

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-252726- -00000-0000

Fecha: 2013-10-24 14:57:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industr.

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE CINASA DE FOSFATIDIL-
INOSITOL- 3 (PI3K) Y UN INHIBIDOR DE mTOR

SOLICITANTE: Novartis AG.

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 23 de Octubre de 2013

P2013/000174



No. 13-252726-00000-0000

Fecha: 2013-10-24 14:57:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000174

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: **NOVARTIS AG**Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel,
SuizaNacionalidad o Domicilio: SuizaLugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)Nombre: VER PAGINA ADJUNTADirección: VER PAGINA ADJUNTANacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/034647Fecha Abril 23, 2012Publicación Internacional No. WO 2012/148846 A1Fecha Noviembre 01, 2012

6

Título (54) COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE CINASA DE FOSFATIDIL-
INOSITOL-3 (PI3K) Y UN INHIBIDOR DE mTORClasificación Internacional (51) A61K 31/436, A61K 31/4439, A61P 35/00

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Abril 25, 2011(31) Número de
Solicitud61/478,572

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



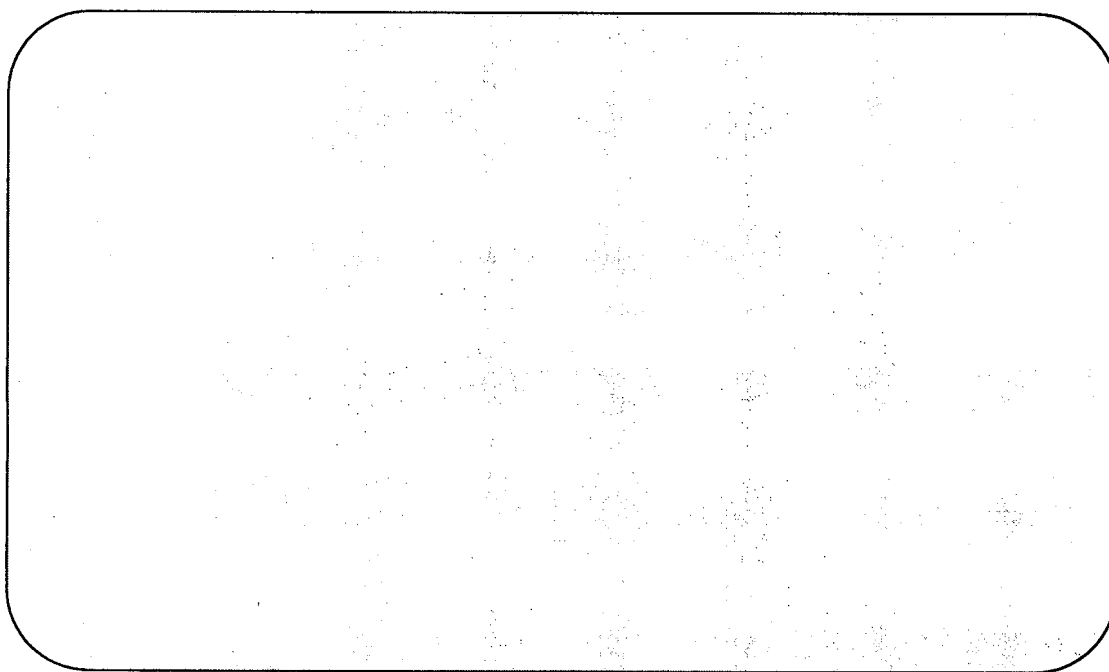
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/034647

Christine FRITSCH

Werk Klybeck, Klybeckstrasse
141, CH-4057 Basel
Suiza
Nacionalidad: Francesa

Carlos GARCIA-ECHEVERRIA

11 Boulevard
de la Republique,
F-92210 Saint-Cloud
Francia
Nacionalidad: Española

Xizhong HUANG

250 Massachusetts
Avenue, Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Sauveur-Michel MAIRA

Werk Klybeck, Klybeckstrasse
141, CH-4057 Basel
Suiza
Nacionalidad: Francesa

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 107414

Bogotá D.C., Octubre 23 de 2013 - 16:31:55

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	522591171	23/10/2013	8.388.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-252726- -00000-0000
Fecha: 2013-10-24 14:57:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020	Fecha: 13 / 10 / 24 AAAA MM DD	Recorrido: 3
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	B-252726	0	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El co Anexo contiene un total de 11 Archivos.
11. en formato pdf, las cuales fueron
procesados

grizelda

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒
☒
☐
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-252726-00000-0000

Fecha: 2013-10-24 14:57:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PI02-F03 (2009-11-10)

 OLARTEMOURE OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.				Espacio reservado para el adhesivo de radicación.	
PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL P2013/000174					
SOLICITUD DE: 1 ☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.					
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.					
2 SOLICITANTE (71)		Nombre: NOVARTIS AG Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Suiza Nacionalidad o Domicilio: Suiza Lugar de Constitución: Suiza Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número	
REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: CARLOS R. OLARTE Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C. Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799 E-mail: office@olartemoure.com		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número 79782747Bta TP 74.295	
INVENTOR (ES) (72)		Nombre: VER PAGINA ADJUNTA Dirección: VER PAGINA ADJUNTA Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA			
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2012/034647 Fecha Abril 23, 2012 Publicación Internacional No. WO 2012/148846 A1 Fecha Noviembre 01, 2012					
6 Título (54) COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE CINASA DE FOSFATIDIL-INOSITOL-3 (PI3K) Y UN INHIBIDOR DE mTOR					
Clasificación Internacional (51) A61K 31/436, A61K 31/4439, A61P 35/00					
Prioridad SI ☒ NO ☐		(33) País de Origen US	(32) Fecha Abril 25,2011	(31) Número de Solicitud 61/478,572	
9 Comprobante de pago No. 13- Fecha					



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/034647

Christine FRITSCH

Werk Klybeck, Klybeckstrasse
141, CH-4057 Basel
Suiza
Nacionalidad: Francesa

Carlos GARCIA-ECHEVERRIA

11 Boulevard
de la Republique,
F-92210 Saint-Cloud
Francia
Nacionalidad: Española

Xizhong HUANG

250 Massachusetts
Avenue, Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Sauveur-Michel MAIRA

Werk Klybeck, Klybeckstrasse
141, CH-4057 Basel
Suiza
Nacionalidad: Frances

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.



Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES

Licencia 376 - 1993 Minjusticia

4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.



Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis"

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346



Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES

Licencia 376 - 1993 Minjusticia

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

NOVARTIS AG

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Date/Fecha: June 27, 2006

City, Country/Ciudad, País: Basel, Switzerland


Arthur Conzuela


Pascal Traub

Attestation

- 1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.
- 2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.
- 3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
- 4 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)



Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven),
2009 (two thousand and nine).

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *H. Stahelin*

3. in his/her function as *Off. Reg.*

4. and certified by the seal of the *Gericht*

Certified *03. Aug. 2006*

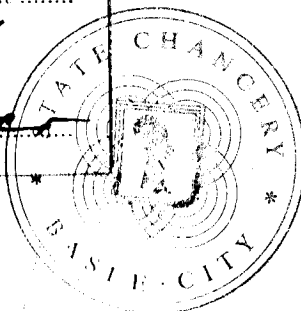
5. in Basel (Bâle) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. *2091/18584*

9. Seal/stamp: 10. Signature: *Fischer*

Heidi Fischer



VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application NOVARTIS AG is entitled to claim priority of earlier application No. 61/478,572 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from FRITSCH, Christine to NOVARTIS AG, dated 27 April 2011 (27.04.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from GARCIA-ECHEVERRIA, Carlos to NOVARTIS AG, dated 02 May 2011 (02.05.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from HUANG, Xizhong to NOVARTIS AG, dated 03 June 2011 (03.06.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from MAIRA, Sauveur-Michel to NOVARTIS AG, dated 06 June 2011 (06.06.2011)



(51) International Patent Classification:

A61K 31/436 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/034647

(22) International Filing Date:

23 April 2012 (23.04.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/478,572 25 April 2011 (25.04.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **FRITSCH, Christine** [FR/CH]; c/o Novartis Pharma AG, Werk Klybeck, Klybeckstrasse 141, CH-4057 Basel (CH). **GARCIA-ECHEVERRIA, Carlos** [ES/FR]; 11 Boulevard de la Republique, F-92210 Saint-Cloud (FR). **HUANG, Xizhong** [US/US]; c/o Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **MAIRA, Sauveur-Michel** [FR/CH]; c/o Novartis Pharma AG, Werk Klybeck, Klybeckstrasse 141, CH-4057 Basel (CH).

(74) Agent: **RUECK, Sandra**; Novartis Pharmaceuticals Corporation, One Health Plaza, Building 101, East Hanover, New Jersey 07936-1080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: COMBINATION OF A PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE (PI3K) INHIBITOR AND A MTOR INHIBITOR

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical combination comprising a phosphatidylinositol- 3-kinase (PI3K) inhibitor compound which is a 2-carboxamide cycloamino urea derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a pharmaceutical composition comprising such a combination; and the uses of such a combination in the treatment proliferative diseases, more specifically of mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent diseases.



Case 54628A

COMBINATION OF A PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE (PI3K) INHIBITOR AND A MTOR INHIBITOR

Field of the Invention

The present invention relates to a pharmaceutical combination comprising a phosphatidylinositol- 3-kinase (PI3K) inhibitor compound which is a 2-carboxamide cycloamino urea derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a pharmaceutical composition comprising such a combination; and the uses of such a combination in the treatment proliferative diseases, more specifically of mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent diseases.

Background of the Invention

It has been shown that mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition can induce upstream insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) signaling resulting in AKT activation in cancer cells. This phenomenon has been suggested to play a role in the attenuation of cellular responses to mTOR inhibition and may attenuate the clinical activity of mTOR inhibitors. Increase in pAKT has for instance been found in approximately 50% in the tumours of all patients in a Phase I study in patients with advanced solid tumours (Taberno et al., Journal of Clinical Oncology, 26 (2008), pp 1603-1610).

In spite of numerous treatment options for proliferative disease patients, there remains a need for effective and safe therapeutic agents and a need for their preferential use in combination therapy. The compounds of formula (A), as set forth herein and including (S)-pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-(4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl)-amide, are highly selective inhibitors of alpha isoform of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). It has been surprisingly discovered that the combination of an effective amount of the alpha-specific PI3K inhibitor compounds of formula (A) with an effective amount of at least one mTOR inhibitor results in unexpected synergistic improvement in the treatment of mammalian target of rapamycin (mTOR) dependent diseases, particularly cancer. When administered simultaneously, sequentially or separately, this alpha-specific PI3K inhibitor compound and the mTOR inhibitor of the present invention interact to strongly inhibit cell proliferation. This beneficial interaction

Case 54628A

allows reduction in the dose required for each compound, leading to a reduction in the side effects and enhancement of the long-term clinical effectiveness of the compounds in treatment.

Summary of the Invention

It has been now found in accordance with the present invention that an alpha-isoform specific phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof reduces or blocks the phosphorylation and activation of AKT by mTOR inhibitors. Accordingly, the present invention relates to a pharmaceutical combination comprising a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In a preferred embodiment, the compound of formula (A) in the present invention is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethylethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I").

In a preferred embodiment, the mTOR inhibitor in the present invention is selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof such as everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511.

In one aspect, the present invention provides a pharmaceutical combination comprising a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in treating or preventing an mTOR kinase dependent disease.

In a further aspect, the present invention provides the use of a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of an mTOR kinase dependent disease.

In further aspect the present invention provides a method of treating or preventing an mTOR kinase dependent disease by administering a compound of formula (A) or a

Case 54628A

pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In a further aspect, the present invention provides a combination of a compound of formula (A) and at least one mTOR inhibitor selected from the group consisting of RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof such as everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511, wherein the active ingredients are present in each case in free form or in the form of a pharmaceutically acceptable salt, and optionally at least one pharmaceutically acceptable carrier, for simultaneous, separate or sequential use for the treatment of mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent diseases.

In a further aspect, the present invention provides a method to reduce or block the phosphorylation and activation of AKT by mTOR inhibitors comprising administering a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

In another embodiment, the present invention provides a method of treating a proliferative disease dependent on acquired phosphorylation and activation of AKT during treatment with at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

In further embodiment, the present invention relates to a method of treating a proliferative disease which has become resistant or has a decreased sensitivity to the treatment with at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof. The resistance is e.g. due to phosphorylation and activation of AKT.

In a further aspect the present invention provides a method for improving efficacy of the treatment of a proliferative disease with at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a combination comprising a compound of

Case 54628A

formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

In one aspect the present invention provides a pharmaceutical composition comprising a PI3K inhibitor compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Detailed Description of the Figures

Figure 1 shows the phosphorylation levels of AKT (S473); MAPK (T202/Y204); MEK1/2 (S217/S221) and actin levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in BT474 breast tumor cells as detected by Western blot analysis.

Figure 2 shows the AKT (S473) phosphorylation levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in BT474 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology.

Figure 3 shows the AKT (T308) phosphorylation levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in BT474 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology.

Figure 4 shows the total AKT expression levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in BT474 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology.

Figure 5 shows the phosphorylation levels of AKT (S473); MAPK (T202/Y204) and actin levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in MDA-MB231 breast tumor cells as detected by Western blot analysis.

Case 54628A

Figure 6 shows the AKT (S473) phosphorylation levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology.

Figure 7 shows the AKT (T308) phosphorylation levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology.

Figure 8 shows the total AKT expression levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology.

Figure 9 shows the phosphorylation levels of AKT (S473) (Panel A) and the total levels of AKT (Panel B) in presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in MDA-MB231 breast tumor cells as detected by Western blot and further quantified using the Quantity One software, in a second set of experiment.

Figure 10 shows the AKT (S473) phosphorylation levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology, in a second set of experiment.

Figure 11 shows the AKT (T308) phosphorylation levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology, in a second set of experiment.

Figure 12 shows the total AKT expression levels in presence of everolimus (RAD001) single agent, Compound I single agent, and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in comparison to the vehicle control in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse Protein Array methodology, in a second set of experiment.

Case 54628A

Figure 13 shows full dose matrix cell proliferation data from single agent and concomitant everolimus (RAD001) and/or Compound I treatment in SKBR-3 human breast cancer cell models.

Figure 14 shows full dose matrix cell proliferation data from single agent and concomitant everolimus (RAD001) and/or Compound I treatment in BT-474 human breast cancer cell models.

Figure 15 shows full dose matrix cell proliferation data from single agent and concomitant everolimus (RAD001) and/or Compound I treatment in T47-D human breast cancer cell models.

Figure 16 shows full dose matrix cell proliferation data from single agent and concomitant everolimus (RAD001) and/or Compound I treatment in ZR-75-1 human breast cancer cell models.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to a pharmaceutical combination comprising (a) a compound of formula (A), as defined herein, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and (b) at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The following general definitions shall apply in this specification, unless otherwise specified:

The terms “comprising” and “including” are used herein in their open-ended and non-limiting sense unless otherwise noted.

The terms “a” and “an” and “the” and similar references in the context of describing the invention (especially in the context of the following claims) are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context. Where the plural form is used for compounds, salts, and the like, this is taken to mean also a single compound, salt, or the like.

“Combination” refers to either a fixed combination in one dosage unit form, or a kit of parts for the combined administration where a compound of the formula (A) and a combination partner (e.g. another drug as explained below, also referred to as “combination

Case 54628A

partner" or "therapeutic agent") may be administered independently at the same time or separately within time intervals, especially where these time intervals allow that the combination partners show a cooperative, e.g. synergistic effect.

"Pharmaceutical combination" as used herein means a product that results from the mixing or combining of more than one active ingredient and includes both fixed and non-fixed combinations of the active ingredients. The term "fixed combination" or "fixed dose" means that the active ingredients, e.g. a compound of formula (A) and a combination partner, are both administered to a patient simultaneously in the form of a single entity or dosage. The term "non-fixed combination" means that the active ingredients, e.g. a compound of formula (I) and a combination partner, are both administered to a patient as separate entities either simultaneously, concurrently or sequentially with no specific time limits, wherein such administration provides therapeutically effective levels of the two compounds in the body of the warm-blooded animal in need thereof. The latter also applies to cocktail therapy, e.g. the administration of three or more active ingredients.

The term "a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor" is defined herein to refer to a compound which targets, decreases or inhibits PI 3-kinase. PI 3-kinase activity has been shown to increase in response to a number of hormonal and growth factor stimuli, including insulin, platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor, epidermal growth factor, colony-stimulating factor, and hepatocyte growth factor, and has been implicated in processes related to cellular growth and transformation.

The term "pharmaceutical composition" is defined herein to refer to a mixture or solution containing at least one active ingredient or therapeutic agent to be administered to a warm-blooded animal, e.g., a mammal or human, in order to prevent or treat a particular disease or condition affecting the warm-blooded animal.

The term "pharmaceutically acceptable" is defined herein to refer to those compounds, materials, compositions and/or dosage forms, which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for contact with the tissues a warm-blooded animal, e.g., a mammal or human, without excessive toxicity, irritation allergic response and other problem complications commensurate with a reasonable benefit / risk ratio.

The phrase "therapeutically effective amount" is used herein to mean an amount sufficient to reduce by at least about 15 percent, preferably by at least 50 percent, more

Case 54628A

preferably by at least 90 percent, and most preferably prevent, a clinically significant deficit in the activity, function and response of the warm-blooded animal in need thereof. Alternatively, a therapeutically effective amount is sufficient to cause an improvement in a clinically significant condition/symptom in the warm-blooded animal in need thereof.

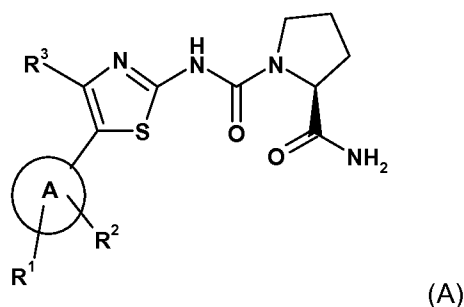
The term "treating" or "treatment" as used herein comprises a treatment relieving, reducing or alleviating at least one symptom in a subject or effecting a delay of progression of a disease. For example, treatment can be the diminishment of one or several symptoms of a disorder or complete eradication of a disorder, such as cancer. Within the meaning of the present invention, the term "treat" also denotes to arrest, delay the onset (i.e., the period prior to clinical manifestation of a disease) and/or reduce the risk of developing or worsening a disease. The term "protect" is used herein to mean prevent delay or treat, or all, as appropriate, development or continuance or aggravation of a disease in a subject.

The term "prevent", "preventing" or "prevention" as used herein comprises the prevention of at least one symptom associated with or caused by the state, disease or disorder being prevented.

The term "jointly therapeutically active" or "joint therapeutic effect" as used herein means that the therapeutic agents may be given separately (in a chronologically staggered manner, especially a sequence-specific manner) in such time intervals that they prefer, in the warm-blooded animal, especially human, to be treated, still show a (preferably synergistic) interaction (joint therapeutic effect). Whether this is the case can, inter alia, be determined by following the blood levels, showing that both compounds are present in the blood of the human to be treated at least during certain time intervals.

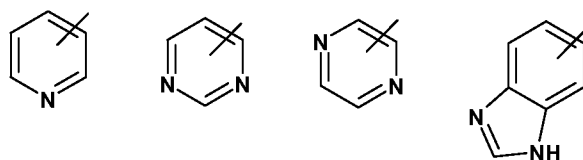
WO2010/029082 describes specific 2-carboxamide cycloamino urea derivatives, which have been found to have inhibitory activity for PI3-kinases (phosphatidylinositol 3-kinases). These specific phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors have advantageous pharmacological properties and show an improved selectivity for the PI3-kinase alpha as compared to the beta and/or delta and/or gamma subtypes. Specific 2-carboxamide cycloamino urea derivatives which are suitable for the present invention, their preparation and suitable formulations containing the same are described in WO2010/029082 and include compounds of formula (A)

Case 54628A



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein

A represents a heteroaryl selected from the group consisting of:



R¹ represents one of the following substituents: (1) unsubstituted or substituted, preferably substituted C₁-C₇-alkyl, wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to nine of the following moieties: deuterium, fluoro, or one to two of the following moieties C₃-C₅-cycloalkyl; (2) optionally substituted C₃-C₅-cycloalkyl wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to four of the following moieties: deuterium, C₁-C₄-alkyl (preferably methyl), fluoro, cyano, aminocarbonyl; (3) optionally substituted phenyl wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to two of the following moieties: deuterium, halo, cyano, C₁-C₇-alkyl, C₁-C₇-alkylamino, di(C₁-C₇-alkyl)amino, C₁-C₇-alkylaminocarbonyl, di(C₁-C₇-alkyl)aminocarbonyl, C₁-C₇-alkoxy; (4) optionally mono- or di- substituted amine; wherein said substituents are independently selected from the following moieties: deuterium, C₁-C₇-alkyl (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, fluoro, chloro, hydroxy), phenylsulfonyl (which is unsubstituted or substituted by one or more, preferably one, C₁-C₇-alkyl, C₁-C₇-alkoxy, di(C₁-C₇-alkyl)amino-C₁-C₇-alkoxy); (5) substituted sulfonyl; wherein said substituent is selected from the following moieties: C₁-C₇-alkyl (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, fluoro), pyrrolidino, (which is unsubstituted or substituted by one or

Case 54628A

more substituents selected from the group of deuterium, hydroxy, oxo;
particularly one oxo); (6) fluoro, chloro;

R² represents hydrogen;

R³ represents (1) hydrogen, (2) fluoro, chloro, (3) optionally substituted methyl,
wherein said substituents are independently selected from one or more,
preferably one to three of the following moieties: deuterium, fluoro, chloro,
dimethylamino;

with the exception of (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({5-[2-(tert-butyl)-
pyrimidin-4-yl]-4-methyl-thiazol-2-yl}-amide).

The radicals and symbols as used in the definition of a compound of formula (A) have
the meanings as disclosed in WO2010/029082 which publication is hereby incorporated into
the present application by reference in its entirety.

A preferred compound of the present invention is a compound which is specifically
described in WO2010/029082. A very preferred compound of the present invention is (S)-
Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-
pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) (Compound I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
The synthesis of (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-
trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) is described in WO2010/029082
as Example 15.

Pharmaceutical combinations of the present invention include at least one compound
which targets, decreases or inhibits the activity/function of serine/threonine mTOR kinase.
Such compounds will be referred to an "mTOR inhibitor" and includes, but is not limited to,
compounds, proteins or antibodies which target/ inhibit the activity/ function of members of
the mTOR kinase family, e.g., RAD rapamycin (sirolimus which is also known by the name
RAPAMUNE) and derivatives/analogues thereof such as everolimus (RAD001, Novartis) or
compounds that inhibit the kinase activity of mTOR by directly binding to the ATP-binding
clef of the enzyme. Everolimus (RAD001) is also known by the name CERTICAN or
AFINITOR.

Suitable mTOR inhibitors include e.g.:

I. Rapamycin which is an immunosuppressive lactam macrolide that is produced
by Streptomyces hygroscopicus.

Case 54628A

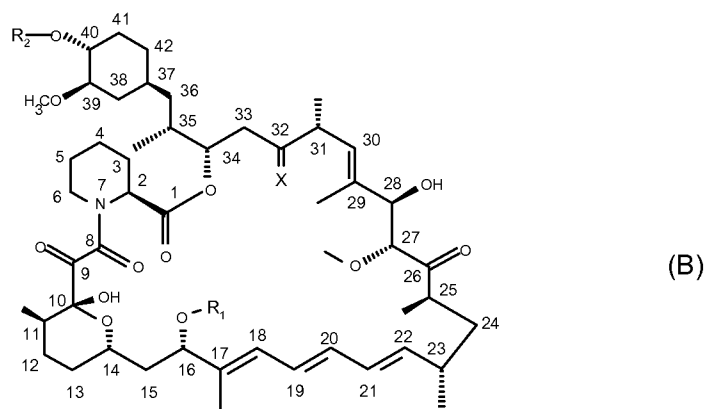
II. Rapamycin derivatives such as:

a. substituted rapamycin e.g. a 40-O-substituted rapamycin e.g. as described in US 5,258,389, WO 94/09010, WO 92/05179, US 5,118,677, US 5,118,678, US 5,100,883, US 5,151,413, US 5,120,842, WO 93/11130, WO 94/02136, WO 94/02485 and WO 95/14023 all of which are incorporated herein by reference;

b. a 16-O-substituted rapamycin e.g. as disclosed in WO 94/02136, WO 95/16691 and WO 96/41807, the contents of which are incorporated herein by reference;

c. a 32-hydrogenated rapamycin e.g. as described in WO 96/41807 and US 5 256 790, incorporated herein by reference.

d. Preferred rapamycin derivatives are compounds of formula (B)



wherein

R_1 is CH_3 or C_{3-6} alkynyl,

R_2 is H or $-CH_2-CH_2-OH$, 3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-methyl-propanoyl or tetrazolyl, and X is $=O$, (H,H) or (H,OH)

provided that R_2 is other than H when X is $=O$ and R_1 is CH_3 ,

or a prodrug thereof when R_2 is $-CH_2-CH_2-OH$, e.g. a physiologically hydrolysable ether thereof.

Compounds of formula (B) are disclosed e.g. in International PCT Applications WO94/09010, WO95/16691 or WO 96/41807, which are incorporated herein by reference.

Case 54628A

They may be prepared as disclosed or by analogy to the procedures described in these references.

Preferred compounds are 32-deoxorapamycin, 16-pent-2-ynyloxy-32-deoxorapamycin, 16-pent-2-ynyloxy-32(S)-dihydro-rapamycin, 16-pent-2-ynyloxy-32(S)-dihydro-40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin and, more preferably, 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin, disclosed as Example 8 in International PCT Application WO94/09010.

Particularly preferred rapamycin derivatives of formula (B) are 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin, 40-[3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-methylpropanoate]-rapamycin (also called CCI779), 40-epi-(tetrazolyl)-rapamycin (also called ABT578), 32-deoxorapamycin, 16-pent-2-ynyloxy-32(S)-dihydro rapamycin, or TAFA-93.

e. Rapamycin derivatives also include so-called rapalogs, e.g. as disclosed in International PCT Applications WO98/02441 and WO01/14387, e.g. AP23573, AP23464, or AP23841.

Rapamycin and derivatives thereof have, on the basis of observed activity, e.g. binding to macrophilin-12 (also known as FK-506 binding protein or FKBP-12), e.g. as described in International PCT Applications WO94/09010, WO95/16691 or WO96/41807, been found to be useful e.g. as immunosuppressant, e.g. in the treatment of acute allograft rejection.

III. Ascomycin, which is an ethyl analog of FK506.

IV. AZD08055 (AstraZeneca) and OSI-027 (OSI Pharmaceuticals), which are compounds that inhibit the kinase activity of mTOR by directly binding to the ATP-binding cleft of the enzyme.

V. SAR543, deferolimus (AP23573/ MK-8669, Ariad/ Merck & Co.), AP23841 (Ariad), KU-0063794 (AstraZeneca/ Kudos), INK-128 (Intellikine), EX2044, EX3855, EX7518, WYE-125132 (Wyeth), XL765 (Exelisis), NV-128 (Novogen), WYE-125132 (Wyeth), EM101/LY303511 (Emiliem).

A preferred mTOR inhibitor for the present invention is everolimus (RAD001). Everolimus (RAD001) has the chemical name ((1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,

Case 54628A

21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18- dihydroxy-12-((1R)-2-((1S,3R,4R)-4-(2-hydroxyethoxy)-3-methoxycyclohexyl)-1-methylethyl)-19,30-dimethoxy-15,17,21,23,29,35-hexamethyl-11,36-dioxo-4-aza-tricyclo[30.3.1.0^{4,9}] hexatriaconta-16,24, 26,28-tetraene-2,3,10,14,20-pentaone.) Everolimus and analogues are described in United States Patent No. 5,665,772, at column 1, line 39 to column 3, line 11.

The structure of the active agents identified by code nos., generic or trade names may be taken from the actual edition of the standard compendium "The Merck Index" or from databases, e.g., Patents International (e.g., IMS World Publications). The corresponding content thereof is hereby incorporated by reference.

Comprised are likewise the pharmaceutically acceptable salts thereof, the corresponding racemates, diastereoisomers, enantiomers, tautomers, as well as the corresponding crystal modifications of above disclosed compounds (i.e., compounds of formula (A) and mTOR inhibitors) where present, e.g. solvates, hydrates and polymorphs, which are disclosed therein. The compounds used as active ingredients in the combinations of the invention can be prepared and administered as described in the cited documents, respectively. Also within the scope of this invention is the combination of more than two separate active ingredients as set forth above, i.e., a pharmaceutical combination within the scope of this invention could include three active ingredients or more.

In one embodiment, the present invention provides a pharmaceutical combination comprising a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl]-amide) ("Compound I") specifically, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In one embodiment, the present invention provides invention provides a pharmaceutical combination comprising a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl]-amide) ("Compound I") specifically, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Case 54628A

The pharmaceutical combinations of the present invention are useful in treating or preventing an mTOR kinase dependent disease in a warm-blooded animal in need thereof. Thus, in one aspect, the present invention provides a pharmaceutical combination comprising a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") specifically, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in treating or preventing an mTOR kinase dependent disease.

The term "mTOR kinase dependent diseases" includes but is not restricted to the following symptoms:

- Organ or tissue transplant rejection, e.g. for the treatment of recipients of e.g. heart, lung, combined heart-lung, liver, kidney, pancreatic, skin or corneal transplants; graft-versus-host disease, such as following bone marrow transplantation;
- Restenosis
- Hamartoma syndromes, such as tuberous sclerosis or Cowden Disease
- Lymphangioleiomyomatosis
- Retinitis pigmentosa
- Autoimmune diseases including encephalomyelitis, insulin-dependent diabetes mellitus, lupus, dermatomyositis, arthritis and rheumatic diseases
- Steroid-resistant acute Lymphoblastic Leukaemia
- Fibrotic diseases including scleroderma, pulmonary fibrosis, renal fibrosis, cystic fibrosis
- Pulmonary hypertension
- Immunomodulation
- Multiple sclerosis
- VHL syndrome
- Carney complex
- Familial adenomatous polyposis
- Juvenile polyposis syndrome
- Birt-Hogg-Duke syndrome
- Familial hypertrophic cardiomyopathy
- Wolf-Parkinson-White syndrome
- Neurodegenerative disorders such as Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's and dementias caused by tau mutations, spinocerebellar ataxia type 3, motor neuron disease

Case 54628A

caused by SOD1 mutations, neuronal ceroid lipofuscinoses/Batten disease (pediatric neurodegeneration)

- wet and dry macular degeneration
- muscle wasting (atrophy, cachexia) and myopathies such as Danon's disease.
- bacterial and viral infections including M. tuberculosis, group A streptococcus, HSV type I, HIV infection
- Neurofibromatosis including Neurofibromatosis type 1,
- Peutz-Jeghers syndrome

Furthermore, "mTOR kinase dependent diseases" include proliferative diseases such as cancers and other related malignancies. A non-limiting list of the cancers associated with pathological mTOR signaling cascades includes breast cancer, renal cell carcinoma, gastric tumors, neuroendocrine tumors, lymphomas and prostate cancer.

Examples for a proliferative disease are for instance benign or malignant tumor, carcinoma of the brain, kidney, liver, adrenal gland, bladder, breast, stomach, gastric tumors, ovaries, colon, rectum, prostate, pancreas, lung, vagina or thyroid, sarcoma, glioblastomas, multiple myeloma or gastrointestinal cancer, especially colon carcinoma or colorectal adenoma or a tumor of the neck and head, an epidermal hyperproliferation, psoriasis, prostate hyperplasia, a neoplasia, a neoplasia of epithelial character, lymphomas, a mammary carcinoma or a leukemia.

In a further aspect, the present invention provides the use of a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl]-amide) (Compound I) specifically, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of an mTOR kinase dependent disease.

In another aspect the present invention provides a method of treating or preventing an mTOR kinase dependent disease by administering a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl]-amide) (Compound I) specifically, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Case 54628A

In another aspect the present invention provides a combination of a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) (Compound I) specifically, and at least one mTOR inhibitor selected from the group consisting of RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof such as everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511, wherein the active ingredients are present in each case in free form or in the form of a pharmaceutically acceptable salt, and optionally at least one pharmaceutically acceptable carrier, for simultaneous, separate or sequential use for the treatment of mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent diseases.

The present invention provides a method to reduce or block the phosphorylation and activation of AKT by mTOR inhibitors comprising administering a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof. In another embodiment, the present invention provides a method of treating a proliferative disease dependent on acquired phosphorylation and activation of AKT during treatment with at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

In another embodiment, the present invention relates to a method of treating a proliferative disease which has become resistant or has a decreased sensitivity to the treatment with at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof. The resistance is e.g. due to phosphorylation and activation of AKT.

In a further aspect the present invention provides a method for improving efficacy of the treatment of a proliferative disease with at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a combination comprising a compound of formula (A), or (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) (Compound I) specifically, or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

Case 54628A

The mTOR inhibitor used according to the present invention may be selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof such as everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511. Particularly preferred mTOR inhibitors in accordance with the present invention are sirolimus and/or everolimus.

The pharmaceutical compositions or combination in accordance with the present invention can be tested in clinical studies. Suitable clinical studies may be, for example, open label, dose escalation studies in patients with proliferative diseases. Such studies prove in particular the synergism of the active ingredients of the combination of the invention. The beneficial effects on proliferative diseases may be determined directly through the results of these studies which are known as such to a person skilled in the art. Such studies may be, in particular, suitable to compare the effects of a monotherapy using the active ingredients and a combination of the invention. Preferably, the dose of agent (a) is escalated until the Maximum Tolerated Dosage is reached, and agent (b) is administered with a fixed dose. Alternatively, the agent (a) may be administered in a fixed dose and the dose of agent (b) may be escalated. Each patient may receive doses of the agent (a) either daily or intermittent. The efficacy of the treatment may be determined in such studies, e.g., after 12, 18 or 24 weeks by evaluation of symptom scores every 6 weeks.

The administration of a pharmaceutical combination of the invention may result not only in a beneficial effect, e.g. a synergistic therapeutic effect, e.g. with regard to alleviating, delaying progression of or inhibiting the symptoms, but also in further surprising beneficial effects, e.g. fewer side-effects, an improved quality of life or a decreased morbidity, compared with a monotherapy applying only one of the pharmaceutically active ingredients used in the combination of the invention.

A further benefit may be that lower doses of the active ingredients of the combination of the invention may be used, for example, that the dosages need not only often be smaller but may also be applied less frequently, which may diminish the incidence or severity of side-effects. This is in accordance with the desires and requirements of the patients to be treated.

It is one objective of this invention to provide a pharmaceutical composition comprising a quantity, which is jointly therapeutically effective at targeting or preventing a

Case 54628A

mammalian target of rapamycin (mTOR) dependent disease in a warm-blooded animal thereof, of (a) the compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and (b) at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and optionally at least one pharmaceutically acceptable carrier. In this composition, the combination partners (a) and (b) can be administered together, one after the other or separately in one combined unit dosage form or in two separate unit dosage forms. The unit dosage form may also be a fixed combination.

In one aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising (a) a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and (b) at least one mTOR inhibitor or pharmaceutically acceptable salt thereof, and optionally at least one pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment, the pharmaceutical composition comprises a quantity of the compound of formula (A) and at least one mTOR inhibitor which is jointly therapeutically effective against a mammalian target of rapamycin (mTOR) dependent disease.

In another aspect, the present invention provides a pharmaceutical combination comprising (a) a compound of formula (A) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and (b) at least one mTOR inhibitor or pharmaceutically acceptable salt thereof, and optionally at least one pharmaceutically acceptable carrier, for simultaneous, separate or sequential use. Combination partners (a) and (b) may be administered together or separately to a warm-blooded animal in need thereof.

In accordance with the present invention, the pharmaceutical compositions for the separate administration of combination partner (a) and combination partner (b) or for the administration in a fixed combination, i.e. a single galenical composition comprising at least two combination partners (a) and (b) may be prepared in a manner known per se and are those suitable for enteral, such as oral or rectal, and parenteral administration to mammals (warm-blooded animals), including humans, comprising a therapeutically effective amount of at least one pharmacologically active combination partner alone, e.g. as indicated above, or in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents, especially suitable for enteral or parenteral application.

The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the compound is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as

Case 54628A

peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin.

Pharmaceutical preparations for the combination therapy for enteral or parenteral administration are, for example, those in unit dosage forms, such as sugar-coated tablets, tablets, capsules or suppositories, or ampoules. If not indicated otherwise, these are prepared in a manner known per se, for example by means of conventional mixing, granulating, sugar-coating, dissolving or lyophilizing processes. It will be appreciated that the unit content of a combination partner contained in an individual dose of each dosage form need not in itself constitute an effective amount since the necessary effective amount may be reached by administration of a plurality of dosage units.

Suitable pharmaceutical compositions may contain, for example, from about 0.1 % to about 99.9%, preferably from about 1 % to about 60 %, of the active ingredient(s). The actual amount of the compound of formula (A) and the mTOR inhibitor administered in accordance with the present invention will depend upon numerous factors such as the severity of the disease to be treated, the age and relative health of the subject, the potency of the compound used, the route and form of administration, and other factors. The drug can be administered more than once a day, preferably once or twice a day. All of these factors are within the skill of the attending clinician.

The compound of formula (A) may be administered in therapeutically effective amounts ranging from about 0.05 to about 50 mg per kilogram body weight of the recipient per day; preferably about 0.1-25 mg/kg/day, more preferably from about 0.5 to 10 mg/kg/day. Thus, for administration to a 70 kg person, the dosage range would most preferably be about 35-700 mg per day.

The mTOR inhibitor everolimus (RAD001) may be administered to a human in a daily dosage range of 0.5 to 1000 mg; preferably in the range of 0.5 mg to 15 mg; most preferably in the range of 0.5 mg to 10 mg.

In particular, a therapeutically effective amount of each of the combination partner of the combination of the invention may be administered simultaneously or sequentially and in any order, and the components may be administered separately or as a fixed combination.

Case 54628A

For example, the method of preventing or treating proliferative diseases according to the invention may comprise (i) administration of the first agent (a) in free or pharmaceutically acceptable salt form and (ii) administration of an agent (b) in free or pharmaceutically acceptable salt form, simultaneously or sequentially in any order, in jointly therapeutically effective amounts, preferably in synergistically effective amounts, e.g. in daily or intermittently dosages corresponding to the amounts described herein. The individual combination partners of the combination of the invention may be administered separately at different times during the course of therapy or concurrently in divided or single combination forms. Furthermore, the term administering also encompasses the use of a pro-drug of a combination partner that convert in vivo to the combination partner as such. The instant invention is therefore to be understood as embracing all such regimens of simultaneous or alternating treatment and the term "administering" is to be interpreted accordingly.

The effective dosage of each of the combination partners employed in the combination of the invention may vary depending on the particular compound or pharmaceutical composition employed, the mode of administration, the condition being treated, the severity of the condition being treated. Thus, the dosage regimen of the combination of the invention is selected in accordance with a variety of factors including the route of administration and the renal and hepatic function of the patient. A clinician or physician of ordinary skill can readily determine and prescribe the effective amount of the single active ingredients required to alleviate, counter or arrest the progress of the condition. Optimal precision in achieving concentration of the active ingredients within the range that yields efficacy without toxicity requires a regimen based on the kinetics of the active ingredients' availability to target sites.

The present invention further comprises the following embodiments:

- A synergistic combination for human administration comprising a compound of formula (A) which is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) and at least one mTOR inhibitor, in free form or in the form of a salt thereof, in a combination range which corresponds to a synergistic combination range of approximately 330 nM-3 μ M and approximately 1 nM - 27 nM respectively in the SKBR-3 breast cancer cell model or the BT-474 breast cancer cell model.

Case 54628A

- A synergistic combination for human administration comprising a compound of formula (A) which is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) and at least one mTOR inhibitor, in free form or in the form of a salt thereof, in a combination range which corresponds to a synergistic combination range of approximately 12 nM – 100 nM and approximately 1 nM - 27 nM respectively in the T47-D breast cancer cell model.
- A synergistic combination for human administration comprising a compound of formula (A) which is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) and at least one mTOR inhibitor, in free form or in the form of a salt thereof, in a combination range which corresponds to a synergistic combination range of approximately 3 μ M and approximately 1 nM - 27 nM respectively in the ZR-75-1 breast cancer cell model.

The following examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Example 1: Effect of the combination of Everolimus (RAD001) with Compound I in BT474 and MDA-MB-231 breast tumor cells detected by Western blot analysis.

Material and Methods

Preparation of compounds: The compound everolimus (RAD001) is synthesized by Novartis Pharma AG. A 20 mM stock solution is prepared in DMSO and stored -20 °C. A 10 mM stock solution of the (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") is prepared in DMSO and stored at -20 °C.

Cells and cell culture conditions: Human breast carcinoma BT474 cells (ATCC HTB-26) and MDA-MB-231 (ATCC HTB-20) are obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

BT474 cells are maintained in Hybri-Care medium (ATCC) supplemented with 10 % v/v fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. MDA-MB-231 cells are grown in RPMI 1640 medium (Amimed, Allschwil, Switzerland) supplemented with 10 % v/v fetal calf serum and 2 mM L-

Case 54628A

glutamine. All media are supplemented with 100 µg/mL penicillin/streptomycin and cells are maintained at 37°C in 5 % CO₂.

Cell treatment and cell extraction: BT474 and MDA-MB-231 cells are seeded at a density of 3.3×10^4 cells/cm² and 1.6×10^4 cells/cm², respectively, and incubated for 48 h at 37°C and 5 % CO₂, prior to treatment with DMSO vehicle, 20 nM RAD001 and/or various concentrations of Compound I for 24 h.

Cell lysates are prepared as follows. Culture plates are washed once with ice-cold PBS containing 1mM PMSF and once with ice-cold extraction buffer [50 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 25 mM β-glycerophosphate, 25 mM NaF, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 15 mM PPI, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium molybdate, leupeptin (10 µg/mL), aprotinin (10 µg/mL), 1 mM DTT and 1 mM PMSF]. Protease inhibitors are purchased from SIGMA Chemical, St. Louis, Mo. Cells are extracted in the same buffer, containing 1 % NP-40 (SIGMA Chemicals). The extracts are homogenized, cleared by centrifugation, aliquoted and frozen at -80°C. Protein concentration is determined with the BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

Immunoblotting: Twenty micrograms of cell extracts are resolved electrophoretically on 12% denaturing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and are transferred to polyvinylidene difluoride filters (PVDF; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) by wet-blotting (1 h at 250 mA) and are probed overnight at 4°C with the following primary antibodies:

- (a) anti-phospho-Akt (S₄₇₃) (clone 14-05; 1:2000) is obtained from DAKO (Glostrup, Denmark) and diluted in PBS, 0.5 % v/v Tween, 0.5% w/v milk.
- (b) anti-phospho-MAPK (T₂₀₂/Y₂₀₄) (clone ECA297; 1:50) is obtained from DAKO (Glostrup, Denmark) and diluted in PBS, 0.5 % v/v Tween, 0.5% w/v milk.
- (c) anti-phospho-MEK 1/2 (S₂₁₇/S₂₂₁) (cat # 9154; 1:1000) is obtained from Cell Signaling Technology and diluted in PBS, 0.1 % v/v Tween, 0.5% w/v milk.
- (d) anti-Actin (cat # MAB1501; 1:20,000) is obtained from Chemicon (Billerica, MA, USA) and diluted in PBS, 0.1 % v/v Tween.

After incubation with the appropriate primary antibody (as listed above), decorated proteins are revealed using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins followed by enhanced chemiluminescence (ECL Plus kit; Amersham

Case 54628A

Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) and are quantified using Quantity One Software (Bio-Rad, Munich, Germany).

Each cell extract is further quantified by Reverse protein Array methodology as described as follows.

Each cell extracts are spotted onto ZeptoMARK® PWG protein microarray chips (Zeptosens, Witterswil, Switzerland) with the piezoelectric microdispense-based, non-contact Nano-Plotter 2.1 (GeSiM, Grosserkmannsdorf, Germany). After spotting the ZeptoMARK® protein microarrays, the chips are incubated for 1 hour at 37°C. To receive a uniform blocking result, the CeLyA blocking buffer BB1 (Zeptosens, cat. No. 9040) is administered via an ultrasonic nebulizer. After 30 minutes of blocking the chips are extensively rinsed with deionized water (Milli-Q quality, 18MΩ x cm) and dried in a nitrogen air flow.

After the sample spotting and blocking procedure, the ZeptoMARK® chips are transferred to the ZeptoCARRIER (Zeptosens, cat. No. 1100), whose six flow cells individually address the six arrays on a chip, and are washed twice with 200 µl CAB1 CeLyA assay buffer (Zeptosens, cat. No. 9032). The assay buffer is then aspirated and each compartment is incubated with 100 µl of the primary target antibody (pAkt Ser473: CST#4060; pAkt Thr308: CST#2965, Akt1 pan: Epitomics # 1085-1) at RT over night. After incubation, the primary antibody is removed, the arrays are washed twice with CAB1 buffer and are further incubated with 100 µl of Alexa fluor 647-labeled anti rabbit IgG Fib fragments (Nitrogen; #Z25305) for one hour at RT in the dark. After incubation, the arrays were washed twice with 200 µl CAB1 buffer. The fluorescence of the target-bound Fib fragments is read out on the ZeptoReader (Zeptosens, Witterswil, Switzerland) using a laser (excitation wavelength 635nm) and a CCD camera. The fluorescence signal was assessed with exposure times of 1, 3, 5 and 10 seconds, depending on the intensity of the signal.

The fluorescence images for each array are analyzed with the ZeptoVIEW Pro 2.0 software (Zeptosens, Witterswil, Switzerland) and the RFI for each signal is calculated.

Antibodies and antibody dilutions used in this experiment:

Antigen	Provider	Ref	Dilution
pAkt Ser473	Cell Signaling Technology	4060	1/ 500
Akt 1 pan	Epitomics	1085-1	1/ 500
Zenon® Alexa Fluor 647 rabbit	Invitrogen	Z25305	1/ 500

Case 54628A

Results:

The phosphorylation levels of AKT(S473), MAPK (T202/Y204), MEK1/2 (S217/S221) and total actin levels in the presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in BT474 breast tumor cells determined by Western blot analysis are depicted in Figure 1.

The phosphorylation levels of AKT(S473), AKT (T308) and total AKT levels in the presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in BT474 breast tumor cells as quantified by Reverse protein Array are depicted in Figure 2 to 4 respectively.

The phosphorylation levels of AKT(S473), MAPK (T202/Y204) and total actin levels in the presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in MDA-MB231 breast tumor cells determined by Western blot analysis are depicted in Figure 5.

The phosphorylation levels of AKT(S473), AKT (T308) and total AKT levels in the presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified by Reverse protein Array are depicted in Figure 6 to 8 respectively.

The phosphorylation levels of AKT(S473) and total AKT levels in the presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in MDA-MB231 breast tumor cells determined by Western blot analysis and Quantified using the Quantity One Software as showed in Figure 9, in a second set of experiment.

The phosphorylation levels of AKT(S473), AKT (T308) and total AKT levels in the presence of everolimus (RAD001) and everolimus (RAD001) in combination with Compound I in MDA-MB231 breast tumor cells as quantified, in a second set of experiment, by Reverse protein Array are depicted in Figure 10 to 12 respectively.

Example 2: Effect of the combination of Everolimus (RAD001) with Compound I in SKBR-3 Human Breast Cancer Cell model

Case 54628A

Material and Methods

The human breast cancer cell line SKBR-3 is purchased from American Type Cell Collection. The SKBR-3 human breast cancer cell line is HER2 amplified. The SKBR-3 human breast cancer cell line is cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator in RPMI 1640 (ATCC #30-2001) or other suggested media complemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine and 1% sodium pyruvate.

Cell Proliferation Assay: Cell viability is determined by measuring cellular ATP content using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega #G7573) according to manufacturer's protocol. Briefly, 1500-50000 cells are plated on either 384 or 96 well plates in 25µl (384 well) or 100µl (96 well) growth media, cells are allowed to attach overnight and followed by 72 hrs of incubation with various concentration of drugs or drug combinations, at the end of the drug treatment, equal volume of the CellTiter-Glo reagent are added to each well to lyse the cell, and luminescence signals are recorded on a Envision plate reader.

Method for calculating the effect of the Combination: To evaluate the everolimus (RAD001) and (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") combination effect and to identify potential synergistic effect at all possible concentrations, the combination studies are conducted with a "dose matrix", where a combination is tested in all possible permutations of serially-diluted everolimus (RAD001) and Compound I single agent doses, in all combination assays, compounds are applied simultaneously. Single agent dose responding curves, IC₅₀, IC₉₀, and the Synergy are all analyzed using Chalice software (CombinatoRx, Cambridge MA). Synergy is calculated by comparing a combination's response to those of its single agents, against the drug-with-itself dose-additive reference model. Deviations from dose additivity can be assessed visually on an Isobologram or numerically with a Combination Index. Excess inhibition compare to additivity can also be plotted as a full dose-matrix chart to capture where the synergies occur. To quantify the overall strength of combination effects, a volume score $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{data} - I_{HSA})$ is also calculated between the data and the highest-single-agent surface, normalized for single agent dilution factors f_X, f_Y .

Results:

Case 54628A

The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The cells are plated at 3000 cells per well in 384 well plates in triplicates, and treated with compound for 72 hrs before the measurement (Figure 13). In this “dose matrix” study, everolimus (RAD001) is subjected to a 4 dose 3X serial dilution with the high dose at 27nM and the low dose at 1nM, and Compound I is subjected to a 7 dose 3X serial dilution with high dose at 3μM and low dose at about 4nM.

The results of this study are set forth in Figure 13. Compound I alone causes a concentration-dependent inhibition of cell growth with the A_{max} , the maximum fraction of inhibition = 0.40 (40% growth inhibition compare to DMSO control); everolimus (RAD001) displaces a similar level of minor growth inhibitory effect on cell proliferation as a single agent, never achieved an IC_{50} , and the A_{max} = 0.32. Concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment significantly boosts the maximum level of inhibition, with A_{max} = 0.63 compared to either single agents (everolimus (RAD001) A_{max} = 0.32, and Compound I A_{max} = 0.40). Over the entire dose matrix, enhanced synergistic activities are observed for everolimus (RAD001) at all doses (1nM-27nM) and part of the higher dose ranges for Compound I (330nM-3μM). At relatively low Compound I concentrations (4nM-37nM), the combination does not seem to exhibit additional benefit compared to Compound I and everolimus (RAD001) as single agent treatments in this experiment.

Example 3: Effect of the combination of Everolimus (RAD001) with Compound I in BT-474 breast tumor cells

Material and Methods

The human breast cancer cell line BT-474 is purchased from American Type Cell Collection. The BT-474 human breast cancer cell line includes both PIK3CA mutation and HER2 amplification. The BT-474 breast cancer cell line is cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator in RPMI 1640 (ATCC #30-2001) or other suggested media complemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine and 1% sodium pyruvate.

Cell Proliferation Assay: Cell viability is determined by measuring cellular ATP content using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega #G7573) according to manufacturer's protocol. Briefly, 1500-50000 cells are plated on either 384 or 96 well plates in 25μl (384 well) or 100μl (96 well) growth media, cells are allowed to attach overnight and

Case 54628A

followed by 72 hrs of incubation with various concentration of drugs or drug combinations, at the end of the drug treatment, equal volume of the CellTiter-Glo reagent are added to each well to lyse the cell, and luminescence signals are recorded on a Envision plate reader.

Method for calculating the effect of the Combination: To evaluate the everolimus (RAD001) and (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") combination effect and to identify potential synergistic effect at all possible concentrations, the combination studies are conducted with a "dose matrix", where a combination is tested in all possible permutations of serially-diluted everolimus (RAD001) and Compound I single agent doses, in all combination assays, compounds are applied simultaneously. Single agent dose responding curves, IC_{50} , IC_{90} , and the Synergy are all analyzed using Chalice software (CombinatoRx, Cambridge MA). Synergy is calculated by comparing a combination's response to those of its single agents, against the drug-with-itself dose-additive reference model. Deviations from dose additivity can be assessed visually on an Isobologram or numerically with a Combination Index. Excess inhibition compare to additivity can also be plotted as a full dose-matrix chart to capture where the synergies occur. To quantify the overall strength of combination effects, a volume score $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{data} - I_{HSA})$ is also calculated between the data and the highest-single-agent surface, normalized for single agent dilution factors f_X, f_Y .

Results:

The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The experiment setup is identical to the experiment procedure described above for the SKBR-3 model (Figure 14). And the same "dose matrix" (everolimus (RAD001): 4 dose, 3X, 1nM to 27nM, Compound I: 7 dose, 3X, 4nM to 3μM) is applied.

The results of this study are set forth in Figure 14. Compound I alone causes a concentration-dependent inhibition of cell growth with the IC_{50} around 3μM and A_{max} around 0.53 (53% growth inhibition compare to DMSO control); everolimus (RAD001) displaces a minor growth inhibitory effect on cell proliferation as a single agent, never achieves an IC_{50} , and $A_{max} = 0.36$. Concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment significantly boosts the maximum level of inhibition, with $A_{max} = 0.66$ compared to either single agents (everolimus (RAD001) $A_{max} = 0.36$, and Compound I $A_{max} = 0.53$). Over the entire dose matrix,

Case 54628A

enhanced synergistic activities are observed for everolimus (RAD001) at all doses (1nM-27nM) and the high dose Compound I (330nM-3 μ M). At lower Compound I concentrations (4nM-37nM), the combination does not seem to exhibit additional benefit compared to Compound I and everolimus (RAD001) as single agent treatments in this experiment.

Example 4: Effect of the combination of Everolimus (RAD001) with Compound I in T47-D Human Breast Cancer Cell Model

Material and Methods

The human breast cancer cell line T47-D is purchased from American Type Cell Collection. The T47-D human breast cancer cell line includes PIK3CA mutation. The T47-D human breast cancer cell line is cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator in RPMI 1640 (ATCC #30-2001) or other suggested media complemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine and 1% sodium pyruvate.

Cell Proliferation Assay: Cell viability is determined by measuring cellular ATP content using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega #G7573) according to manufacturer's protocol. Briefly, 1500-50000 cells are plated on either 384 or 96 well plates in 25 μ l (384 well) or 100 μ l (96 well) growth media, cells are allowed to attach overnight and followed by 72 hrs of incubation with various concentration of drugs or drug combinations, at the end of the drug treatment, equal volume of the CellTiter-Glo reagent are added to each well to lyse the cell, and luminescence signals are recorded on a Envision plate reader.

Method for calculating the effect of the Combination: To evaluate the everolimus (RAD001) and (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") combination effect and to identify potential synergistic effect at all possible concentrations, the combination studies are conducted with a "dose matrix", where a combination is tested in all possible permutations of serially-diluted everolimus (RAD001) and Compound I single agent doses, in all combination assays, compounds are applied simultaneously. Single agent dose responding curves, IC₅₀, IC₉₀, and the Synergy are all analyzed using Chalice software (CombinatoRx, Cambridge MA). Synergy is calculated by comparing a combination's response to those of its single agents, against the drug-with-itself dose-additive reference model. Deviations from dose additivity can be assessed visually on an Isobologram or numerically with a Combination

Case 54628A

Index. Excess inhibition compare to additivity can also be plotted as a full dose-matrix chart to capture where the synergies occur. To quantify the overall strength of combination effects, a volume score $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{data} - I_{HSA})$ is also calculated between the data and the highest-single-agent surface, normalized for single agent dilution factors f_X, f_Y .

Results:

The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The experiment setup is identical to the experiment procedure described above for the SKBR-3 model (Figure 15). And the same “dose matrix” (everolimus (RAD001): 4 dose, 3X, 1nM to 27nM, Compound I: 7 dose, 3X, 4nM to 3μM) is applied.

The results of this study are set forth in Figure 15. Compound I alone causes a significant concentration-dependent inhibition of cell growth with the IC_{50} around 330nM and A_{max} around 0.67 (67% growth inhibition compare to DMSO control); everolimus (RAD001) displaces a minor growth inhibitory effect on cell proliferation as a single agent, never achieved an IC_{50} , and $A_{max} = 0.37$. Concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment does not boost the maximum level of inhibition, with $A_{max} = 0.68$, comparable to the single agent Compound I treatment ($A_{max} = 0.67$). Over the entire dose matrix, slightly enhanced and weakly synergistic activities are observed for everolimus (RAD001) at all doses (1nM-27nM) and the relatively dose Compound I (12nM-100nM). At both high and low end of Compound I concentrations (4nM, 330nM-3μM), the combination does not seem to exhibit additional benefit compare to Compound I and everolimus (RAD001) as single agent treatments in this experiment.

Example 5: Effect of the combination of Everolimus (RAD001) with Compound I in ZR-75-1 Human Breast Cancer Cell Model

Material and Methods

The human breast cancer cell line ZR-75-1 is purchased from American Type Cell Collection. The ZR-75-1 human breast cancer cell line includes PTEN mutation. The ZR-75-1 human breast cancer cell line is cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator in RPMI 1640

Case 54628A

(ATCC #30-2001) or other suggested media complemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine and 1% sodium pyruvate.

Cell Proliferation Assay: Cell viability is determined by measuring cellular ATP content using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega #G7573) according to manufacturer's protocol. Briefly, 1500-50000 cells are plated on either 384 or 96 well plates in 25µl (384 well) or 100µl (96 well) growth media, cells are allowed to attach overnight and followed by 72 hrs of incubation with various concentration of drugs or drug combinations, at the end of the drug treatment, equal volume of the CellTiter-Glo reagent are added to each well to lyse the cell, and luminescence signals are recorded on a Envision plate reader.

Method for calculating the effect of the Combination: To evaluate the everolimus (RAD001) and (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) ("Compound I") combination effect and to identify potential synergistic effect at all possible concentrations, the combination studies are conducted with a "dose matrix", where a combination is tested in all possible permutations of serially-diluted everolimus (RAD001) and Compound I single agent doses, in all combination assays, compounds are applied simultaneously. Single agent dose responding curves, IC_{50} , IC_{90} , and the Synergy are all analyzed using Chalice software (CombinatoRx, Cambridge MA). Synergy is calculated by comparing a combination's response to those of its single agents, against the drug-with-itself dose-additive reference model. Deviations from dose additivity can be assessed visually on an Isobologram or numerically with a Combination Index. Excess inhibition compare to additivity can also be plotted as a full dose-matrix chart to capture where the synergies occur. To quantify the overall strength of combination effects, a volume score $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{data} - I_{HSA})$ is also calculated between the data and the highest-single-agent surface, normalized for single agent dilution factors f_X, f_Y .

Results:

The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The effect of single agent and concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment on cell proliferation is evaluated using the cell titer glow (CTG) assay described above. The experiment setup is identical to the experiment procedure described above for

Case 54628A

the SKBR-3 model (Figure 16). And the same “dose matrix” (everolimus (RAD001): 4 dose, 3X, 1nM to 27nM, Compound I: 7 dose, 3X, 4nM to 3 μ M) is applied.

The results of this study are set forth in Figure 16. Compound I alone does not caused significant inhibition on cell growth with $A_{\max}$ around 0.16 (16% growth inhibition compare to DMSO control); everolimus (RAD001) displaces better growth inhibitory effect on cell proliferation as a single agent, with IC_{50} around 15nM and $A_{\max} = 0.55$. Concomitant everolimus (RAD001)/Compound I treatment significantly boosts the maximum level of inhibition, with $A_{\max} = 0.67$ compare to either single agents (everolimus (RAD001) $A_{\max} = 0.55$, and Compound I $A_{\max} = 0.16$). However, over the entire dose matrix, significant and weakly synergistic effect boost is observed at the highest dose of Compound 1 (3 μ M). At lower dose range of Compound I (4nM-1 μ M), the combination does not seem to exhibit additional benefit compared to Compound I and everolimus (RAD001) as single agent treatments in this experiment.

Example 6: Effect of the combination of Everolimus (RAD001) with Compound I in DU145 Human Prostate Carcinoma Nude Mouse Xenograft Model

Methods and Materials:

8 weeks old, male nude mice (nu/nu, Harlan) having a body weight (BW) range of 21.0 – 31.3 g on Day 1 of the study are used. The animals are fed ad libitum water (reverse osmosis, 1 ppm Cl) and NIH 31 Modified and Irradiated lab Diet(R) consisting of 18.0% crude protein, 5.0% crude fat, and 5.0% crude fiber. The mice are housed on irradiated Enrich-o’cobs(TM) Laboratory Animal Bedding in static microisolators on a 12-hour light cycle at 21-22°C and 40-60% humidity.

The DU145 human prostate carcinoma cell line is obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The DU145 cell line is maintained as exponentially growing cultures in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ mL penicillin G sodium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 2 μ g/mL gentamicin, 10 mM HEPES, and 0.075% sodium bicarbonate. The tumor cells are cultured in tissue culture flasks in a humidified incubator at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

DU145 prostate carcinoma cells are harvested during exponential growth and resuspended at a concentration of 5×10^7 cells/ mL in cold PBS with 50% Matrigel™ (BD Biosciences). Each nude mouse is inoculated subcutaneously in the right flank with 0.2 mL

Case 54628A

of the suspension (1×10^7 cells). The tumors are calipered in two dimensions to monitor growth as their mean volume approached the desired 100-150 mm³ range. Tumor size, in mm³, is calculated from: Tumor Volume = (width² x length)/ 2. Tumor weight can be estimated with the assumption that 1 mg is equivalent to 1 mm³ of tumor volume. Seven days after tumor implantation, on Day 1 of the study, mice with individual tumor sizes of 144-196 mm³ are sorted into 11 groups of ten mice, with a group mean tumor volume of 181-184 mm³.

(S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl]-amide) ("Compound I") is stirred in N-methylpyrrolidone (NMP; 10% of final volume) at room temperature until dissolved. Polyethylene glycol 300 (PEG300) is added (30% of final volume), followed by Solutol[®] HSS15 (20% of final volume), and the mixture is stirred until homogenous. The final volume is achieved by addition of deionized water (40% of final volume). The Compound I vehicle, NMP: PEG300: Solutol[®] HS15: deionized water (10:30:20:60), is designated as "Vehicle 1". Solutions for the lower doses are prepared by dilution of the high-dose solution with Vehicle 1. Fresh dosing solutions are prepared weekly and stored at 4°C, protected from light.

Everolimus (RAD001) is formulated in a microemulsion that contained 2% (w/w) active ingredient, i.e. 20 mg RAD001/ g; the density of the microemulsion is 0.995 g/ cm³. The RAD001 microemulsion is aliquotted and initially stored at -20°C. An aliquot of the stock is thawed, divided into weighed daily portions, and stored at 4°C. On each treatment day, a RAD001 aliquot is brought to room temperature and diluted with dextrose in water (D5W) to provide a 1 mg/mL solution for the highest dose. This stock is diluted with D5W to prepare solutions for the lower doses. The placebo microemulsion, diluted with D5W, is designated as "Vehicle 2".

Treatment Plan:

Compound I, RAD001, and their vehicles are each administered by oral gavage (p.o.) once daily for twenty-one consecutive days (qd x 21). For combination therapies on Days 1-20, RAD001 is dosed within 30 minutes after Compound I. On Day 21 and on Day 7 in Group 10, RAD001 followed by Compound I immediately, on a cage by cage basis. Paclitaxel is administered via bolus tail vein injections (i.v.) once daily on alternate days for five doses (qod x 5). The dosing volume, 10 mL/ kg (0.2 mL/ 20 g mouse), is scaled to the

Case 54628A

weight to each animal as determined on the day of dosing, except on weekends, when the Friday BWs are carried forward.

11 groups of nude mice (n = 10 per group) are treated as follows: Group 1 mice receives Vehicle 1 and Vehicle 2, and served as controls for all analyses. Groups 2-4 receives monotherapies with 12.5, 25, and 50 mg/kg Compound I, respectively. Groups 5-7 receives monotherapies with 2.5, 5, and 10 mg/kg RAD001, respectively. Group 8 receives 12.5 mg/kg Compound I in combination with 10 mg/kg RAD001. Group 9 receives 25 mg/kg Compound I in combination with 5 mg/kg RAD001. Group 10 receives 50 mg/kg Compound I in combination with 2.5 mg/kg RAD001; because of toxicity, this treatment is stopped after seven doses of each agent (qd x 7). Group 11 receives 25 mg/kg paclitaxel.

Tumor growth inhibition:

Treat efficacy is determined on Day 21. For the purpose of statistical and graphical analyses, ΔTV , the difference in tumor volume between Day 1 (the start of dosing) and the endpoint day, is determined for each animal that survives to Day 21. For each treatment group, the response on the endpoint day is calculated by the following relation:

$$T/C(\%) = 100 \times \Delta T / \Delta C, \text{ for } \Delta T > 0$$

where, ΔT = (mean tumor volume of the treated group on the endpoint day) – (mean tumor volume of the treated group on Day 1), and ΔC = (mean tumor volume of the control group on the endpoint day) – (mean tumor volume of the control group on Day 1). A treatment that achieves a T/C value of 40% or less may be classified as potentially therapeutically active.

Criteria for Regression Responses:

Treat efficacy may also be determined from the number of regression responses. Treatment may cause a partial regression (PR) or a complete regression (CR) of the tumor in an animal. A PR indicates that the tumor volume is 50% or less of its Day 1 volume for three consecutive measurements during the course of the study, and equal to or greater than 13.5 mm³ for one or more of these three measurements. A CR indicates that the tumor volume is less than 13.5 mm³ for three consecutive measurements during the course of the study.

Toxicity:

Case 54628A

Animals are weighed on Days 1-5, and on each treatment day (except weekend days) until the end of the study. Acceptable toxicity for the maximum tolerated dose is defined as a group mean BW loss of less than 15% during the test, and not more than one treatment-related (TR) death among ten animals. Any animal with BW losses exceeding 20% for one measurement, is to be euthanized and classified as a TR death, unless it is the first death in the group. Non-treatment-related (NTR) deaths are to be categorized as NTRa (due to accident or error), NTRu (due to unknown causes), or NTRm (necropsy-confirmed tumor dissemination by invasion and/or metastasis). To conserve animals while providing maximum information the first death in a group is to be classified as NTRu, but the death is to be reclassified as TR if subsequent group performance shows that the treatment is toxic.

Sampling:

On Day 7, Animals #1-4 in Group 10 are euthanized 2 hours post-dosing by terminal cardiac puncture under CO₂ anesthesia. On Day 8, at 24 hours post-dosing, Animal #5 is sampled likewise. Full volume blood is collected from each animal and individually processed for plasma with K-EDTA as anticoagulant. The plasma samples are frozen at -80°C. Tumors are excised and snap frozen in liquid N₂. At 2 and 24 hours post-final dosing on Day 21, four animals per time point in Groups 1, 4, 6 and 9 are sampled for blood and tumors as previously described.

In the raw data, Group 4 Animals #2, 6 and 7 exit the study as TR deaths; and Group 9 Animals #4 and 10 exit as TR and NTR, respectively. These animals actually survive to Day 21 and are sampled.

Statistical and Graphical Analyses:

Statistical and graphical analyses are performed with Prism 3.03 (Graph Pad) for Windows. The significance of differences between the mean Δ TV values for treated versus control groups of mice is determined by analysis of variance (ANOVA), with Bartlett's test, and a post-hoc Dunnett's multiple comparison test. When Bartlett's test indicated significant differences among the variances ($P < 0.0001$), the results are analyzed with the nonparametric Kruskal-Wallis test, which shows significant differences among the median volume changes ($P < 0.0001$). Differences between groups are analyzed post-hoc with Dunn's multiple comparison test. The Mann-Whitney U test is employed to compare median volume changes in two groups. The two-tailed statistical analyses are conducted at $P =$

Case 54628A

0.05. Prism summarizes test results as not significant (ns) at $P > 0.05$, significant (symbolized by **) at $0.01 < P \leq 0.05$, very significant (symbolized by ***) at $0.001 < P \leq 0.01$, and extremely significant (symbolized by ****) at $P \leq 0.001$. Because tests of statistical significance do not provide an estimate of the magnitude of the difference between groups, all levels of significance are described as either significant or not significant.

A scatter plot is constructed to show ΔTV values for individual animals, by group. Group mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), or median tumor volumes are plotted as linear functions of time. Group mean BW changes over the course of the study are plotted as percent change, $\pm$ SEM, from Day 1. Tumor growth curves are truncated when TR death exceeded 10%.

Results:

The following data are obtained from the study:

Group	n	Treatment	Mean volume Change, mm ³	Statistical Signif. (vs. G1, G2, G3, G6, or G7)	Mean BW Nadir	Deaths (TR/ NTR)
1	10	Vehicle 1, Vehicle 2	784 (T/C = --)	--	--	0/0
2	10	Compound I (12.5 mg/kg)	501 (T/C = 64%)	ns (vs. G1) -- (others)	--	0/0
3	10	Compound I (25 mg/kg)	129 (T/C = 16%)	*** (vs. G1) -- (others)	--	0/0
4	7	Compound I (50 mg/kg)	150 (T/C = 19%)	ne (vs. G1) – (others)	- 8.1% Day 8	3/0
5	10	RAD001 (2.5 mg/kg)	424 (T/C = 54%)	ns (vs. G1) -- (others)	--	0/0
6	10	RAD001 (5 mg/kg)	269 (T/C = 43%)	* (vs. G1) -- (others)	--	0/0
7	10	RAD001 (10 mg/kg)	341 (T/C = 43%)	ns (vs. G1) -- (others)	--	0/0
8	8	Compound I (12/ mg/kg), RAD001 (10 mg/kg)	226 (T/C = 29%)	* (vs. G1) ns (vs. G2, vs. G7) -- (others)	-4.9% Day 15	1/1
9	8	Compound I (25 mg/kg), RAD001 (10 mg/kg)	115 (T/C = 15%)	*** (vs. G1) ns (vs. G3, vs. G6) -- (others)	- 11.6% Day 21	1/1
10	0	Compound I (50 mg/kg), RAD001 2.5 mg/kg)	--	ne (vs. G1) -- (others)	-19.4% Day 5	5/0 (5 ES)

Case 54628A

11	9	Paclitaxel	898 (T/C = 115%)	ns (using Mann-Witney U test) (vs. G1) -- (others)	-1.9% Day 12	0/1
----	---	------------	---------------------	--	-----------------	-----

Study Endpoint = 1000 mm³; Days in Progress = 21.

n = number of animals in a group not dead from treatment-related, accidental, or unknown causes, or euthanized for sampling

Mean Volume Change = group mean volume change between Day 1 and Day 21

T/C = $100 \times (\Delta T / \Delta C)$ = percent change between Day 1 and Day 21 in the mean tumor volume of a treated group (ΔT) compared with change in control group 1 (ΔC)

Statistical Significance (Kruskal-Wallis with post-hoc Dunn's multiple comparison test): ne = not evaluable, ns = not significant, * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$, compared to indicated group.

Mean BW Nadir = lowest group mean body weight, as % change from Day 1 up to Day 21; -- indicates no decrease in mean body weight is observed.

ES = Euthanized for sampling.

In this study, a broad range of ΔTV values for Vehicle-treated Group 1 mice results in up to 9.9-fold differences between individual animals. Significant activities are still observed with all treatments producing T/C values below the 40% threshold that denotes potential therapeutic activity.

Compound I/ RAD001 combinations at the 12.5: 10 and 25:5 mg/kg dose ratios (Groups 8 and 9) result in 29% and 15% T/C, and statistically significant activities ($P < 0.05$ and $P < 0.001$) respectively. Combination therapy at the 12.5:10 mg/kg ratio (Group 8) improves upon the Compound I and RAD001 monotherapies in Groups 2 and 7 respectively; however, the ΔTV values for Group 8 lay within the ranges of the values for Groups 2 and 7, and statistically significant improvement over the monotherapy is not observed.

Combination therapy at the 25:5 mg/kg ratio (Group 9) results in 15% T/C, and thus slightly improves upon the Compound I monotherapy in Group 3 (16% T/C). Combination of Compound I/ RAD001 at the 50:2.5 mg/kg dose ratio results in 19.4% group mean BW loss

Case 54628A

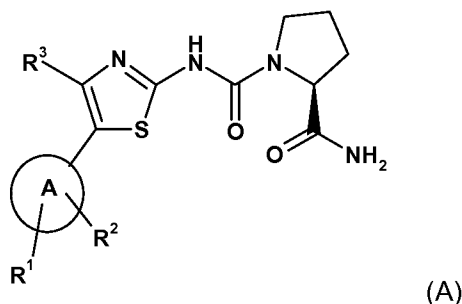
on Day 5; and 50% mortality by Day 7 when the treatment is stopped.

Case 54628A

Claims:

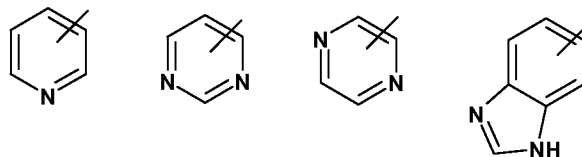
1. A pharmaceutical combination comprising

a) a compound of formula (A)



or a salt thereof, wherein

A represents a heteroaryl selected from the group consisting of:



R^1 represents one of the following substituents: (1) unsubstituted or substituted, preferably substituted C_1 - C_7 -alkyl, wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to nine of the following moieties: deuterium, fluoro, or one to two of the following moieties C_3 - C_5 -cycloalkyl; (2) optionally substituted C_3 - C_5 -cycloalkyl wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to four of the following moieties: deuterium, C_1 - C_4 -alkyl (preferably methyl), fluoro, cyano, aminocarbonyl; (3) optionally substituted phenyl wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to two of the following moieties: deuterium, halo, cyano, C_1 - C_7 -alkyl, C_1 - C_7 -alkylamino, di(C_1 - C_7 -alkyl)amino, C_1 - C_7 -alkylaminocarbonyl, di(C_1 - C_7 -alkyl)aminocarbonyl, C_1 - C_7 -alkoxy; (4) optionally mono- or di- substituted amine; wherein said substituents are independently selected from the following moieties: deuterium, C_1 - C_7 -alkyl (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, fluoro, chloro, hydroxy), phenylsulfonyl (which is

Case 54628A

unsubstituted or substituted by one or more, preferably one, C₁-C₇-alkyl, C₁-C₇-alkoxy, di(C₁-C₇-alkyl)amino-C₁-C₇-alkoxy); (5) substituted sulfonyl; wherein said substituent is selected from the following moieties: C₁-C₇-alkyl (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, fluoro), pyrrolidino, (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, hydroxy, oxo; particularly one oxo); (6) fluoro, chloro;

R² represents hydrogen;

R³ represents (1) hydrogen, (2) fluoro, chloro, (3) optionally substituted methyl, wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to three of the following moieties: deuterium, fluoro, chloro, dimethylamino;

with the exception of (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({5-[2-(tert-butyl)-pyrimidin-4-yl]-4-methyl-thiazol-2-yl}-amide)

and

b) at least one mTOR inhibitor.

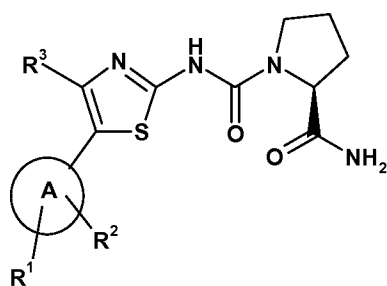
2. The pharmaceutical combination according to claim 1 wherein the compound of formula (A) is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide).

3. A pharmaceutical combination according to claims 1 or 2 wherein the mTOR inhibitor is selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof such as everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511

4. A pharmaceutical combination according to claim 1 or 2 for use in treating or preventing a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent disease.

Case 54628A

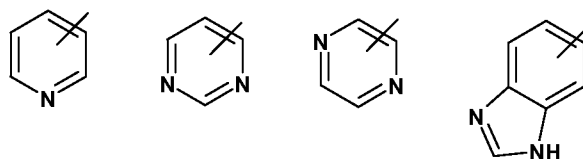
5. A pharmaceutical composition comprising a compound of formula (A) according to claim 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
6. Use of a compound of formula (A)



(A)

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein

A represents a heteroaryl selected from the group consisting of:



R¹ represents one of the following substituents: (1) unsubstituted or substituted, preferably substituted C₁-C₇-alkyl, wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to nine of the following moieties: deuterium, fluoro, or one to two of the following moieties C₃-C₅-cycloalkyl; (2) optionally substituted C₃-C₅-cycloalkyl wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to four of the following moieties: deuterium, C₁-C₄-alkyl (preferably methyl), fluoro, cyano, aminocarbonyl; (3) optionally substituted phenyl wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to two of the following moieties: deuterium, halo, cyano, C₁-C₇-alkyl, C₁-C₇-alkylamino, di(C₁-C₇-alkyl)amino, C₁-C₇-alkylaminocarbonyl, di(C₁-C₇-alkyl)aminocarbonyl, C₁-C₇-alkoxy; (4) optionally mono- or di- substituted amine; wherein said substituents are independently selected from the following moieties: deuterium, C₁-C₇-alkyl (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from

Case 54628A

the group of deuterium, fluoro, chloro, hydroxy), phenylsulfonyl (which is unsubstituted or substituted by one or more, preferably one, C₁-C₇-alkyl, C₁-C₇-alkoxy, di(C₁-C₇-alkyl)amino-C₁-C₇-alkoxy); (5) substituted sulfonyl; wherein said substituent is selected from the following moieties: C₁-C₇-alkyl (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, fluoro), pyrrolidino, (which is unsubstituted or substituted by one or more substituents selected from the group of deuterium, hydroxy, oxo; particularly one oxo); (6) fluoro, chloro;

R² represents hydrogen;

R³ represents (1) hydrogen, (2) fluoro, chloro, (3) optionally substituted methyl, wherein said substituents are independently selected from one or more, preferably one to three of the following moieties: deuterium, fluoro, chloro, dimethylamino;

with the exception of (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({5-[2-(tert-butyl)-pyrimidin-4-yl]-4-methyl-thiazol-2-yl}-amide); and

at least one mTOR inhibitor for the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent disease.

7. Use according to claim 6 wherein the compound of formula (A) is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide).

8. Use according to claims 6 or 7 wherein the mTOR inhibitor is selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogs thereof such as everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511.

9. Use according to claims 6 or 7 wherein the disease to be treated is a benign or malignant tumor; carcinoma of the brain, kidney, liver, adrenal gland, bladder, breast, renal cell carcinoma, neuroendocrine tumors, prostate, stomach, gastric tumors, ovaries, colon, rectum, prostate, pancreas, lung, vagina or thyroid, sarcoma, glioblastomas, multiple myeloma or gastrointestinal cancer, especially colon carcinoma or colorectal adenoma or a

Case 54628A

tumor of the neck and head, an epidermal hyperproliferation, psoriasis, prostate hyperplasia, a neoplasia, a neoplasia of epithelial character, lymphomas, a mammary carcinoma or a leukemia; organ or tissue transplant rejection; restenosis; tuberous sclerosis; Cowden Disease; lymphangioleiomyomatosis; retinitis pigmentosa; an autoimmune diseases; steroid-resistant acute Lymphoblastic Leukaemia; a fibrotic diseases; pulmonary hypertension; Immunomodulation; multiple sclerosis; VHL syndrome; Carney complex; familial adenomatous polyposis; juvenile polyposis syndrome; Birt-Hogg-Duke syndrome; familial hypertrophic cardiomyopathy; Wolf-Parkinson-White syndrome; a Neurodegenerative disorder; wet and dry macular degeneration; muscle wasting (atrophy, cachexia) or a myopathies; a bacterial or viral infection; Neurofibromatosis or Peutz-Jeghers syndrome.

9. A pharmaceutical combination according to claim 1 or 2 for use in treating or preventing a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent disease.

10. A method of treating or preventing a target of rapamycin (mTOR) kinase dependent diseases by administering a compound of formula (A) according to claim 1 or 2 or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

11. A method of treating a proliferative disease dependent on acquired phosphorylation and activation of AKT in the treatment with at least one mTOR inhibitor comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of formula (A) according to claim 1 or 2 or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

12. The method according to claim 11, wherein the disease to be treated is a benign or malignant tumor; carcinoma of the brain, kidney, liver, adrenal gland, bladder, breast, renal cell carcinoma, neuroendocrine tumors, prostate, stomach, gastric tumors, ovaries, colon, rectum, prostate, pancreas, lung, vagina or thyroid, sarcoma, glioblastomas, multiple myeloma or gastrointestinal cancer, especially colon carcinoma or colorectal adenoma or a tumor of the neck and head, an epidermal hyperproliferation, psoriasis, prostate hyperplasia, a neoplasia, a neoplasia of epithelial character, lymphomas, a mammary carcinoma or a leukemia; organ or tissue transplant rejection; restenosis; tuberous sclerosis; Cowden Disease; lymphangioleiomyomatosis; retinitis pigmentosa; an autoimmune diseases; steroid-resistant acute Lymphoblastic Leukaemia; a fibrotic diseases; pulmonary hypertension; Immunomodulation; multiple sclerosis; VHL syndrome; Carney complex; familial

Case 54628A

adenomatous polyposis; juvenile polyposis syndrome; Birt-Hogg-Duke syndrome; familial hypertrophic cardiomyopathy; Wolf-Parkinson-White syndrome; a Neurodegenerative disorder; wet and dry macular degeneration; muscle wasting (atrophy, cachexia) or a myopathies; a bacterial or viral infection; Neurofibromatosis or Peutz-Jeghers syndrome.

13. A method of treating a proliferative disease which has become resistant or has a decreased sensitivity to the treatment with at least one mTOR inhibitor comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of formula (A) a compound of formula (A) according to claim 1 or 2 or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

14. A method for improving efficacy of the treatment of a target of a proliferative disease with at least one mTOR inhibitor comprising administering a combination comprising a compound of formula (A) according to claim 1 or 2 and at least one mTOR inhibitor to a warm-blooded animal in need thereof.

FIG. 1

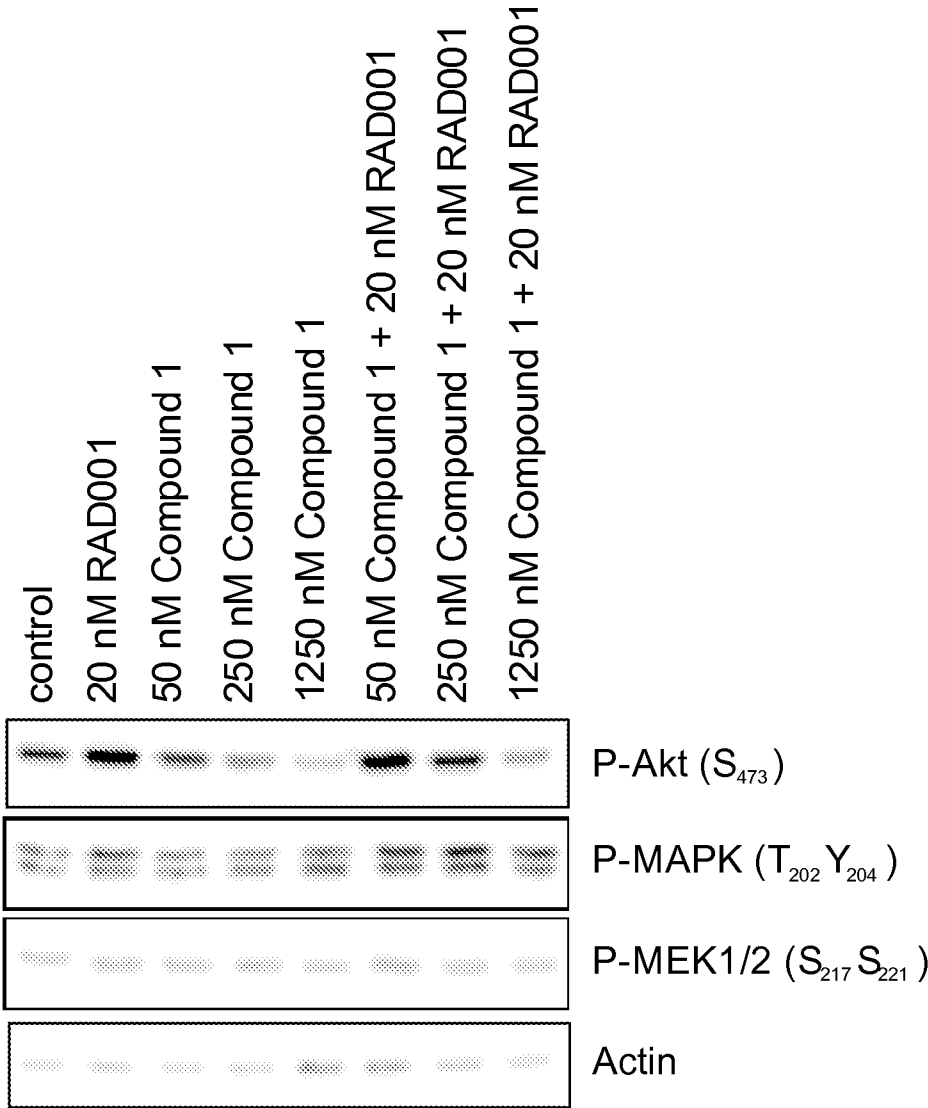


FIG. 2

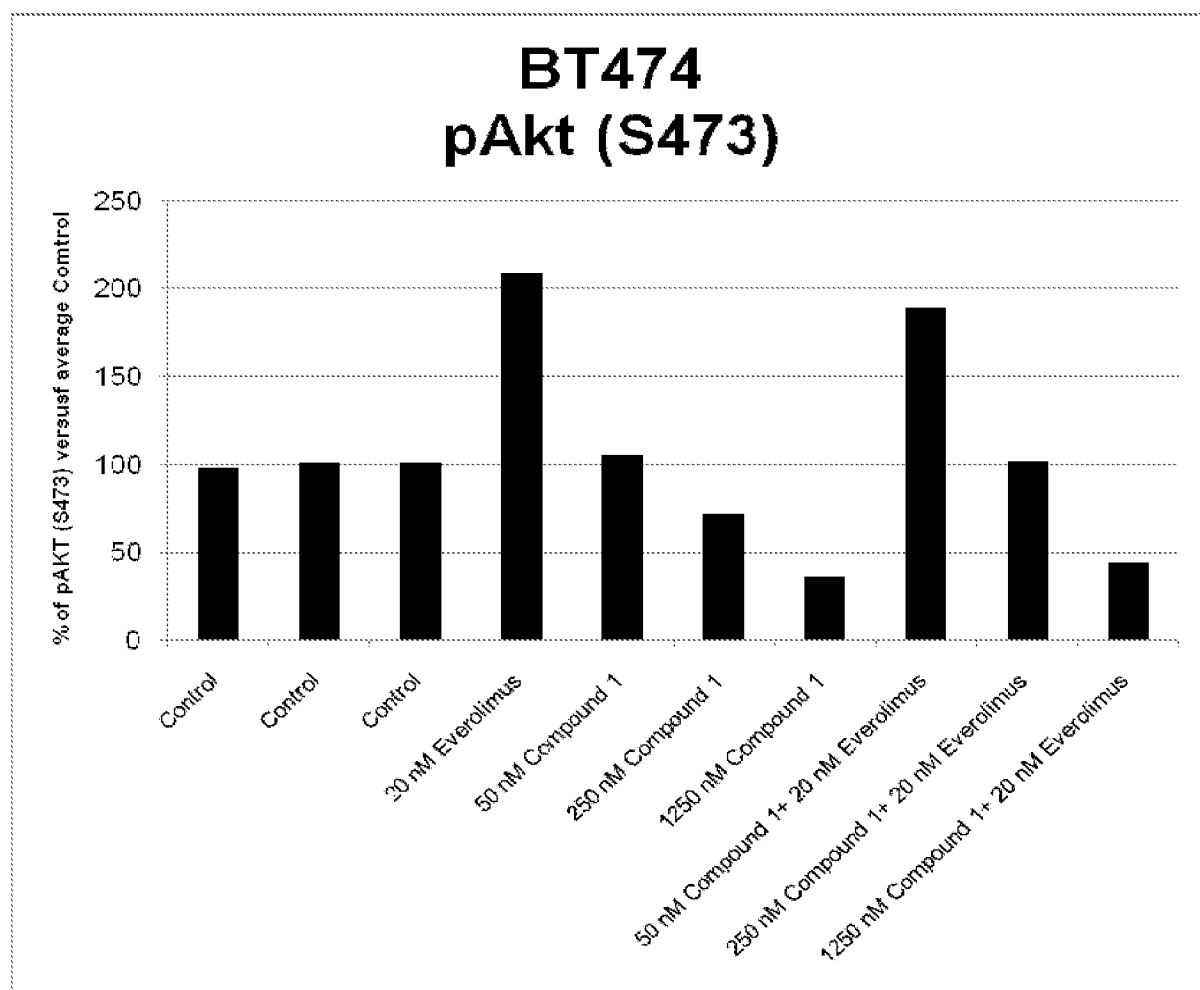


FIG. 3

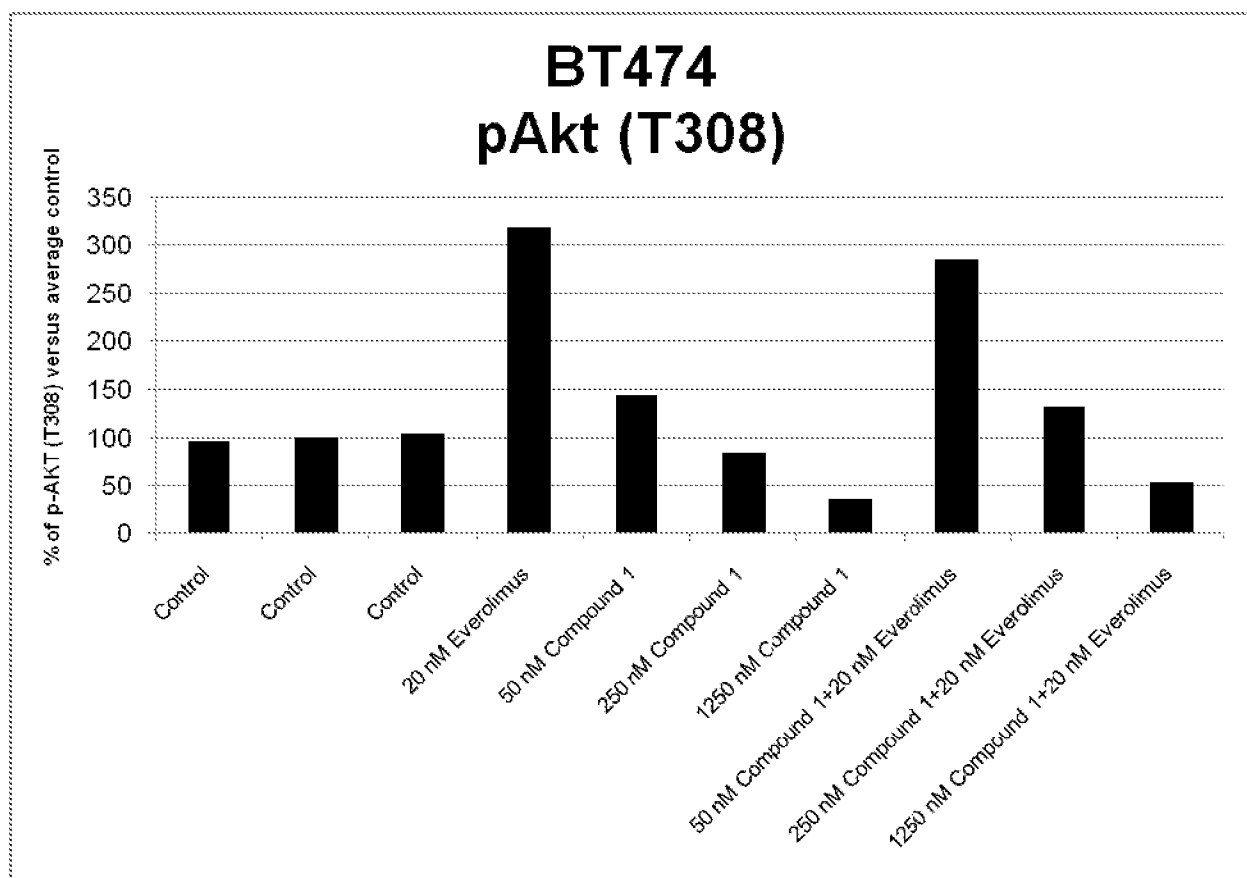


FIG. 4

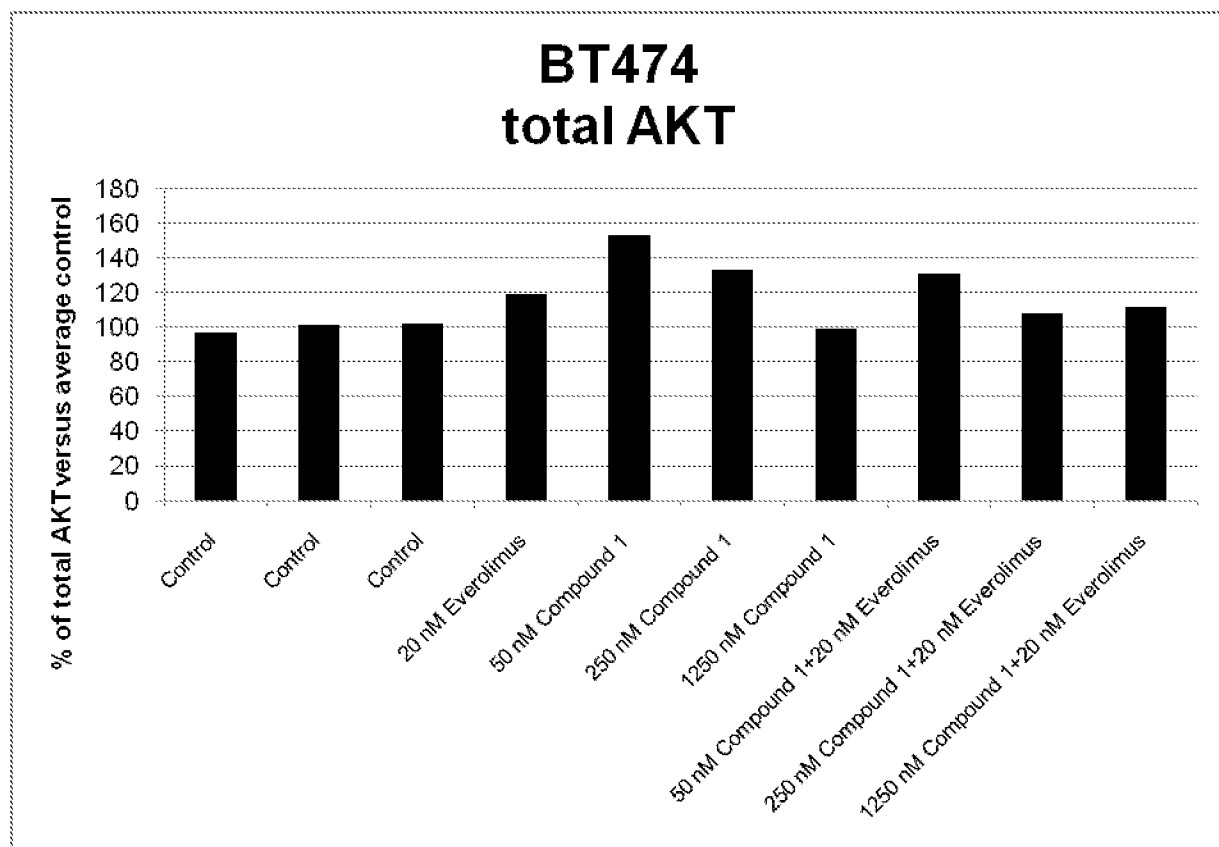


FIG. 5

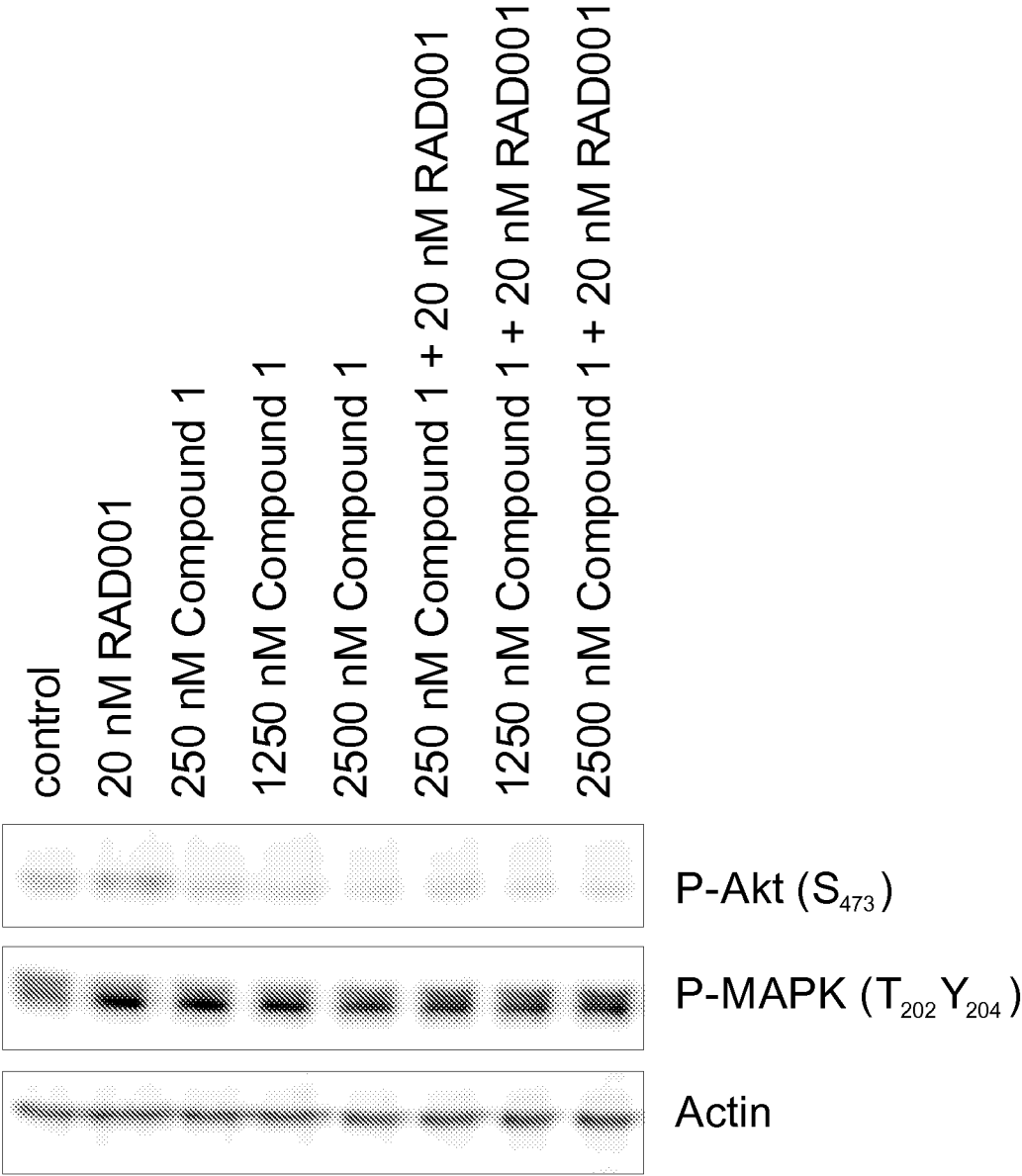


FIG. 6

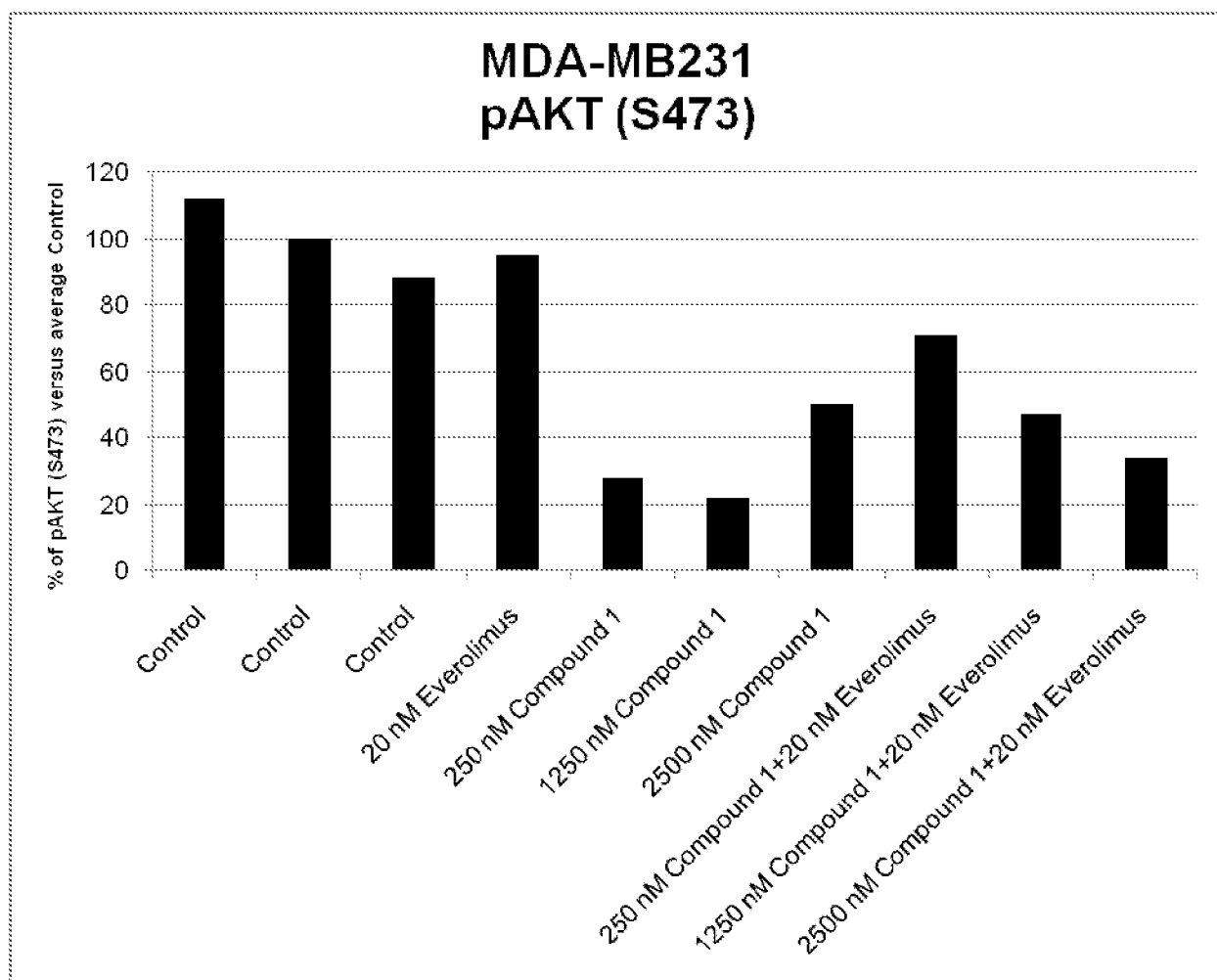


FIG. 7

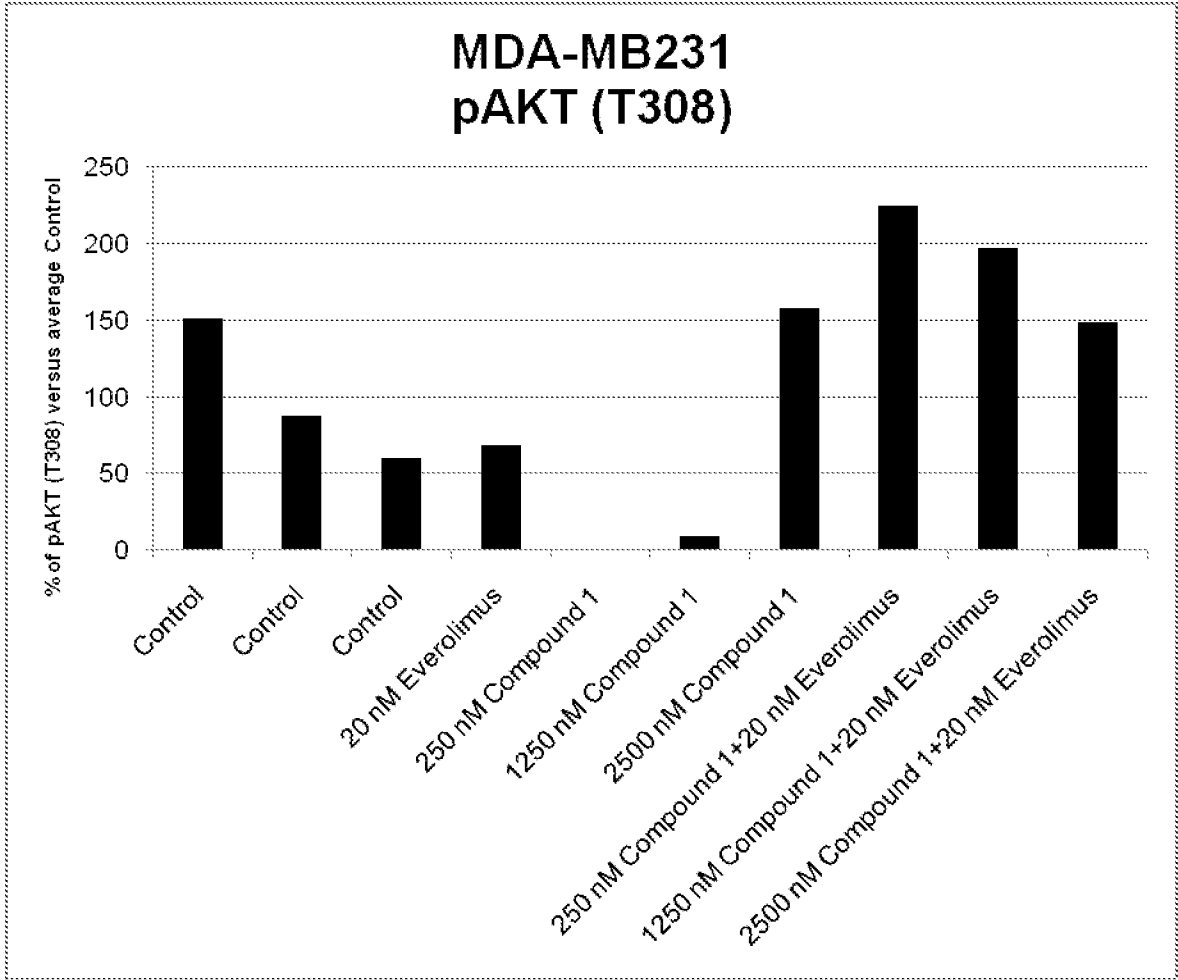


FIG. 8

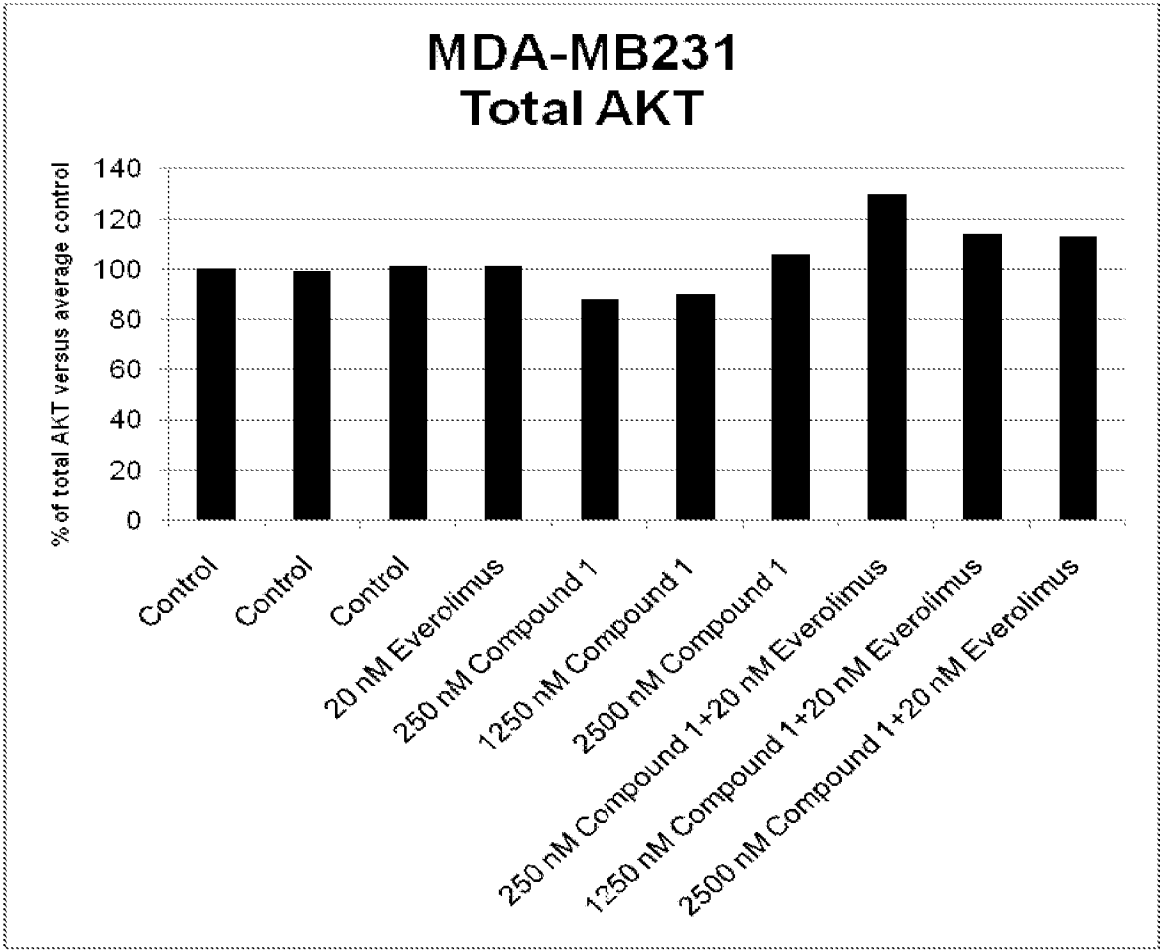
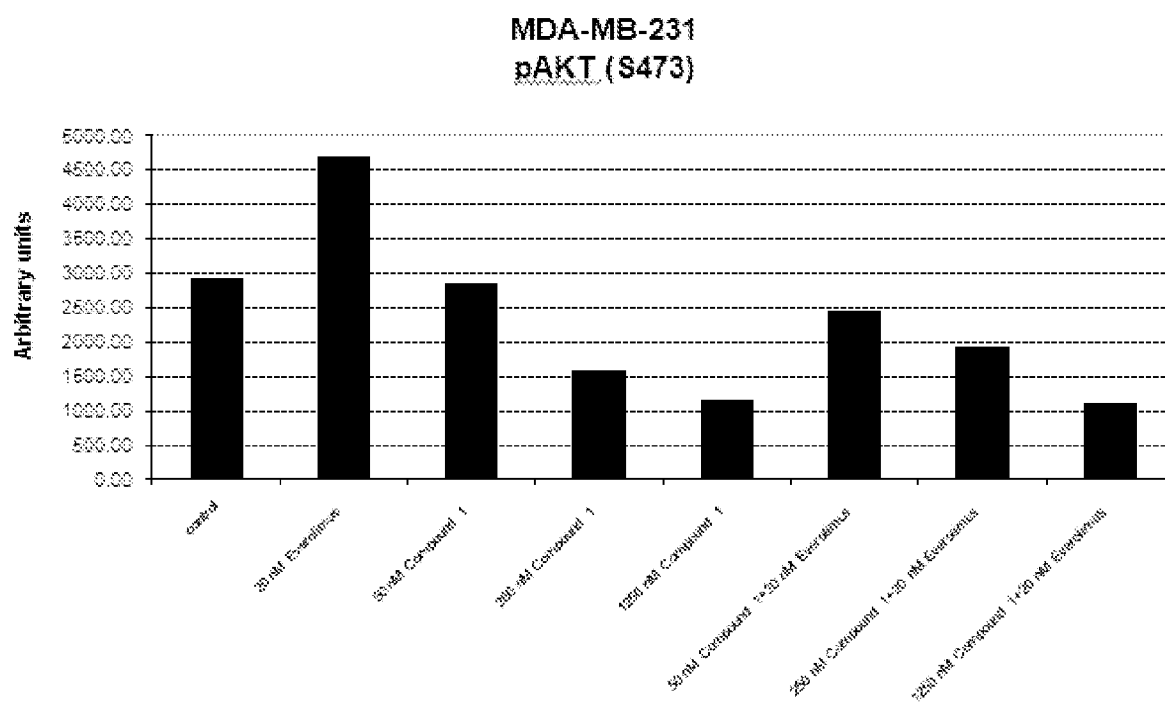


FIG. 9

A



B

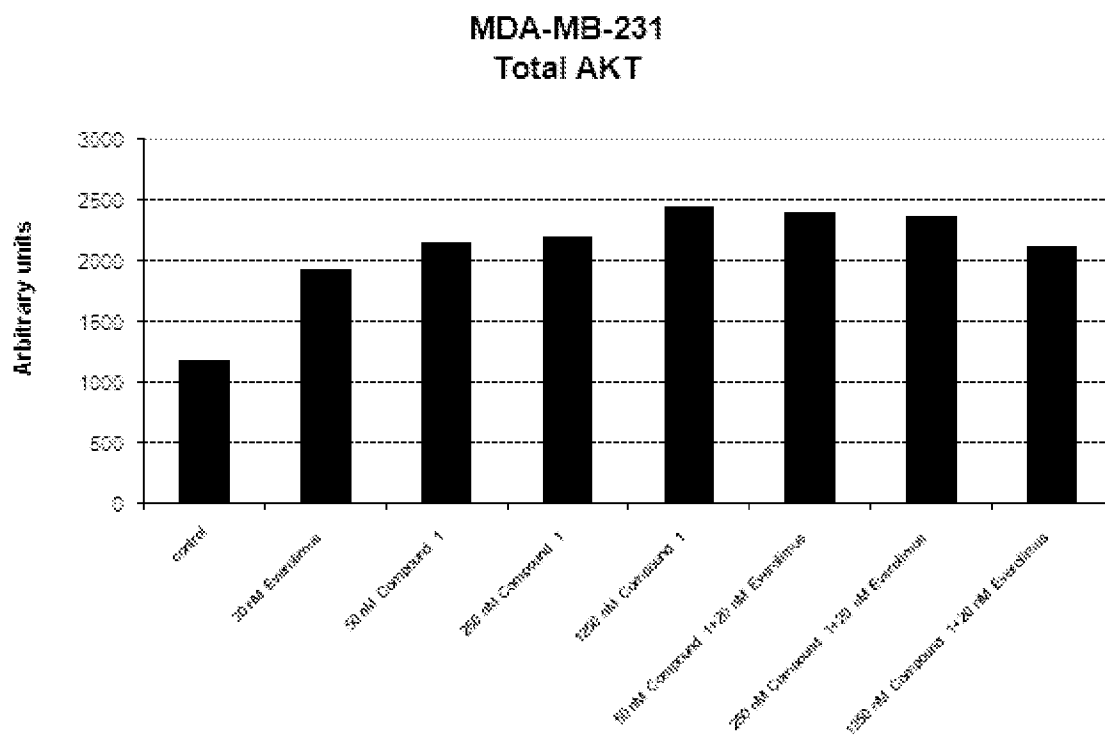


FIG. 10

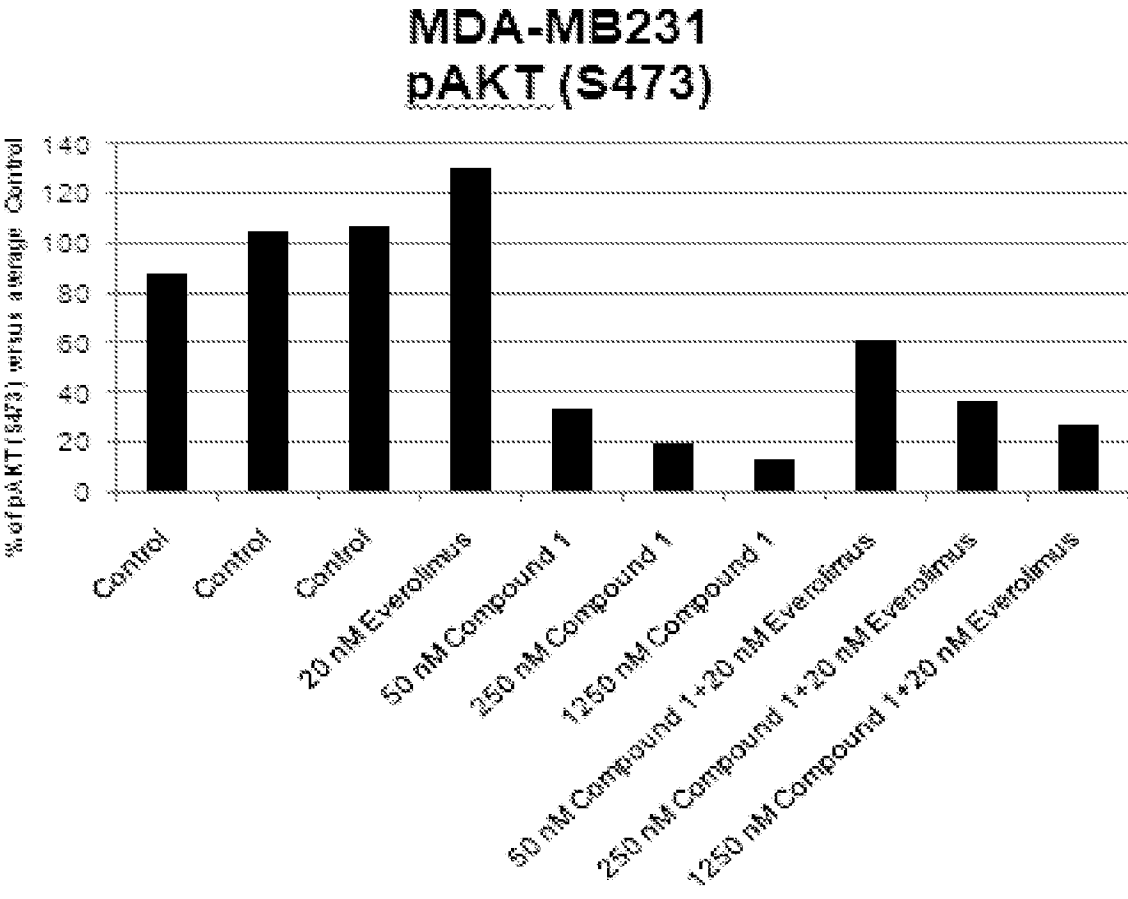


FIG. 11

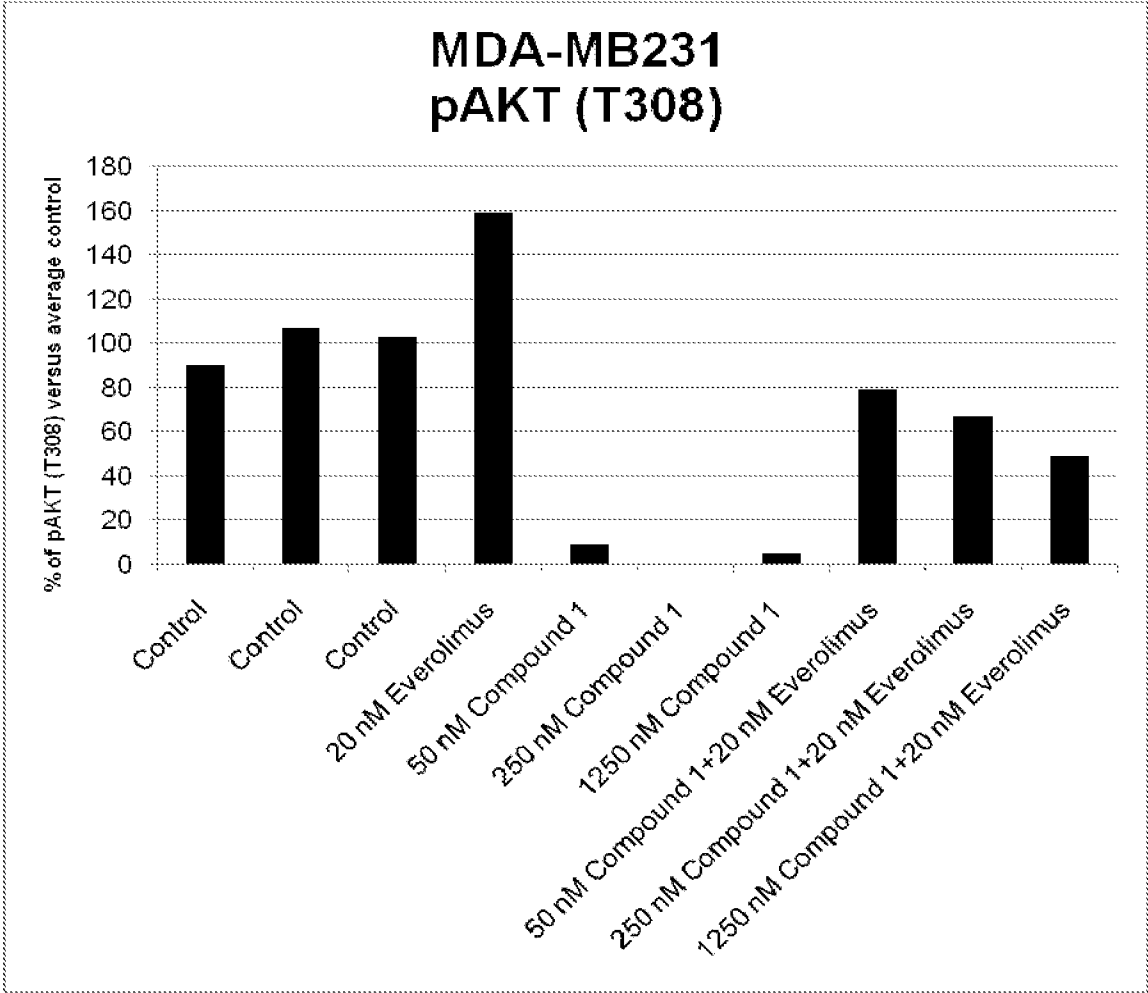


FIG. 12

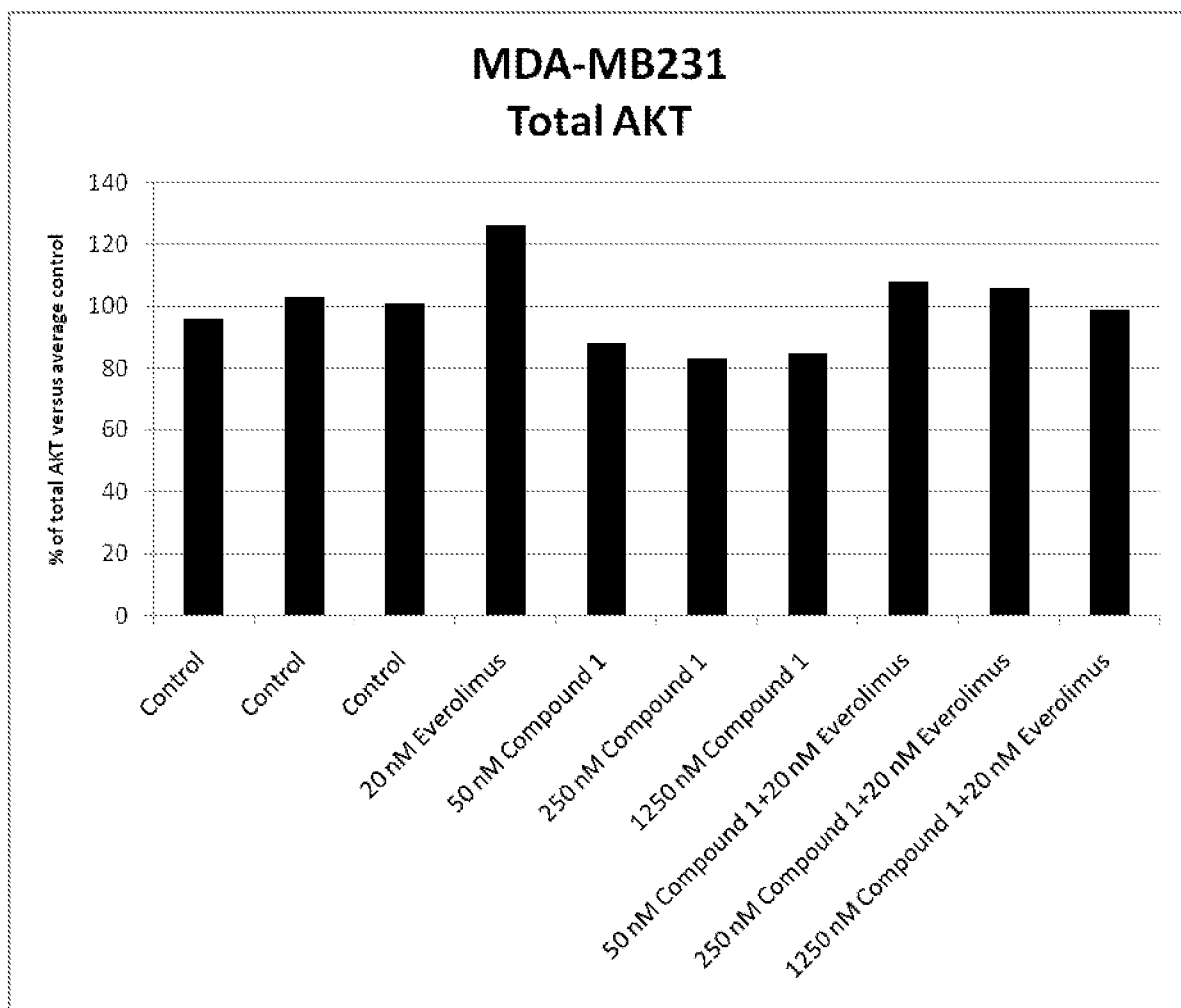
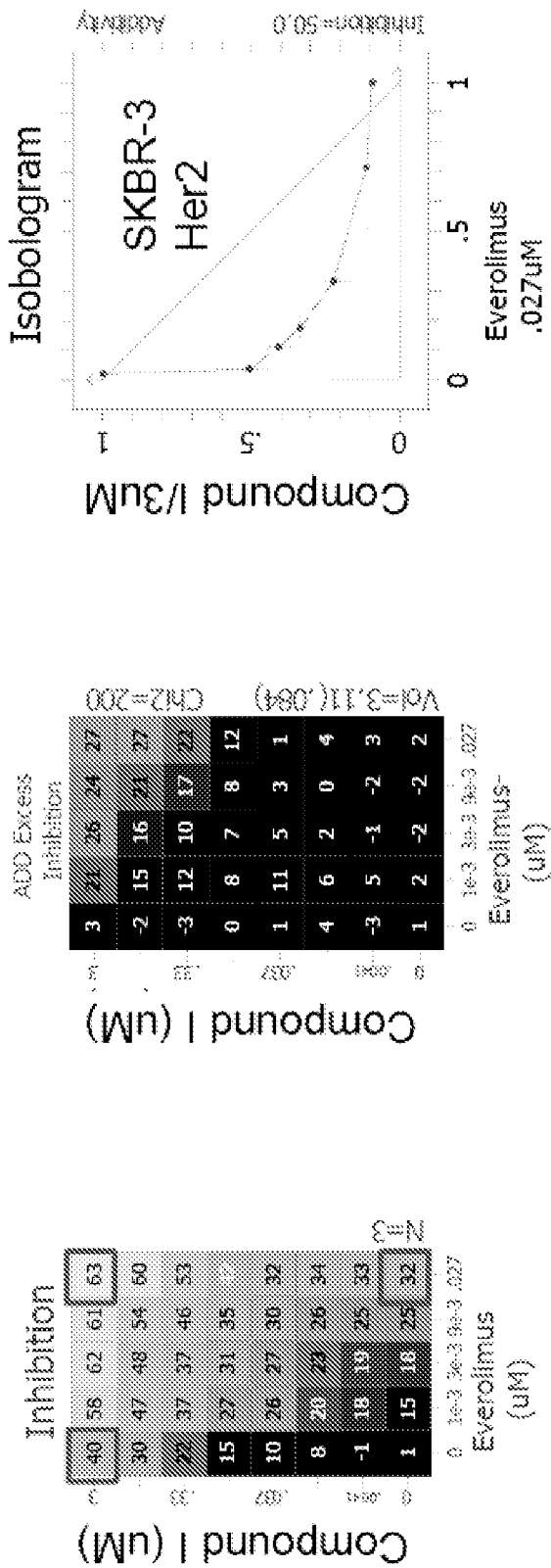
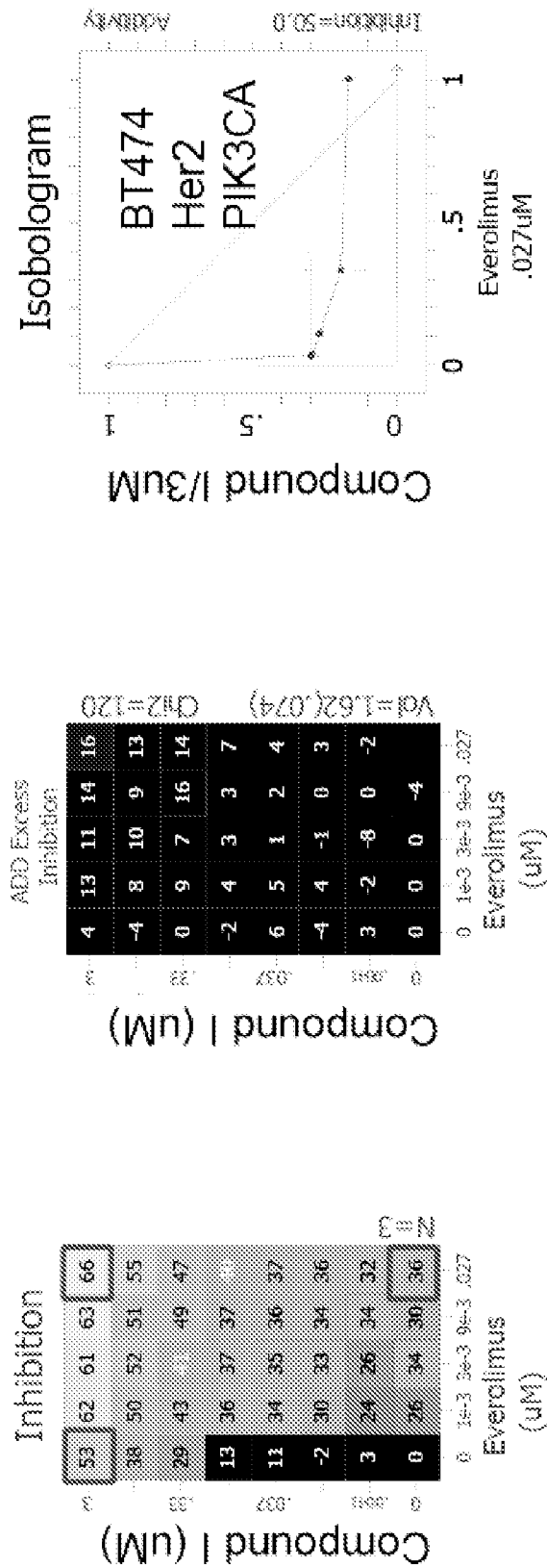


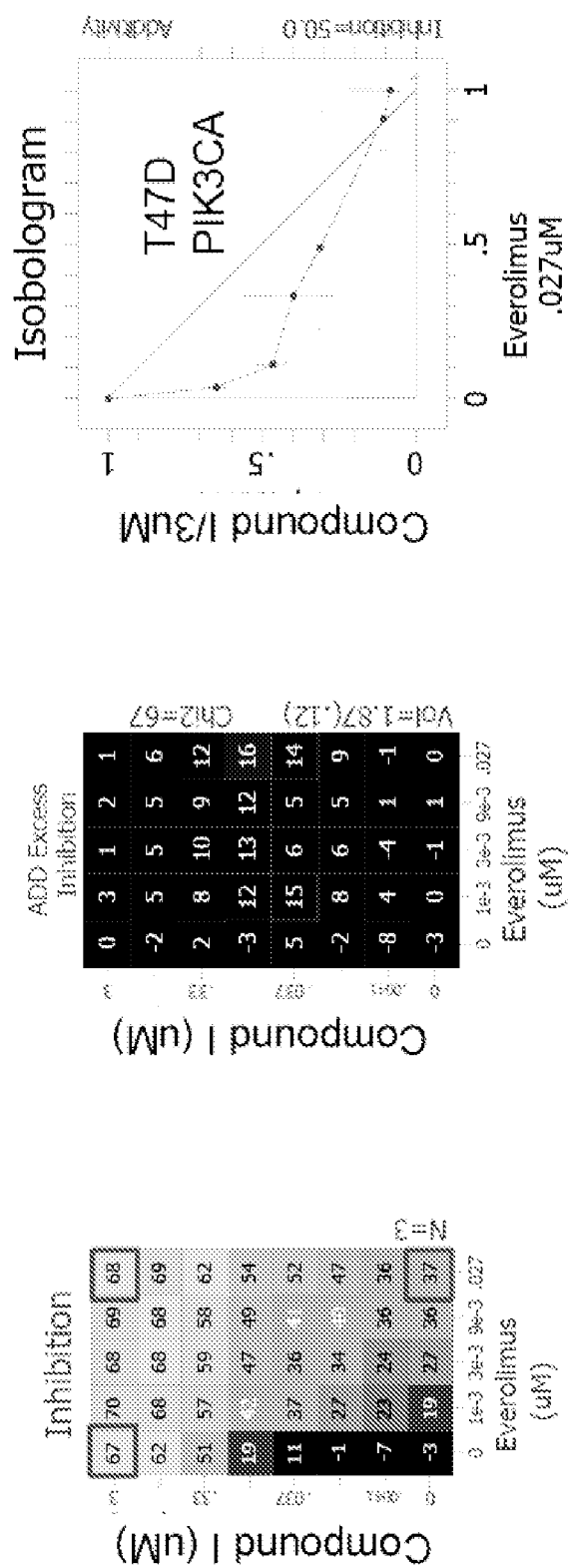
FIG. 13



☐ Amax

FIG. 14





 Amax

FIG. 15

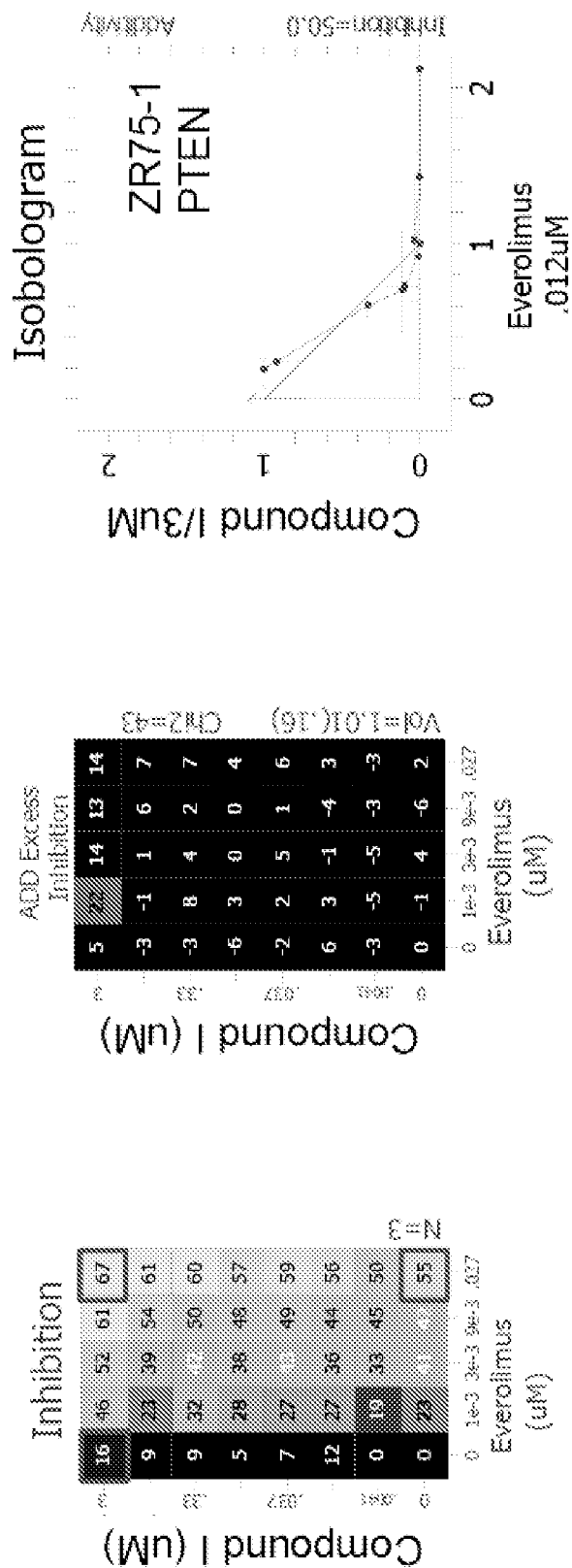


FIG. 16

□ Amax

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/034647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/436 A61K31/4439 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/029082 A1 (NOVARTIS AG [CH]; CARAVATTI GIORGIO [CH]; FAIRHURST ROBIN ALEC [GB]; F) 18 March 2010 (2010-03-18) cited in the application	1-14
Y	claims page 37, line 28 - line 32 page 55; example 15	1-14
Y	----- WO 2010/049481 A1 (NOVARTIS AG [CH]; GARCIA-ECHEVERRIA CARLOS [CH]; MAIRA SAUVEUR-MICHEL) 6 May 2010 (2010-05-06) claims page 1 page 6 - page 8 page 11 - page 12 example 1 ----- -/--	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2012

Date of mailing of the international search report

28/06/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kollmannsberger, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/034647

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHAI SUPARAT RISA ET AL: "Dual inhibition of PI3Kα and mTOR as an alternative treatment for Kaposi's sarcoma", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 68, no. 20, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 8361-8368, XP002514946, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0878 the whole document -----	1-14
A	WO 2004/096797 A1 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; BRUCE IAN [GB]; CUENOUD B) 11 November 2004 (2004-11-11) page 52; example 133 -----	1-14
A	V. SERRA ET AL: "NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Growth of Cancer Cells with Activating PI3K Mutations", CANCER RESEARCH, vol. 68, no. 19, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 8022-8030, XP55018423, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1385 the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/034647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010029082 A1	18-03-2010	AR 073369 A1	03-11-2010
		AU 2009290904 A1	18-03-2010
		CA 2734819 A1	18-03-2010
		CN 102149711 A	10-08-2011
		CO 6351738 A2	20-12-2011
		DO P2011000070 A	31-03-2011
		EA 201100447 A1	31-10-2011
		EC SP11010880 A	29-04-2011
		EP 2331537 A1	15-06-2011
		JP 2012502080 A	26-01-2012
		KR 20110038737 A	14-04-2011
		MA 32604 B1	01-09-2011
		PA 8841901 A1	28-06-2010
		PE 07962011 A1	04-11-2011
		SM AP201100019 A	06-05-2011
		SV 2011003853 A	16-05-2011
		TW 201014851 A	16-04-2010
		US 2010105711 A1	29-04-2010
		UY 32096 A	30-04-2010
		WO 2010029082 A1	18-03-2010
WO 2010049481 A1	06-05-2010	AU 2009309616 A1	06-05-2010
		CA 2736361 A1	06-05-2010
		CN 102202668 A	28-09-2011
		EP 2349275 A1	03-08-2011
		JP 2012506898 A	22-03-2012
		KR 20110090911 A	10-08-2011
		US 2011195966 A1	11-08-2011
		WO 2010049481 A1	06-05-2010
WO 2004096797 A1	11-11-2004	AR 044519 A1	14-09-2005
		AT 445614 T	15-10-2009
		AU 2004234068 A1	11-11-2004
		AU 2008255157 A1	08-01-2009
		BR PI0410037 A	25-04-2006
		CA 2524401 A1	11-11-2004
		CL 9172004 A1	11-02-2005
		CN 1816549 A	09-08-2006
		CN 101648949 A	17-02-2010
		EC SP056127 A	01-03-2006
		EP 1622897 A1	08-02-2006
		EP 2157091 A1	24-02-2010
		ES 2331883 T3	19-01-2010
		HK 1091810 A1	20-05-2010
		IS 8152 A	25-11-2005
		JP 4510807 B2	28-07-2010
		JP 2006525266 A	09-11-2006
		KR 20060009884 A	01-02-2006
		MA 27774 A1	01-02-2006
		MX PA05011740 A	26-01-2006
		PE 01472005 A1	05-05-2005
		PT 1622897 E	10-12-2009
		RU 2384580 C2	20-03-2010
		RU 2009134044 A	20-03-2011
		US 2007032487 A1	08-02-2007
		US 2011105535 A1	05-05-2011
		WO 2004096797 A1	11-11-2004

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (TCP)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
1 de noviembre de 2012 (01.11.2012)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT WO 2012/148846 A1

(51) Clasificación Internacional de Patente:
A61K 31/436 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)

(74) Agente: RUECK, Sandra; Novartis Pharmaceuticals Corporation, One Health Plaza, Building 101, East Hanover, Nueva Jersey 07936-1080 (US).

(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/US2012/034647

(81) Estados (Países) Designados (*a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Presentación Internacional:
23 de abril de 2012 (23.04.2012)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
61/478,572 25-abril-2011 (25.04.2011) US

(71) Solicitante (*para todos los Estados (Países) designados excepto US*): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea (CH).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **FRITSCH, Christine** [FR/CH]; c/o Novartis Pharma AG, Werk Klybeck, Klybeckstrasse 141, CH-4057 Basilea (CH). **GARCIA-ECHEVERRIA, Carlos** [ES/FR]; 11 Boulevard de la Republique, F-92210 Saint-Cloud (FR). **HUANG, Xizhong** [US/US]; c/o Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **MAIRA, Sauveur-Michel** [FR/CH]; c/o Novartis Pharma AG, Werk Klybeck, Klybeckstrasse 141, CH-4057 Basilea (CH).

(84) Estados (Países) Designados (*a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiáticos (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeos (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones de acuerdo con la Regla 4.17:

-- *con respecto al derecho de la solicitante de reclamar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))*

Publicada:

-- *con reporte de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(54) Título : COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE CINASA DE FOSFATIDIL-INOSITOL-3 (PI3K) Y UN INHIBIDOR DE mTOR

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de cinasa de fosfatidil-inositol-3 (PI3K), el cual es un derivado de 2-carboxamida-cicloamino-urea, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; a una composición farmacéutica, la cual comprende dicha combinación; y a los usos de esta combinación en el tratamiento de las enfermedades proliferativas, más específicamente de las enfermedades dependientes de la cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR).

WO 2012/148846 A1

COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE CINASA DE FOSFATIDIL- INOSITOL-3 (PI3K) Y UN INHIBIDOR DE mTOR

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a una combinación
farmacéutica que comprende un Compuesto Inhibidor de cinasa de
fosfatidil-inositol-3 (PI3K), el cual es un derivado de 2-carboxamida-
cicloamino-urea, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
y cuando menos un inhibidor del objetivo de rapamicina de mamífero
10 (mTOR), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; a una
composición farmacéutica, la cual comprende dicha combinación; y a
los usos de esta combinación en el tratamiento de las enfermedades
proliferativas, más específicamente de las enfermedades
dependientes de la cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero
15 (mTOR).

Antecedentes de la Invención

Se ha demostrado que la inhibición del objetivo de rapamicina
de mamífero (mTOR) puede inducir la señalización del receptor del
factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R) corriente arriba que da
20 como resultado la activación de AKT en las células de cáncer. Se ha
sugerido que este fenómeno tiene una función en la atenuación de
las respuestas celulares a la inhibición de mTor, y puede atenuar la
actividad clínica de los inhibidores de mTOR. Se ha encontrado el
aumento en pAKT, por ejemplo, en aproximadamente el 50 por ciento
25 de los tumores de todos los pacientes en un estudio en Fase I en los

pacientes con tumores sólidos avanzados (Taberno y colaboradores, Journal of Clinical Oncology, 26 (2008), páginas 1603-1610).

A pesar de las numerosas opciones de tratamiento para los pacientes de las enfermedades proliferativas, sigue existiendo una
5 necesidad de agentes terapéuticos efectivos y seguros, y una necesidad de su uso preferencial en la terapia de combinación. Los compuestos de la fórmula (A), como se estipulan en la presente, e incluyendo la 1-(4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il)-amida de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-
10 dicarboxílico, son inhibidores altamente selectivos de la isoforma alfa de la cinasa de fosfatidil-inositol-3 (PI3K). De una manera sorprendente, se ha descubierto que la combinación de una cantidad efectiva del los compuestos inhibidores de PI3K específicos de alfa de la fórmula (A), con una cantidad efectiva de cuando menos un
15 inhibidor de mTor, da como resultado una mejora sinérgica inesperada en el tratamiento de las enfermedades dependientes del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR), en particular, cáncer. Cuando se administran de una manera simultánea, en secuencia o por separado, este Compuesto Inhibidor de PI3K específico de alfa y
20 el inhibidor de mTor de la presente invención, interactúan para inhibir fuertemente la proliferación celular. Esta interacción benéfica permite hacer una reducción en la dosis requerida para cada compuesto, conduciendo a una reducción en los efectos secundarios, y a una mejora de la efectividad clínica a largo plazo de los
25 compuestos en el tratamiento.

Breve Descripción de la Invención

Ahora se ha encontrado, de acuerdo con la presente invención, que un compuesto inhibidor de la cinasa de fosfatidil-inositol-3 (PI3K) específico de la isoforma alfa de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, reduce o bloquea la fosforilación y activación de AKT mediante los inhibidores de mTOR. De conformidad con lo anterior, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad preferida, el compuesto de la fórmula (A) en la presente invención es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I").

En una modalidad preferida, el inhibidor de mTor de la presente invención se selecciona a partir de rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511.

En un aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la

fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la fórmula (A), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la
10 prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor.

 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor, mediante la administración de un compuesto de la fórmula (A), o de una sal farmacéuticamente
15 aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una combinación de un compuesto de la fórmula (A), y cuando menos un inhibidor de mTor seleccionado a partir del grupo que consiste en
20 rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132,
25 XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511, en donde los

ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso simultáneo, separado, o en secuencia, para el tratamiento de las enfermedades dependientes de la cinasa del
5 objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para reducir o bloquear la fosforilación y activación de AKT mediante los inhibidores de mTor, el cual comprende administrar un
10 compuesto de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa dependiente de la fosforilación y activación adquirida de AKT durante
15 el tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (A), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

20 En una modalidad adicional, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que ha llegado a ser resistente o que tiene una sensibilidad reducida al tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende
25 administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto

de la fórmula (A), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite. La resistencia se debe, por ejemplo, a la fosforilación y activación de AKT.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficacia del tratamiento de una enfermedad proliferativa con cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende administrar una combinación que comprende un compuesto de la
10 fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite. En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto inhibidor de PI3K de
15 la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción Detallada de las Figuras

La Figura 1 muestra los niveles de fosforilación de AKT (S473);
20 MAPK (T202/Y204); MEK1/2 (S217/S221), y los niveles de actina en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I") como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el
25 Compuesto I en las células tumorales de mama BT474, como se

detectan mediante análisis Western Blot.

La Figura 2 muestra los niveles de fosforilación de AKT (S473) en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en
5 combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama BT474, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas.

La Figura 3 muestra los niveles de fosforilación de AKT (T308) en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el
10 Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama BT474, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas.

La Figura 4 muestra los niveles totales de expresión de AKT en
15 la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama BT474, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas.

20 La Figura 5 muestra los niveles de fosforilación de AKT (S473); MAPK (T202/Y204), y los niveles de actina en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se detectan
25 mediante análisis Western Blot.

La Figura 6 muestra los niveles de fosforilación de AKT (S473) en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de
5 vehículo en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas.

La Figura 7 muestra los niveles de fosforilación de AKT (T308) en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en
10 combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas.

La Figura 8 muestra los niveles totales de expresión de AKT en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el
15 Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas.

La Figura 9 muestra los niveles de fosforilación de AKT (S473)
20 (Panel A), y los niveles totales de AKT (Panel B) en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se detectan mediante Western Blot, y además como se cuantifican utilizando el software Quantity One, en un segundo conjunto de
25 experimentos.

La Figura 10 muestra los niveles de fosforilación de AKT (S473) en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de
5 vehículo en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas, en un segundo conjunto de experimentos.

La Figura 11 muestra los niveles de fosforilación de AKT (T308) en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente,
10 el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas, en un segundo conjunto de experimentos.

La Figura 12 muestra los niveles totales de expresión de AKT
15 en la presencia de everolimus (RAD001) como único agente, el Compuesto I como único agente, y everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en comparación con el control de vehículo en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se
20 cuantifican mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas, en un segundo conjunto de experimentos.

La Figura 13 muestra los datos de proliferación celular de matriz de la dosis completa a partir del tratamiento de un único agente y concomitante con everolimus (RAD001) y/o el Compuesto I
25 en modelos de células de cáncer de mama humano SKBR-3.

La Figura 14 muestra los datos de proliferación celular de matriz de la dosis completa a partir del tratamiento de un único agente y concomitante con everolimus (RAD001) y/o el Compuesto I en modelos de células de cáncer de mama humano BT-474.

5 La Figura 15 muestra los datos de proliferación celular de matriz de la dosis completa a partir del tratamiento de un único agente y concomitante con everolimus (RAD001) y/o el Compuesto I en modelos de células de cáncer de mama humano T47-D.

La Figura 16 muestra los datos de proliferación celular de
10 matriz de la dosis completa a partir del tratamiento de un único agente y concomitante con everolimus (RAD001) y/o el Compuesto I en modelos de células de cáncer de mama humano ZR-75-1.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se refiere a una combinación
15 farmacéutica que comprende: (a) un compuesto de la fórmula (A), como se define en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las siguientes definiciones generales se aplicarán en esta
20 memoria descriptiva, a menos que se especifique de otra manera:

Los términos "comprendiendo" e "incluyendo" se utilizan en la presente en su sentido abierto y no limitante, a menos que se observe de otra manera.

Los términos "un" y "uno" y "el", y referencias similares en el
25 contexto de describir la invención (en especial en el contexto de las

siguientes reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente, o que sea claramente contradicho por el contexto. Cuando se utilice la forma plural para los compuestos, sales, y similares, esto también significa un solo compuesto, sal, o similar.

“Combinación” se refiere a ya sea una combinación fija en una forma unitaria de dosificación, o bien a un kit de partes para la administración combinada, en donde un compuesto de la fórmula (A) y un componente de combinación (por ejemplo, otro fármaco como se explica más adelante, también referido como “componente de combinación” o “agente terapéutico”) se pueden administrar independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, en especial en donde estos intervalos de tiempo permitan que los componentes de la combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

“Combinación farmacéutica”, como se utiliza en la presente, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo, e incluye tanto las combinaciones fijas como no fijas de los ingredientes activos. El término “combinación fija” o “dosis fija” significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de la fórmula (A) y un componente de combinación, se administran ambos a un paciente de una manera simultánea en la forma de una sola entidad o dosificación. El término “combinación no fija” significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de la fórmula (I) y un componente de combinación, se

administran ambos a un paciente como entidades separadas, ya sea de una manera simultánea, concurrente, o en secuencia, sin límites de tiempo específicos, en donde esta administración proporcione niveles terapéuticamente efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del animal de sangre caliente que lo necesite. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, a la administración de tres o más ingredientes activos.

El término "un inhibidor de cinasa de fosfatidil-inositol-3" se define en la presente para referirse a un compuesto que dirige, reduce, o inhibe la cinasa PI-3. Se ha demostrado que la actividad de la cinasa PI-3 aumenta en respuesta a un número de estímulos hormonales y de factores de crecimiento, incluyendo insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento tipo insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor estimulante de colonias, y factor de crecimiento de hepatocitos, y se ha implicado en los procesos relacionados con el crecimiento y la transformación celular.

El término "composición farmacéutica" se define en la presente para referirse a una mezcla o solución que contiene cuando menos un ingrediente activo o agente terapéutico, para administrarse a un animal de sangre caliente, por ejemplo, a un mamífero o a un ser humano, con el objeto de prevenir o tratar una enfermedad o condición particular que afecte al animal de sangre caliente.

El término "farmacéuticamente aceptable" se define en la presente para referirse a los compuestos, materiales, composiciones

y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un buen juicio médico, sean adecuados para hacer contacto con los tejidos de un animal de sangre caliente, por ejemplo, de un mamífero o de un ser humano, sin una excesiva toxicidad irritación, respuesta alérgica, y
5 otras complicaciones problemáticas, de una manera conmensurada con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

La frase "cantidad terapéuticamente efectiva" se utiliza en la presente para significar una cantidad suficiente para reducir por cuando menos aproximadamente el 15 por ciento, de preferencia por
10 cuando menos el 50 por ciento, más preferiblemente por cuando menos el 90 por ciento, y de una manera muy preferible, para evitar un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del animal de sangre caliente que lo necesite. De una manera alternativa, una cantidad terapéuticamente efectiva es
15 suficiente para provocar una mejora en una condición/un síntoma clínicamente significativo en el animal de sangre caliente que lo necesite.

El término "tratar" o "tratamiento", como se utiliza en la presente, comprende el tratamiento que libera, reduce, o alivia
20 cuando menos un síntoma en un sujeto, o que efectúa una demora del progreso de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno, o la erradicación completa de un trastorno, tal como cáncer. Dentro del significado de la presente invención, el término "tratar" también
25 denota detener, retardar el establecimiento (es decir, el período

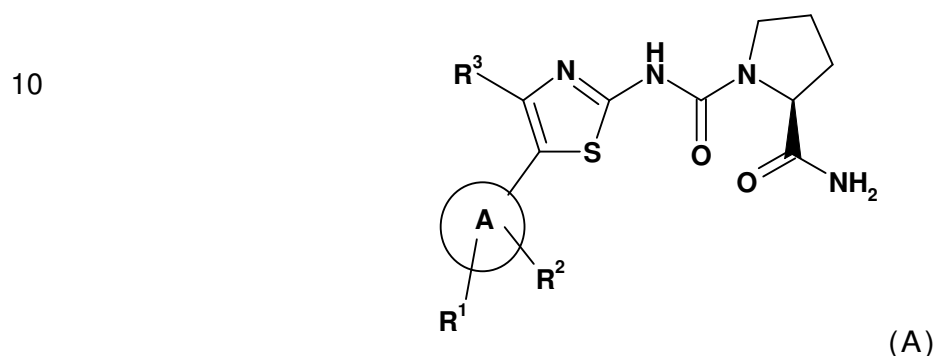
anterior a la manifestación clínica de una enfermedad), y/o reducir el riesgo de desarrollar o empeorar una enfermedad. El término “proteger” se utiliza en la presente para significar prevenir, retardar, o tratar, o todas, como sea apropiado, el desarrollo o la continuación o la agravación de una enfermedad en un sujeto.

El término “prevenir”, “previniendo” o “prevención”, como se utiliza en la presente, comprende la prevención de cuando menos un síntoma asociado con, o causado por, el estado, enfermedad, o trastorno que esté siendo prevenido.

El término “conjuntamente activos terapéuticamente” o “efecto terapéutico conjunto”, como se utiliza en la presente, significa que los agentes terapéuticos se pueden dar por separado (de una manera cronológicamente escalonada, en especial de una manera específica de la secuencia) a intervalos de tiempo tales que de preferencia, en el animal de sangre caliente, en especial en el ser humano que se vaya a tratar, todavía muestren una interacción (de preferencia sinérgica) (efecto terapéutico conjunto). Que éste sea el caso se puede determinar, entre otras cosas, siguiendo los niveles en sangre que muestren que ambos compuestos estén presentes en la sangre del ser humano que se vaya a tratar, cuando menos durante ciertos intervalos de tiempo.

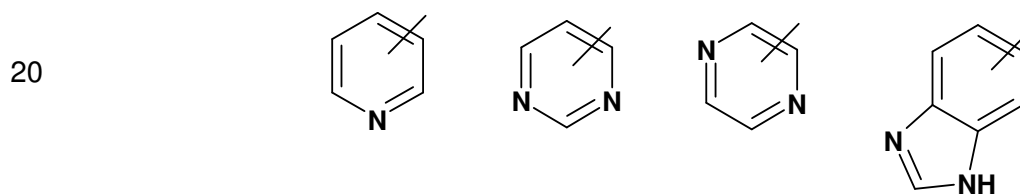
La Publicación Internacional Número WO2010/029082 describe los derivados específicos de 2-carboxamida-cicloamino-urea, los cuales se ha encontrado que tienen una actividad inhibidora para las cinasas PI3 (cinasas de fosfatidil-inositol-3). Estos inhibidores

específicos de la cinasa de fosfatidil-inositol-3 (PI3K), tienen propiedades farmacológicas convenientes, y muestran una mejor selectividad para la cinasa-PI3 alfa comparándose con los subtipos beta y/o delta y/o gamma. Los derivados específicos de la 2-carboxamida-cicloamino-urea que son adecuados para la presente invención, su preparación, y las formulaciones adecuadas que los contienen, se describen en la Publicación Internacional Número WO2010/029082, e incluyen los compuestos de la fórmula (A):



15 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

A representa un heteroarilo seleccionado a partir del grupo que consiste en:



R¹ representa uno de los siguientes sustituyentes: (1) alquilo de 1 a 7 átomos de carbono insustituido o sustituido, de preferencia sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan

25

independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a nueve de las siguientes fracciones: deuterio, flúor, o de una a dos de las siguientes fracciones: cicloalquilo de 3 a 5 átomos de carbono; (2) cicloalquilo de 3 a 5 átomos de carbono opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a cuatro de las siguientes fracciones: deuterio, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono (de preferencia metilo), flúor, ciano, amino-carbonilo; (3) fenilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a dos de las siguientes fracciones: deuterio, halógeno, ciano, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-amino, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-amino-carbonilo, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino-carbonilo, alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono; (4) amina opcionalmente mono- o di-sustituida; en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de las siguientes fracciones: deuterio, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, flúor, cloro, hidroxilo), fenil-sulfonilo (que está insustituido o sustituido por uno o más, de preferencia uno de alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino-alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono); (5) sulfonilo sustituido; en donde el sustituyente se selecciona a partir de las siguientes

fracciones: alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, flúor), pirrolidino (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, hidroxilo, oxo; en particular un oxo); (6) flúor, cloro;

R^2 representa hidrógeno;

R^3 representa: (1) hidrógeno, (2) flúor, cloro, (3) metilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a tres de las siguientes fracciones: deuterio, flúor, cloro, dimetil-amino; con la excepción de la 1-({5-[2-(terbutil)-pirimidin-4-il]-4-metil-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico.

Los radicales y símbolos como se utilizan en la definición de un compuesto de la fórmula (A) tienen los significados como se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO2010/029082, cuya publicación se incorpora a la presente solicitud como referencia en su totalidad.

Un compuesto preferido de la presente invención es un compuesto que se describe específicamente en la Publicación Internacional Número WO2010/029082. Un compuesto muy preferido de la presente invención es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (Compuesto I) o una sal

farmacéuticamente aceptable de la misma. La síntesis de la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico se describe en la Publicación Internacional Número WO2010/029082 como el Ejemplo 15.

Las combinaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen cuando menos un compuesto que dirige, reduce, o inhibe la actividad/función de la cinasa de serina/treonina mTor. Estos compuestos será referidos como un “inhibidor de mTOR” e incluyen, pero no se limitan a, los compuestos, proteínas o anticuerpos que dirigen/inhiben la actividad/función de los miembros de la familia de cinasa mTor, por ejemplo, rapamicina RAD (sirolimus, que también se conoce por el nombre de RAPAMUNE), y los derivados/análogos de la misma, tales como everolimus (RAD001, Novartis), o los compuestos que inhiben la actividad de cinasa de mTor mediante su enlace directo con la hendidura de enlace del ATP de la enzima. El everolimus (RAD001) también se conoce por el nombre de CERTICAN o AFINITOR.

Los inhibidores de mTor adecuados incluyen, por ejemplo:

I. Rapamicina, la cual es un macrólido inmunosupresor de lactama que es producido por *Streptomyces hygroscopicus*.

II. Derivados de rapamicina, tales como:

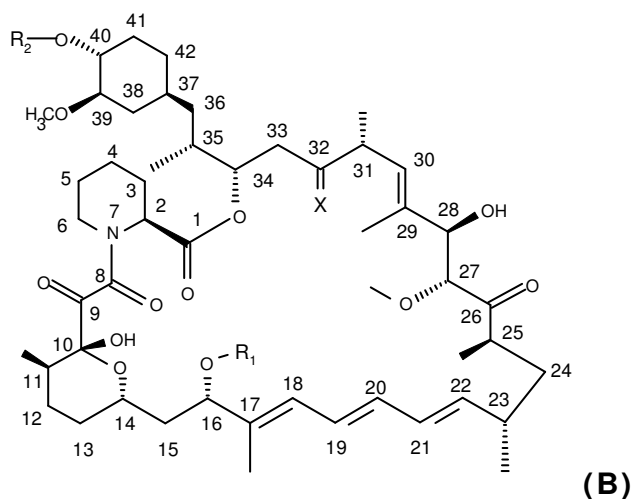
a. rapamicina sustituida, por ejemplo, una 40-O-rapamicina sustituida, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,258,389, en las

Publicaciones Internacionales Números WO 94/09010 y WO 92/05179, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 5,118,677, US 5,118,678, US 5,100,883, US 5,151,413, y US 5,120,842, en las Publicaciones Internacionales Números WO 93/11130, WO 94/02136, WO 94/02485 y WO 95/14023, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia;

b. una 16-O-rapamicina sustituida, por ejemplo, como se da a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO 94/02136, WO 95/16691 y WO 96/41807, el contenido de las cuales se incorpora a la presente como referencia;

c. una rapamicina 32-hidrogenada, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/41807 y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,256,790, incorporadas a la presente como referencia.

d. Los derivados de rapamicina preferidos son los compuestos de la fórmula (B):



en donde:

R_1 es CH_3 o alquililo de 3 a 6 átomos de carbono,

R_2 es H o $-CH_2-CH_2-OH$, 3-hidroxi-2-(hidroxi-metil)-
 5 2-metil-propanoílo o tetrazolilo, y X es $=O$, (H,H) o (H,OH)

en el entendido de que R_2 es diferente de H cuando
 X es $=O$ y R_1 es CH_3 ,

o un pro-fármaco de los mismos cuando R_2 es
 $-CH_2-CH_2-OH$, por ejemplo, un éter fisiológicamente hidrolizable de
 10 los mismos.

Los compuestos de la fórmula (B) se dan a conocer,
 por ejemplo, en las Solicitudes Internacionales del TCP Números
 WO94/09010, WO95/16691 o WO 96/41807, las cuales se incorporan
 a la presente como referencia. Se pueden preparar como se da a
 15 conocer o por analogía a los procedimientos descritos en estas
 referencias.

Los compuestos preferidos son 32-desoxo-
 rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32-desoxo-rapamicina, 16-pent-2-
 iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-40-O-
 20 (2-hidroxi-etil)-rapamicina y, más preferiblemente, 40-O-(2-hidroxi-
 etil)-rapamicina, como se da a conocer como el Ejemplo 8 en la
 Solicitud Internacional del TCP Número WO94/09010.

Los derivados de rapamicina particularmente
 preferidos de la fórmula (B) son 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, 40-
 25 [3-hidroxi-2-(hidroxi-metil)-2-metil-propanoato]-rapamicina (también

denominada como CCI779), 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (también denominada como ABT578), 32-desoxo-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-di-hidro-rapamicina, o TAFA-93.

e. Los derivados de rapamicina también incluyen los denominados como rapálogos, por ejemplo, como se dan a conocer en las Solicitudes Internacionales del TCP Números WO98/02441 y WO01/14387, por ejemplo, AP23573, AP23464, o AP23841.

Se ha encontrado que la rapamicina y sus derivados, con base en la actividad observada, por ejemplo, que se enlazan con la macrofilina-12 (también conocida como proteína de enlace de FK-506 o FKBP-12), por ejemplo, como se describe en las Solicitudes Internacionales del TCP Números WO94/09010, WO95/16691 o WO96/41807, son útiles, por ejemplo, como inmunosupresores, por ejemplo, en el tratamiento de rechazo agudo de aloinjerto.

III. Ascomicina, la cual es un análogo etílico de FK506.

IV. AZD08055 (AstraZeneca), y OSI-027 (OSI Pharmaceuticals), los cuales son compuestos que inhiben la actividad de cinasa de mTor mediante su enlace directo con la hendidura de enlace del ATP de la enzima.

V. SAR543, deferolimus (AP23573/ MK-8669, Ariad/ Merck & Co.), AP23841 (Ariad), KU-0063794 (AstraZeneca/ Kudos), INK-128 (Intellikine), EX2044, EX3855, EX7518, WYE-125132 (Wyeth), XL765 (Exelisis), NV-128 (Novogen), WYE-125132 (Wyeth), EM101/

LY303511 (Emiliem).

Un inhibidor de mTor preferido para la presente invención es el everolimus (RAD001). El everolimus (RAD001) tiene el nombre químico de ((1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,
 5 30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-hidroxi-etoxi)-3-metoxi-ciclohexil]-1-metil-etil]-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-aza-triciclo-[30.3.1.04,9]-hexa-triaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona). El everolimus y sus análogos se describen en la Patente de los Estados Unidos de
 10 Norteamérica Número 5,665,772, en la columna 1, línea 39 a la columna 3, línea 11.

La estructura de los agentes activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales, se puede tomar de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de las
 15 bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications). El contenido correspondiente de las mismas se incorpora a la presente como referencia.

De la misma manera están comprendidas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los racematos
 20 correspondientes, diaestereoisómeros, enantiómeros, tautómeros, así como las modificaciones de cristal correspondientes de los compuestos anteriormente descritos (es decir, los compuestos de la fórmula (A) y los inhibidores de mTOR), en donde estén presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, los cuales se dan a
 25 conocer en las mismas. Los compuestos utilizados como ingredientes

activos en las combinaciones de la invención se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados, respectivamente. También, dentro del alcance de esta invención está la combinación de más de dos ingredientes activos separados como se estipula anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de esta invención podría incluir tres ingredientes activos o más.

En una modalidad, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A), o la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I") de una manera específica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A), o la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I") de una manera específica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor de mTor everolimus (RAD001) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las combinaciones farmacéuticas de la presente invención son útiles en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor en un animal de sangre caliente que

lo necesite. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A), o la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-
 5 pirrolidin-1,2-dicarboxílico (“Compuesto I”) de una manera específica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor.

10 El término “enfermedades dependientes de la cinasa mTOR” incluye, pero no se restringe a, los siguientes síntomas:

- Rechazo de trasplante de órganos o tejidos, por ejemplo, para el tratamiento de receptores de, por ejemplo, trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón,
 15 pancreáticos, de piel o córnea; enfermedad del injerto contra el huésped, tal como en seguida de trasplante de médula ósea;
- Restenosis;
- Síndromes de hamartoma, tales como esclerosis tuberosa o enfermedad de Cowden;
- 20 • Linfangioleiomiomatosis;
- Retinitis pigmentosa;
- Enfermedades autoinmunes, incluyendo encefalomiелitis, diabetes mellitus dependiente de insulina, lupus, dermatomiositis, artritis, y enfermedades reumáticas;
- 25 • Leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides;

- Enfermedades fibróticas, incluyendo esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis quística;
- Hipertensión pulmonar;
- Inmunomodulación;
- 5 • Esclerosis múltiple;
- Síndrome de VHL;
- Complejo de Carney;
- Poliposis adenomatosa familiar;
- Síndrome de poliposis juvenil;
- 10 • Síndrome de Birt-Hogg-Duke;
- Cardiomiopatía hipertrófica familiar;
- Síndrome de Wolf-Parkinson-White;
- Trastornos neurodegenerativos, tales como Parkinson, Huntington, Alzheimer, y demencias causadas por mutaciones tau,
- 15 ataxia espinocerebelar tipo 3, enfermedad de neuronas motoras causada por mutaciones SOD1, lipofucinoses ceroides neuronales/enfermedad de Batten (neurodegeneración pediátrica) ;
- Degeneración macular húmeda y seca;
- Consunción muscular (atrofia, caquexia), y miopatías,
- 20 tales como enfermedad de Danon;
- Infecciones bacterianas y virales, incluyendo M. tuberculosis, estreptococos del grupo A, HSV tipo I, infección por VIH;
- Neurofibromatosis, incluyendo Neurofibromatosis tipo 1;
- 25 • Síndrome de Peutz-Jeghers.

Adicionalmente, las “enfermedades dependientes de cinasa mTOR” incluyen las enfermedades proliferativas, tales como cánceres y otras malignidades relacionadas. Una lista no limitante de los cánceres asociados con las cascadas de señalización de mTor patológicas incluye cáncer de mama, carcinoma de células renales, tumores gástricos, tumores neuroendocrinos, linfomas, y cáncer de próstata.

Los ejemplos para una enfermedad proliferativa son, por ejemplo, tumor benigno o maligno, carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándula suprarrenal, vejiga, mama, estómago, tumores gástricos, de ovarios, colon, recto, próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, en especial carcinoma de colon o adenoma colo-rectal, o un tumor de cuello y cabeza, una hiper-proliferación epidérmica, soriasis, hiperplasia de próstata, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, linfomas, un carcinoma mamario, o una leucemia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la fórmula (A), o 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (Compuesto I) de una manera específica, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la elaboración de un medicamento para el

tratamiento o la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa mTor, mediante la administración de un compuesto de la fórmula (A), o 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (Compuesto I) de una manera específica, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación de un compuesto de la fórmula (A), o 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (Compuesto I) de una manera específica, y cuando menos un inhibidor de mTor seleccionado a partir del grupo que consiste en rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511, en donde los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso simultáneo,

separado, o en secuencia, para el tratamiento de las enfermedades dependientes de la cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR).

La presente invención proporciona un método para reducir o
5 bloquear la fosforilación y activación de AKT mediante los inhibidores de mTor, el cual comprende administrar un compuesto de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de una
10 enfermedad proliferativa dependiente de la fosforilación y activación adquirida de AKT durante el tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (A), o de una sal
15 farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que ha llegado a ser resistente o que tiene una sensibilidad reducida al
20 tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (A), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite. La
25 resistencia es, por ejemplo, debido a la fosforilación y activación de

AKT.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficacia del tratamiento de una enfermedad proliferativa con cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende 5 administrar una combinación que comprende un compuesto de la fórmula (A), o 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (Compuesto I) de una manera específica, o una sal 10 farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTor, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

El inhibidor de mTor utilizado de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar a partir de rapamicina RAD 15 (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE- 20 125132, y EM101/LY303511. Los inhibidores de mTor particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención son sirolimus y/o everolimus.

Las composiciones farmacéuticas o la combinación de acuerdo con la presente invención se pueden probar en estudios clínicos. Los 25 estudios clínicos adecuados pueden ser, por ejemplo, estudios de

escala de dosis, de etiqueta abierta, en pacientes con enfermedades proliferativas. Estos estudios prueban en particular el sinergismo de los ingredientes activos de la combinación de la invención. Los efectos benéficos sobre las enfermedades proliferativas se pueden
5 determinar directamente a través de los resultados de estos estudios, los cuales son conocidos como tales para una persona experta en este campo. Estos estudios pueden ser particularmente adecuados para comparar los efectos de una monoterapia utilizando los ingredientes activos y una combinación de la invención. De
10 preferencia, la dosis del agente (a) se escala hasta que se alcance la Máxima Dosificación Tolerada, y el agente (b) se administra con una dosis fija. De una manera alternativa, el agente (a) se puede administrar en una dosis fija y la dosis del agente (b) se puede escalar. Cada paciente puede recibir la dosis del agente (a) ya sea
15 diariamente, o bien de una forma intermitente. La eficacia del tratamiento se puede determinar en estos estudios, por ejemplo, después de 12, 18 ó 24 semanas, mediante la evaluación de los puntajes de síntomas cada 6 semanas.

La administración de una combinación farmacéutica de la
20 invención puede dar como resultado no solamente un efecto benéfico, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico, por ejemplo, con respecto a aliviar, demorar el progreso de, o inhibir los síntomas, sino también efectos benéficos adicionales sorprendentes, por ejemplo, más pocos efectos secundarios, una mejor calidad de
25 vida o una patología reducida, comparándose con una monoterapia

que aplique solamente uno de los ingredientes farmacéuticamente activos utilizados en la combinación de la invención.

Un beneficio adicional puede ser que se pueden utilizar dosis más bajas de los ingredientes activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que las dosificaciones no necesitan ser
5 solamente con frecuencia más pequeñas, sino que también se pueden aplicar con menor frecuencia, lo cual puede disminuir la incidencia o la gravedad de los efectos secundarios. Esto está de acuerdo con los deseos y requerimientos de los pacientes que se
10 vayan a tratar.

Es un objetivo de esta invención proporcionar una composición farmacéutica, la cual comprende una cantidad que es conjuntamente efectiva terapéuticamente para dirigirse a, o prevenir, una enfermedad dependiente del objetivo de mamífero de rapamicina
15 (mTOR) en un animal de sangre caliente, de (a) el compuesto de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) cuando menos un inhibidor de mTOR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En esta composición, los componentes
20 de combinación (a) y (b) se pueden administrar juntos, uno después del otro, o por separado en una forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación unitaria separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

25 En un aspecto, la presente invención proporciona una

composición farmacéutica, la cual comprende: (a) un compuesto de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) cuando menos un inhibidor de mTOR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la composición farmacéutica comprende una cantidad del compuesto de la fórmula (A), y cuando menos un inhibidor de mTOR, la cual es conjuntamente efectiva terapéuticamente contra una enfermedad dependiente del objetivo de mamífero de rapamicina (mTOR).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica, la cual comprende: (a) un compuesto de la fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) cuando menos un inhibidor de mTOR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente cuando menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso simultáneo, separado, o en secuencia. Los componentes de combinación (a) y (b) se pueden administrar juntos o por separado a un animal de sangre caliente que lo necesite.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones farmacéuticas para la administración separada del componente de combinación (a), y el componente de combinación (b), o para la administración en una combinación fija, es decir, una sola composición galénica comprendiendo cuando menos dos componentes de combinación (a) y (b), se pueden preparar de una manera conocida por sí misma, y son aquéllas adecuadas para su

administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo seres humanos, las cuales comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de cuando menos un componente de combinación farmacológicamente activo solo, por ejemplo, como se indica anteriormente, o en 5 combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en especial adecuados para aplicación enteral o parenteral.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, 10 excipiente, o portador con el que se administre el compuesto. Estos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquéllos de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí, y similares. De 15 preferencia se emplean agua o soluciones salinas en solución acuosa y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como los vehículos, en particular para las soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington's Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin.

20 Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para su administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquéllas que están en formas de dosificación unitaria, tales como tabletas recubiertas con azúcar, tabletas, cápsulas o supositorios, o ampolletas. Si no se indica de otra manera, éstas se 25 preparan de una manera conocida por sí misma, por ejemplo, por

medio de los procesos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución, o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario de un componente de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no
5 necesita constituir por sí mismo una cantidad efectiva, debido a que se puede alcanzar la cantidad efectiva necesaria mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden contener, por ejemplo, de aproximadamente el 0.1 por ciento a
10 aproximadamente el 99.9 por ciento, de preferencia de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 60 por ciento de los ingredientes activos. La cantidad real del compuesto de la fórmula (A) y el inhibidor de mTOR, administrada de acuerdo con la presente invención, dependerá de numerosos factores, tales como la
15 gravedad de la enfermedad que se vaya a tratar, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la vía y forma de administración, y otros factores. El fármaco se puede administrar más de una vez al día, de preferencia una o dos veces al día. Todos estos factores están dentro de la capacidad del clínico que atienda.

20 El compuesto de la fórmula (A) se puede administrar en las cantidades terapéuticamente efectivas en el intervalo de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día; de preferencia, de aproximadamente 0.1 a 25 miligramos/kilogramo/día, más
25 preferiblemente de aproximadamente 0.5 a 10 miligramos/kilogramo/

día. Por consiguiente, para su administración a una persona de 70 kilogramos, el intervalo de dosificación estaría más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 35 a 700 miligramos al día.

El inhibidor de mTOR everolimus (RAD001) se puede
5 administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación diaria de 0.5 a 1,000 miligramos; de preferencia en el intervalo de 0.5 miligramos a 15 miligramos; más preferiblemente en el intervalo de 0.5 miligramos a 10 miligramos.

En particular, se puede administrar una cantidad
10 terapéuticamente efectiva de cada uno de los componentes de combinación de la invención de una manera simultánea o en secuencia y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como una combinación fija., por ejemplo, el método para prevenir o tratar enfermedades proliferativas de acuerdo con la invención puede comprender: (i) la administración del
15 primer agente (a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, y (ii) la administración de un agente (b) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, de una manera simultánea o en secuencia en cualquier orden, en cantidades conjuntamente efectivas
20 terapéuticamente, de preferencia en cantidades sinérgicamente efectivas, por ejemplo, en dosificaciones diarias o intermitentes correspondientes a las cantidades descritas en la presente. Los componentes de combinación individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en diferentes tiempos
25 durante el curso de la terapia o de una manera concurrente en

formas de combinación divididas o individuales. Adicionalmente, el término administración también abarca el uso de un pro-fármaco de un componente de combinación que se convierta *in vivo* hasta el componente de combinación como tal. Por consiguiente, se debe
5 entender que la presente invención abarca todos los regímenes de tratamiento simultáneo o alternado, y el término "administración" se debe interpretar de conformidad con lo anterior.

La dosificación efectiva de cada uno del componentes de combinación empleados en la combinación de la invención puede
10 variar dependiendo del compuesto particular o de la composición farmacéutica empleada, del modo de administración, de la condición que se esté tratando, y de la gravedad de la condición que se esté tratando. Por consiguiente, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una
15 variedad de factores, incluyendo la vía de administración y la función renal y hepática del paciente. Un clínico o médico de una experiencia ordinaria puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de los ingredientes activos individuales requeridos para aliviar, contrarrestar, o detener el progreso de la condición. La
20 precisión óptima para alcanzar la concentración de los ingredientes activos dentro del intervalo que proporcione eficacia sin toxicidad, requiere de un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos para los sitios objetivo.

La presente invención comprende además las siguientes
25 modalidades:

• Una combinación sinérgica para su administración humana, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A), el cual es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-
5 tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, y cuando menos un inhibidor de mTOR, en forma libre o en la forma de una sal del mismo, en un intervalo de combinación que corresponde a un intervalo de combinación sinérgica de aproximadamente 330 nM a 3 μ M, y de aproximadamente 1 nM a 27
10 nM, respectivamente, en el modelo de células de cáncer de mama SKBR-3 o en el modelo de células de cáncer de mama BT-474.

• Una combinación sinérgica para su administración humana, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A), el cual es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-
15 tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, y cuando menos un inhibidor de mTOR, en forma libre o en la forma de una sal del mismo, en un intervalo de combinación que corresponde a un intervalo de combinación sinérgica de aproximadamente 12 nM a 100 nM, y de aproximadamente 1 nM a 27
20 nM, respectivamente, en el modelo de células de cáncer de mama T47-D.

• Una combinación sinérgica para su administración humana, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A), el cual es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-
25 tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-

dicarboxílico, y cuando menos un inhibidor de mTOR, en forma libre o en la forma de una sal del mismo, en un intervalo de combinación que corresponde a un intervalo de combinación sinérgica de aproximadamente 3 μ M, y de aproximadamente 1 nM a 27 nM, respectivamente, en el modelo de células de cáncer de mama ZR-75-1.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1: Efecto de la combinación de Everolimus (RAD001) con el Compuesto I en células tumorales de mama BT474 y MDA-MB-231 detectado mediante análisis Western Blot.

Material y Métodos

Preparación de compuestos:

El compuesto everolimus (RAD001) es sintetizado por Novartis Pharma AG. Se prepara una solución de suministro 20 mM en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y se almacena a -20°C. Se prepara una solución de suministro 10 mM de la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I") en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y se almacena a -20°C.

Células y condiciones de cultivo celular:

Las células de carcinoma de mama humano BT474 (ATCC HTB-26), y MDA-MB-231 (ATCC HTB-20), se obtienen en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA).

Las células BT474 se mantienen en un medio Hybri-Care (ATCC) complementado con suero fetal de becerro al 10 por ciento en volumen/volumen y L-glutamina 2 mM. Las células MDA-MB-231 se cultivan en un medio RPMI 1640 (Amimed, Allschwil, Suiza) complementado con suero fetal de becerro al 10 por ciento en volumen/volumen y L-glutamina 2 mM. Todos los medios se complementan con 100 microgramos/mililitro de penicilina/estreptomicina, y las células se mantienen a 37°C en CO₂ al 5 por ciento.

10 *Tratamiento celular y extracción de células:*

Las células BT474 y MDA-MB-231 se siembran a una densidad de 3.3×10^4 células/cm² y 1.6×10^4 células/cm², respectivamente, y se incuban durante 48 horas a 37°C y con CO₂ al 5 por ciento, antes del tratamiento con el vehículo de sulfóxido de dimetilo (DMSO), RAD001 20 nM, y/o diferentes concentraciones del Compuesto I durante 24 horas.

Los lisados celulares se preparan como sigue. Las placas de cultivo se lavan una vez con suero regulado con fosfato helado (PBS) que contiene PMSF 1 mM, y una vez con regulador de extracción helado [Hepes 50 mM (pH de 7.4), NaCl 150 mM, β -glicerofosfato 25 mM, NaF 25 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, PPi 15 mM, orto-vanadato de sodio 2 mM, molibdato de sodio 10 mM, leupeptina (10 microgramos/mililitro), aprotinina (10 microgramos/mililitro), DTT 1 mM, y PMSF 1 mM]. Los inhibidores de proteasa se adquieren en SIGMA Chemical, St. Louis, Mo. Las células se extraen en el mismo

regulador, que contiene NP-40 al 1 por ciento (SIGMA Chemicals). Los extractos se homogeneizan, se aclaran mediante centrifugación, se ponen en alícuotas, y se congelan a -80°C . La concentración de proteína se determina con El Ensayo de Proteína BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA).

Inmunotransferencia:

Veinte microgramos de extractos celulares se resuelven electroforéticamente sobre geles desnaturalizantes de dodecil-sulfato de sodio/poliacrilamida al 12 por ciento (SDS-PAGE), y se transfieren a filtros de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) mediante transferencia húmeda (1 hora a 250 mA), y se sondean durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:

(a) Anti-fosfo-Akt (S_{473}) (clon 14-05; 1:2000) se obtiene en DAKO (Glostrup, Dinamarca), y se diluye en suero regulado con fosfato (PBS), Tween al 0.5 por ciento en volumen/volumen, leche al 0.5 por ciento en peso/volumen.

(b) Anti-fosfo-MAPK ($\text{T}_{202}/\text{Y}_{204}$) (clon ECA297; 1:50) se obtiene en DAKO (Glostrup, Dinamarca), y se diluye en suero regulado con fosfato (PBS), Tween al 0.5 por ciento en volumen/volumen, leche al 0.5 por ciento en peso/volumen.

(c) Anti-fosfo-MEK 1/2 ($\text{S}_{217}/\text{S}_{221}$) (cat # 9154; 1:1000) se obtiene en Cell Signaling Technology, y se diluye en suero regulado con fosfato (PBS), Tween al 0.1 por ciento en volumen/volumen, leche al 0.5 por ciento en peso/volumen.

(d) Anti-Actina (cat # MAB1501; 1:20,000) se obtiene en Chemicon (Billerica, MA, EUA), y se diluye en suero regulado con fosfato (PBS), Tween al 0.1 por ciento en volumen/volumen.

Después de la incubación con el anticuerpo primario apropiado
5 (como se enlista anteriormente), las proteínas decoradas se revelan
utilizando inmunoglobulinas anti-ratón o anti-conejo conjugadas con
peroxidasa de radícula roja, seguidas por una quimiluminiscencia
mejorada (kit ECL Plus; Amersham Pharmacia Biotech,
Buckinghamshire, Reino Unido), y se cuantifican utilizando el
10 software Quantity One (Bio-Rad, Munich, Alemania).

Cada extracto celular se cuantifica además mediante la metodología de Arreglo Inverso de Proteínas como se describe en seguida.

Cada uno de los extractos celulares se mancha sobre chips de
15 microarreglos de proteína PWG ZeptoMARK® (Zeptosens, Witterswil, Suiza) con el Nano-Graficador sin contacto basado en micro-dosificación piezoeléctrica Nano-Plotter 2.1 (GeSiM, Grosserkmannsdorf, Alemania). Después de manchar los microarreglos de proteína ZeptoMARK®, los chips se incuban
20 durante 1 hora a 37°C. Para recibir un resultado de bloqueo uniforme, se administra el regulador de bloqueo BB! CeLyA (Zeptosens, Cat. No. 9040) por medio de un nebulizador ultrasónico. Después de 30 minutos de bloqueo, los chips se enjuagan extensamente con agua desionizada (calidad Milli-Q, 18MΩ x cm), y
25 se secan en un flujo de aire con nitrógeno.

Después del procedimiento de manchado y bloqueo de la muestra, los chips ZeptoMARK® se transfieren al ZeptoCARRIER (Zeptosens, Cat. No. 1100), cuyas seis celdas de flujo resuelven
5 individualmente los seis arreglos sobre un chip, y se lavan dos veces con 200 microlitros de regulador de ensayo CAB1 CeLyA (Zeptosens, Cat. No. 9032). El regulador de ensayo se aspira entonces, y cada compartimiento se incuba con 100 microlitros del anticuerpo objetivo
10 primario (pAkt Ser473: CST#4060; pAkt Thr308: CST#2965, Akt1 pan: Epitomics # 1085-1) a temperatura ambiente durante la noche. Después de la incubación, se remueve el anticuerpo primario, los arreglos se lavan dos veces con regulador CAB1 y se incuban
adicionalmente con 100 microlitros de fragmentos Fib de IgG anti-conejo marcados con Alexa-fluor 647 (Nitrógeno; #Z25305) durante
15 una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, los arreglos se lavan dos veces con 200 microlitros de regulador CAB1. La fluorescencia de los fragmentos Fib enlazados con el objetivo se lee en el ZeptoReader (Zeptosens, Witterswil, Suiza) utilizando un dispositivo de láser (longitud de onda de
20 excitación de 635 nanómetros), y una cámara CCD. La señal de fluorescencia se evaluó con los tiempos de exposición de 1, 3, 5 y 10 segundos, dependiendo de la intensidad de la señal.

Las imágenes de fluorescencia para cada arreglo se analizan con el software ZeptoVIEW Pro 2.0 (Zeptosens, Witterswil, Suiza), y
25 se calcula el RFI para cada señal.

Anticuerpos y diluciones de anticuerpos empleadas en este experimento:

5	Antígeno	Proveedor	Ref.	Dilución
	pAkt Ser473	Cell Signaling Technology	4060	1/ 500
	Akt 1 pan	Epitomics	1085-1	1/ 500
10	Zenon® Alexa Fluor 647 conejo	Invitrogen	Z25305	1/ 500

Resultados:

15 Los niveles de fosforilación de AKT(S473), MAPK (T202/Y204), MEK1/2 (S217/S221), y los niveles totales de actina en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en las células tumorales de mama BT474, determinados mediante análisis Western Blot, se ilustran en la

20 Figura 1.

Los niveles de fosforilación de AKT(S473), AKT (T308), y los niveles totales de AKT en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en las células tumorales de mama BT474, como se cuantifican mediante el

25 Arreglo Inverso de Proteína, se ilustran en las Figuras 2 a 4,

respectivamente.

Los niveles de fosforilación de AKT(S473), MAPK (T202/Y204), y los niveles totales de actina en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el
5 Compuesto I, en las células tumorales de mama MDA-MB231, determinados mediante análisis Western Blot, se ilustran en la Figura 5.

Los niveles de fosforilación de AKT(S473), AKT (T308), y los niveles totales de AKT en la presencia de everolimus (RAD001), y de
10 everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican mediante Arreglo Inverso de Proteína, se ilustran en las Figuras 6 a 8, respectivamente.

Los niveles de fosforilación de AKT(S473), y los niveles totales
15 de AKT en la presencia de everolimus (RAD001), y de everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en las células tumorales de mama MDA-MB231, determinados mediante análisis Western Blot, y cuantificados utilizando el software Quantity One, como se muestra en la Figura 9, en un segundo conjunto de
20 experimentos.

Los niveles de fosforilación de AKT(S473), AKT (T308), y los niveles totales de AKT en la presencia de everolimus (RAD001), y de
everolimus (RAD001) en combinación con el Compuesto I, en las células tumorales de mama MDA-MB231, como se cuantifican, en un
25 segundo conjunto de experimentos, mediante Arreglo Inverso de

Proteína, se ilustran en las Figuras 10 a 12, respectivamente.

Ejemplo 2: Efecto de la combinación de Everolimus (RAD001) con el Compuesto I en el modelo de células de cáncer de mama humano SKBR-3

Material y métodos

La línea celular de cáncer de mama humano SKBR-3 se adquiere en American Type Cell Collection. La línea celular de cáncer de mama humano SKBR-3 se amplifica con HER2. La línea celular de cáncer de mama humano SKBR-3 se cultiva a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5 por ciento en RPMI 1640 (ATCC #30-2001) u otro medio sugerido complementado con suero bovino fetal al 10 por ciento, 2 milimoles/litro de glutamina y piruvato de sodio al 1 por ciento.

Ensayo de proliferación celular:

La viabilidad celular se determina mediante la medición del contenido celular de ATP utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega #G7573) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Dicho de una manera breve, se emplacan de 1,500 a 50,000 células en placas ya sea de 384 o bien de 96 pozos en 25 microlitros (384 pozos) o en 100 microlitros (96 pozos) del medio de cultivo, las células se dejan adherirse durante la noche, y seguido por 72 horas de incubación con diferentes concentraciones de fármacos o de combinaciones de fármacos; al final del tratamiento con el fármaco, se agrega un volumen igual del reactivo CellTiter-Glo

a cada pozo para lisar las células, y se registran las señales de luminiscencia en un lector de placas Envision.

Método para calcular el efecto de la combinación:

Para evaluar el efecto de la combinación de everolimus (RAD001), y 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I"), y para identificar el efecto sinérgico potencial en todas las posibles concentraciones, se conducen los estudios de la combinación con una "matriz de dosis", en donde se prueba una combinación en todas las posibles permutaciones de everolimus diluido en serie (RAD001), y las dosis del Compuesto I como único agente, y en todos los ensayos de combinación, los compuestos se aplican de una manera simultánea. Las curvas de respuesta a la dosis de un solo agente, IC_{50} , IC_{90} , y el sinergismo se analizan todos utilizando el software Chalice (CombinatoRx, Cambridge, MA). El sinergismo se calcula mediante la comparación de una respuesta de la combinación a aquéllos de sus agentes individuales, contra el modelo de referencia de dosis aditiva del fármaco consigo mismo. Las desviaciones a partir de la aditividad de la dosis se pueden evaluar visualmente en un Isobolograma, o numéricamente con un Índice de Combinación. El exceso de inhibición comparándose con la aditividad también se puede graficar como un diagrama de matriz de dosis completa para capturar en dónde se presentan los sinergismos. Con el fin de cuantificar la fuerza global de los efectos de la combinación, también se calcula

una puntuación de volumen $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{\text{datos}} - I_{HSA})$ entre los datos y la superficie más alta del agente individual, normalizada para los factores de dilución del agente individual f_X, f_Y .

Resultados:

5 El efecto del agente individual y del tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la proliferación celular se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow (CTG) descrito anteriormente. Las células se emplazan a 3,000 células por pozo en placas de 384 pozos por triplicado, y se tratan con el compuesto
10 durante 72 horas antes de la medición (Figura 13). En este estudio de “matriz de dosis”, el everolimus (RAD001) se somete a una dilución en serie de 4 dosis 3 veces con la dosis alta a 27 nM, y la dosis baja a 1 nM, y el Compuesto I se somete a una dilución en serie de 7 dosis 3 veces con la dosis alta a 3 μ M y con la dosis baja
15 a aproximadamente 4 nM.

Los resultados de este estudio se estipulan en la Figura 13. El Compuesto I solo provoca una inhibición dependiente de la concentración del crecimiento celular con la A_{max} , la máxima fracción de inhibición = 0.40 (inhibición del crecimiento del 40 por ciento comparándose con el control de sulfóxido de dimetilo (DMSO)); el
20 everolimus (RAD001) exhibe un nivel similar de un efecto inhibidor del crecimiento menor sobre la proliferación celular que un agente individual, y nunca alcanzó una IC_{50} , y la $A_{\text{max}} = 0.32$. El tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I refuerza de una
25 manera significativa el máximo nivel de inhibición, con $A_{\text{max}} = 0.63$

comparándose con cualquiera de los agentes individuales (everolimus (RAD001) $A_{\max} = 0.32$, y el Compuesto I $A_{\max} = 0.40$). Sobre toda la matriz de dosis, se observan mejores actividades sinérgicas para el everolimus (RAD001) en todas las dosis (1 nM a 27 nM), y parte de los intervalos de dosis más altos para el Compuesto I (de 330 nM a 3 μ M). En concentraciones relativamente bajas del Compuesto I (de 4 nM a 37 nM), la combinación no parece exhibir un beneficio adicional comparándose con el Compuesto I y everolimus (RAD001) como tratamientos con un solo agente en este experimento.

Ejemplo 3: Efecto de la combinación de Everolimus (RAD001) con el Compuesto I en células tumorales de mama BT-474

Material y métodos

La línea celular de cáncer de mama humano BT-474 se adquiere en la American Type Cell Collection. La línea celular de cáncer de mama humano BT-474 incluye tanto la mutación PIK3CA como la amplificación HER2. La línea celular de cáncer de mama BT-474 se cultiva a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5 por ciento en RPMI 1640 (ATCC #30-2001) u otro medio sugerido complementado con suero bovino fetal al 10 por ciento, 2 milimoles/litro de glutamina, y piruvato de sodio al 1 por ciento.

Ensayo de proliferación celular:

La viabilidad celular se determina mediante la medición del contenido celular de ATP utilizando el ensayo de viabilidad celular

luminiscente CellTiter-Glo® (Promega #G7573) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Dicho de una manera breve, se emplacan de 1,500 a 50,000 células en placas ya sea de 384 o bien de 96 pozos en 25 microlitros (384 pozos) o 100 microlitros (96 pozos) del medio de cultivo, las células se dejaron adherirse durante la noche, y seguido por 72 horas de incubación con diferentes concentraciones de fármacos o combinaciones de fármacos; al final del tratamiento con el fármaco, se agrega un volumen igual del reactivo CellTiter-Glo a cada pozo para lisar las células, y se registran las señales de luminiscencia en un lector de placas Envision.

Método para calcular el efecto de la combinación:

Para evaluar el efecto de la combinación de everolimus (RAD001), y 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I"), y para identificar el efecto sinérgico potencial en todas las posibles concentraciones, se conducen los estudios de la combinación con una "matriz de dosis", en donde se prueba una combinación en todas las posibles permutaciones de everolimus diluido en serie (RAD001), y dosis del Compuesto I como único agente, y en todos los ensayos de combinación, los compuestos se aplican de una manera simultánea. Las curvas de respuesta a la dosis de un solo agente, IC₅₀, IC₉₀, y el sinergismo, se analizan todos utilizando el software Chalice (CombinatoRx, Cambridge, MA). El sinergismo se calcula mediante la comparación de una respuesta de la combinación a aquéllos de sus agentes

individuales, contra el modelo de referencia de dosis aditiva del fármaco consigo mismo. Las desviaciones a partir de la aditividad de la dosis se pueden evaluar visualmente en un Isoblograma, o numéricamente con un Índice de Combinación. El exceso de inhibición comparándose con la aditividad también se puede graficar como un diagrama de matriz de dosis completa para capturar en dónde se presentan los sinergismos. Con el fin de cuantificar la fuerza global de los efectos de la combinación, también se calcula una puntuación de volumen $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{\text{datos}} - I_{HSA})$ entre los datos y la superficie más alta del agente individual, normalizada para los factores de dilución del agente individual f_X, f_Y .

Resultados:

El efecto del agente individual y el tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la proliferación celular se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow (CTG) descrito anteriormente. El efecto del agente individual y el tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la proliferación celular se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow (CTG) descrito anteriormente. El establecimiento del experimento es idéntico al procedimiento del experimento descrito anteriormente para el modelo SKBR-3 (Figura 14). Y se aplica la misma “matriz de dosis” (everolimus (RAD001): 4 dosis, 3X, de 1 nM a 27 nM, Compuesto I: 7 dosis, 3X, de 4 nM a 3 µM).

Los resultados de este estudio se estipulan en la Figura 14. El Compuesto I solo provoca una inhibición dependiente de la

concentración del crecimiento celular con la IC_{50} alrededor de 3 μM y una A_{max} de alrededor de 0.53 (inhibición del crecimiento del 53 por ciento comparándose con el control de sulfóxido de dimetilo (DMSO)); el everolimus (RAD001) exhibe un efecto inhibidor del crecimiento menor sobre la proliferación celular como un agente individual, nunca alcanza una IC_{50} , y la $A_{max} = 0.36$. El tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I refuerza de una manera significativa el máximo nivel de inhibición, con $A_{max} = 0.66$ comparándose con cualquiera de los agentes individuales (everolimus (RAD001) $A_{max} = 0.36$, y el Compuesto I $A_{max} = 0.53$). Sobre toda la matriz de dosis, se observan mejores actividades sinérgicas para el everolimus (RAD001) en todas las dosis (de 1 nM a 27 nM), y el Compuesto I en dosis alta (de 330 nM a 3 μM). En concentraciones más bajas del Compuesto I (de 4 nM a 37 nM), la combinación no parece exhibir un beneficio adicional comparándose con el Compuesto I y everolimus (RAD001) como tratamientos con un solo agente en este experimento.

Ejemplo 4: Efecto de la combinación de Everolimus (RAD001) con el Compuesto I en un modelo células de cáncer de mama humano T47-D

Material y métodos

La línea celular de cáncer de mama humano T47-D se adquiere en American Type Cell Collection. La línea celular de cáncer de mama humano T47-D incluye la mutación PIK3CA. La línea celular de

cáncer de mama humano T47-D se cultiva a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5 por ciento en RPMI 1640 (ATCC #30-2001) u otro medio sugerido complementado con suero bovino fetal al 10 por ciento, 2 milimoles/litro de glutamina, y piruvato de sodio al 1 por ciento.

5 *Ensayo de proliferación celular:*

La viabilidad celular se determina mediante la medición del contenido celular de ATP utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega #G7573) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Dicho de una manera breve, se emplacan de
 10 1,500 a 50,000 células en placas ya sea de 384 o bien de 96 pozos en 25 microlitros (384 pozos) o 100 microlitros (96 pozos) de medio de cultivo, las células se dejan adherirse durante la noche, y seguido por 72 horas de incubación con diferentes concentraciones de fármacos o combinaciones de fármacos; al final del tratamiento con
 15 el fármaco, se agrega un volumen igual del reactivo CellTiter-Glo a cada pozo para lisar las células, y se registran las señales de luminiscencia en un lector de placas Envision.

Método para calcular el efecto de la combinación:

Para evaluar el efecto de la combinación de everolimus
 20 (RAD001) y 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (“Compuesto I”), y para identificar el efecto sinérgico potencial en todas las posibles concentraciones, se conducen estudios de la combinación con una “matriz de dosis”, en donde se
 25 prueba una combinación en todas las posibles permutaciones de

everolimus diluido en serie (RAD001), y dosis del Compuesto I como
 único agente, y en todos los ensayos de combinación, los
 compuestos se aplican de una manera simultánea. Las curvas de
 respuesta a la dosis de un solo agente, IC_{50} , IC_{90} , y el sinergismo se
 5 analizan todos utilizando el software Chalice (CombinatoRx,
 Cambridge MA). El sinergismo se calcula mediante la comparación
 de una respuesta de la combinación con aquéllos de sus agentes
 individuales, contra el modelo de referencia de dosis aditiva del
 fármaco consigo mismo. Las desviaciones a partir de la aditividad de
 10 la dosis se pueden evaluar visualmente en un Isoblograma o
 numéricamente con un Índice de Combinación. El exceso de
 inhibición comparándose con la aditividad también se puede graficar
 como un diagrama de matriz de dosis completa para capturar en
 dónde se presentan los sinergismos. Con el fin de cuantificar la
 15 fuerza global de los efectos de la combinación, también se calcula
 una puntuación de volumen $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{\text{datos}} - I_{HSA})$ entre los
 datos y la superficie más alta del agente individual, normalizada para
 los factores de dilución del agente individual f_X, f_Y .

Resultados:

20 El efecto del agente individual y el tratamiento concomitante
 con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la proliferación celular
 se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow (CTG) descrito
 anteriormente. El efecto del agente individual y el tratamiento
 concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la
 25 proliferación celular se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow

(CTG) descrito anteriormente. El establecimiento del experimento es idéntico al procedimiento del experimento descrito anteriormente para el modelo SKBR-3 (Figura 15). Y se aplica la misma “matriz de dosis” (everolimus (RAD001): 4 dosis, 3X, de 1 nM a 27 nM, 5 Compuesto I: 7 dosis, 3X, de 4 nM a 3 μ M).

Los resultados de este estudio se estipulan en la Figura 15. El Compuesto I solo provoca una inhibición dependiente de la concentración significativa del crecimiento celular con la IC_{50} de alrededor de 330 nM y la A_{max} de alrededor de 0.67 (inhibición del crecimiento del 67 por ciento comparándose con el control de sulfóxido de dimetilo (DMSO)); el everolimus (RAD001) exhibe un efecto inhibidor del crecimiento menor sobre la proliferación celular como un agente individual, y nunca alcanzó una IC_{50} , y la A_{max} = 0.37. El tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/ 10 Compuesto I no refuerza el máximo nivel de inhibición, con A_{max} = 0.68, comparable con el tratamiento con el Compuesto I como único agente (A_{max} = 0.67). Sobre toda la matriz de dosis, se observan actividades ligeramente mejoradas y débilmente sinérgicas se observan para el everolimus (RAD001) en todas las dosis (de 1 nM a 15 27 nM), y en la dosis relativa del Compuesto I (de 12 nM a 100 nM). En el extremo tanto alto como bajo de las concentraciones del Compuesto I (4nM, de 330 nM a 3 μ M), la combinación no parece exhibir un beneficio adicional comparándose con el Compuesto I y everolimus (RAD001) como tratamientos con un solo agente en este 20 25 experimento.

Ejemplo 5: Efecto de la combinación de Everolimus (RAD001) con el Compuesto I en el modelo de cáncer de mama humano ZR-75-1

Material y métodos

5 La línea celular de cáncer de mama humano ZR-75-1 se adquiere en American Type Cell Collection. La línea celular de cáncer de mama humano ZR-75-1 incluye la mutación PTEN. La línea celular de cáncer de mama humano ZR-75-1 se cultiva a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5 por ciento en RPMI 1640 (ATCC #30-2001) u otro medio sugerido complementado con suero bovino fetal al 10 por ciento, 2 milimoles/litro de glutamina, y piruvato de sodio al 1 por ciento.

Ensayo de proliferación celular:

15 La viabilidad celular se determina mediante la medición del contenido celular de ATP utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega #G7573) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Dicho de una manera breve, se emplacan de 1,500 a 50,000 células en placas ya sea de 384 o bien de 96 pozos en 25 microlitros (384 pozos) o 100 microlitros (96 pozos) de medio de cultivo; las células se dejan adherirse durante la noche, y seguido por 72 horas de incubación con diferentes concentraciones de fármacos o combinaciones de fármacos; al final del tratamiento con el fármaco, se agrega un volumen igual del reactivo CellTiter-Glo a cada pozo para lisar las células, y se registran las señales de
20
25 luminiscencia en un lector de placas Envision.

Método para calcular el efecto de la combinación:

Para evaluar el efecto de la combinación de everolimus (RAD001) y 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (“Compuesto I”), y para identificar el efecto sinérgico potencial en todas las posibles concentraciones, se conducen estudios de la combinación con una “matriz de dosis”, en donde se prueba una combinación en todas las posibles permutaciones de everolimus diluido en serie (RAD001), y dosis del Compuesto I como único agente, y en todos los ensayos de combinación, los compuestos se aplican de una manera simultánea. Las curvas de respuesta a la dosis de un solo agente, IC_{50} , IC_{90} , y el sinergismo, se analizan todos utilizando el software Chalice (CombinatoRx, Cambridge MA). El sinergismo se calcula mediante la comparación de una respuesta de la combinación con aquéllos de sus agentes individuales, contra el modelo de referencia de dosis aditiva del fármaco consigo mismo. Las desviaciones a partir de la aditividad de la dosis se pueden evaluar visualmente en un Isoblograma o numéricamente con un Índice de Combinación. El exceso de inhibición comparándose con la aditividad también se puede graficar como un diagrama de matriz de dosis completa para capturar en dónde se presentan los sinergismos. Con el fin de cuantificar la fuerza global de los efectos de la combinación, también se calcula una puntuación de volumen $V_{HSA} = \sum_{X,Y} \ln f_X \ln f_Y (I_{\text{datos}} - I_{HSA})$ entre los

datos y la superficie más alta del agente individual, normalizada para los factores de dilución del agente individual f_x, f_y .

Resultados:

El efecto del agente individual y el tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la proliferación celular se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow (CTG) descrito anteriormente. El efecto del agente individual y el tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I sobre la proliferación celular se evalúa utilizando el ensayo Cell-titer-glow (CTG) descrito anteriormente. El establecimiento del experimento es idéntico al procedimiento del experimento descrito anteriormente para el modelo SKBR-3 (Figura 16). Y se aplica la misma “matriz de dosis” (everolimus (RAD001): 4 dosis, 3X, de 1 nM a 27 nM, Compuesto I: 7 dosis, 3X, de 4 nM a 3 μ M).

Los resultados de este estudio se estipulan en la Figura 16. El Compuesto I solo no provoca una inhibición significativa sobre el crecimiento celular con la A_{max} alrededor de 0.16 (inhibición del crecimiento del 16 por ciento comparándose con el control de sulfóxido de dimetilo (DMSO)); el everolimus (RAD001) exhibe un mejor efecto inhibidor del crecimiento sobre la proliferación celular como un agente individual, con la IC_{50} alrededor de 15nM, y la $A_{max} = 0.55$. El tratamiento concomitante con everolimus (RAD001)/Compuesto I refuerza de una manera significativa el máximo nivel de inhibición, con $A_{max} = 0.67$ comparándose con cualquiera de los agentes individuales (everolimus (RAD001) $A_{max} = 0.55$, y el

Compuesto I $A_{\max} = 0.16$). Sin embargo, sobre toda la matriz de dosis, se observa un refuerzo del efecto significativo y débilmente sinérgico en la dosis más alta del Compuesto I (3 μM). En el intervalo de dosis más baja del Compuesto I (de 4 nM a 1 μM), la combinación no
 5 parece exhibir un beneficio adicional comparándose con el Compuesto I y everolimus (RAD001) como tratamientos con un solo agente en este experimento.

10 **Ejemplo 6: Efecto de la combinación de Everolimus (RAD001) con el Compuesto I en el modelo de xenoinjerto en ratón sin pelo de carcinoma de próstata humano DU145**

Métodos y Materiales:

Se utilizan ratones sin pelo machos de 8 semanas de edad (nu/nu, Harlan) que tienen un intervalo de peso corporal (BW) de
 15 21.0 a 31.3 gramos en el día 1 del estudio. Los animales se alimentan con agua al gusto (ósmosis inversa, 1 ppm de Cl), y Dieta de Laboratorio Modificada e Irradiada NIH 31 (R) que consiste en el 18.0 por ciento de proteína cruda, el 5.0 por ciento de grasa cruda, y el 5.0 por ciento de fibra cruda. Los ratones se alojan en Camas para
 20 Animales de Laboratorio irradiadas Enrich-o'cobs(TM) en micro-aisladores estáticos con un ciclo de 12 horas de luz a 21-22°C y con el 40 al 60 por ciento de humedad.

La línea celular de carcinoma de próstata humano DU145 se obtiene en la American Type Culture Collection (ATCC). La línea
 25 celular DU145 se mantiene como cultivos que crecen

exponencialmente en el medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10 por ciento, glutamina 2 mM, 100 unidades/mililitros de penicilina G-sodio, 100 microgramos/mililitro de sulfato de estreptomicina, 2 microgramos/mililitro de gentamicina, HEPES 10 mM, y Bicarbonato de sodio al 0.075 por ciento. Las células tumorales se cultivan en matraces de cultivo de tejido en una incubadora humidificada a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5 por ciento y con el 95 por ciento de aire.

Las células de carcinoma de próstata DU145 se cosechan durante el crecimiento exponencial, y se vuelven a suspender en una concentración de 5×10^7 células/mililitro en suero regulado con fosfato (PBS) frío con Matrigel^{MR} al 50 por ciento (BD Biosciences). Cada ratón sin pelo se inyecta subcutáneamente en el flanco derecho con 0.2 mililitros de la suspensión (1×10^7 células). Los tumores se calibraron en dos dimensiones para monitorear el crecimiento a medida que su volumen promedio se aproximaba al intervalo deseado de 100 a 150 milímetros cúbicos. El tamaño del tumor, en milímetros cúbicos, se calcula a partir de: Volumen del tumor = (anchura² x longitud)/2. El peso del tumor se puede estimar con la asunción de que 1 miligramo es equivalente a 1 milímetro cúbico de volumen tumoral. Siete días después de la implantación del tumor, en el día 1 del estudio, los ratones con tamaños tumorales individuales de 144 a 196 milímetros cúbicos se clasifican en 11 grupos de diez ratones, con un volumen tumoral promedio del grupo de 181 a 184 milímetros cúbicos.

La 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico ("Compuesto I") se agita en N-metil-pirrolidona (NMP; 5 volumen final del 10 por ciento) a temperatura ambiente hasta disolverse. Se agregó polietilenglicol 300 (PEG300) (volumen final del 30 por ciento), seguido por Solutol® HSS15 (volumen final del 20 por ciento), y la mezcla se agita hasta quedar homogénea. El volumen final se alcanza mediante la adición de agua desionizada 10 (volumen final del 40 por ciento). El vehículo del Compuesto I, NMP: PEG300: Solutol® HS15: agua desionizada (10:30:20:60), se designa como el "Vehículo 1". Se preparan soluciones para las dosis más bajas mediante la dilución de la solución de dosis alta con el Vehículo 1. Se preparan soluciones de dosificación frescas 15 semanalmente, y se almacenan a 4 °C, protegidas de la luz.

El everolimus (RAD001) se formula en una microemulsión que contiene el ingrediente activo al 2 por ciento (peso/peso), es decir, 20 miligramos de RAD001/gramo; la densidad de la microemulsión es de 0.995 gramos/cm³. La microemulsión de RAD001 se pone en 20 alícuotas, e inicialmente se almacena a -20 °C. Se descongela una alícuota del suministro, se divide en porciones diarias ponderadas, y se almacena a 4 °C. En cada día del tratamiento, una alícuota de RAD001 se lleva hasta la temperatura ambiente, y se diluye con dextrosa en agua (D5W), para proporcionar una solución de 1 25 miligramo/mililitro para la dosis más alta. Este suministro se diluye

con D5W para preparar soluciones para las dosis más bajas. La microemulsión de placebo se diluye con D5W, y se designa como el “Vehículo 2”.

Plan de tratamiento:

5 El Compuesto I, RAD001, y sus vehículos, se administran cada uno mediante intubación oral (p.o.) una vez al día durante veintiún días consecutivos (qd x 21). Para las terapias de combinación en los Días 1-20, el RAD001 se dosifica dentro de 30 minutos después del Compuesto I. En el día 21 y en el día 7 en el Grupo 10, se dosifica el
10 RAD001 seguido inmediatamente por el Compuesto I, sobre una base de jaula por jaula. El paclitaxel se administra por medio de inyecciones de bolo en la vena de la cola (i.v.) una vez al día el los días alternados para cinco dosis (qod x 5). El volumen de dosificación (10 mililitros/kilogramo, 2 mililitros/20 gramos por ratón)
15 se escala al peso de cada animal como se determine en el día de la dosificación, excepto en los fines de semana, cuando se llevan adelante los pesos corporales (BW_s) del viernes.

11 grupos de ratones sin pelo (n = 10 por grupo) se tratan como sigue: Los ratones del Grupo 1 reciben el Vehículo 1 y el
20 Vehículo 2, y sirven como controles para todos los análisis. Los Grupos 2 a 4 reciben monoterapias con 12.5, 25, y 50 miligramos/kilogramo del Compuesto I, respectivamente. Los Grupos 5 a 7 reciben monoterapias con 2.5, 5, y 10 miligramos/kilogramo de RAD001, respectivamente. El Grupo 8 recibe 12.5 miligramos/
25 kilogramo del Compuesto I en combinación con 10 miligramos/

kilogramo de RAD001. El Grupo 9 recibe 25 miligramos/kilogramo del Compuesto I en combinación con 5 miligramos/kilogramo de RAD001. El Grupo 10 recibe 50 miligramos/kilogramo del Compuesto I en combinación con 2.5 miligramos/kilogramo de RAD001; debido a la toxicidad, este tratamiento se detiene después de siete dosis de cada agente (qd x 7). El Grupo 11 recibe 25 miligramos/kilogramo de paclitaxel.

Inhibición del crecimiento tumoral:

La eficacia de tratamiento se determina en el día 21. Para el propósito de los análisis estadísticos y gráficos, ΔTV , la diferencia en el volumen del tumor entre el día 1 (el inicio de la dosificación), y el día del punto final, se determina para cada animal que sobreviva al día 21. Para cada grupo de tratamiento, la respuesta en el día del punto final se calcula mediante la siguiente relación:

$$T/C(\%) = 100 \times \Delta T / \Delta C, \text{ para } \Delta T > 0$$

en donde ΔT = (volumen promedio del tumor del grupo tratado en el día del punto final) – (volumen promedio del tumor del grupo tratado en el día 1), y ΔC = (volumen promedio del tumor del grupo de control en el día del punto final) – (volumen promedio del tumor del grupo de control en el día 1). Un tratamiento que alcance un valor T/C del 40 por ciento o menos se puede clasificar como potencialmente activo terapéuticamente.

Criterios para las Respuestas de Regresión:

La eficacia del tratamiento también se puede determinar a partir del número de respuestas de regresión. El tratamiento puede

provocar una regresión parcial (PR) o una regresión completa (CR) del tumor en un animal. Una regresión parcial (PR) indica que el volumen del tumor es del 50 por ciento o menos de su volumen en el día 1 para tres mediciones consecutivas durante el transcurso del estudio, e igual o mayor de 13.5 milímetros cúbicos para una o más de estas tres mediciones. Una regresión completa (CR) indica que el volumen del tumor es menor de 13.5 milímetros cúbicos para tres mediciones consecutivas durante el transcurso del estudio.

Toxicidad:

Los animales se pesan en los Días 1 a 5, y en cada día del tratamiento (excepto en los días del fin de semana) hasta el final del estudio. La toxicidad aceptable para la máxima dosis tolerada se define como una pérdida de peso corporal (BW) promedio del grupo de menos del 15 por ciento durante la prueba, y no más de una muerte relacionada con el tratamiento (TR) entre diez animales. Cualquier animal con pérdidas del peso corporal (BW) que excedan al 20 por ciento para una medición, se debe eutanizar y clasificar como una muerte relacionada con el tratamiento (TR), a menos que sea la primera muerte en el grupo. Las muertes no relacionadas con el tratamiento (NTR) se van a categorizar como NTRa (debidas a un accidente o a un error), NTRu (debidas a causas desconocidas), o NTRm (diseminación del tumor por invasión y/o metástasis confirmada en la necropsia). Con el fin de conservar los animales mientras que se proporcione la máxima información, la primera muerte en un grupo se va a clasificar como debida a causas

desconocidas (NTRu), pero la muerte se debe volver a clasificar como relacionada con el tratamiento (TR) si el desempeño subsiguiente del grupo muestra que el tratamiento es tóxico.

Muestreo:

5 En el día 7, los Animales #1-4 en el Grupo 10 se eutanizan 2 horas después de la dosificación mediante punción cardíaca térmica bajo anestesia con CO₂. En el día 8, a las 24 horas después de la dosificación, el Animal #5 se muestrea de la misma manera. Se recolecta el volumen completo de sangre a partir de cada animal, y
10 se procesa individualmente para determinar el plasma con K-EDTA como anticoagulante. Las muestras de plasma se congelan a -80 °C. Los tumores se separan y se congelan instantáneamente en N₂ líquido. A las 2 y 24 horas después de la dosificación final en el día 21, se muestrean cuatro animales por punto del tiempo en los
15 Grupos 1, 4, 6 y 9 para determinar la sangre y los tumores como se describe anteriormente.

 En los datos sin procesar, los Animales #2, 6 y 7 del Grupo 4 salen del estudio como muertes relacionadas con el tratamiento (TR); y los Animales #4 y 10 del Grupo 9 salen como relacionadas con el
20 tratamiento (TR) y no relacionadas con el tratamiento (NTR), respectivamente. Estos animales realmente sobreviven hasta el día 21 y se muestrean.

Análisis estadísticos y gráficos:

 Los análisis estadísticos y gráficos se llevan a cabo con Prism
25 3.03 (Graph Pad) para Windows. El significado de las diferencias

entre los valores promedio ΔTV para los grupos de ratones tratados contra los de control se determina mediante el análisis de variación (ANOVA), con la prueba de Bartlett, y con una prueba de comparación múltiple de Dunnett *post-hoc*. Cuando la prueba de

5 Bartlett indica diferencias significativas entre las variaciones ($P < 0.0001$), los resultados se analizan con la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica, que muestra las diferencias significativas entre los cambios de volumen promedio ($P < 0.0001$). Las diferencias entre los grupos se analizan *post-hoc* con la prueba de comparación múltiple

10 de Dunn. Se emplea la prueba Mann-Whitney U para comparar los cambios de volumen promedio en dos grupos. Los análisis estadísticos de dos colas se conducen en $P = 0.05$. Prism resume los resultados de prueba como no significativos (ns) en $P > 0.05$, significativos (simbolizados por “*”) en $0.01 < P \leq 0.05$, muy

15 significativos (simbolizados por “**”) en $0.001 < P \leq 0.01$, y extremadamente significativos (simbolizados por “***”) en $P \leq 0.001$. Debido a que las pruebas de significado estadístico no proporcionan una estimación de la magnitud de la diferencia entre grupos, todos los niveles de significado se describen ya sea como significativos o

20 no significativos.

Se construye una gráfica de dispersión para mostrar los valores ΔTV para los animales individuales, por grupo. El promedio del grupo $\pm$ error estándar del promedio (SEM), o los volúmenes tumorales medios se grafican como las funciones lineales del tiempo.

25 Los cambios de peso corporal (BW) promedio del grupo durante el

transcurso del estudio se grafican como porcentaje de cambio $\pm$ error estándar del promedio (SEM), a partir del día 1. Las curvas del crecimiento tumoral están truncadas cuando la muerte relacionada con el tratamiento excedió del 10 por ciento.

5 Resultados:

Se obtienen los siguientes datos a partir del estudio:

10	Grupo	n	Tratamiento	Cambio de Volumen promedio, mm³	Signif. Estadístico (vs. G1, G2, G3, G6, o G7)	BW Promedio Nadir	Muertes (TR/NTR)
	1	10	Vehículo 1, Vehículo 2	784 (T/C = --)	--	--	0/0
15	2	10	Compuesto I (12.5 mg/kg)	501 (T/C = 64%)	ns (vs. G1) -- (otros)	--	0/0
20	3	10	Compuesto I (25 mg/kg)	129 (T/C = 16%)	*** (vs. G1) -- (otros)	--	0/0
25	4	7	Compuesto I (50 mg/kg)	150 (T/C = 19%)	ne (vs. G1) – (otros)	- 8.1% día 8	3/0

5

10

15

20

25

Grupo	n	Tratamiento	Cambio de Volumen promedio, mm ³	Signif. Estadístico (vs. G1, G2, G3, G6, o G7)	BW Promedio Nadir	Muertes (TR/NTR)
5	10	RAD001 (2.5 mg/kg)	424 (T/C = 54%)	ns (vs. G1) -- (otros)	--	0/0
6	10	RAD001 (5 mg/kg)	269 (T/C = 43%)	* (vs. G1) -- (otros)	--	0/0
7	10	RAD001 (10 mg/kg)	341 (T/C = 43%)	ns (vs. G1) -- (otros)	--	0/0
8	8	Compuesto I (12/ mg/kg), RAD001 (10 mg/kg)	226 (T/C = 29%)	* (vs. G1) ns (vs. G2, vs. G7) -- (otros)	-4.9% Día 15	1/1
9	8	Compuesto I (25 mg/kg), RAD001 (10 mg/kg)	115 (T/C = 15%)	*** (vs. G1) ns (vs. G3, vs. G6)	- 11.6 % día 21	1/1

51015

Grupo	n	Tratamiento	Cambio de Volumen promedio, mm ³	Signif. Estadístico (vs. G1, G2, G3, G6, o G7)	BW Promedio Nadir	Muertes (TR/NTR)
				-- (otros)		
10	0	Compuesto I (50 mg/kg), RAD001 2.5 mg/kg)	--	ne (vs. G1) -- (otros)	- 19.4 % día 5	5/0 (5 ES)
11	9	Paclitaxel	898 (T/C = 115%)	ns (usando la prueba de Mann-Witney U) (vs. G1) -- (otros)	-1.9% Día 12	0/1

20

Punto final del estudio = 1000 mm³; Días en progreso = 21.

n = Número de animales en un grupo que no murieron por causas relacionadas con el tratamiento, accidentales, o desconocidas, o que se eutanizaron para el muestreo.

Cambio de volumen promedio = cambio de volumen promedio del grupo entre el día 1 y el día 21.

25

$T/C = 100 \times (\Delta T / \Delta C)$ = porcentaje de cambio entre el día 1 y el día 21 en el volumen tumoral promedio de un grupo tratado (ΔT) comparándose con el cambio en el grupo de control 1 (ΔC).

Significado estadístico (Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn *post-hoc*): ne = no evaluable, ns = no significativo,
 5 * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$, comparándose con el grupo indicado.

BW Promedio Nadir = peso corporal promedio más bajo del grupo, como el porcentaje de cambio desde el día 1 hasta el día 21; -- indica que no se observa ninguna disminución en el peso corporal
 10 promedio.

ES = Eutanizados para el muestreo.

En este estudio, un intervalo amplio de valores ΔTV para los ratones del Grupo 1 tratados con vehículo, da como resultado diferencias de hasta 9.9 veces entre los animales individuales.
 15 Todavía se observan actividades significativas con todos los tratamientos que producen valores T/C por debajo del umbral del 40 por ciento que denota la actividad terapéutica potencial.

Las combinaciones del Compuesto I/RAD001 en las proporciones de dosis de 12.5:10 y 25:5 miligramos/kilogramo
 20 (Grupos 8 y 9) dan como resultado el 29 por ciento y el 15 por ciento de T/C, y las actividades estadísticamente significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.001$), respectivamente. La terapia de combinación en la proporción de 12.5:10 miligramos/kilogramo (Grupo 8) mejora con las monoterapias con el Compuesto I y RAD001 en los Grupos 2 y 7,
 25 respectivamente; sin embargo, los valores ΔTV para el Grupo 8 están

dentro de los intervalos de valores para Grupos 2 y 7, y no se observa ninguna mejora estadísticamente significativa durante la monoterapia.

La terapia de combinación en la proporción de 25:5 miligramos/
5 kilogramo (Grupo 9) da como resultado el 15 por ciento de T/C y, por
consiguiente, mejora ligeramente con la monoterapia con el
Compuesto I en el Grupo 3 (16 por ciento de T/C). La combinación
del Compuesto I/RAD001 en la proporción de dosis de 50:2.5
10 miligramos/kilogramo da como resultado el 19.4 por ciento de la
pérdida de peso corporal (BW) promedio del grupo en el día 5; y el
50 por ciento de mortalidad en el día 7 cuando se interrumpe el
tratamiento.

15

20

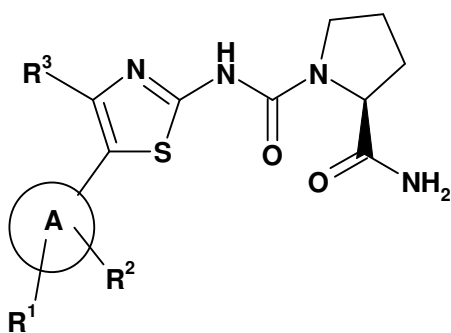
25

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica, la cual comprende:

a) un compuesto de la fórmula (A):

5



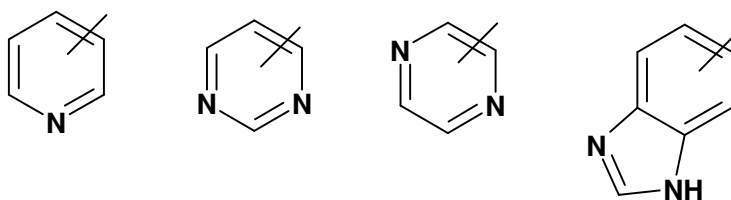
(A)

10

o una sal del mismo, en donde:

A representa un heteroarilo seleccionado a partir del grupo que consiste en:

15



R¹ representa uno de los siguientes sustituyentes: (1) alquilo de 1 a 7 átomos de carbono insustituido o sustituido, de preferencia sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a nueve de las siguientes fracciones: deuterio, flúor, o de una a dos de las siguientes fracciones: cicloalquilo de 3 a 5 átomos de carbono; (2) cicloalquilo de 3 a 5 átomos de carbono opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan

25

independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a cuatro de las siguientes fracciones: deuterio, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono (de preferencia metilo), flúor, ciano, amino-carbonilo; (3) fenilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a dos de las siguientes fracciones: deuterio, halógeno, ciano, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-amino, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-amino-carbonilo, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino-carbonilo, alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono; (4) amina opcionalmente mono- o di-sustituida; en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de las siguientes fracciones: deuterio, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, flúor, cloro, hidroxilo), fenil-sulfonilo (que está insustituido o sustituido por uno o más, de preferencia uno de alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino-alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono); (5) sulfonilo sustituido; en donde el sustituyente se selecciona a partir de las siguientes fracciones: alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, flúor), pirrolidino (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, hidroxilo,

oxo; en particular un oxo); (6) flúor, cloro;

R^2 representa hidrógeno;

R^3 representa: (1) hidrógeno, (2) flúor, cloro, (3) metilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a tres de las siguientes fracciones: deuterio, flúor, cloro, dimetil-amino;

con la excepción de la 1-({5-[2-(terbutil)-pirimidin-4-il]-4-metil-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico

y

b) cuando menos un inhibidor de mTOR.

2. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula (A) es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico.

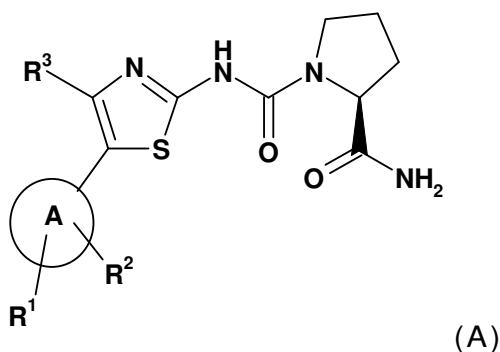
3. Una combinación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el inhibidor de mTOR se selecciona a partir de rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511

4. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la

reivindicación 1 ó 2, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa del objetivo de mamífero de rapamicina (mTOR).

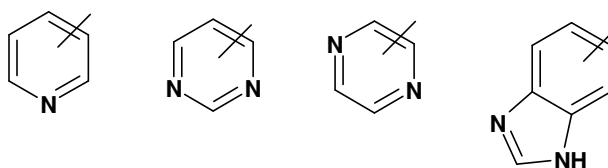
5. Una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la fórmula (A) de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTOR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El uso de un compuesto de la fórmula (A):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

A representa un heteroarilo seleccionado a partir del grupo que consiste en:



R¹ representa uno de los siguientes sustituyentes:

(1) alquilo de 1 a 7 átomos de carbono insustituido o sustituido, de preferencia sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan

independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a nueve de las siguientes fracciones: deuterio, flúor, o de una a dos de las siguientes fracciones: cicloalquilo de 3 a 5 átomos de carbono; (2) cicloalquilo de 3 a 5 átomos de carbono opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a cuatro de las siguientes fracciones: deuterio, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono (de preferencia metilo), flúor, ciano, amino-carbonilo; (3) fenilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a dos de las siguientes fracciones: deuterio, halógeno, ciano, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-amino, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-amino-carbonilo, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino-carbonilo, alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono; (4) amina opcionalmente mono- o di-sustituida; en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de las siguientes fracciones: deuterio, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, flúor, cloro, hidroxilo), fenil-sulfonilo (que está insustituido o sustituido por uno o más, de preferencia uno de alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono, di-(alquilo de 1 a 7 átomos de carbono)-amino-alcoxilo de 1 a 7 átomos de carbono); (5) sulfonilo sustituido; en donde el sustituyente se selecciona a partir de las siguientes

fracciones: alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, flúor), pirrolidino (que está insustituido o sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados a partir del grupo de deuterio, hidroxilo, oxo; en particular un oxo); (6) flúor, cloro;

R^2 representa hidrógeno;

R^3 representa: (1) hidrógeno, (2) flúor, cloro, (3) metilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente a partir de una o más, de preferencia de una a tres de las siguientes fracciones: deuterio, flúor, cloro, dimetil-amino; con la excepción de la 1-({5-[2-(terbutil)-pirimidin-4-il]-4-metil-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico; y

cuando menos un inhibidor de mTOR, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa del objetivo de mamífero de rapamicina (mTOR).

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el compuesto de la fórmula (A) es la 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico.

8. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 ó 7, en donde el inhibidor de mTOR se selecciona a partir de rapamicina RAD (sirolimus), y derivados/análogos de la misma, tales como

everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511.

9. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 ó 7, en donde la enfermedad que se vaya a tratar es un tumor benigno o maligno; carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándula suprarrenal, vejiga, mama, carcinoma de células renales, tumores neuro-endocrinos, próstata, estómago, tumores gástricos, de ovarios, colon, recto, próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, en especial carcinoma de colon o adenoma colo-rectal, o un tumor de cuello y cabeza, una hiper-proliferación epidérmica, soriasis, hiperplasia de próstata, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, linfomas, un carcinoma mamario o una leucemia; rechazo de trasplante de órganos o tejidos; restenosis; esclerosis tuberosa; enfermedad de Cowden; linfangioleiomiomatosis; retinitis pigmentosa; enfermedades autoinmunes; leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides; enfermedades fibróticas; hipertensión pulmonar; Inmunomodulación; esclerosis múltiple; síndrome de VHL; complejo de Carney; poliposis adenomatosa familiar; síndrome de poliposis juvenil; síndrome de Birt-Hogg-Duke; cardiomiopatía hipertrófica familiar; síndrome de Wolf-Parkinson-White; un trastorno neurodegenerativo; degeneración macular húmeda y seca;

consunción muscular (atrofia, caquexia), o miopatías; una infección bacteriana o viral; neurofibromatosis, o síndrome de Peutz-Jeghers.

10. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para utilizarse en el tratamiento o en la
5 prevención de una enfermedad dependiente de la cinasa del objetivo de mamífero de rapamicina (mTOR).

11. Un método para el tratamiento o la prevención de las enfermedades dependientes de la cinasa del objetivo de mamífero de rapamicina (mTOR), mediante la administración de un compuesto de
10 la fórmula (A) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor de mTOR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un método para el tratamiento de una enfermedad
15 proliferativa dependiente de la fosforilación y activación adquirida de AKT en el tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTOR, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (A) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un
20 animal de sangre caliente que lo necesite.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad que se vaya a tratar es un tumor benigno o maligno; carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándula suprarrenal, vejiga, mama, carcinoma de células renales, tumores neuroendocrinos,
25 próstata, estómago, tumores gástricos, de ovarios, colon, recto,

próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, en especial carcinoma de colon o adenoma colo-rectal, o un tumor de cuello y cabeza, una hiper-proliferación epidérmica, soriasis, hiperplasia de próstata, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, linfomas, un carcinoma mamario o una leucemia; rechazo de trasplante de órganos o tejidos; restenosis; esclerosis tuberosa; enfermedad de Cowden; linfangioleiomiomatosis; retinitis pigmentosa; enfermedades autoinmunes; leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides; enfermedades fibróticas; hipertensión pulmonar; Inmunomodulación; esclerosis múltiple; síndrome de VHL; complejo de Carney; poliposis adenomatosa familiar; síndrome de poliposis juvenil; síndrome de Birt-Hogg-Duke; cardiomiopatía hipertrófica familiar; síndrome de Wolf-Parkinson-White; un trastorno neurodegenerativo; degeneración macular húmeda y seca; consunción muscular (atrofia, caquexia) o miopatías; una infección bacteriana o viral; neurofibromatosis, o síndrome de Peutz-Jeghers.

14. Un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que ha llegado a ser resistente o que tiene una sensibilidad reducida al tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTOR, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (A) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

15. Un método para mejorar la eficacia del tratamiento de un

objetivo de una enfermedad proliferativa con cuando menos un
inhibidor de mTOR, el cual comprende administrar una combinación
que comprende un compuesto de la fórmula (A) de acuerdo con la
reivindicación 1 ó 2, y cuando menos un inhibidor de mTOR, a un
5 animal de sangre caliente que lo necesite.

10

15

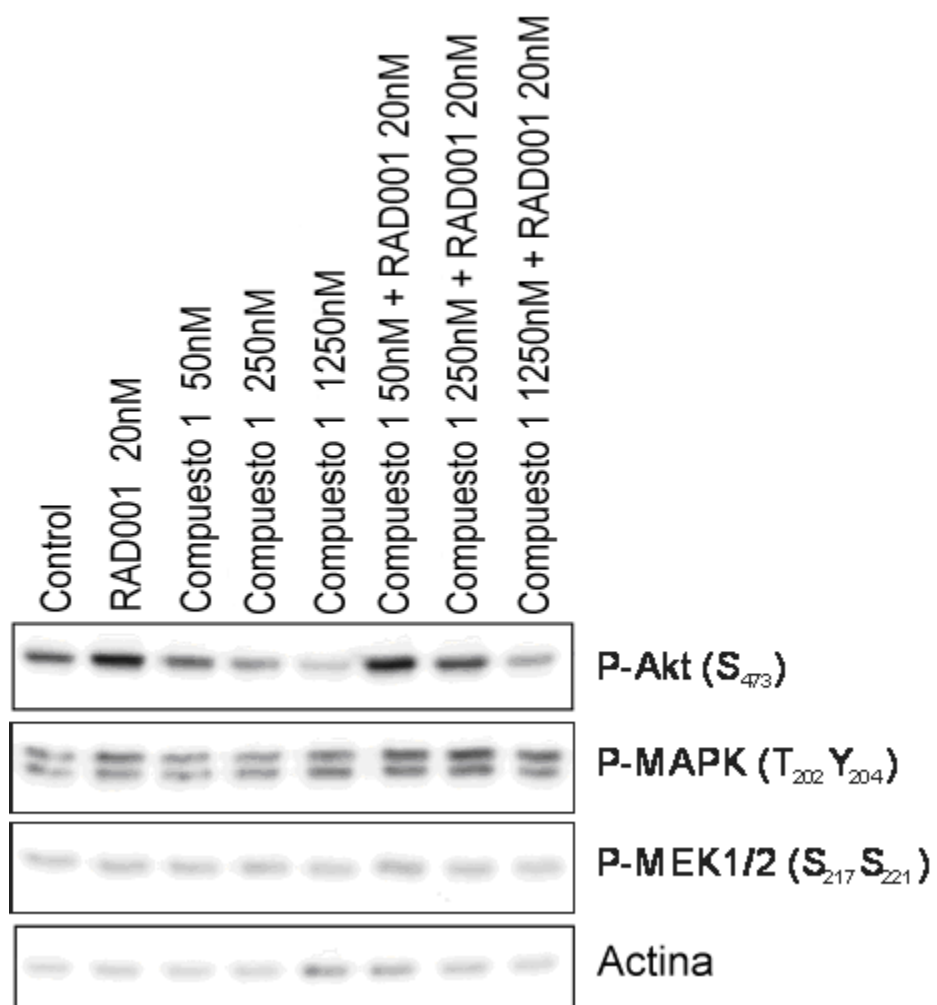
20

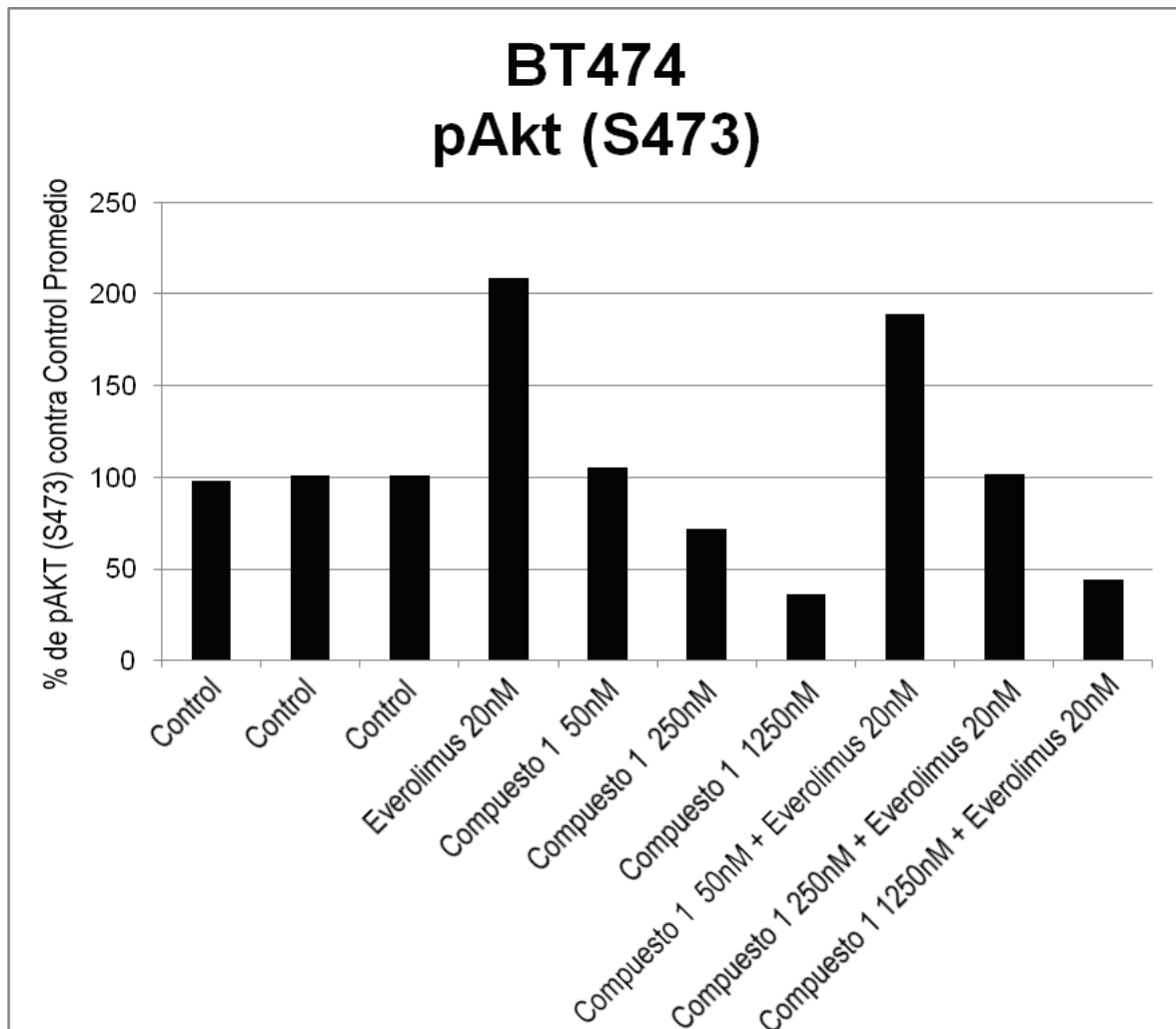
25

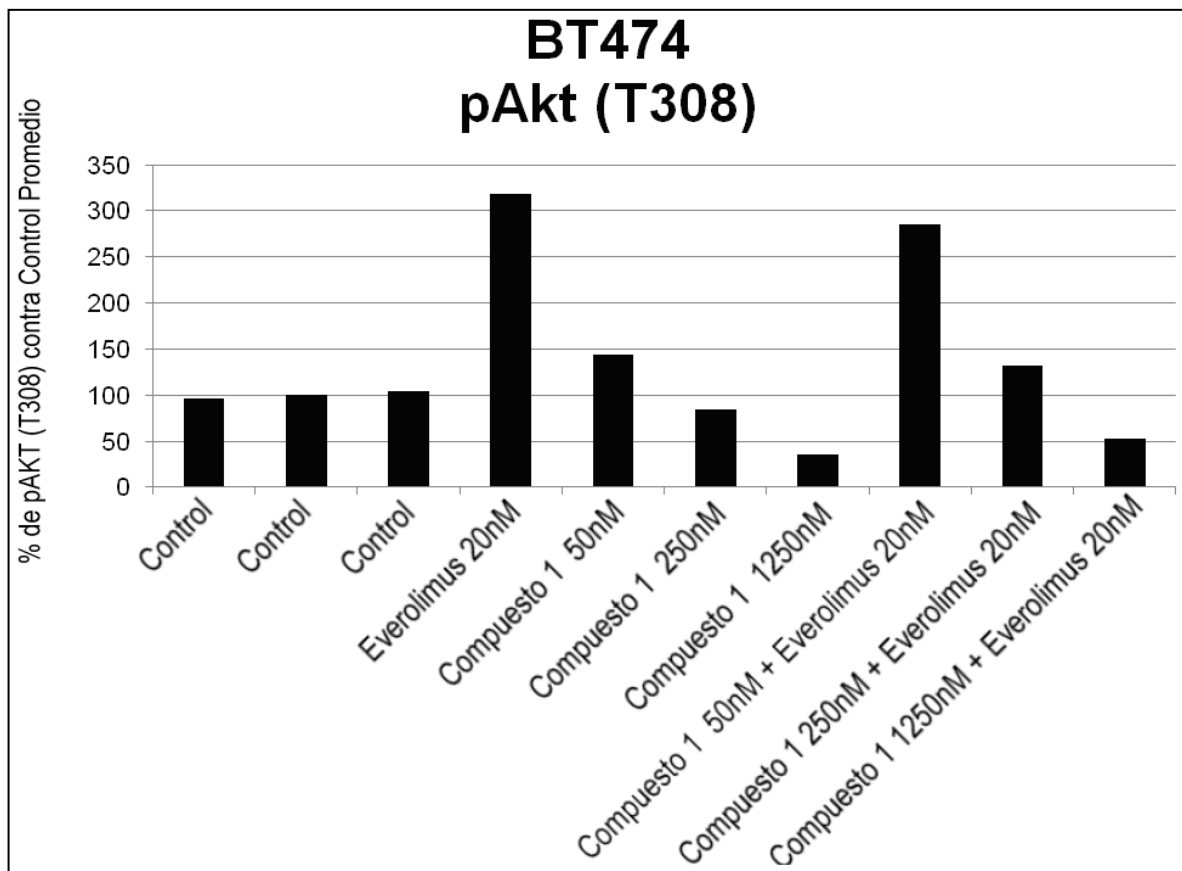
RESUMEN

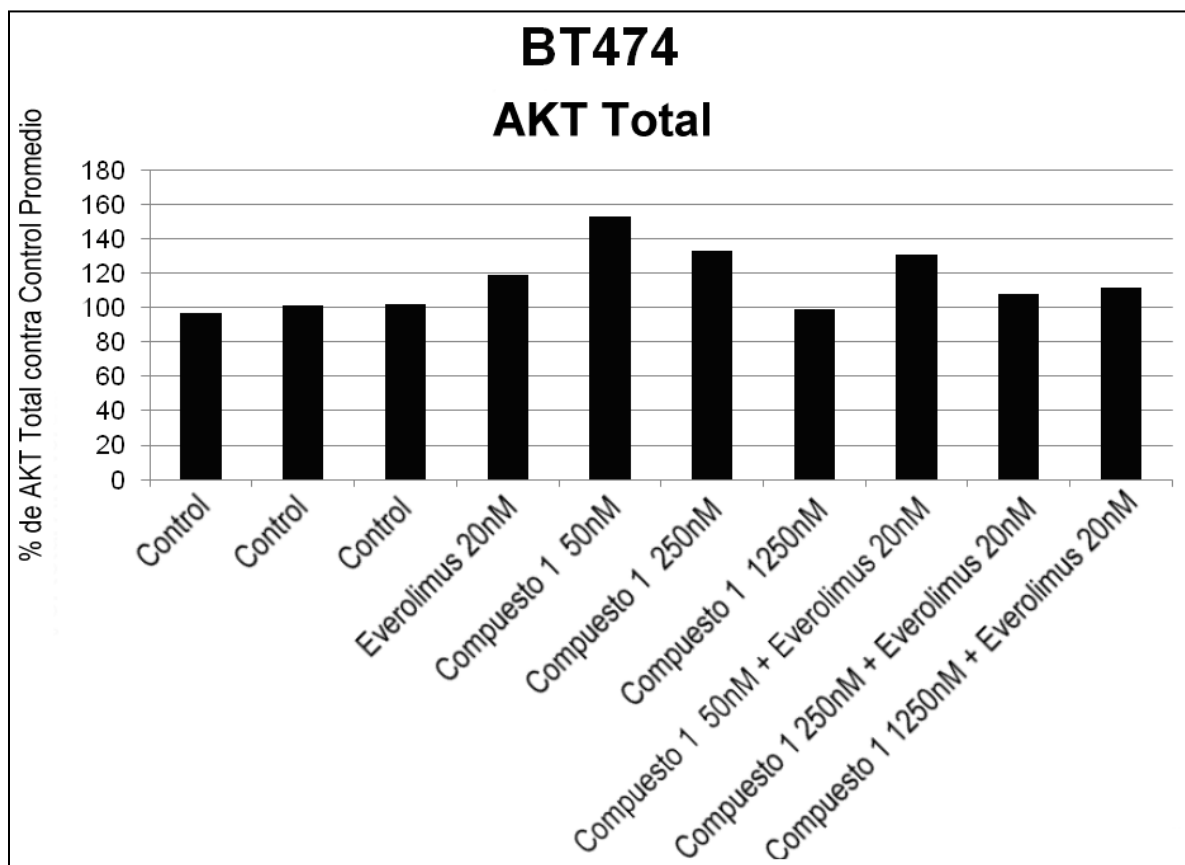
La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de cinasa de fosfatidil-inositol-3 (PI3K), el cual es un derivado de 2-carboxamida-cicloamino-urea, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; a una composición farmacéutica, la cual comprende dicha combinación; y a los usos de esta combinación en el tratamiento de las enfermedades proliferativas, más específicamente de las enfermedades dependientes de la cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR).

* * * * *

**FIG. 1**

**FIG. 2**

**FIG. 3**

**FIG. 4**

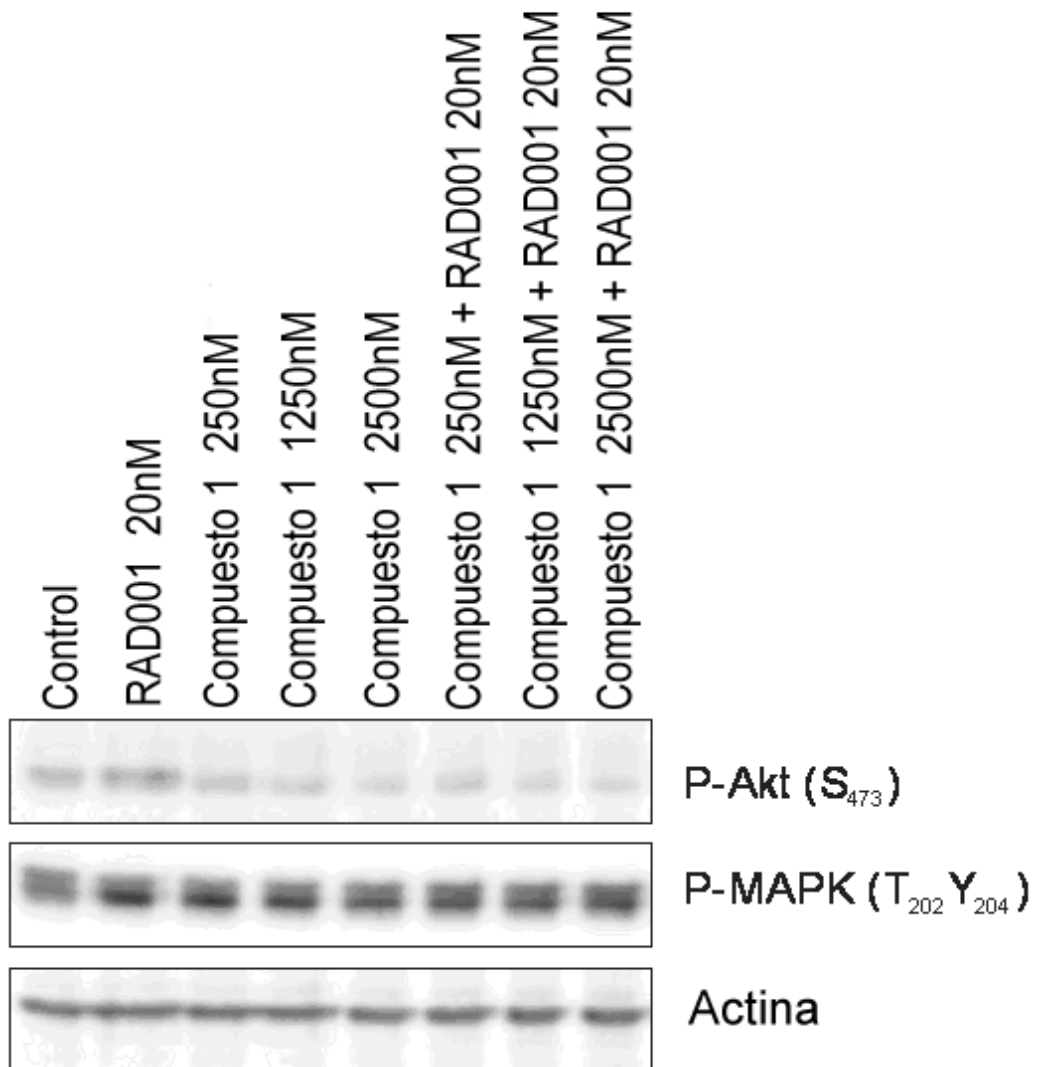
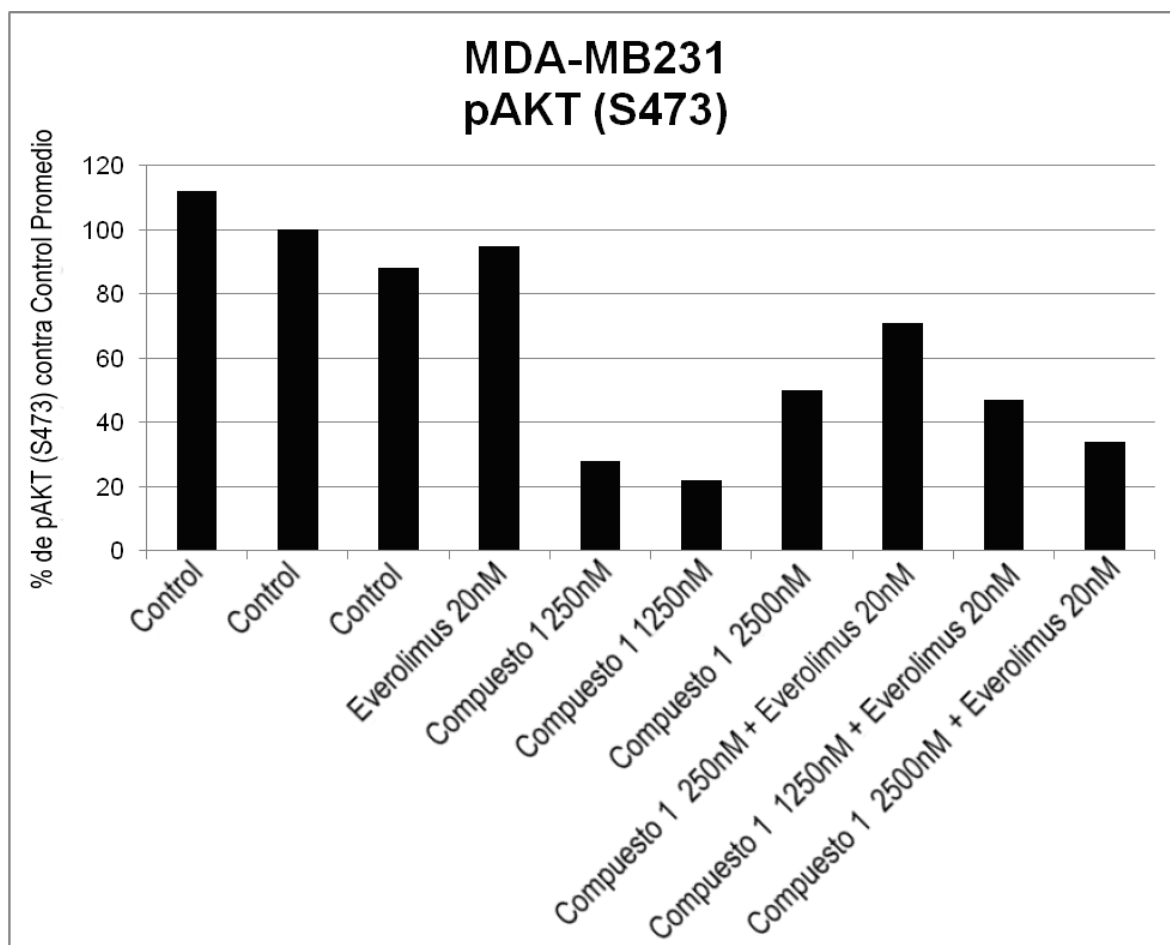
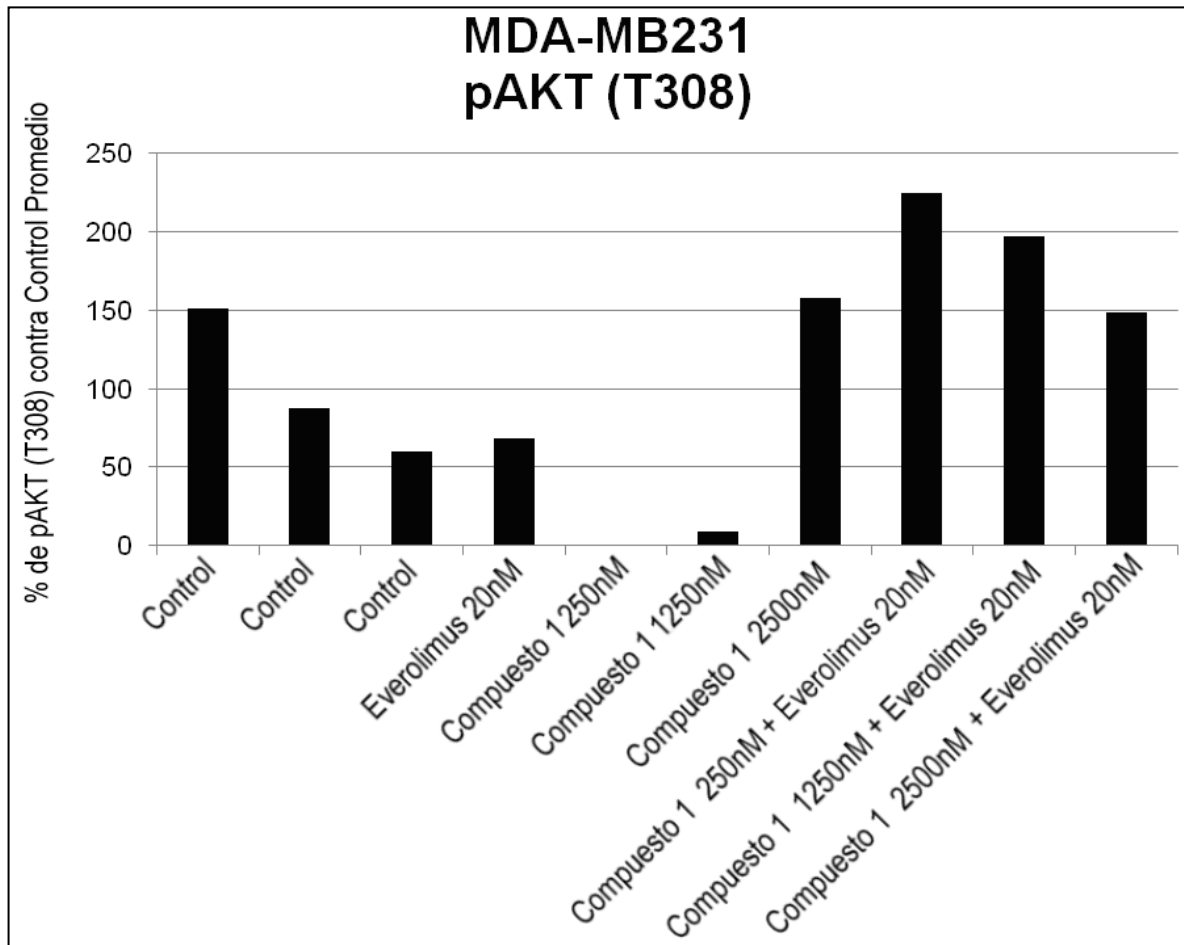
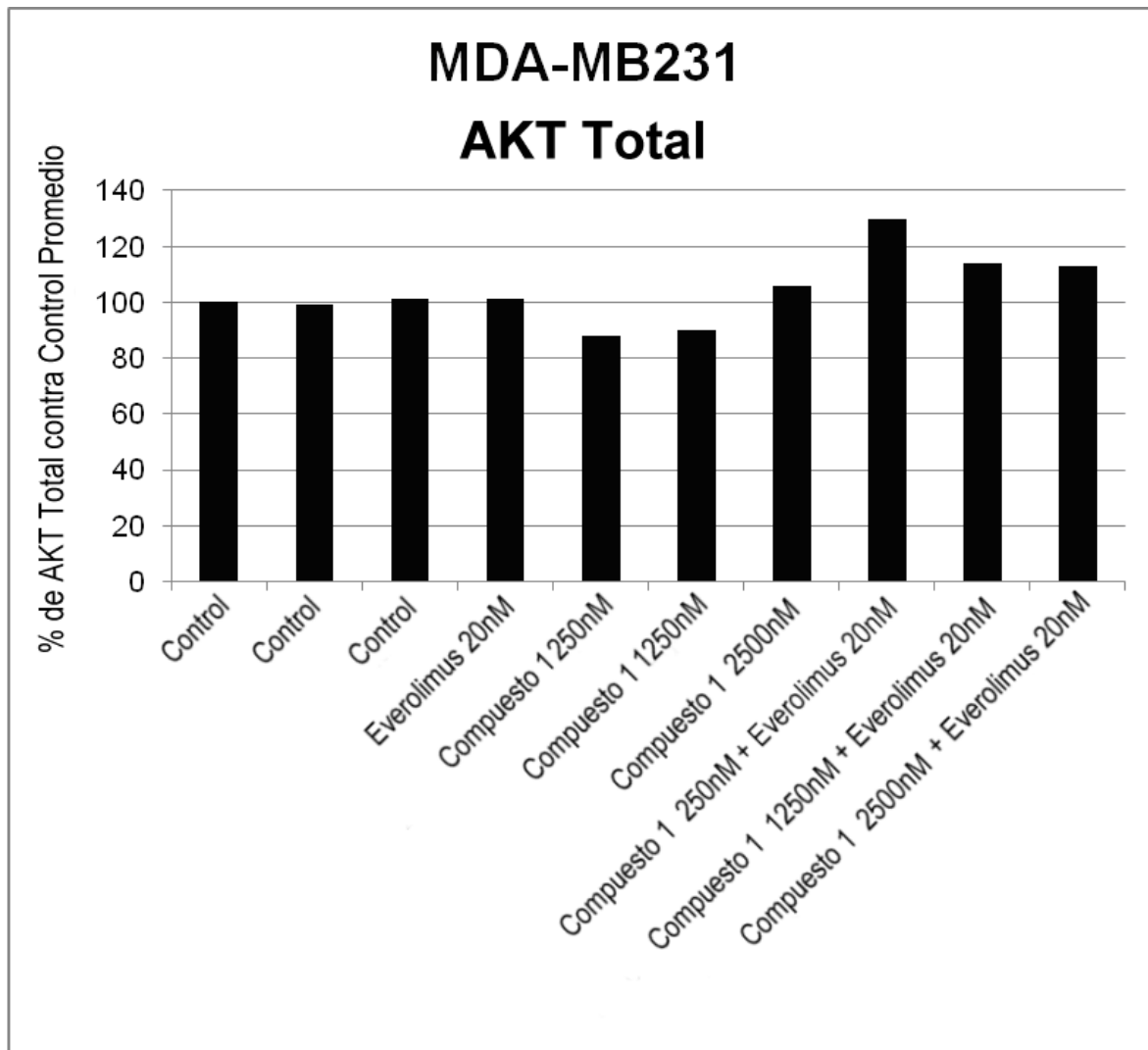
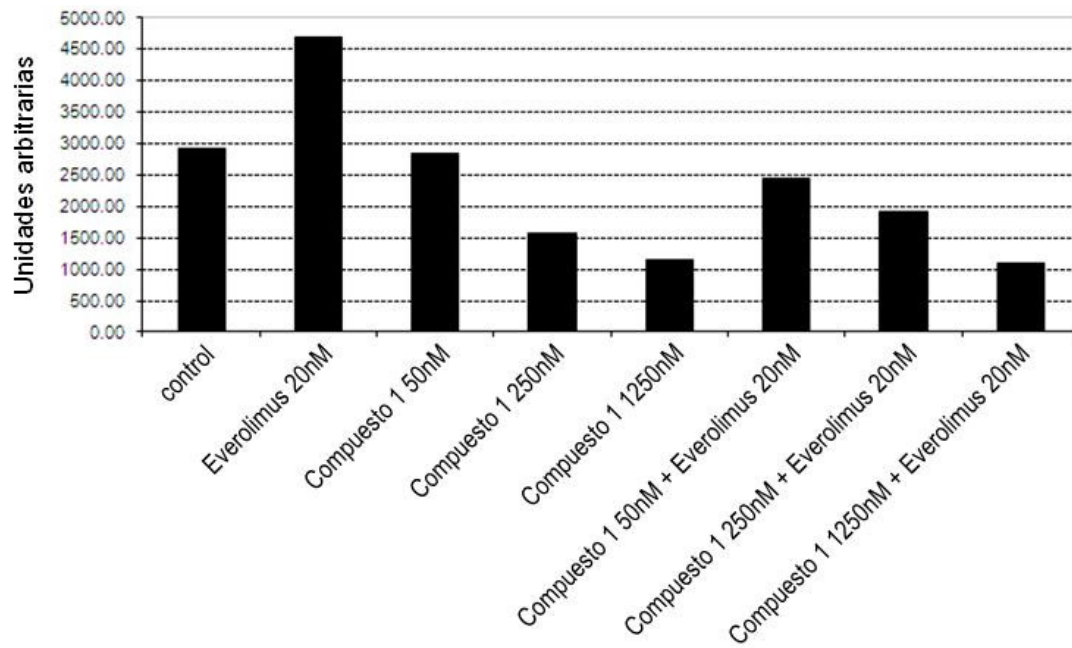
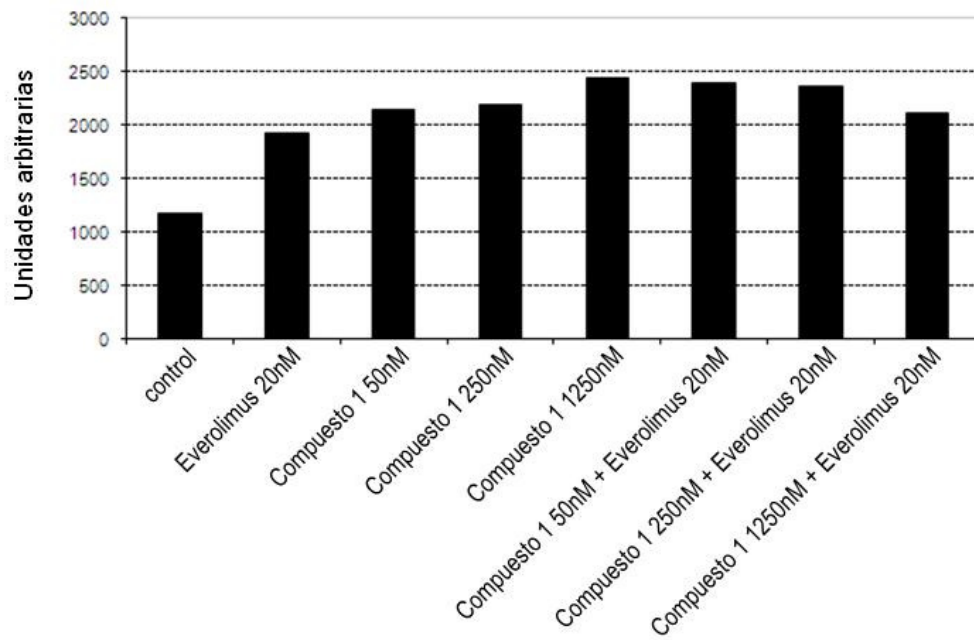


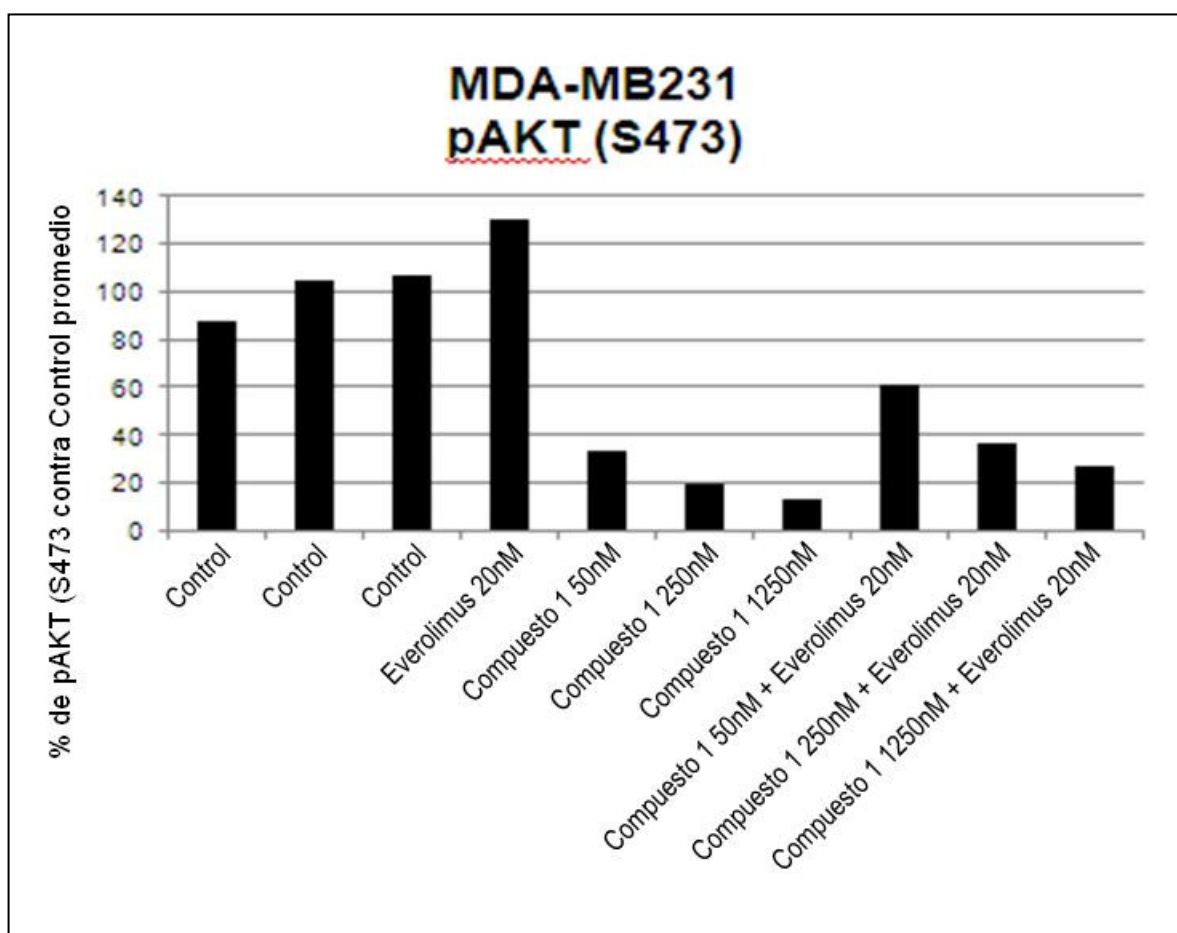
FIG. 5

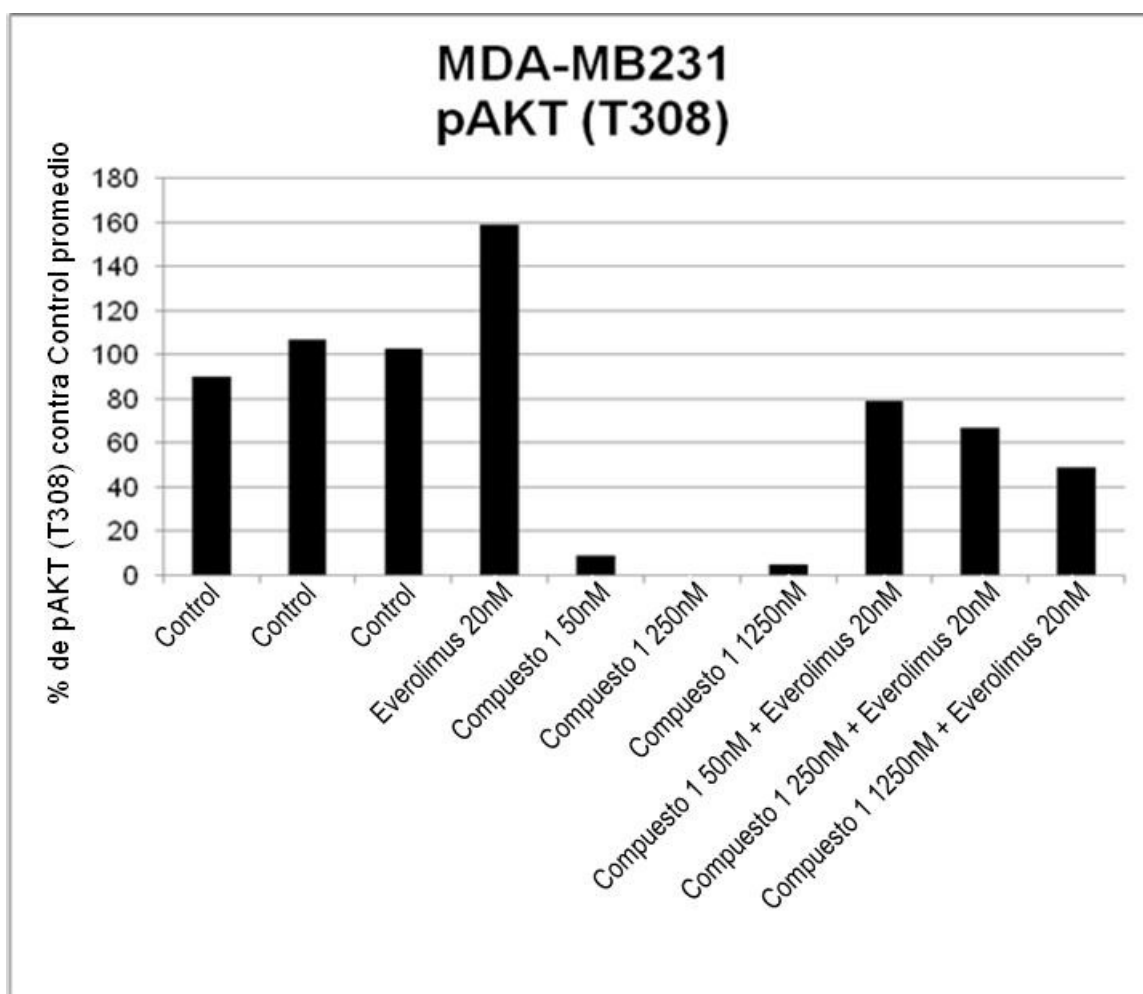
**FIG. 6**

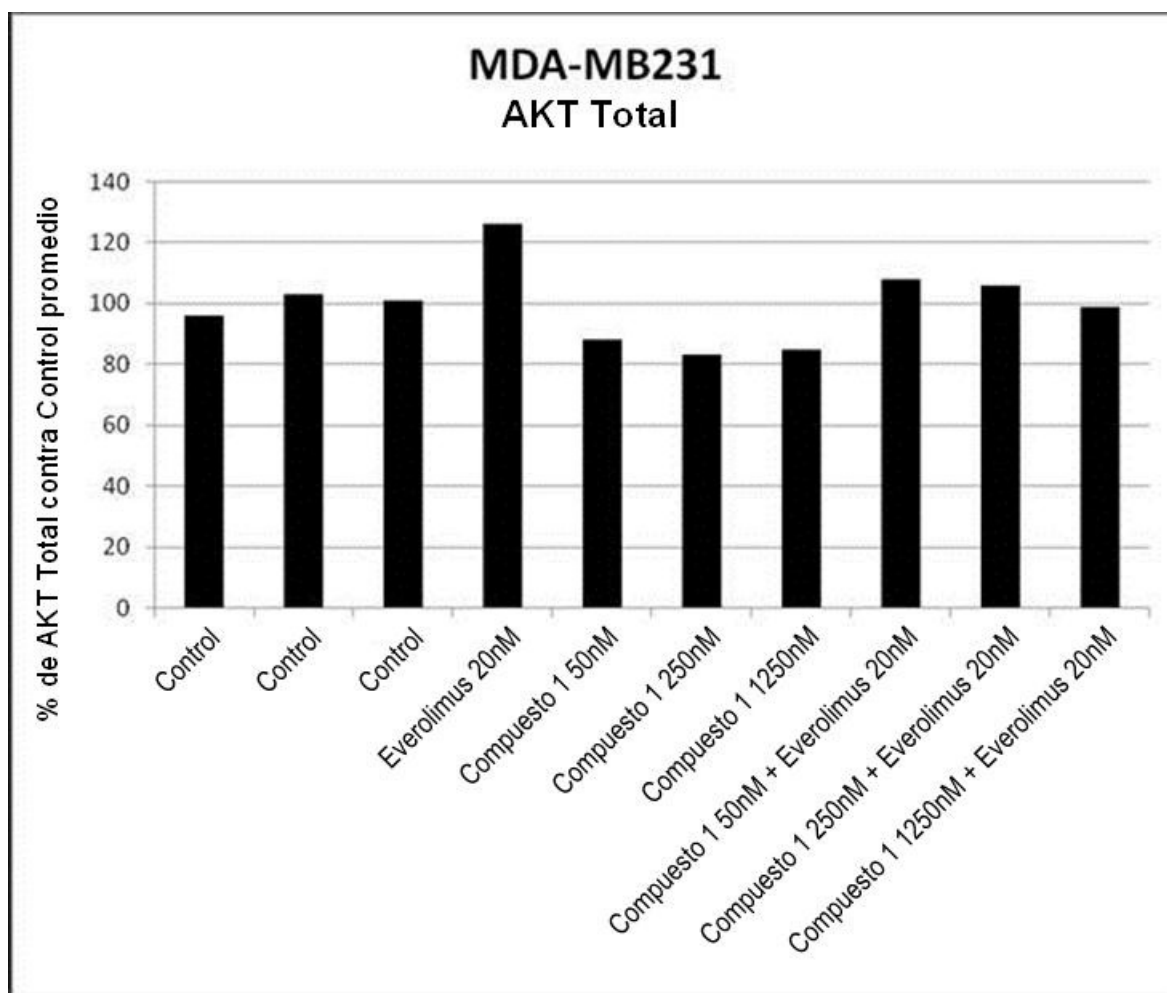
**FIG. 7**

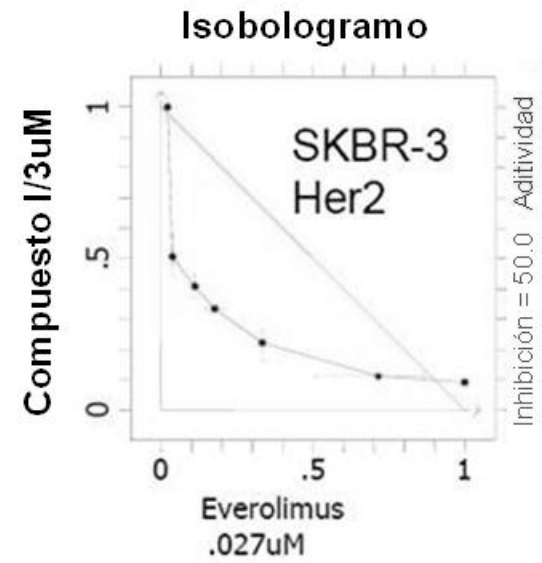
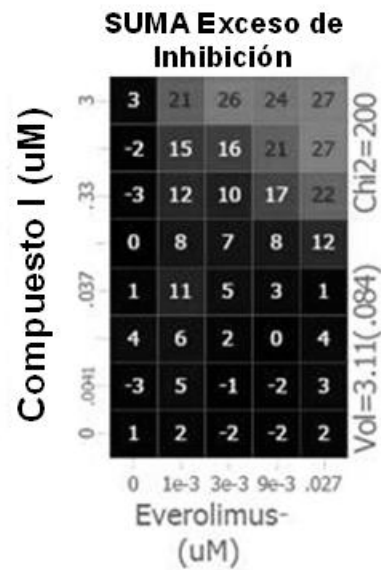
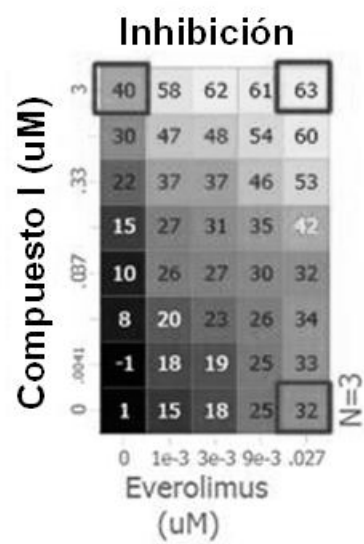
**FIG. 8**

MDA-MB-231
pAKT (S473)**FIG. 9A****MDA-MB-231**
AKT Total**FIG. 9B**

**FIG. 10**

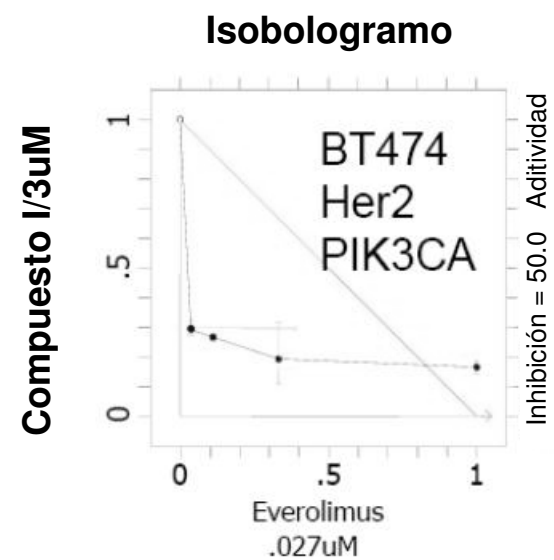
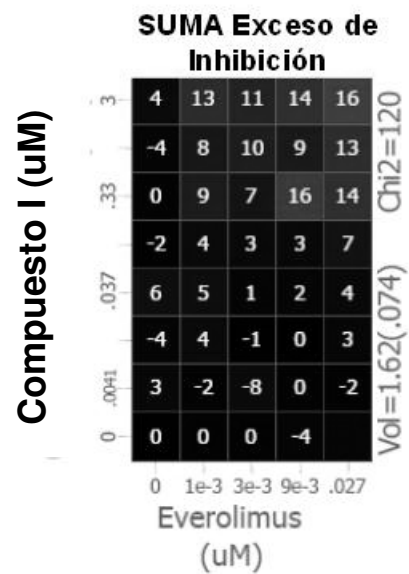
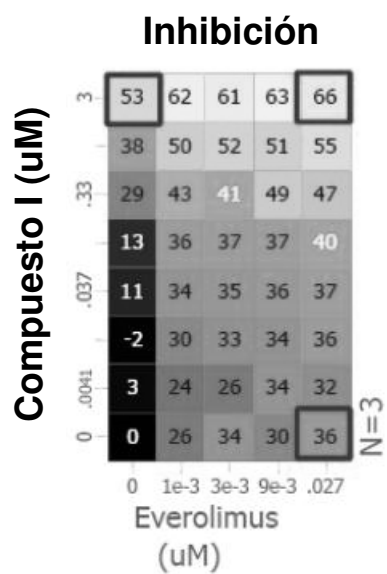
**FIG. 11**

**FIG. 12**



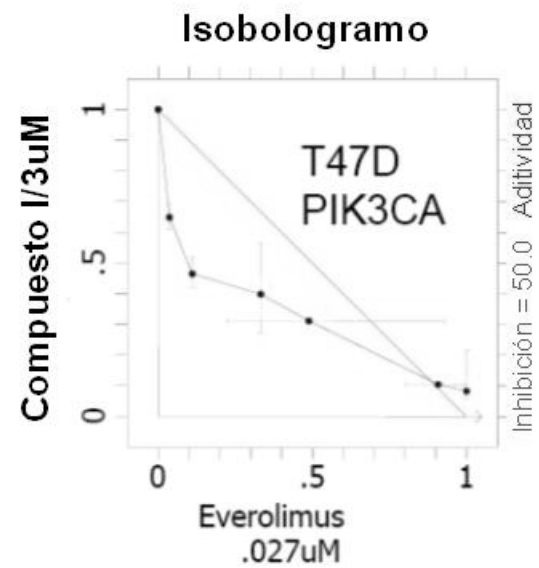
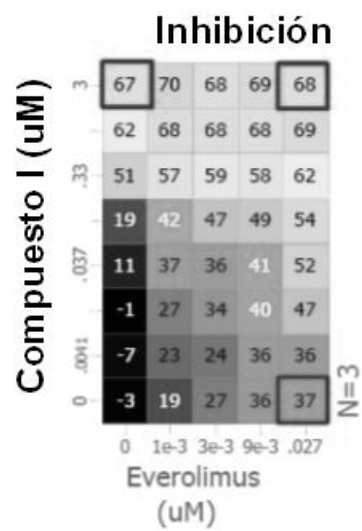
☐ Amax

FIG. 13



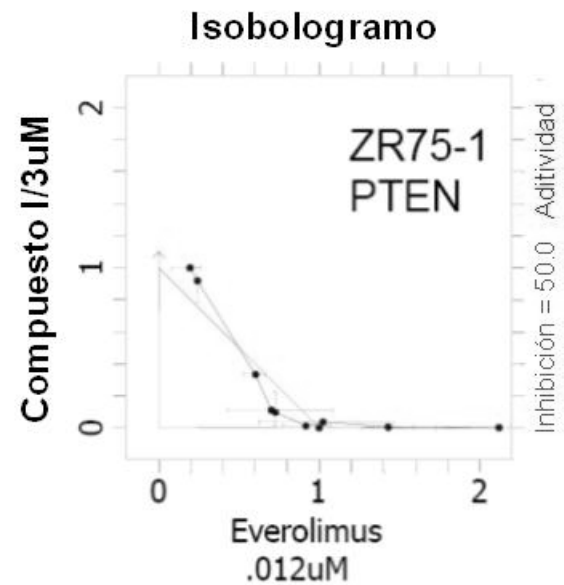
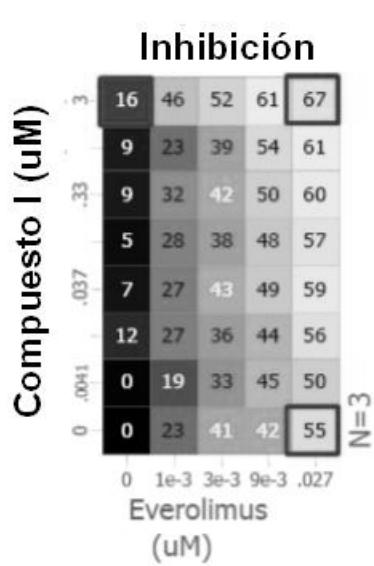
☐ Amax

FIG. 14



□ Amax

FIG. 15



☐ Amax

FIG. 16

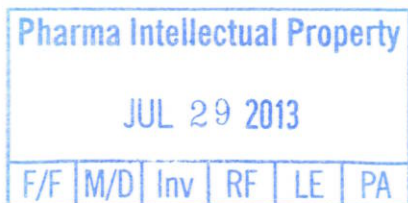
PATENT COOPERATION TREATY

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

Novartis AG
Postfach
4002 Basel
SUISSE



NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing

(day/month/year)

23.07.2013

Applicant's or agent's file reference

PAT054628-WO-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2012/034647

International filing date (day/month/year)

23.04.2012

Priority date (day/month/year)

25.04.2011

Applicant

Novartis AG

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Christensen, Jette

Tel. +49 89 2399-8052



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PAT054628-WO-PCT	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US2012/034647	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23.04.2012	Priority date (<i>day/month/year</i>) 25.04.2011	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K31/436			
Applicant Novartis AG			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ <i>sent to the applicant and to the International Bureau</i> a total of <u>9</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ <i>(sent to the International Bureau only)</i> a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☒ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 21.02.2013	Date of completion of this report 23.07.2013		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Kollmannsberger, M Telephone No. +49 89 2399-7364		



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2012/034647

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-37 as originally filed

Claims, Numbers

1-13 filed with the demand for preliminary international examination

Drawings, Sheets

1/16-16/16 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2012/034647

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2, 8, 12, 13</u>
	No: Claims	<u>1, 3-7, 9-11</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-13</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-13</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 Claims 7-11 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

- 2 Prior art

- 2.1 Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2010/029082 A1 (NOVARTIS AG [CH]; CARAVATTI GIORGIO [CH]; FAIRHURST ROBIN ALEC [GB]; F) 18 March 2010 (2010-03-18)cited in the application
- D2 WO 2010/049481 A1 (NOVARTIS AG [CH]; GARCIA-ECHEVERRIA CARLOS [CH]; MAIRA SAUVEUR-MICHEL) 6 May 2010 (2010-05-06)
- D3 CHAISUPARAT RISA ET AL: "Dual inhibition of PI3Kalpha and mTOR as an alternative treatment for Kaposi's sarcoma", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 68, no. 20, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 8361-8368, XP002514946, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0878
- D4 WO 2004/096797 A1 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; BRUCE IAN [GB]; CUENOUD B) 11 November 2004 (2004-11-11)
- D5 V. SERRA ET AL: "NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Growth of Cancer Cells with Activating PI3K Mutations", CANCER RESEARCH,

vol. 68, no. 19, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 8022-8030,
XP55018423,
ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1385

- 2.2 In the following paragraphs references to the above documents relate to the parts indicated in the search report unless specified otherwise.
- 2.3 The compound of example 15 of D1 which forms part of the present claims will be referred to as compound (1).

3 Novelty

- 3.1 D1 discloses a generic class of compounds as PI3K inhibitors for cancer treatment. The compound of present claim 1 (*Compound (1)*) is disclosed as example 15.

D1 furthermore mentions that these compounds may be administered together with immunosuppressants as e. g. FK-506 and rapamycin. Rapamycin is claimed in present claim 1 and FK506 may be seen as an analogue/derivative thereof as claimed (see section VIII).

Starting from the disclosure on page 37, lines 28-32 only the compound (1) has to be selected from the example compounds of D1. Such a one-dimensional selection from a list does not confer novelty. The list of "specific diseases" in claim 1 can neither establish novelty since it includes e. g. "proliferative diseases" which is a generic rather than a specific term and covers the diseases disclosed in D1, e. g. on page 27/28.

Claims 1, 5, 6 and 7 are thus not novel over D1.

Claims 3, 4, 9 and 10 are also not novel over D1 because the diseases listed in these claims are disclosed on page 27/28 of D1.

- 3.2 The method defined in claim 11 does not require the administration of an mTOR inhibitor. The treatment of the claimed diseases using compounds (A) alone is known from D1. It does not appear that a disease listed in D1 (e. g. on page 27/28) is distinguishable from the same disease "*which has become resistant or has a decreased sensitivity to the treatment with at least one mTOR inhibitor*" as defined in claim 11.

Claim 11 is thus not novel over D1.

- 3.3 Claims 2 and 8 are novel over D1 because D1 does not disclose a combination of compound (1) and everolimus.

- 3.4 Claims 12 and 13 are novel over D1 because D1 does not disclose the mTOR inhibitors specified in these claims.
- 3.5 The claims are novel over D2-D5 because these documents do not disclose compound (1).

4 Inventive step

- 4.1 The claims are directed at combinations of PI3K inhibitor compound (1) and mTOR inhibitors.

- 4.2 The claims lack an inventive step for the following reasons:

- 4.3 It is known that combinations of PI3K inhibitors and mTOR inhibitors are useful in cancer treatment (see e.g. D2 and D3). It is noted that D2 shows effects on the same breast cancer cell lines that are used also in the present application. D2 also mentions that a synergistic effect is achieved by the combination of the PI3K inhibitors of D2 with mTOR inhibitors. Everolimus (see present claims 2, 8 and 13) is mentioned as a particularly preferred mTOR inhibitor.

Starting from D1 a skilled person would thus know that the anti-cancer effect of the PI3K inhibitors of D1 may be enhanced by combination with mTOR inhibitors. He would thus solve the problem of finding advantageous pharmaceutical compositions in the claimed way. Also D5 discloses that dual inhibition of PI3K and mTOR is advantageous.

- 4.4 It has been argued that, in contrast to compound (1), the compounds of D2 and D5 are not selective for PI3K α but are unselective PI3K inhibitors. A skilled man would not have transferred the knowledge of D2/D5 to the compounds of D1.

However, this argument is not convincing. Even assuming that a skilled man had known that the PI3K inhibitors used in D2 and D5 are not selective for PI3K α (which may be doubted in particular in the case of D2 since the source to which the applicant has referred was not publically available at the priority date) nowhere in these documents it is said that the beneficial combination of PI3K and mTOR inhibitors depends on the selectivity or not to a specific isoform/subtype. A skilled man would even know from D3 that the combined inhibition of specifically PI3K α and mTOR, as in the present case, is beneficial for a particular neoplastic disease.

- 4.5 It is also noted that the data presented in the application relate to combinations of compound (1) with everolimus in cancer treatment only. Any argument trying to establish unexpected synergistic behaviour of this combination must thus fail for the present claim set which is directed to (i) many combinations with other mTOR inhibitors which have not been tested and (ii) many diseases which are far away from cancer (e. g. bacterial and viral infections).

Re Item VII

Certain defects in the international application

Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in D2-D5 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.

If the proviso defined in the original claims is due to prior art known to the applicant such prior art should be discussed in the description (Rule 5.1(a)(ii) PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 The definition of the mTOR inhibitors in claims 3 and 8 is unclear (Art. 6 PCT) due to the term "*derivatives/analogs thereof*". A skilled man would not know which types of structural and/or functional variations are covered by this definition.
- 2 Claim 11 defines a proliferative disease "which has become resistant or has a decreased sensitivity to the treatment with (...)". It is unclear how such a disease in a particular subject may be distinguished from a disease which has not lost sensitivity to such treatment. It is furthermore unclear what degree of resistance "decreased sensitivity" is intended to define.

Sewkian Rudge
Patent Attorney I

Novartis Pharma AG
Patent Department
Forum 1
Novartis Campus
4056 Basel
SWITZERLAND
Telephone: +41 61 3248788
Fax: +41613227532
wendy.rudge@novartis.com



CONFIRMATION

✓ 21/2/13

European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk

Fax no: (+31-70) 340-3016

Number of pages: 5 + 4 + 14 + 13 + 9

February 15, 2013

EPO - DG 2

25. 02. 2013

Re: International Patent Application No.: PCT/US2012/034647

45

Our ref.: PAT054628-WO-PCT

Dear Sir or Madam,

We hereby request International Preliminary Examination of the above application and enclose a copy of the PCT demand.

Please deduct the required fees from our deposit account number 28110031.

With reference to the Written Opinion, we have the following comments.

Amendments under Art. 34 PCT.

New claims 1 to 13 are submitted herewith and are to replace original claims 1 to 14. The new claims are based on the original application documents as shown below.

Original claims 1, 5, 6, 10 and 13 have been amended (a) to specify that the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor compound of formula (A) is (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and (b) to identify a specific list of mTOR inhibitors. Original claim 1 has been amended to specify that the claimed combination is for use in the treatment or prevention of specific mTOR kinase dependent diseases. Original claims 5, 6, and 10 have been amended to identify a specific list of mTOR kinase dependent diseases.

New claims 2 and 8 have been added to specify that the mTOR inhibitor is everolimus (RAD001). Support for these new claims may be found, for example, on pages 12-13 of the original description filed with the PCT.

New claims 3 and 9 have been added to identify a specific list of proliferative diseases. Support for these new claims may be found, for example, on page 15 of the original description filed with the PCT.

New claims 4 and 10 have been added to specify that the gastrointestinal cancer is selected from colon carcinoma, colorectal adenoma or a tumor of the neck and head.

New claims 12 and 13 have been added to identify a pharmaceutical combination comprising (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and at least one of a specific list of mTOR inhibitors. Support for these new claims may be found, for example, on pages 10-13 of the original description filed with the PCT.

Original claims 2, 3, 4, 7, 8, 9 (both versions), 11, 12 and 14 have been deleted.

The remaining claims have been renumbered and their dependencies amended accordingly.

Thus, the new claims are formally admissible.

By virtue of the above-mentioned amendments, the novelty objections raised in the Written Opinion have become void.

Formality observations

The amended claims do not include two claims numbered 9.

It is submitted that one skilled in the art would clearly understand the definition of mTOR inhibitors in original claims 3 and 8. With his/her knowledge and experience, one skilled in the art would understand the phrase "RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/ analogs thereof" based upon the teachings of the present application (e.g., pages 10-13 of the original description filed in the PCT application).

The amended claims do not include the phrase "such as".

The amended claims identify a specific list of mTOR inhibitors.

Original claims 11 and 12 have been deleted. It is further submitted that the method of original claim 13 (now claim 11) is clear as amended.

It is submitted that this formality objections raised in the Written Opinion have become void.

Novelty (Art. 33(2) PCT)

D1 (WO2010/029082 A1) discloses the compounds of formula A generally and the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) as PI3K inhibitors.

D1 does not disclose that the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) can be used in combination with the specific mTOR inhibitors for the treatment of the specified mTOR kinase dependent diseases.

D1 does not disclose that the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) can be used in combination with the specific mTOR inhibitors identified in new claims 12 and 13.

D2 (WO2010/049481), D3 (Chaisuparat et al, Cancer Research, American Association for Cancer Research US, 68(20): 8361-8368 (October 15, 2008), D4 (WO2004/096797 A1) and D5 (V. Serra et al, Cancer Research, 68(19): 8022-8030 (October 1, 2008)) do not disclose the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide), either alone or in combination with any of the specified mTOR inhibitors.

It is therefore submitted that the present claims are novel over the cited prior art.

Inventive Step (Art. 33(3) PCT)

The presently claimed subject matter is directed to the specific combination of the alpha-isoform specific PI3K inhibitor compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511 or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in the treatment or prevention of specific mTOR kinase dependent diseases.

The presently claimed subject matter is further directed to the specific combination of the alpha-isoform specific PI3K inhibitor compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor selected from everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

As disclosed on page 8 of the original description filed in the PCT application and pages 1-3 and 129 of D1, the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) is a PI3K inhibitor that is highly selective for the alpha isoform of the phosphatidylinositol kinase. PI3Ks comprise a family of lipid kinases that catalyze the transfer of phosphate to the D-3' position of inositol lipids to produce phosphoinositol-3-phosphate (PIP), phosphoinositol-3,4-diphosphate (PIP₂) and phosphoinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) that, in turn, act as second messengers in signaling cascades by docking proteins containing pleckstrin-homology FYVE, Phox and other phospholipid-binding domains into a variety of signaling complexes often at the plasma membrane. Of the two Class 1 PI3Ks, Class1A PI3Ks are heterodimers composed of a catalytic p110 subunit (alpha, beta, and delta isoforms) constitutively associated with a regulatory subunit that can be p85-alpha, p55-alpha, p50-alpha, p8-beta or p55-gamma. The Class 1B sub-class has one family member, a heterodimer composed of a catalytic p110-gamma subunit associated with one of two regulatory subunits, p101 or p84. In contrast to prior known PI3K inhibitors, the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) has a high selectivity for the alpha-isoform of the PI3K.

As seen in Examples 1-6 and Figures 1-16 of the present application, it has been surprisingly discovered that the alpha-isoform specific PI3K inhibitor compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) has a strong synergistic interaction and/or significantly improved antitumor activity when used in combination with specific mTOR inhibitors, particularly everolimus (RAD001), both in vitro and in vivo. This beneficial effect could not have been derived from any of the cited prior art.

The Examiner asserts that D1 (WO2010/029082 A1) discloses the compounds of formula (A) as PI3K inhibitors for cancer treatment and the compounds FK506 and rapamycin as immunosuppressants and that the claims are not novel and thus lack inventive step over D1.

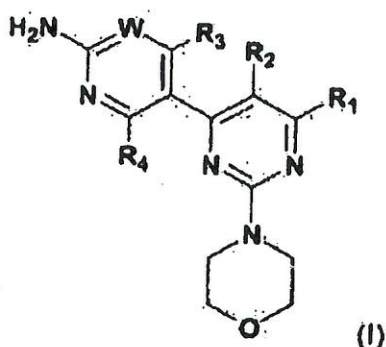
For the reasons set forth above, the Applicant submits that the amended claims are both novel and inventive over D1.

The Applicant respectfully disagrees with the Examiner for the additional reasons cited below:

D1 does not provide any teaching that the alpha-isoform specific PI3K inhibitor compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) can achieve these beneficial effects when combined with these specific mTOR inhibitor for the specified mTOR kinase dependent diseases. This deficiency is not cured by D2 or D5.

D2 and D5 do not provide any teaching of the present invention or the described unexpected beneficial effects of the combination of the present invention. Both D2 and D5 are directed to PI3K compounds having clear structural and functional different properties to the alpha-isoform specific PI3K inhibitor compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide).

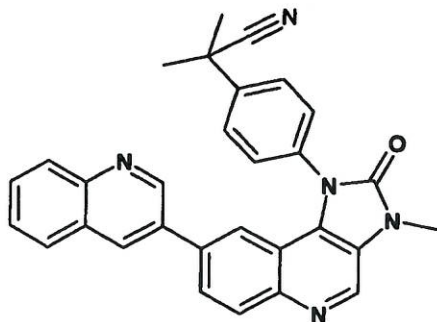
D2 is directed to the compound of formula (I)



This compound of formula (I), particularly 5-(2,6-di-morpholin-4-yl-pyrimidin-4-yl)-4-trifluoromethyl-pyridin-2-yl amine (also known as "NVP-BKM120"), is a pan-PI3K inhibitor compound that inhibits all four (4) isoforms (alpha, beta, delta and gamma) of PI3K. (See, Table 1 of S. Maira et al, "Identification and Characterization of NVP-BKM120, an Orally Available Pan-Class I PI3-Kinase Inhibitor", Molecular Cancer Therapeutics, 11: 317-328 (February 2012).) In contrast to the present invention, D2 does not disclose an alpha-

specific PI3K inhibitor generally or the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) specifically.

D5 is directed to the compound NVP-BEZ235 having the following structure:



NVP-BEZ235 is a compound that inhibits all four (4) isoforms (alpha, beta, delta and gamma) of PI3K and mTOR kinase. (See Table 1 of S. Maira et al, "Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/ mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity, Molecular Cancer Therapeutics, 7: 1851-1863 (2008).) In contrast to the present invention, D5 does not disclose an alpha-specific PI3K inhibitor generally or the compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) specifically.

As seen above, none of the cited reference D1, alone or in combination with D2 or D5, does not provide any teaching that the alpha-isoform specific PI3K inhibitor compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) can achieve these beneficial effects when combined with these specific mTOR inhibitors for the specified mTOR kinase dependent diseases.

An inventive step must therefore be acknowledged for the subject of the present claims.

In the name of the Applicant,
The Representative

Sewkian Rudge
European Patent Attorney

cc. W:PO 0041223388270

Enc.:

New claims 1 to 13.

S. Maira et al, "Identification and Characterization of NVP-BKM120, an Orally Available Pan-Class I PI3-Kinase Inhibitor", Molecular Cancer Therapeutics, 11: 317-328 (February 2012).

S. Maira et al, "Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/ mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity, Molecular Cancer Therapeutics, 7: 1851-1863 (2008).

Case 54628-WO-PCT

PCT/US2012/034647

EPO - 09 2

Revised Set of Claims:

25. 02. 2013

43

1. A pharmaceutical combination comprising

- a) a compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl]-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

and

- b) at least one mTOR inhibitor selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511 or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

for use in treating or preventing a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent disease selected from organ or tissue transplant rejection, graft-versus-host disease, restenosis, Hamartoma syndromes, lymphangiomyomatosis, retinitis pigmentosa, autoimmune diseases, steroid resistant acute Lymphoblastic leukaemia, fibrotic diseases, pulmonary hypertension, immunomodulation, multiple sclerosis, VHL syndrome, carney complex, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis syndrome, Birt-Hogg-Due syndrome, familial hypertrophic cardiomyopathy, Wolf-Parkinson-White syndrome, neurodegenerative disorders, wet and dry macular degeneration, muscle wasting and myopathies, bacterial and viral infections, neurofibromatosis, Peutz-Jeghers syndrome and a proliferative disease.

2. A pharmaceutical combination for use according to claim 1 wherein the mTOR inhibitor is everolimus (RAD001).

3. A pharmaceutical combination for use according to claim 1 or 2, wherein the proliferative disease is selected from benign or malignant tumor, carcinoma of the brain, kidney, liver, adrenal gland, bladder, breast, renal cell carcinoma, neuroendocrine tumors, prostate, stomach, gastric tumors, ovaries, colon, rectum, prostate, pancreas, lung, vagina or thyroid, sarcoma, glioblastomas, multiple myeloma or gastrointestinal cancer, an epidermal hyperproliferation, psoriasis, prostate hyperplasia, a neoplasia, a neoplasia of epithelial character, lymphomas, a mammary carcinoma or a leukemia.

Case 54628-WO-PCT

PCT/US2012/034647

4. A pharmaceutical combination for use according to claim 3, wherein the gastrointestinal cancer is selected from colon carcinoma, colorectal adenoma or a tumor of the neck and head.
5. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutical combination according to a claim 1 or 2 for use in treating or preventing a mTOR kinase dependent disease selected from organ or tissue transplant rejection, graft-versus-host disease, restenosis, Hamartoma syndromes, lymphangioleiomyomatosis, retinitis pigmentosa, autoimmune diseases, steroid resistant acute Lymphoblastic leukaemia, fibrotic diseases, pulmonary hypertension, immunomodulation, multiple sclerosis, VHL syndrome, carney complex, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis syndrome, Birt-Hogg-Due syndrome, familial hypertrophic cardiomyopathy, Wolf-Parkinson-White syndrome, neurodegenerative disorders, wet and dry macular degeneration, muscle wasting and myopathies, bacterial and viral infections, neurofibromatosis, Peutz-Jeghers syndrome and a proliferative disease.
6. Use of a compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and at least one mTOR inhibitor selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogues thereof, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511 or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent disease selected from organ or tissue transplant rejection, graft-versus-host disease, restenosis, Hamartoma syndromes, lymphangioleiomyomatosis, retinitis pigmentosa, autoimmune diseases, steroid resistant acute Lymphoblastic leukaemia, fibrotic diseases, pulmonary hypertension, immunomodulation, multiple sclerosis, VHL syndrome, carney complex, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis syndrome, Birt-Hogg-Due syndrome, familial hypertrophic cardiomyopathy, Wolf-Parkinson-White syndrome, neurodegenerative disorders, wet and dry macular degeneration, muscle wasting and myopathies, bacterial and viral infections, neurofibromatosis, Peutz-Jeghers syndrome and a proliferative disease.
7. A method of treating or preventing a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent diseases by administering a compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof and at least one mTOR inhibitor selected from

Case 54628-WO-PCT

PCT/US2012/034647

RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogs thereof, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511 or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof, wherein the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase dependent disease is selected from organ or tissue transplant rejection, graft-versus-host disease, restenosis, Hamartoma syndromes, lymphangioleiomyomatosis, retinitis pigmentosa, autoimmune diseases, steroid resistant acute Lymphoblastic leukaemia, fibrotic diseases, pulmonary hypertension, immunomodulation, multiple sclerosis, VHL syndrome, carney complex, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis syndrome, Birt-Hogg-Due syndrome, familial hypertrophic cardiomyopathy, Wolf-Parkinson-White syndrome, neurodegenerative disorders, wet and dry macular degeneration, muscle wasting and myopathies, bacterial and viral infections, neurofibromatosis, Peutz-Jeghers syndrome and a proliferative disease.

8. A use according to claim 6 or a method according to claim 7, wherein the mTOR inhibitor is everolimus (RAD001).

9. A use according to claim 6 or a method according to claim 7, wherein the proliferative disease is selected from benign or malignant tumor; carcinoma of the brain, kidney, liver, adrenal gland, bladder, breast, renal cell carcinoma, neuroendocrine tumors, prostate, stomach, gastric tumors, ovaries, colon, rectum, prostate, pancreas, lung, vagina or thyroid, sarcoma, glioblastomas, multiple myeloma or gastrointestinal cancer, an epidermal hyperproliferation, psoriasis, prostate hyperplasia, a neoplasia, a neoplasia of epithelial character, lymphomas, a mammary carcinoma or a leukemia.

10. A use or a method according to claim 9, wherein the gastrointestinal cancer is selected from colon carcinoma, colorectal adenoma, and a tumor of the neck and head.

11. A method of treating a proliferative disease which has become resistant or has a decreased sensitivity to the treatment with at least one mTOR inhibitor selected from RAD rapamycin (sirolimus) and derivatives/analogs thereof, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomycin (an ethyl analog of FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511 or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising administering a

Case 54628-WO-PCT

PCT/US2012/034647

therapeutically effective amount of a compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a warm-blooded animal in need thereof.

12. A pharmaceutical combination comprising

a) a compound (S)-Pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 2-amide 1-({4-methyl-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimethyl-ethyl)-pyridin-4-yl]-thiazol-2-yl}-amide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and

b) at least one mTOR inhibitor selected from everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, and EM101/LY303511, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. A pharmaceutical combination according to claim 12, wherein the mTOR inhibitor is everolimus (RAD001) or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica, la cual comprende:

5 a) un compuesto de 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

y

10 b) cuando menos un inhibidor de mTOR seleccionado a partir de rapamicina RAD (sirolimus) y derivados/análogos de la misma, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, 15 XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,

para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad dependiente de cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR) seleccionada a partir de rechazo de trasplante de 20 órganos o tejidos, enfermedad del injerto contra el huésped, restenosis, síndromes de hamartoma, linfangioleiomiomatosis, retinitis pigmentosa, enfermedades autoinmunes, leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides, enfermedades fibróticas, hipertensión pulmonar, inmunomodulación, esclerosis múltiple, 25 síndrome de VHL, complejo de Carney, poliposis adenomatosa

familiar, síndrome de poliposis juvenil, síndrome de Birt-Hogg-Due, cardiomiopatía hidrotrófica familiar, síndrome de Wolf-Parkinson-White, trastornos neurodegenerativos, degeneración macular húmeda y seca, consunción muscular y miopatías, infecciones bacterianas y virales, neurofibromatosis, síndrome de Peutz-Jeghers, y una enfermedad proliferativa.

2. Una combinación farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001).

3. Una combinación farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la enfermedad proliferativa se selecciona a partir de tumor benigno o maligno, carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándula suprarrenal, vejiga, mama, carcinoma de células renales, tumores neuroendocrinos, próstata, estómago, tumores gástricos, ovarios, colon, recto, próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, una hiper-proliferación epidérmica, soriasis, hiperplasia de próstata, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, linfomas, un carcinoma mamario, o una leucemia.

4. Una combinación farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el cáncer gastrointestinal se selecciona a partir de carcinoma de colon, adenoma colo-rectal, o un tumor de cuello y cabeza.

5. Una composición farmacéutica, la cual comprende una

combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad dependiente de cinasa mTOR seleccionada a partir de rechazo de trasplante de órganos o tejidos, enfermedad del injerto
 5 contra el huésped, restenosis, síndromes de hamartoma, linfangioleiomiomatosis, retinitis pigmentosa, enfermedades autoinmunes, leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides, enfermedades fibróticas, hipertensión pulmonar, inmunomodulación, esclerosis múltiple, síndrome de VHL, complejo de Carney, poliposis
 10 adenomatosa familiar, síndrome de poliposis juvenil, síndrome de Birt-Hogg-Due, cardiomiopatía hidrotrófica familiar, síndrome de Wolf-Parkinson-White, trastornos neurodegenerativos, degeneración macular húmeda y seca, consunción muscular y miopatías, infecciones bacterianas y virales, neurofibromatosis, síndrome de
 15 Peutz-Jeghers, y una enfermedad proliferativa.

6. El uso de un compuesto de 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y cuando menos un inhibidor de mTOR
 20 seleccionado a partir de rapamicina RAD (sirolimus) y derivados/análogos de la misma, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-
 25 125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511 o una sal

farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad dependiente de cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR) seleccionada a partir de rechazo de trasplante de
5 órganos o tejidos, enfermedad del injerto contra el huésped, restenosis, síndromes de hamartoma, linfangioleiomiomatosis, retinitis pigmentosa, enfermedades autoinmunes, leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides, enfermedades fibróticas, hipertensión pulmonar, inmunomodulación, esclerosis múltiple,
10 síndrome de VHL, complejo de Carney, poliposis adenomatosa familiar, síndrome de poliposis juvenil, síndrome de Birt-Hogg-Due, cardiomiopatía hidrotrofica familiar, síndrome de Wolf-Parkinson-White, trastornos neurodegenerativos, degeneración macular húmeda y seca, consunción muscular y miopatías, infecciones bacterianas y
15 virales, neurofibromatosis, síndrome de Peutz-Jeghers, y una enfermedad proliferativa.

7. Un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cinasa dependiente del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR), mediante la administración de un compuesto de 1-
20 ({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y cuando menos un inhibidor de mTOR seleccionado a partir de rapamicina RAD (sirolimus) y derivados/análogos de la misma, everolimus (RAD001),
25 temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina

(un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, a un animal de sangre caliente que lo necesite, en donde la enfermedad dependiente de cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR) se selecciona a partir de rechazo de trasplante de órganos o tejidos, enfermedad del injerto contra el huésped, restenosis, síndromes de hamartoma, linfangioleiomiomatosis, retinitis pigmentosa, enfermedades autoinmunes, leucemia linfoblástica aguda resistente a esteroides, enfermedades fibróticas, hipertensión pulmonar, inmunomodulación, esclerosis múltiple, síndrome de VHL, complejo de Carney, poliposis adenomatosa familiar, síndrome de poliposis juvenil, síndrome de Birt-Hogg-Due, cardiomiopatía hidrotrófica familiar, síndrome de Wolf-Parkinson-White, trastornos neurodegenerativos, degeneración macular húmeda y seca, consunción muscular y miopatías, infecciones bacterianas y virales, neurofibromatosis, síndrome de Peutz-Jeghers, y una enfermedad proliferativa.

8. Un uso de acuerdo con la reivindicación 6, o un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001).

9. Un uso de acuerdo con la reivindicación 6, o un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad proliferativa se selecciona a partir de tumor benigno o maligno;

carcinoma del cerebro, riñón, hígado, glándula suprarrenal, vejiga, mama, carcinoma de células renales, tumores neuroendocrinos, próstata, estómago, tumores gástricos, ovarios, colon, recto, próstata, páncreas, pulmón, vagina o tiroides, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiple o cáncer gastrointestinal, una hiperproliferación epidérmica, soriasis, hiperplasia de próstata, una neoplasia, una neoplasia de carácter epitelial, linfomas, un carcinoma mamario, o una leucemia.

10. Un uso o un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el cáncer gastrointestinal se selecciona a partir de carcinoma de colon, adenoma colo-rectal, y un tumor de cuello y cabeza.

11. Un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que ha llegado a ser resistente o que tiene una disminución de sensibilidad al tratamiento con cuando menos un inhibidor de mTOR seleccionado a partir de rapamicina RAD (sirolimus) y derivados/análogos de la misma, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, ascomicina (un análogo etílico de FK506), deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, el cual comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-

amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, a un animal de sangre caliente que lo necesite.

12. Una combinación farmacéutica, la cual comprende:

5 a) un compuesto de 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) de 2-amida del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y

 b) cuando menos un inhibidor de mTOR seleccionado
10 a partir de everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), zotarolimus (ABT578), SAR543, deferolimus (AP23573/ MK-8669), AP23841, KU-0063794, INK-128, EX2044, EX3855, EX7518, AZD08055, OSI-027, WYE-125132, XL765, NV-128, WYE-125132, y EM101/LY303511, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15 13. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el inhibidor de mTOR es everolimus (RAD001), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

RESUMEN

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de cinasa de fosfatidil-inositol-3 (PI3K), el cual es un derivado de 2-carboxamida-cicloamino-urea, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y cuando menos un inhibidor del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; a una composición farmacéutica, la cual comprende dicha combinación; y a los usos de esta combinación en el tratamiento de las enfermedades proliferativas, más específicamente de las enfermedades dependientes de la cinasa del objetivo de rapamicina de mamífero (mTOR).

* * * * *

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 54628 - WO - PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2012/034647	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23/04/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 25/04/2011
Applicant NOVARTIS AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/034647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/436 A61K31/4439 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/029082 A1 (NOVARTIS AG [CH]; CARAVATTI GIORGIO [CH]; FAIRHURST ROBIN ALEC [GB]; F) 18 March 2010 (2010-03-18) cited in the application	1-14
Y	claims page 37, line 28 - line 32 page 55; example 15	1-14
Y	----- WO 2010/049481 A1 (NOVARTIS AG [CH]; GARCIA-ECHEVERRIA CARLOS [CH]; MAIRA SAUVEUR-MICHEL) 6 May 2010 (2010-05-06) claims page 1 page 6 - page 8 page 11 - page 12 example 1 ----- -/-	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2012

Date of mailing of the international search report

28/06/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kollmannsberger, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/034647

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHAI SUPARAT RISA ET AL: "Dual inhibition of PI3K α and mTOR as an alternative treatment for Kaposi's sarcoma", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 68, no. 20, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 8361-8368, XP002514946, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0878 the whole document	1-14
A	----- WO 2004/096797 A1 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; BRUCE IAN [GB]; CUENOUD B) 11 November 2004 (2004-11-11) page 52; example 133	1-14
A	----- V. SERRA ET AL: "NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Growth of Cancer Cells with Activating PI3K Mutations", CANCER RESEARCH, vol. 68, no. 19, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 8022-8030, XP55018423, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1385 the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/034647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010029082	A1	18-03-2010	
		AR 073369 A1	03-11-2010
		AU 2009290904 A1	18-03-2010
		CA 2734819 A1	18-03-2010
		CN 102149711 A	10-08-2011
		CO 6351738 A2	20-12-2011
		DO P2011000070 A	31-03-2011
		EA 201100447 A1	31-10-2011
		EC SP11010880 A	29-04-2011
		EP 2331537 A1	15-06-2011
		JP 2012502080 A	26-01-2012
		KR 20110038737 A	14-04-2011
		MA 32604 B1	01-09-2011
		PA 8841901 A1	28-06-2010
		PE 07962011 A1	04-11-2011
		SM AP201100019 A	06-05-2011
		SV 2011003853 A	16-05-2011
		TW 201014851 A	16-04-2010
		US 2010105711 A1	29-04-2010
		UY 32096 A	30-04-2010
		WO 2010029082 A1	18-03-2010
WO 2010049481	A1	06-05-2010	
		AU 2009309616 A1	06-05-2010
		CA 2736361 A1	06-05-2010
		CN 102202668 A	28-09-2011
		EP 2349275 A1	03-08-2011
		JP 2012506898 A	22-03-2012
		KR 20110090911 A	10-08-2011
		US 2011195966 A1	11-08-2011
		WO 2010049481 A1	06-05-2010
WO 2004096797	A1	11-11-2004	
		AR 044519 A1	14-09-2005
		AT 445614 T	15-10-2009
		AU 2004234068 A1	11-11-2004
		AU 2008255157 A1	08-01-2009
		BR PI0410037 A	25-04-2006
		CA 2524401 A1	11-11-2004
		CL 9172004 A1	11-02-2005
		CN 1816549 A	09-08-2006
		CN 101648949 A	17-02-2010
		EC SP056127 A	01-03-2006
		EP 1622897 A1	08-02-2006
		EP 2157091 A1	24-02-2010
		ES 2331883 T3	19-01-2010
		HK 1091810 A1	20-05-2010
		IS 8152 A	25-11-2005
		JP 4510807 B2	28-07-2010
		JP 2006525266 A	09-11-2006
		KR 20060009884 A	01-02-2006
		MA 27774 A1	01-02-2006
		MX PA05011740 A	26-01-2006
		PE 01472005 A1	05-05-2005
		PT 1622897 E	10-12-2009
		RU 2384580 C2	20-03-2010
		RU 2009134044 A	20-03-2011
		US 2007032487 A1	08-02-2007
		US 2011105535 A1	05-05-2011
		WO 2004096797 A1	11-11-2004