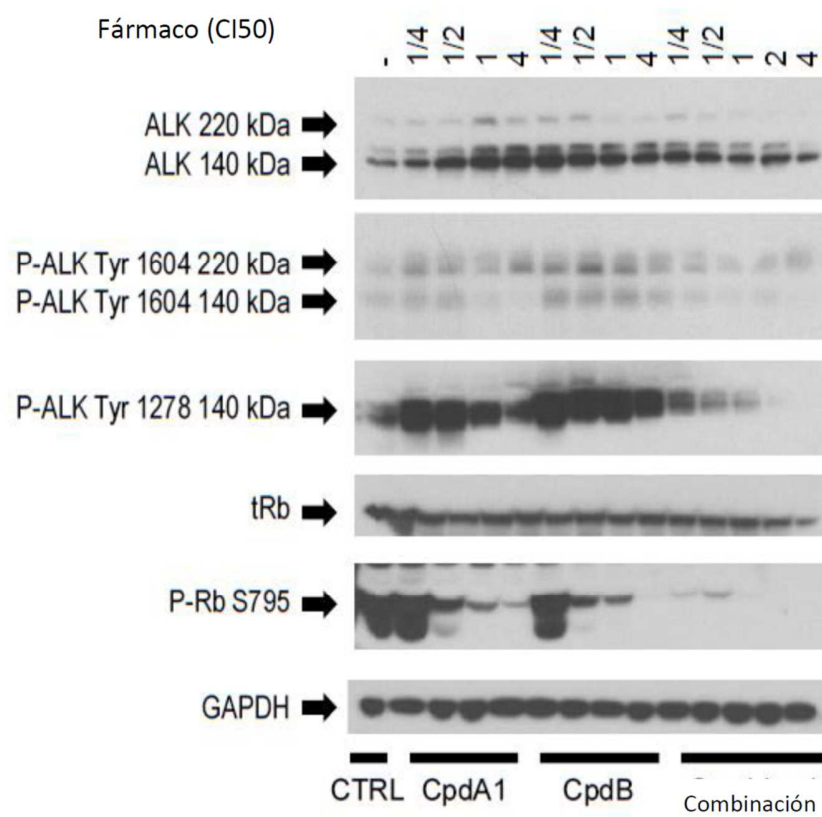


FIG.17

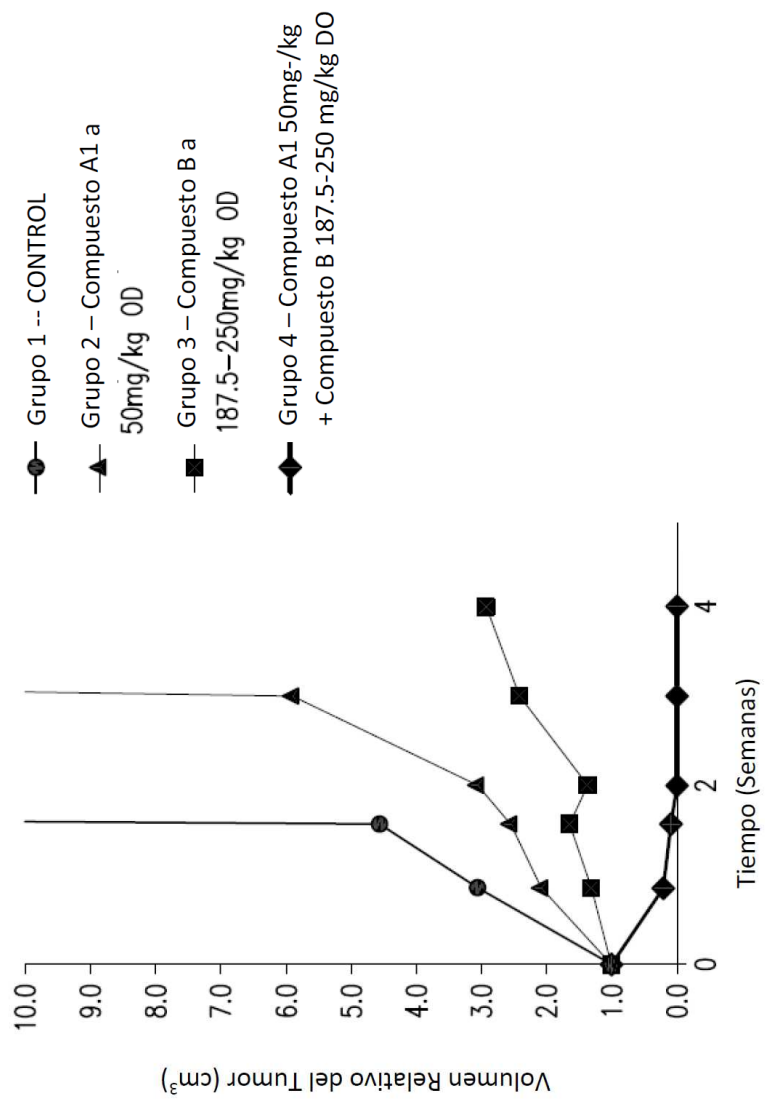


FIG.18

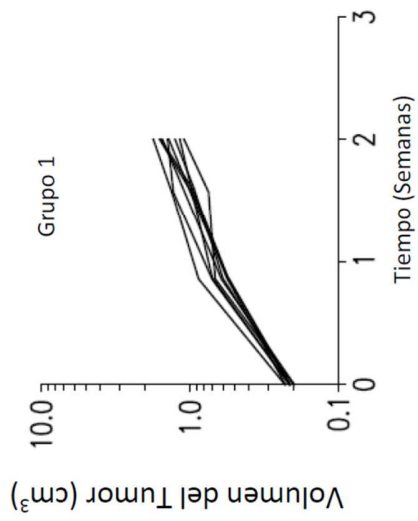


FIG.19A

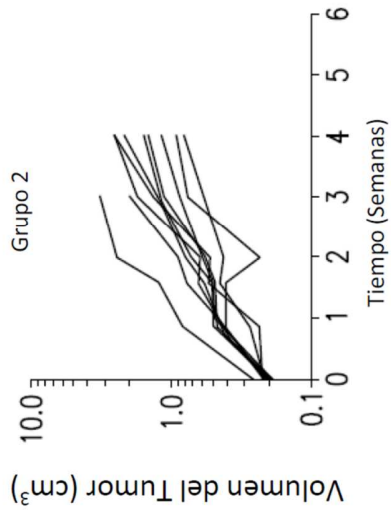


FIG.19B

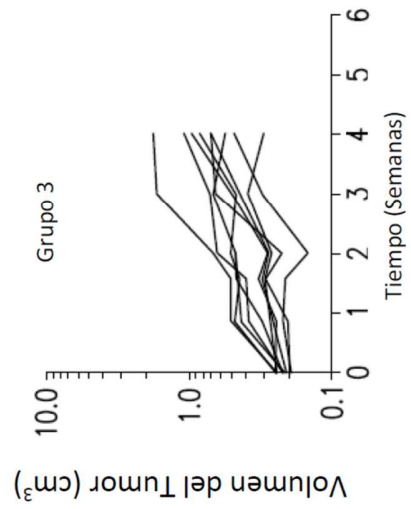


FIG.19C

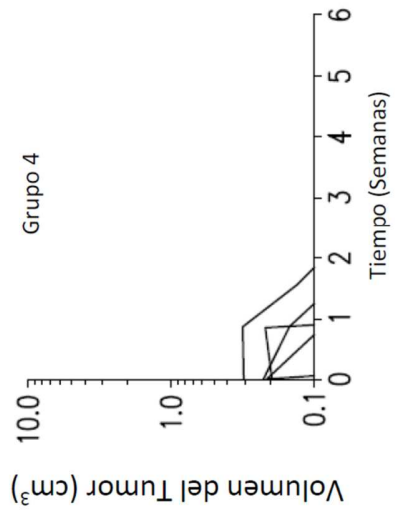


FIG.19D

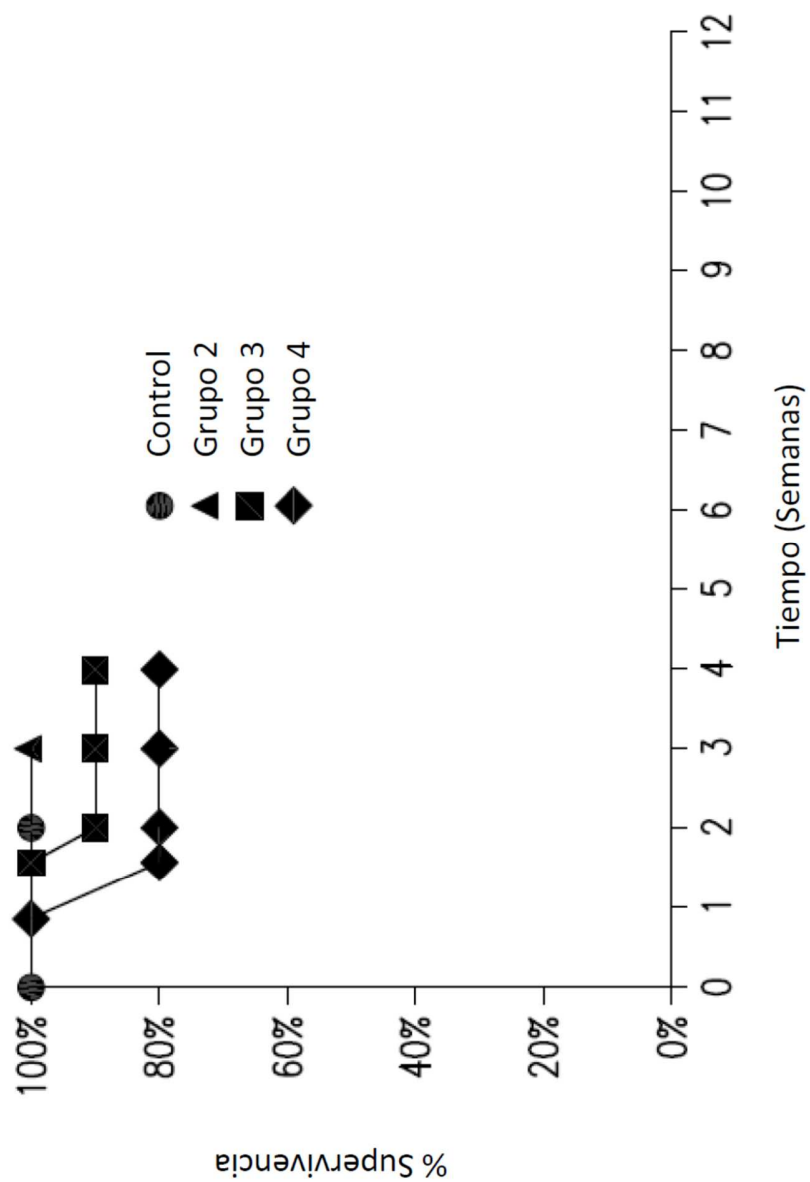


FIG.20

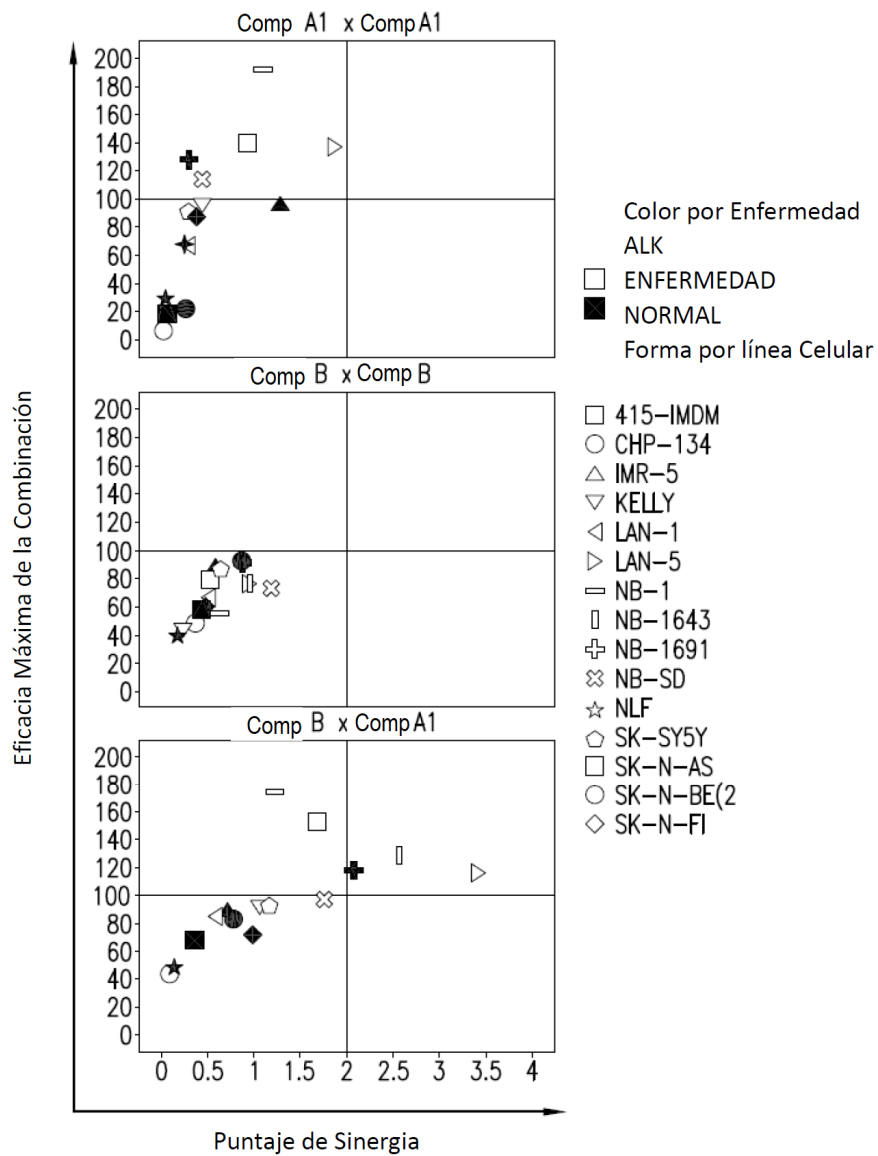


FIG. 21

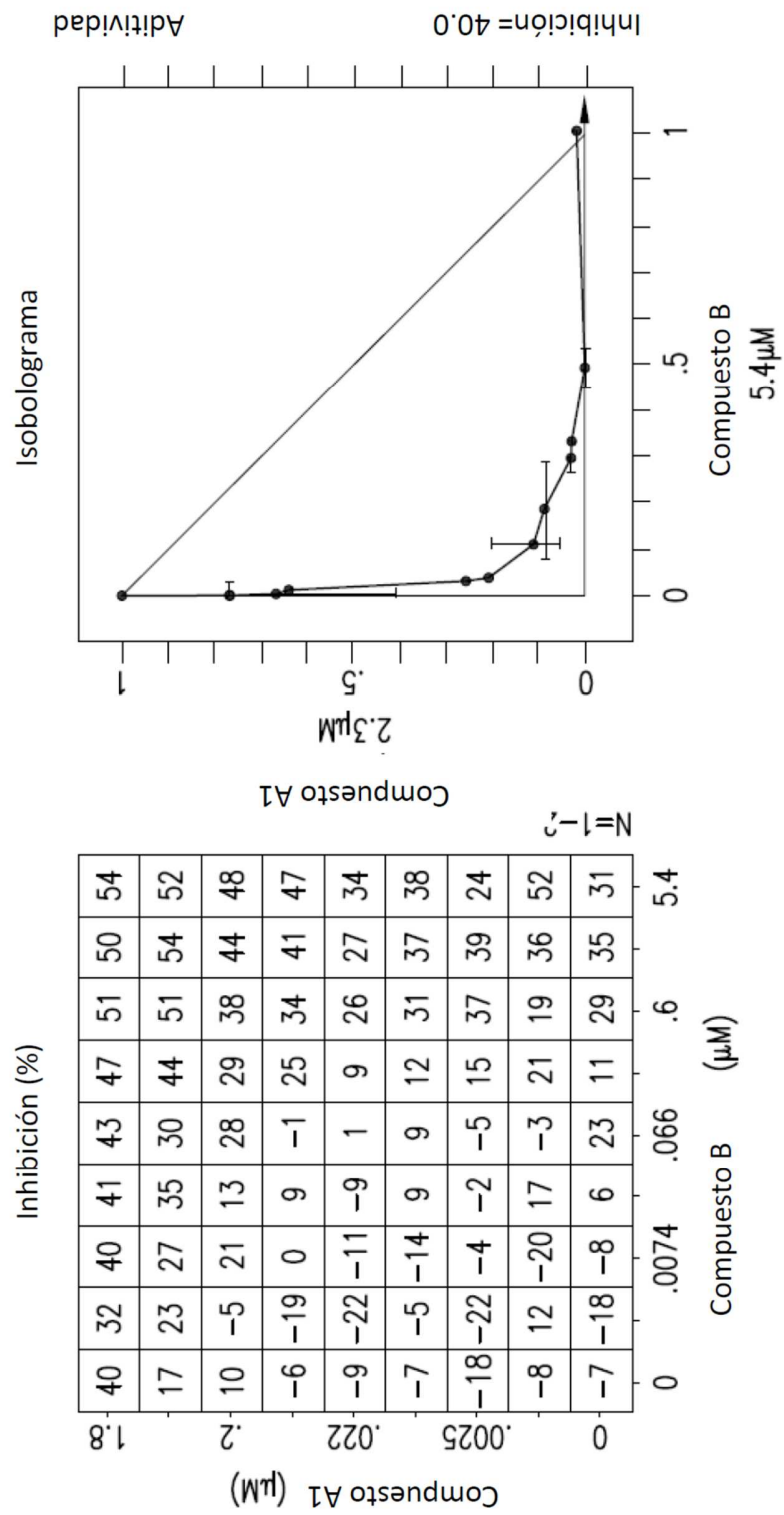
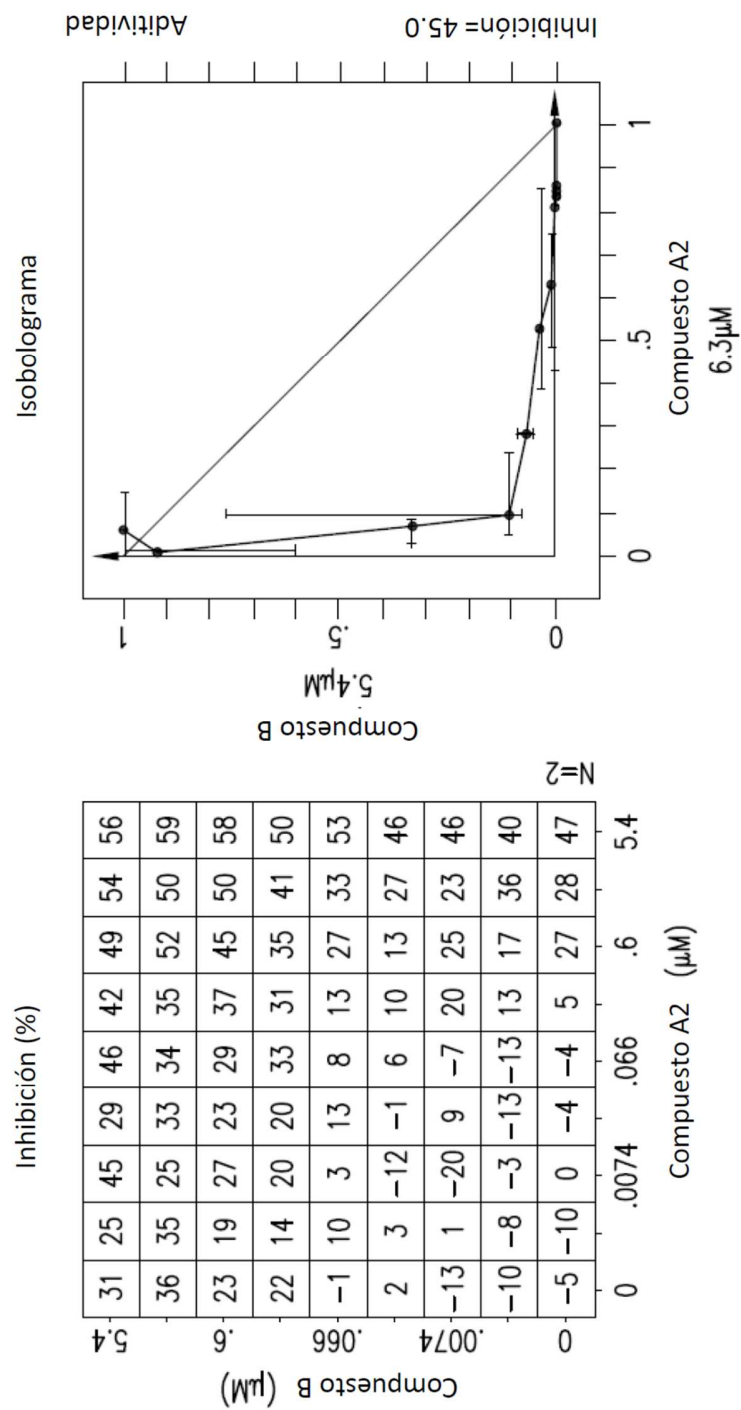
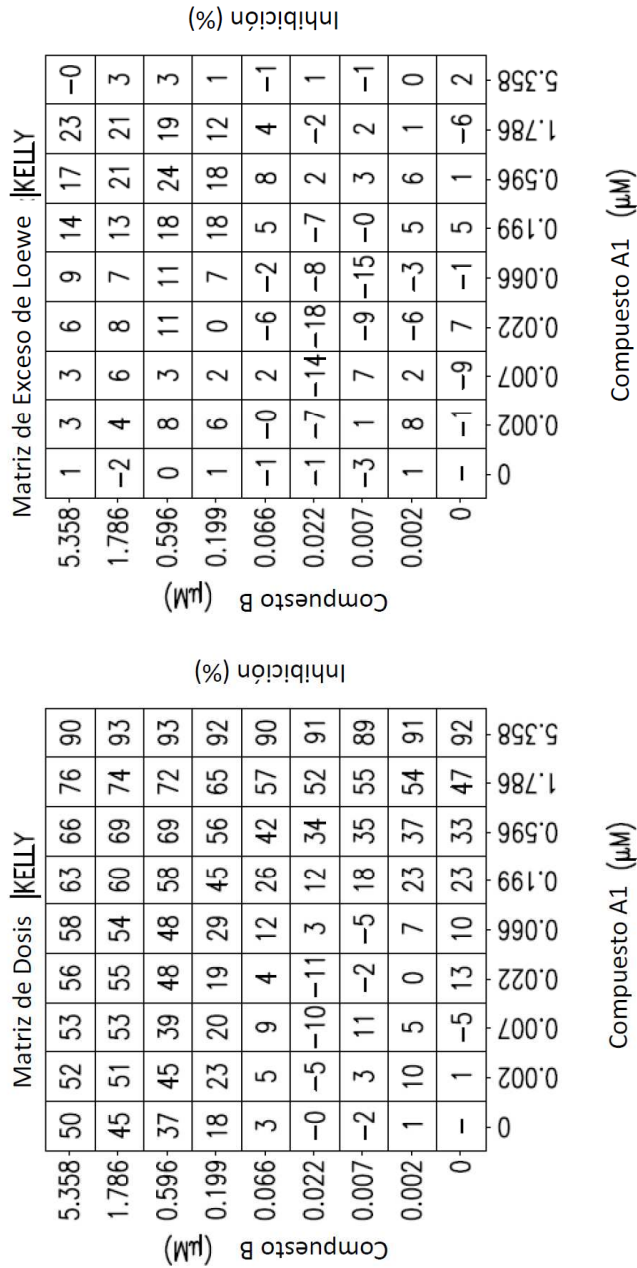


FIG.22A





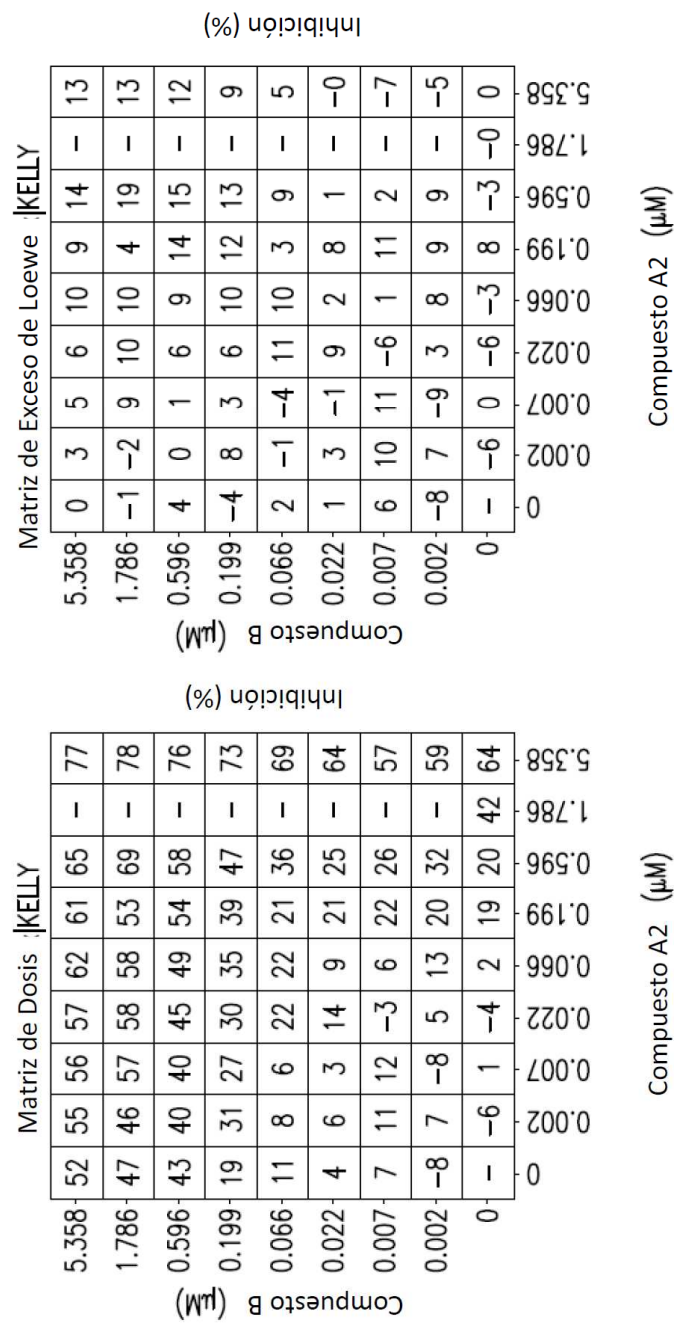


FIG.23B

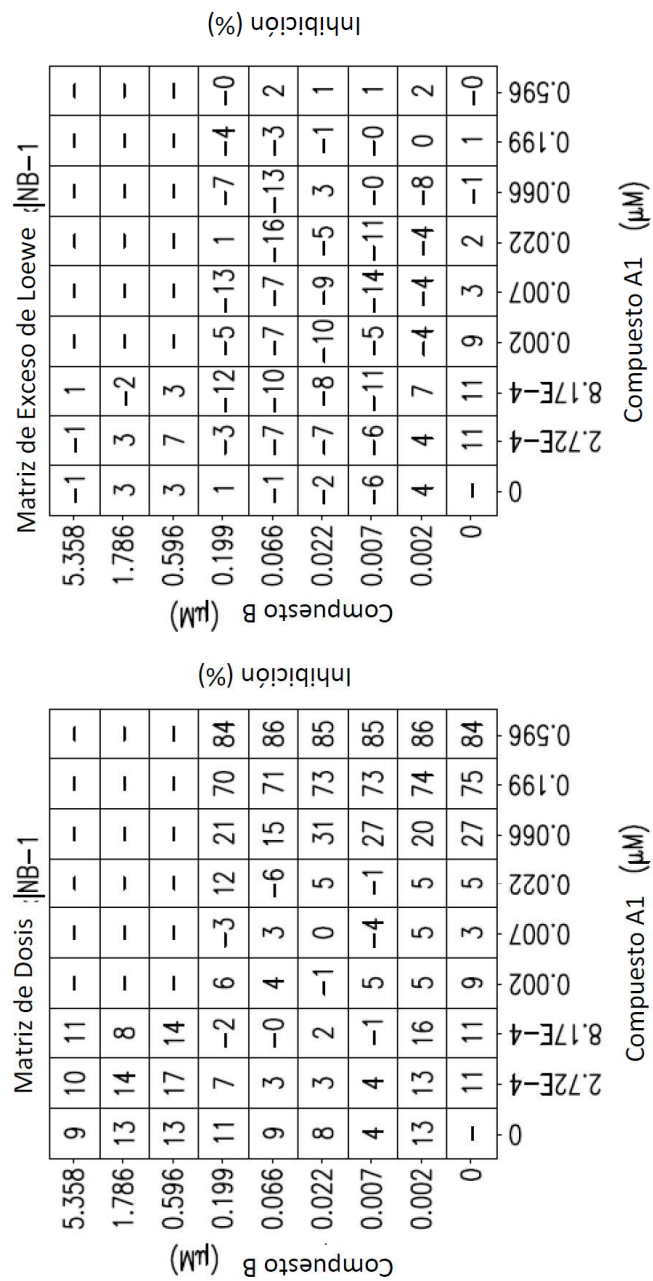


FIG.23C

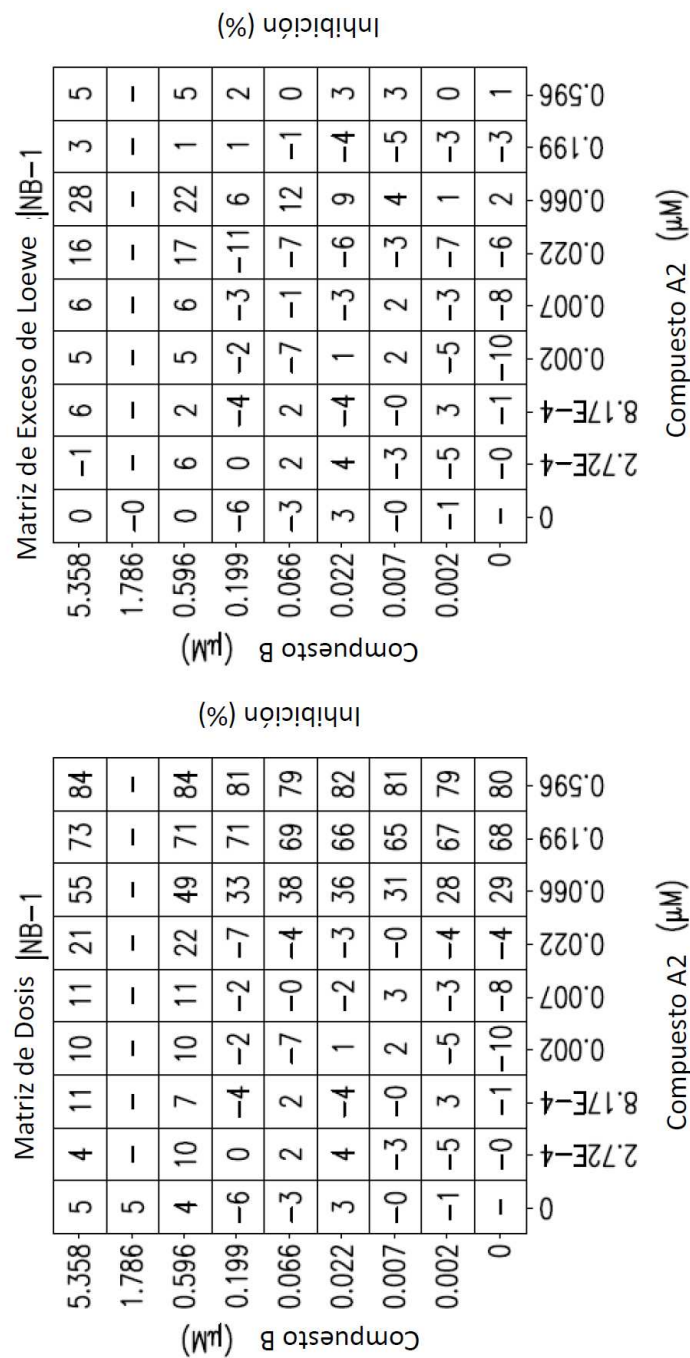


FIG.23D

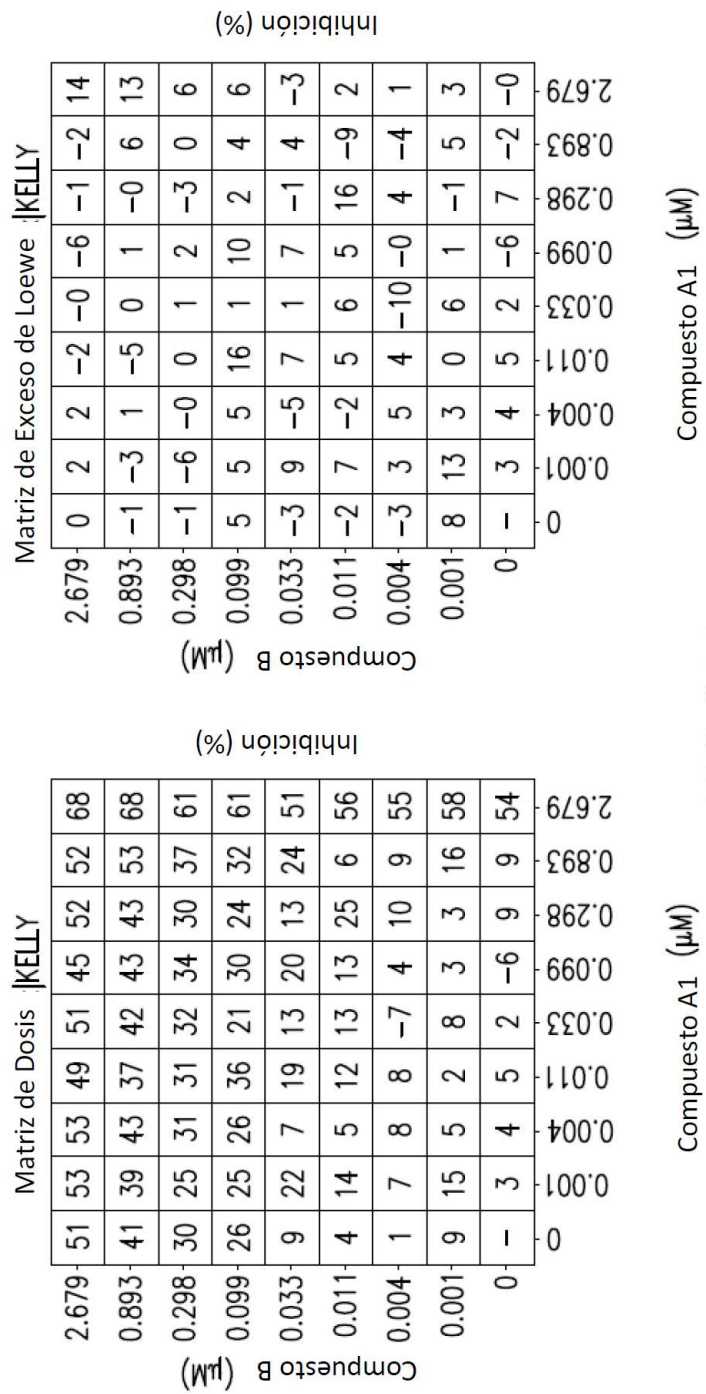


FIG.24A

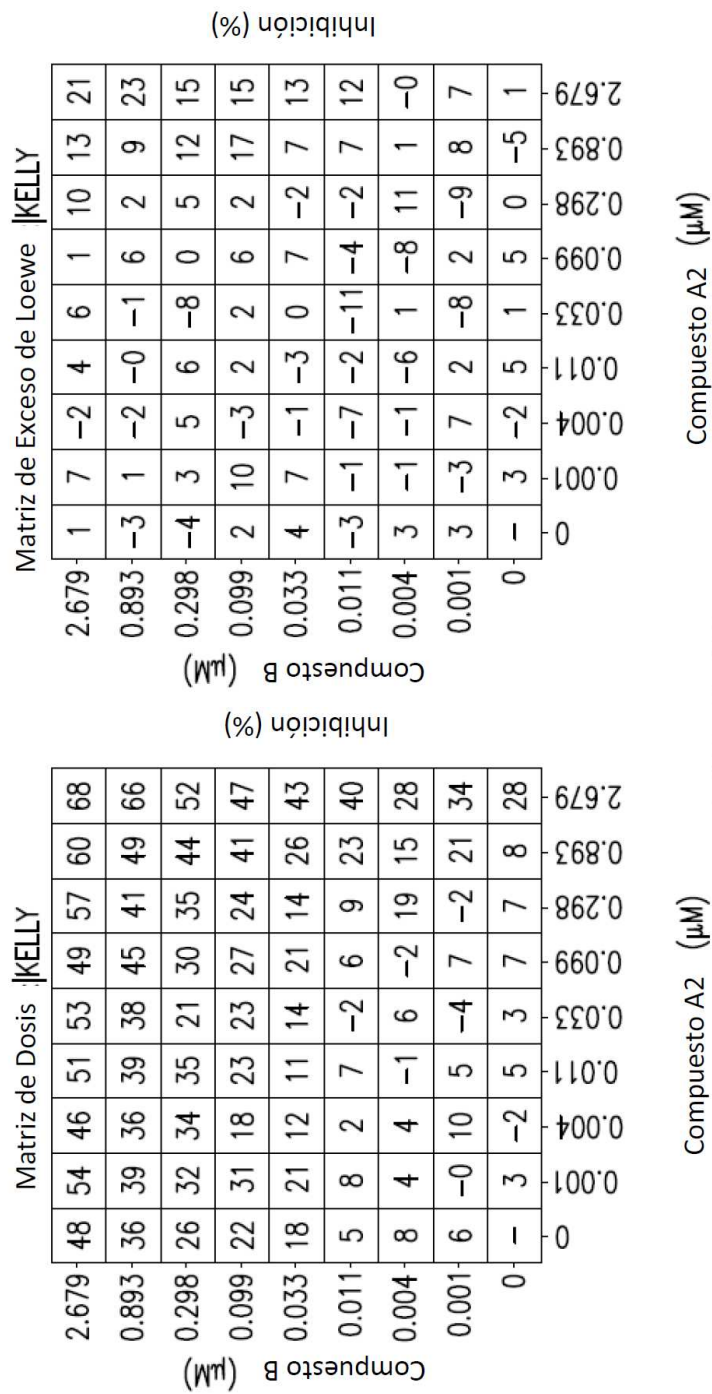
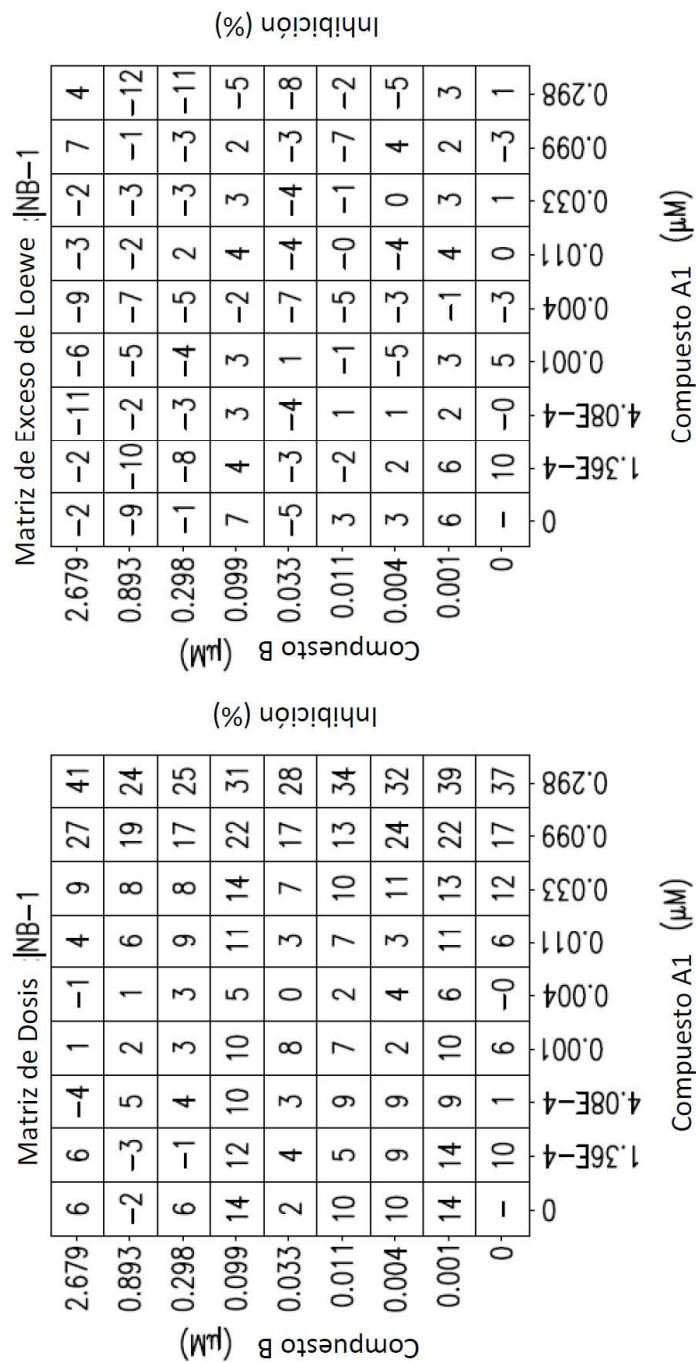


FIG.24B



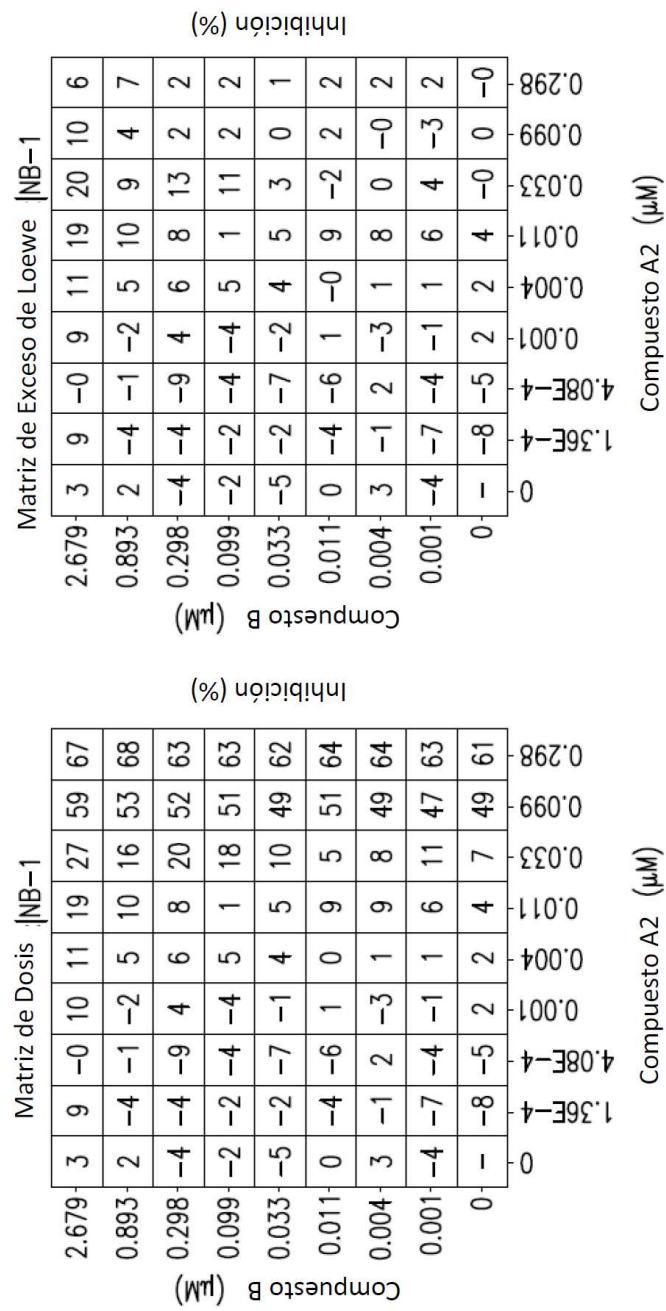


FIG.24D

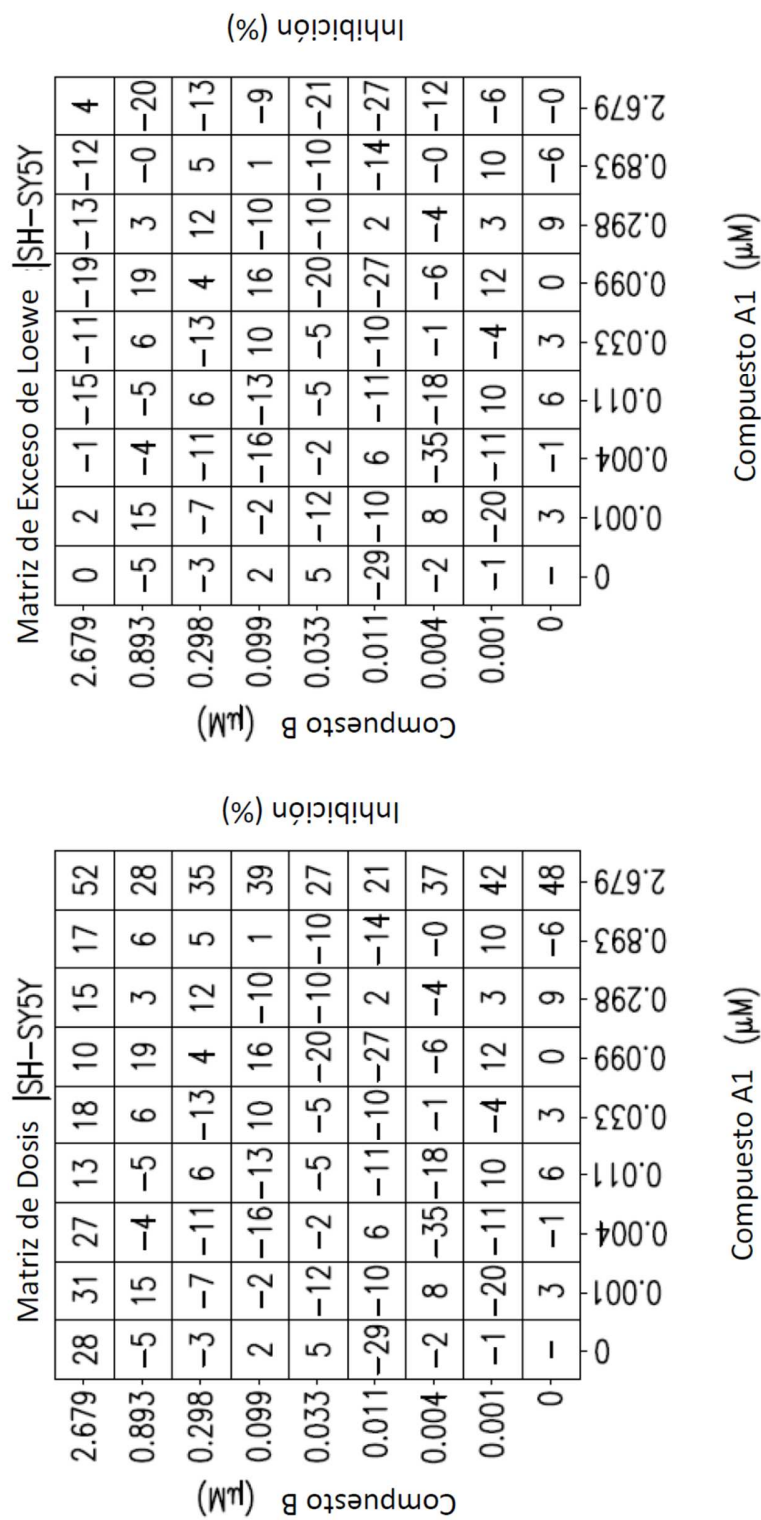


FIG.24E

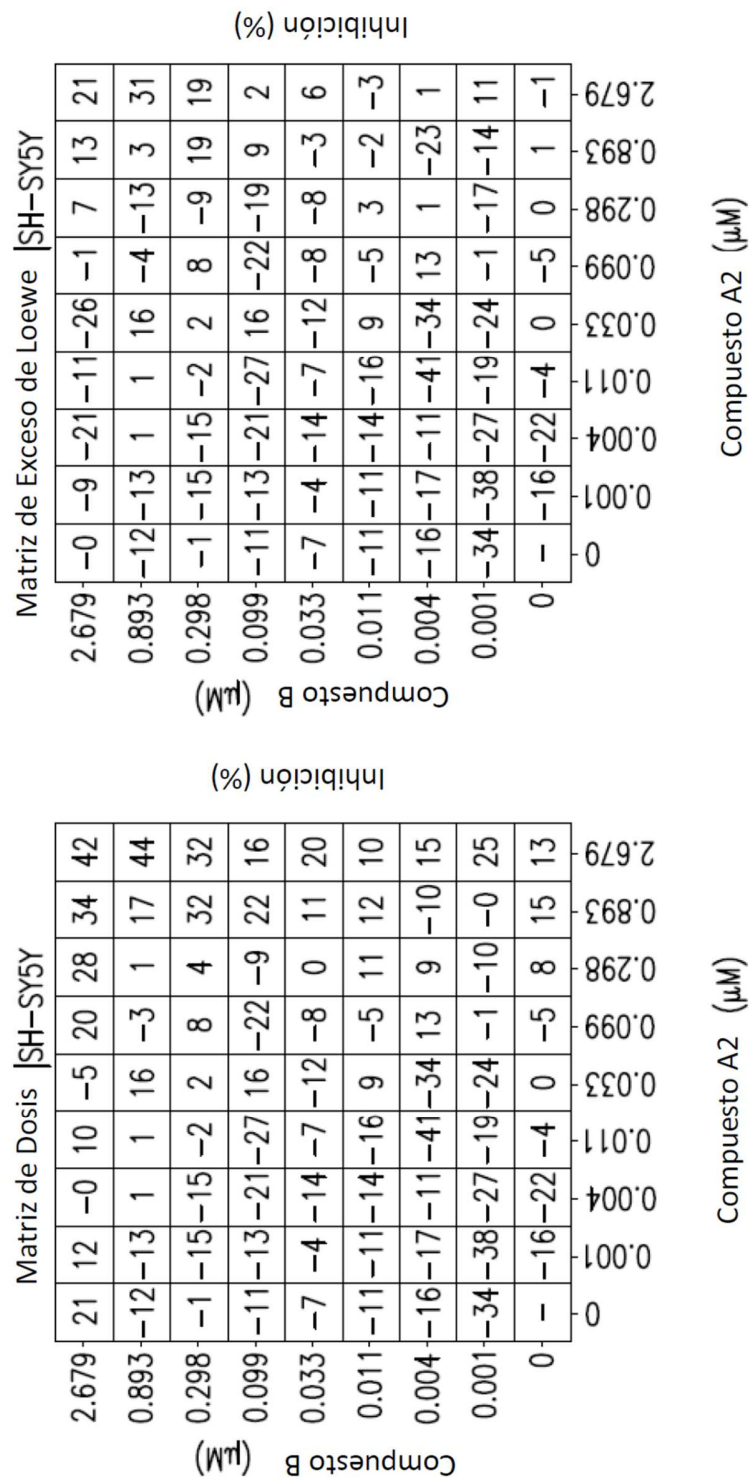


FIG.24F