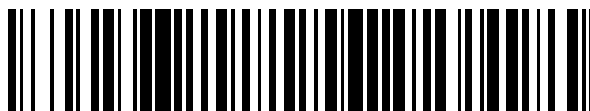


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 205**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2007 E 07809273 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2046315**

54 Título: **Agentes terapéuticos para el tratamiento de linfoma de células del manto**

30 Prioridad:

02.06.2006 US 803845 P

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

18.07.2013

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201 , US**

72 Inventor/es:

**BYRD, JOHN, C.;
PERROTTI, DANILO;
CHEN, CHING-SHIH;
DALTON, JAMES, T.;
FRISSORA, FRANK;
ZHAO, XIAOBIN;
LIU, QING y
MUTHUSAMY, NATARAJAN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 414 205 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes terapéuticos para el tratamiento de linfoma de células del manto

5 ANTECEDENTES

[0001] A pesar del progreso que se ha hecho en el tratamiento de tumores malignos linfoides, tales como leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC), la mayoría de los pacientes con cada una de estas enfermedades desarrollan eventualmente resistencia y por último lugar mueren de su leucemia. En LLA y LLC se ha mostrado que los mecanismos de resistencia implican alternancia en la expresión de miembros de la familia Bcl-2 que previene la apoptosis y la señalización anómala mediante rutas de PKC, PI3 cinasa/AKT y ERK en parte mediadas por interacciones de células del estroma. Por tanto, se necesitan nuevas terapias que actúen mediante mecanismos de acción novedosos que actúen tanto independiente de la expresión de miembros de la familia Bcl-2 como antagonicen rutas de transducción de señales anómalas para tanto LLC como LLA. Los linfocitos normales utilizan serina/treonina fosfatasa tales como PP1, PP2A y PP2B para tanto inactivar las rutas de transducción de señales como antagonizar la acción de miembros de la familia Bcl-2 que incluyen Bcl-2 y Bad. En trastornos linfoproliferativos de linfocitos B, estas mismas fosfatasas son frecuentemente silenciadas, un proceso que puede contribuir adicionalmente a la resistencia a fármacos observada en estas enfermedades. No se han probado agentes terapéuticos que activen serina/treonina fosfatasas tales como PP2A en la clínica para LLC y LLA.

[0002] FTY720 (clorhidrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol) es un compuesto sintético producido por modificación de un inmunodepresor natural, ISP-1. Se observó que FTY720 interfería en el tráfico de linfocitos T y en estudios preclínicos se demostró que prolongaba la supervivencia de órganos de aloinjerto trasplantados sin toxicidad evidente para el huésped. Estudios clínicos de fase I/II temprana de FTY720 para tratar y prevenir rechazo de órgano demostraron ser prometedores. Como consecuencia, FTY720 está actualmente en ensayos clínicos de fase III como inmunodepresor para rechazo de trasplante renal. FTY720 provoca una linfopenia resultante de una redistribución reversible de linfocitos de la circulación a tejidos linfoides secundarios. FTY720 se fosforila por esfingosina cinasa y el compuesto fosforilado es un potente agonista en cuatro receptores de esfingosina-1-fosfato que modulan respuestas quimiotácticas y el tráfico de linfocitos. Se ha mostrado que FTY720 se une al receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P), produciendo una disminución del número de linfocitos maduros en circulación por aceleración de la recirculación de linfocitos. Estudios previos también han sugerido que FTY720 también podría promover la activación de la serina/treonina fosfatasa PP2A.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0003] Fig. 1: Diagrama esquemático de FTY720.

[0004] Fig. 2: Citotoxicidad mediada por FTY720 en líneas de linfocitos B MEC, Ramos, Raji y 697 - Análisis cinético de la dosis y el tiempo. Células MEC (panel a), Ramos (panel b), Raji (panel c) o 697 (panel d) (1×10^5 células/ml) se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de FTY720 o vehículo DMSO durante 24 horas (barra rellena) o 48 horas (barra en rejilla). Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos se recogieron en modo de lista. Los datos mostrados representan % de células viables por anexina VTPI \pm DE que están normalizadas a control de medio. (n=3; *p<0,001) cuando se comparan con control de medio).

[0005] Fig. 3: Citotoxicidad mediada por FTY720 en linfocitos B CD19+ de pacientes con LLC - Análisis cinético de la dosis y el tiempo. Linfocitos B CD19+ purificados de pacientes con LLC (1×10^6 /ml de medio) se incubaron con concentraciones indicadas de FTY720 o vehículo DMSO durante 24 horas (panel izquierdo) o 48 horas (panel derecho). Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos se recogieron en modo de lista. Los datos mostrados representan % de células viables por anexina V/YP \pm DE que están normalizadas a control de medio (n=15) *p<0,001 cuando se comparan con control de vehículo sin tratar)

[0006] Fig. 4. La citotoxicidad inducida por FTY720 en células de LLC es independiente de la activación de caspasas. *Panel 4a:* Linfocitos B purificados de pacientes con LLC (1×10^6 /ml de medio) se incubaron con FTY720 10 μ M en presencia o ausencia de z-VAD-fmk (150 μ M) durante 24 horas. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos se recogieron en modo de lista. Los datos mostrados representan %

de células viables por anexina V/YP⁺ ± DE que están normalizadas a control de medio. (n=3; *p=0,001 cuando se comparó con el grupo tratado con FARA; **p=0,998 cuando se comparó con el grupo tratado con FTY720). Panel 4b: Linfocitos B purificados de pacientes con LLC (1x10⁶ /ml de medio) se incubaron con DMSO (ninguno) o FTY720 10 uM durante 24 y 48 h. Los análisis de transferencia Western de los lisados de cada una de las condiciones se evaluaron para PARP, caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 escindida y sin escindir como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". La flecha en negrita indica la forma sin escindir de cada una de las proteínas y las flechas discontinuas indican productos escindidos. Como controles positivos se usaron lisados de células de Jurkat sin tratar y tratados con UV.

10 **[0007] Fig. 5. La citotoxicidad inducida por FTY720 en linfocitos B es independiente de Bcl-2.** Células 697 transfectadas con vector vacío 697-neo (barra en rejilla) o 697-bcl-2 (barra rellena) (1 x 10⁵ células/ml) se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de FTY720 o vehículo DMSO durante 24 horas. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos se recogieron en modo de lista. Los 15 datos mostrados representan % de células viables por anexina V/YP⁺ ± DE que están normalizadas a control de medio.

[0008] Fig. 6. La citotoxicidad inducida por FTY720 en células de LLC depende de la activación de PP2A. Panel a: FTY720 indujo actividad de PP2A en linfocitos B CD19+ de pacientes con LLC: Linfocitos B 20 purificados de pacientes con LLC (1 x 10⁶ /ml de medio) se incubaron con DMSO o FTY720 10 uM durante 0, 1, 2, 3 ó 15 horas. La actividad de PP2A en los lisados celulares se midió como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". El panel izquierdo muestra la cinética del tiempo de un experimento representativo. El panel derecho muestra el resumen de la actividad de PP2A a las 4 horas en 5 muestras independientes en respuesta a DMSO, FTY720 10 uM ó 1,9-didesoxi-forskolina. Panel b: La actividad de PP2A inducida por FTY720 en linfocitos B 25 CD19+ se inhibe por ácido okadaico. Linfocitos B purificados de pacientes con LLC (1 x 10⁶ /ml de medio) se pretrataron con medio o ácido okadaico (5 nM) durante 2 horas, seguido de incubación con DMSO o FTY72 10 uM durante periodos de tiempo indicados. La actividad de PP2A en los lisados celulares se midió como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos" (n=4. *p<0,001 cuando se comparó con el grupo tratado con FTY720). Panel c: La citotoxicidad celular inducida por FTY720 es parcialmente rescatada por ácido okadaico. Linfocitos B 30 purificados de pacientes con LLC (1 x 10⁶ /ml de medio) se pretrataron con medio o ácido okadaico (5 nM) durante 2 horas, seguido de incubación con DMSO o FTY720 10 uM. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos se recogieron en modo de lista. Los datos mostrados representan % de células viables por anexina V/YP⁺ ± DE que están normalizadas a control de medio (n=4; *p=0,06 cuando se comparó con el grupo 35 tratado con FTY720).

[0009] Fig. 7. La citotoxicidad inducida por FTY720 en la línea de linfocitos B Ramos depende de la activación de PP2A. Panel a: FTY720 indujo actividad de PP2A inducida en la línea de linfocitos B Ramos. Se incubaron linfocitos B Ramos (1 x 10⁵ /ml de medio) con DMSO, FTY720 10 uM ó 1,9-didesoxi-forskolina 10 uM 40 durante 4 horas. La actividad de PP2A en los lisados celulares se midió como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". El resultado mostrado es uno representativo de 2 experimentos independientes. Panel b: La actividad de PP2A inducida por FTY720 en la línea de linfocitos B Ramos se inhibe por ácido okadaico. Se pretrataron linfocitos B Ramos (1 x 10⁵ /ml de medio) con medio o las concentraciones indicadas de ácido okadaico durante 2 horas, seguido de la incubación con DMSO o FTY72 10 uM durante 4 horas. La actividad de 45 PP2A en los lisados celulares se midió como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". El resultado mostrado es uno representativo de 2-3 experimentos independientes. Panel c: La citotoxicidad celular inducida por FTY720 es parcialmente rescatada por ácido okadaico en linfocitos B Ramos. Se pretrataron linfocitos B Ramos (1 x 10⁵ /ml de medio) con medio o concentraciones indicadas de ácido okadaico (5 nM) durante 2 horas, seguido de incubación con DMSO o FTY720 10 uM. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio 50 como se describe en la sección de "Materiales y procedimientos". Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos se recogieron en modo de lista. Los datos mostrados representan % de células viables por anexina V/YP⁺ ± DE que están normalizadas a control de medio. Los resultados mostrados es la media ± DE de 5 experimentos independientes.

55 **[0010] Fig. 8. Evaluación terapéutica in vivo de FTY720 en un modelo de ratón de xenoinjerto SCID de linfoma/leucemia diseminada.** Veintiséis C.B.-17 SCID de 6-8 semanas de edad hembra se inyectaron con 2 x 10⁶ células Raji intravenosamente (i.v) por la vena de la cola en 200 de ul PBS estéril. Setenta y cuatro horas después de la inoculación, los animales se dividieron en 4 grupos de tratamiento iguales. Los 3 primeros grupos sirvieron de control y recibieron inyección de vehículo, trastuzumab o rituximab y el 4^o grupo consistió en animales tratados con

FTY720 (5 mg/kg) cada día durante 2 semanas i.p. Todos los animales se monitorizaron diariamente para signos de enfermedad y se sacrificaron inmediatamente si se observó parálisis de las extremidades traseras, disnea o 30% de pérdida de peso corporal. El punto final del estudio fue la supervivencia definida como el tiempo para el desarrollo de parálisis de las extremidades traseras. La mediana del tiempo de supervivencia para ratones tratados con FTY720 fue 47 días (IC del 95% 39-53). Esto es significativamente prolongado en comparación con los controles de placebo (18 días, IC del 95% 17-19; FTY720 frente a placebo $P < 0,0001$).

[0011] Fig. 9: FTY720 inhibe la proliferación de varias líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA). Cultivos celulares se expusieron durante 48 horas a control de vehículo y concentraciones crecientes de FTY720, y posteriormente se sometieron a ensayo de MTS por instrucciones del fabricante. Se muestran las concentraciones medias (Fig. 9A) a las que la proliferación se inhibió el 50% (CI50) y curvas de dosis representativas (Fig. 9B).

[0012] Figura 10: FTY720 induce apoptosis en líneas celulares de LMA. Se expusieron cultivos celulares a control de vehículo y dosis crecientes de FTY720 durante 48 horas. Las células se tiñeron entonces con anexina V (AnV) y yoduro de propidio (YP), y se analizaron usando citometría de flujo rutinaria. El porcentaje de células viables (AnV⁻ YP⁻), células que experimentan apoptosis (AnV⁺ YP⁻) y células necróticas (AnV⁺ YP⁺) se representa para cada línea celular estudiada en la Fig. 10A. Representaciones representativas para la línea celular MV411 se muestran en la Fig. 10B.

[0013] Figura 11: FTY720 no produce detención del ciclo celular en líneas celulares de LMA. Se trataron suspensiones de células con control de vehículo, 1 μ M, y FTY720 10 μ M durante 48 horas. Después de la fijación en etanol, las muestras se tiñeron con yoduro de propidio y se evaluaron para contenido de ADN. El porcentaje de células en subG1, G1, S y G2-M para cada línea celular se representa (Fig. 11A) con representaciones representativas más adelante para MV411 (Fig. 11B). Aunque no se observa detención del ciclo celular, la inducción de apoptosis es observada por la fracción creciente de sub G1 con tratamiento con FTY720.

[0014] Figura 12: El derivado D2 de FTY720 muestra citotoxicidad similar al compuesto parental. Se examinó la inhibición de la proliferación celular para diversos derivados usando ensayo de MTS. Aunque D1 parece ser ligeramente menos eficaz, las líneas celulares de LMA muestran sensibilidad similar a D2, un derivado menos inmunosupresor.

[0015] Figura 13: FTY720 indujo apoptosis en células de linfoma de células del manto mediante mecanismo dependiente de la activación de caspasas. Panel a: FTY720 indujo apoptosis en células de LCM: Células MCL primarias (2×10^6 /ml), células Jeko y Mino (5×10^5) se trataron con FTY720 0, 1,25,5, 7,5, 10 y 15 μ M durante 24 h. Las células se recogieron y se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Las células se analizaron por citometría de flujo. Las células vivas se identificaron excluyendo tinción de FITC y YP. Las células anexina V⁻YP⁻ normalizadas a controles de vehículo se representan como % de células vivas. Panel b: la apoptosis inducida por FTY720 depende de la activación de caspasas. Células Mino (5×10^5 /ml) se trataron con FTY720 15 μ M en la presencia o ausencia de z-Vad-fink 150 μ M durante 24 h. El panel izquierdo representa el porcentaje de células viables por anexina V/YP \pm DE normalizadas a control de medio. El panel derecho muestra el análisis de transferencia Western de lisados 4 h y 24 h después del tratamiento con anticuerpo anti-PARP. Los lisados de células tratadas con UV se usaron como control positivo para PARP procesada.

[0016] Figura 14: Los mecanismos de FTY720 indujeron muerte celular en células de LCM primarias y líneas celulares de LCM. 14a: FTY720 indujo modulación por disminución de ciclina D1 en células de LCM primarias. Células de LCM primarias (2×10^6 /ml) se trataron con FTY720 15 μ M. Los lisados celulares se recogieron 8 y 24 h después del tratamiento y se sometieron a transferencia Western usando los anticuerpos indicados. 14b: FTY720 indujo modulación por disminución de niveles de proteínas fosfo Akt y Akt en células de LCM. Células Mino (5×10^5 /ml) se trataron con FTY720 15 μ M. Los lisados celulares se recogieron 8 y 24 h después del tratamiento y se sometieron a transferencia Western usando los anticuerpos indicados. 14c: FTY720 indujo disminución en ciclina D1 en la línea celular Mino. Células Mino (2×10^5 /ml) se trataron con FTY720 15 μ M. Los lisados celulares se recogieron 12, 24 y 48 h después del tratamiento y se sometieron a transferencia Western usando anticuerpo anti-ciclina D1. El control de actina muestra carga comparable en cada uno de los carriles. 14d: FTY720 indujo detención del ciclo celular en células de LCM. Células Mino (5×10^5 /ml) se trataron con vehículo DMSO, FTY720 7,5 μ M o 10 μ M durante 12, 24 h. Las células se recogieron y se fijaron con etanol y posteriormente se tiñeron con yoduro de propidio. El ciclo celular se analizó por citometría de flujo. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. 14e: FTY720 indujo fosforilación de ERK1/2 en la línea celular Mino. Se trataron células Mino (5×10^5 /ml) con FTY720 12 μ M durante los periodos de tiempo indicados y los lisados celulares se

recogieron 8 y 24 h después del tratamiento y se sometieron a transferencia Western usando los anticuerpos indicados.

5 **[0017]** Nagahara y col. (J. Cancer Res., 2001, 92(6), 680-687) informaron de apoptosis inducida por FTY720 en la línea celular HL60 (LMA) y en linfocitos T Jurkat. Se dijo que células Jurkat que expresan en exceso Bcl-2 no mostraron apoptosis.

[0018] Fujino y col. (J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002, 300(3), 939-945) mostró resultados similares con linfocitos T Jurkat que expresan en exceso Bcl-2.

10 **[0019]** Li Dengju y col. (Huazhong University J. Med. Sci., 2004, 24(1), 45-47) probaron los efectos de FTY720 sobre HL60 (LMA) y U937 (LMA).

[0020] Matsuaoka y col. (Brit. J. Pharmacol., 2003, 138, 1303-1312) probaron el efecto de FTY720 sobre linfocitos T Jurkat, U937 (LMA) y B-LLA y establecieron que la apoptosis no es inducida en linfocitos B de LLA, debido a la presencia de Bcl-2.

15 **[0021]** Nagahara y col. (J. Immunol., 2000, 156(6), 3250-3259); Matsuoka y col. (Cell Biology Int., 2000, 24(12), 976-977); y Seitz y col. (Exp. Hematol., 2005, 33(7), 99) también se refieren a FTY720, pero no mencionan ningún efecto de FTY720 sobre células que expresan en exceso Bcl-2.

[0022] Los documentos US 6.004.565 y US 6.121.329 se refieren al uso de FTY720 como inmunodepresor, para prevenir rechazo de trasplante.

25 DESCRIPCIÓN

[0023] La presente invención proporciona un procedimiento y composición novedosa para su uso en el tratamiento de linfoma de células del manto (LCM). En algunas realizaciones, los pacientes son resistentes a otros tratamientos.

30 **[0024]** A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, etc., usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la presente invención. Como mínimo, y no como un intento por limitar la solicitud de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse en vista del número de dígitos significativos y aproximaciones de redondeo comunes.

40 **[0025]** A pesar de que los intervalos y parámetros numéricos que exponen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan tan precisos como sea posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar encontrada en sus mediciones de prueba respectivas. Cada intervalo numérico facilitado en toda esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que se encuentre dentro de tal intervalo numérico más ancho, como si tales intervalos numéricos más estrechos fueran todos expresamente escritos en el presente documento.

[0026] El término "resistente" representa pacientes previamente tratados que tanto no respondieron al tratamiento con el agente como tuvieron una respuesta al tratamiento y luego recayeron.

50 **[0027]** El término "tratamiento" como se usa en el presente documento incluye destrucción parcial o total de los tumores malignos linfoides con efectos destructores mínimos sobre células normales.

[0028] El término "prevención" incluye tanto prevenir la aparición de un tumor maligno linfóide clínicamente evidente como prevenir la aparición de un estadio preclínicamente evidente de tumor maligno linfóide en individuos en riesgo. También pretende englobarse por esta definición la prevención de metástasis de células malignas o para detener o invertir la progresión de células malignas. Esto incluye tratamiento profiláctico de aquellos en riesgo de desarrollar precánceres y cánceres.

[0029] Los términos “terapéuticamente eficaz” y “farmacológicamente eficaz” pretenden clasificar la cantidad de cada agente que logrará el objetivo de mejora en la gravedad de la enfermedad y la frecuencia de incidencia, a la vez que se previenen los efectos secundarios adversos normalmente asociados a terapias alternativas.

5 **[0030]** El término “sujeto” para los fines de tratamiento incluye cualquier sujeto humano o animal que tenga un trastorno caracterizado por tumores malignos linfoides o está en riesgo de desarrollar un trastorno tal. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de linfocitos B, leucemia mieloide aguda (LMA) y linfoma de células del manto (LCM). Para los procedimientos descritos en el presente documento, el sujeto es cualquier sujeto humano o animal, y en algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano que ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar un tumor maligno linfoide. El sujeto puede estar en riesgo debido a exposición a agentes carcinogénicos, estar genéticamente predispuesto a tumores malignos linfoides, etc. Además de ser útil para tratamiento humano, los compuestos de la presente invención también son útiles para tratamiento veterinario de mamíferos, que incluyen animales de compañía y animales de granja tales como, pero no se limitan a, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas y cerdos.

10
15 **[0031]** Los procedimientos descritos en el presente documento pueden producir muerte celular por varios mecanismos diferentes; sin embargo, un aspecto de estos procedimientos es que puede inducir apoptosis en tumores malignos linfoides. El término “apoptosis” se refiere al procedimiento de muerte celular programada. En cada persona, cientos de miles de células viejas o dañadas mueren cada día mediante el proceso de apoptosis y son sustituidas en los altilibajos de mantener un número constante de células vivas en el cuerpo. Las células viejas y dañadas mueren en respuesta a una señal desencadenada sobre la superficie celular para autodestruir la célula diana. La apoptosis se distingue de otros mecanismos de muerte celular, tales como necrosis, que produce inflamación que incluye hinchazón, rojez, dolor y dolor con la palpación. La apoptosis no estimula tales reacciones. En apoptosis, las células se secan, se rompen en trozos y el contenido se elimina discretamente mediante procesos que no inducen inflamación. Por estos motivos es altamente deseable inducir la apoptosis, en vez de la necrosis, en células rápidamente proliferantes, tales como células cancerosas. Sin embargo, las mutaciones en algunas células cancerosas confieren resistencia de estas células a la apoptosis. Se ha encontrado que los procedimientos descritos en el presente documento inducen apoptosis incluso en tumores malignos linfoides que, debido a las mutaciones, son por lo demás resistentes a la apoptosis. La apoptosis puede distinguirse de otros mecanismos de tratamiento por procedimientos tales como microscopía, que se conocen en la técnica.

20
25
30 **[0032]** Los términos “células proliferativas”, “células proliferantes”, “células rápidamente proliferantes” “células proliferantes no deseables”, “células rápidamente proliferantes no deseables” “células rápidamente proliferantes no queridas” y similares se refieren a células cancerosas, células precancerosas y otras células anormales rápidamente divisorias en un sujeto.

35 **[0033]** Derivados pretende engloban cualquier compuesto que esté estructuralmente relacionado con los compuestos de fórmula I que poseen actividad sustancialmente equivalente, como se mide por la capacidad del derivado para inducir apoptosis en tumores malignos linfoides sin inhibición de COX-2 sustancial. A modo de ejemplo, tales compuestos pueden incluir profármacos de los mismos. Tales compuestos pueden formarse *in vivo*, tal como por mecanismos metabólicos.

40 **[0034]** En el presente documento también se describen procedimientos terapéuticos de inducción de apoptosis en tumores malignos linfoides. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I a un sujeto que tiene un trastorno o que tiene predisposición a un trastorno que implica tumores malignos linfoides.

45 **[0035]** En la familia de compuestos de fórmula I también están incluidas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. El término “sales farmacéuticamente aceptables” connota sales comúnmente usadas para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. La naturaleza de la sal no es crítica, a condición de que sea farmacéuticamente aceptable. Sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas de compuestos de fórmula I pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Ejemplos de tales ácidos inorgánicos son ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse de clases alifáticas, cicloalifáticas, aromáticas, aralifáticas, heterocíclicas, carboxílicas y sulfónicas de ácidos orgánicos, ejemplos de los cuales incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico, salicílico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico, pamoico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, 2-hidroxietanosulfónico, toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico,

esteárico, alginico, hidroxibutírico, galactárico y galacturónico. Sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas de compuestos de fórmula I incluyen sales metálicas preparadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Alternativamente, las sales orgánicas preparadas a partir de N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína pueden usarse a partir de sales de adición de base de los compuestos de fórmula I. Todas estas sales pueden prepararse mediante medios convencionales a partir de los compuestos correspondientes de fórmula I haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o base apropiado con el compuesto de fórmula I.

[0036] En el presente documento también se describe una composición farmacéutica para inducir apoptosis en tumores malignos linfoides, tal como para tratar, prevenir o retrasar la aparición de un tumor maligno linfoides en un sujeto en necesidad de tal tratamiento. La composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo en asociación con al menos un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable (denominados conjuntamente en el presente documento "materiales de vehículo") y, si se desea, otros principios activos. Los compuestos activos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida para aquellos expertos en la materia, en forma de una composición farmacéutica adaptada para tal vía y en una dosis eficaz para el tratamiento previsto. Los compuestos activos y la composición pueden, por ejemplo, administrarse por vía oral, intravascularmente, intraperitonealmente, intranasalmente, intrabronquialmente, subcutáneamente, intramuscularmente o tópicamente (incluyendo aerosol). Con algunos sujetos puede ser más apropiada la administración local, en vez de la administración al sistema. La formulación en un vehículo de lípido puede usarse para potenciar la biodisponibilidad.

[0037] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser para fines tanto de prevención como de tratamiento. Los procedimientos y composiciones usados en el presente documento pueden usarse solos o conjuntamente con terapias adicionales conocidas para aquellos expertos en la materia en la prevención o tratamiento de trastornos caracterizados por tumores malignos linfoides. Alternativamente, los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse como terapia auxiliar. A modo de ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse solos o conjuntamente con otros agentes antineoplásicos u otros agentes inhibidores del crecimiento u otros fármacos o nutrientes.

[0038] Está disponible un gran número de agentes antineoplásicos en uso comercial, en evaluación clínica y en desarrollo preclínico que podrían seleccionarse para el tratamiento de cánceres u otros trastornos caracterizados por la rápida proliferación de células por quimioterapia de fármacos de combinación. Tales agentes antineoplásicos se clasifican en varias categorías principales, concretamente, agentes tipo antibiótico, agentes alquilantes, agentes antimetabolitos, agentes hormonales, agentes inmunológicos, agentes tipo interferón y una categoría de diversos agentes. Alternativamente pueden usarse otros agentes antineoplásicos, tales como inhibidores de proteasas de la metalomatrix (MMP) tales como inhibidores de MMP-13 que incluyen batimastat, marimastat, AG-3340 de Agouron Pharmaceutical y RO-32-3555 de Roche, o inhibidores de α 3. Agentes adecuados que pueden usarse en terapia de combinación serán reconocidos por aquellos expertos en la materia. Similarmente, si se desea terapia de combinación, también pueden usarse agentes radioprotectores conocidos para aquellos expertos en la materia.

[0039] El término "terapia auxiliar" (o "terapia de combinación"), en la definición del uso de un compuesto de la presente invención y uno o varios de otros agentes farmacéuticos, pretende englobar la administración de cada agente en un modo secuencial en una pauta que proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos, y también está previsto que englobe la co-administración de estos agentes en un modo sustancialmente simultáneo, tal como en una única formulación que tiene una relación fija de estos agentes activos, o en múltiples formulaciones separadas para cada agente.

[0040] Para administración por vía oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está hecha en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del principio activo. Ejemplos de tales unidades de dosificación son cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o una suspensión, con aditivos convencionales tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; y con lubricantes tales como talco o estearato de magnesio. El principio activo también puede administrarse mediante inyección como una composición en la que puede usarse, por ejemplo, solución salina, dextrosa o agua como vehículo adecuado.

[0041] Para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal, el compuesto puede combinarse con una disolución acuosa estéril que es, en algunas realizaciones, isotónica con la sangre del receptor.

Tales formulaciones pueden prepararse disolviendo principio activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles tales como cloruro sódico, glicina y similares, y que tiene un pH tamponado compatible con condiciones fisiológicas para producir una disolución acuosa, y convirtiendo dicha disolución en estéril. Las formulaciones pueden estar presentes en recipientes unitarios o de múltiples dosis tales como ampollas cerradas o 5 viales.

[0042] Formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del compuesto activo que, en algunas realizaciones, es isotónica. Las preparaciones para inyecciones también pueden formularse suspendiendo o emulsionando los compuestos en disolvente no acuoso, tal 10 como aceite vegetal, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol.

[0043] La forma de dosificación y cantidad puede establecerse fácilmente por referencia a tratamiento conocido o pautas profilácticas. La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y la pauta de dosificación para tratar una condición de enfermedad con los compuestos y/o composiciones de la presente 15 invención depende de una variedad de factores que incluye la edad, peso, sexo y condición médica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía y frecuencia de administración, y el compuesto particular empleado, además de las propiedades farmacocinéticas del individuo tratado y, por tanto, pueden variar ampliamente. La dosificación será generalmente inferior si los compuestos se administran localmente en vez de sistémicamente, y para prevención en vez de para tratamiento. Tales tratamientos pueden administrarse tan frecuentemente como sea necesario y durante 20 el periodo de tiempo juzgado necesario por el médico práctico. Un experto en la materia apreciará que la pauta de dosificación o cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor que va a administrarse puede necesitar optimizarse para cada individuo. Las composiciones farmacéuticas pueden contener principio activo en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 2000 mg en algunas realizaciones, en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 500 mg en otras realizaciones, y entre aproximadamente 1 y 200 mg en otras realizaciones más. En algunas realizaciones, una 25 dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal es apropiada. En otras realizaciones puede ser apropiada una dosis diaria de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. La dosis diaria puede administrarse en dosis individuales o múltiples dosis al día.

[0044] **EJEMPLO 1** (no parte de la invención)

[0045] FTY720 es un agente inmunosupresor que está siendo desarrollado para prevenir rechazo de trasplante de órgano. Aquí, los presentes inventores demuestran aquí un mecanismo novedoso por el que FTY720 30 media en efectos citotóxicos en líneas celulares que representan diferentes tumores malignos de linfocitos B y en células de leucemia linfocítica crónica (LLC) primarias. FTY720 indujo apoptosis celular como se detecta por tinción con anexina V/yoduro de propidio en líneas de linfocitos B que representan leucemia linfoblástica aguda (LLA) y linfocitos B CD19+ primarios derivados de pacientes con LLC en un tiempo y modo dependiente de la dosis. A diferencia de los informes previos en líneas de linfocitos T, la citotoxicidad inducida por FTY720 en células de LLC primarias y la línea de células Raji es independiente de la activación de la caspasa 3, 8 y 9 o escisión de poli-ADP 35 ribosa polimerasa. Además, el inhibidor de pan-caspasa Z-VAD-fmk rescató las células de fludarabina, pero no apoptosis inducida por FTY720. La expresión en exceso de Bcl-2 fracasó en proteger los linfocitos B de la apoptosis inducida por FTY720, sugiriendo el efecto citotóxico independiente de Bcl-2. De forma interesante, FTY720 indujo un aumento coherente en la actividad de proteína fosfatasa 2A (PP2A) y concentraciones de ácido okadaico que inhibieron la actividad de PP2A inducida por FTY720 también produjeron la inhibición de citotoxicidad mediada por 40 FTY720 en células de LLC primarias y líneas de linfocitos B, que indica una función para la activación de PP2A en la citotoxicidad mediada por FTY720. Además, el tratamiento con FTY720 produjo supervivencia prolongada asociada a eficacia terapéutica *in vivo* significativa en un modelo de ratón SCID de xenoinjerto de linfoma/leucemia de linfocitos B diseminados. Estos resultados proporcionan la primera prueba de una citotoxicidad de FTY720 dependiente de PP2A e independiente de caspasas en linfocitos B y la eficacia de FTY720 como agente terapéutico en una variedad de tumores malignos de linfocitos B que incluyen LLC.

[0046] **Materiales y procedimientos**

[0047] **Células:** Se obtuvo sangre de pacientes con LLC de linfocitos B con consentimiento informado bajo un protocolo aprobado por el comité de ética interno del hospital. Todos los pacientes examinados en esta serie 55 tuvieron LLC inmunofenotípicamente definida como se explica resumidamente por los criterios del 96 Instituto nacional del cáncer modificados. Los linfocitos B de LLC se aislaron de sangre recientemente donada usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Ficoll-Paque Plus, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ). Las células mononucleares aisladas se incubaron en medio RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (SBF, Hyclone Laboratories, Logan, UT), L-glutamina 2 mM

(Invitrogen, Carlsbad, CA) y penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) [Sigma-Aldrich, St. Louis] a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Los linfocitos B de LLC recientemente aislados se usaron en todos los experimentos descritos en el presente documento. Las fracciones de linfocitos B enriquecidas se prepararon usando el kit de selección negativo para MACS de Miltenyi Biotec (Auburn, CA) o el kit "Rosette-Sep" de Stem Cell Technologies (Vancouver, British Columbia, Canadá) según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron líneas celulares de linfocitos B humanos Raji y Ramos de ATCC (Manassas, VA) y las células MEC se obtuvieron del banco de líneas celulares alemán (Braunschweig, Alemania). Las líneas celulares 697-neo y 697-Bcl-2 fueron una amable donación del Dr. John Reed (Burnham Institute, La Jolla, CA). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco/Invitrogen).

[0048] Reactivos químicos: FTY720 se sintetizó según un procedimiento informado (32), y su identidad y pureza se confirmaron por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Z-VAD-fmk (Sigma-Aldrich, St. Louis) y ácido okadaico (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) se usaron a las concentraciones indicadas.

[0049] Análisis de viabilidad celular y apoptosis: La viabilidad celular se llevó a cabo por tinción dual con anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (YP) como se ha descrito previamente. Brevemente, 1×10^6 células se tiñeron con anexina V-FITC (BD Pharmingen) y yoduro de propidio (BD Pharmingen) durante 15 minutos en la oscuridad y se analizaron por citometría de flujo usando un citómetro Beckman-Coulter EPICS XL (Beckman-Coulter, Miami, FL). Las células apoptóticas se identificaron como células positivas para anexina V y/o YP. Las células que excluyeron tanto FITC como YP se consideraron viables. Las células anexina V⁺/YP⁻ se representan como % de células vivas normalizadas a controles sin tratar.

[0050] Ensayo de MTT: El crecimiento celular se evaluó usando el ensayo de MTT. Las células (1×10^6) se dispusieron en 200 µl de medio ± concentraciones indicadas de FTY720 en cada pocillo de placas de microtitulación planas de 96 pocillos en cultivos por triplicado y se incubaron durante la noche a 37 °C en una estufa de incubación a 5% de CO₂ atmósfera. Se preparó MTT a 5 mg/ml en PBS y se añadió a cada pocillo a las 12 ó 36 horas. Los cultivos celulares continuaron durante otras 12 h a 37 °C. La disolución de revelado de color se añadió a cada pocillo y la absorbancia se midió usando un lector de placas de microcultivo con una longitud de onda de 570 nm. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de absorbancia en células con tratamientos indicados con respecto a la de en células con tratamiento de control de vehículo.

[0051] Transferencia Western. Se realizaron ensayos de inmunotransferencia como se ha descrito previamente (34). Se prepararon lisados celulares y se cuantificaron por el procedimiento de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Los lisados con 50 µg de proteína total se separaron usando electroforesis en gel de 10% de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Las transferencias se sondaron con los anticuerpos primarios indicados, seguido de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo o de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). La detección se hizo con sustrato quimioluminiscente (SuperSignal, Pierce Inc. Rockford, IL). Los anticuerpos para PARP (Ab-2) y caspasa 9 se compraron de Oncogene/Calbiochem/EMD Biosciences (San Diego, CA). Los anticuerpos para caspasa 3 (AR-14), caspasa 3/cpp32 y caspasa 8 (AR-18) fueron una amable donación del Dr. John Reed (Burnham Institute, La Jolla, CA).

[0052] Actividad DE PP2A: La actividad de la proteína fosfatasa del lisado celular total se determinó midiendo la generación de PO₄ libre del fosfopéptido de treonina usando el ensayo con el complejo verde de malaquita-fosfato como se describe por el fabricante (Upstate, Charlottesville, CA). Los lisados celulares se prepararon en un tampón de lisis de bajo detergente (1% de Nonidet P-40, HEPES 10 mM, NaCl 0,5 M, 10% de glicerol, PMSF 1 mM, benzamidina 5 mM, 10 µg/ml de leupeptina). El ensayo de fosfatasa se realizó en un tampón de reacción específico para PP2A (Upstate) usando sustrato de fosfopéptido 750 µM. Después de la incubación de 30 min a 30 °C se añadió colorante de malaquita y el fosfato libre se midió por densidad óptica a 650 nm. Para evitar la variabilidad entre diferentes muestras inmunoprecipitadas, las actividades de fosfatasa se normalizaron con la cantidad de PP2A inmunoprecipitado, como se detecta y cuantifica por análisis de transferencia Western de cada grupo de tratamiento.

[0053] Evaluación de la eficacia terapéutica in vivo en un modelo de xenoinjerto: La evaluación *in vivo* de FTY720 se llevó a cabo usando el linfoma diseminado que lleva el modelo de xenoinjerto de ratón SCID. Este modelo se generó usando la línea de linfocitos B Raji humana inyectada en ratones SCID como se ha descrito previamente. Células Raji se cultivaron en RPMI 1640 + 10% de SBF. Se confirmó que cultivos confluentes con

>95% de viabilidad expresaron CD19 humanos por citometría de flujo. Veintiséis ratones C.B.-17 SCID de 6-8 semanas de edad hembra (Taconic Farm, Germantown, NY) se inyectaron con 2×10^6 células intravenosamente (i.v) en 200 μ l de PBS estéril mediante la vena de la cola. Setenta y dos horas después de la inoculación, los animales se dividieron en 4 grupos de tratamiento iguales. Los 3 primeros grupos sirvieron de control y recibieron inyección de 5 vehículo, trastuzumab o rituximab; y el 4º grupo consistió en animales tratados con FTY720 (5 mg/kg) cada día durante 2 semanas i.p. Los ratones SCID sin tratar con FTY720 inoculados con células Raji desarrollaron participación sintomática del sistema nervioso central que produjo parálisis progresiva de las extremidades traseras asociada a disminución de la movilidad, pérdida de peso corporal y muerte 17-21 días después de la inoculación. Todos los animales se monitorizaron diariamente para signos de enfermedad y se sacrificaron inmediatamente si se observó parálisis de las extremidades traseras, disnea o 30% de pérdida de peso corporal. El peso corporal se midió una vez cada semana. El punto final del estudio fue la supervivencia definida como el tiempo para el desarrollo de parálisis de las extremidades traseras. Los animales que alcanzaron el punto final o sobrevivieron después de 6 meses de observación se sacrificaron por dislocación cervical. El examen histopatológico del hígado, pulmón y cerebro se realizó para detectar cualquier enfermedad residual. Las presencias de células CD19⁺ se evaluaron en la médula ósea de estos ratones por citometría de flujo.

[0054] Análisis estadístico de datos. Todo el análisis se realizó por estadísticos en el Centro de bioestadística, Universidad del Estado de Ohio. Se usó el software SPSS (versión 9.0, SPSS, Chicago, IL) para todo el análisis estadístico. La significancia se probó basándose en valores de p bilateral. La comparación se hizo entre 20 diferentes grupos usando la prueba del orden con signo de Wilcoxon y prueba de la t para datos emparejados para estudios *in vitro*. La prueba del orden logarítmico se aplicó para el análisis del estudio de supervivencia de animales.

[0055] Citotoxicidad mediada por FTY720 en líneas de linfocitos B y linfocitos B purificados de pacientes con LLC. Varios estudios han demostrado una función de FTY720 en la regulación de la recirculación de 25 linfocitos T *in vivo* y la citotoxicidad *in vitro* en líneas de linfocitos T. (25, v 27, 36) Sin embargo, no se ha realizado el análisis sistemático del efecto de FTY720 en leucemia linfocítica de linfocitos B aguda y crónica. Los presentes inventores sintetizaron primero FTY720 como se ha explicado brevemente en la sección de procedimientos. La incubación de MEC, una línea de linfocitos B establecida de un paciente con LLC, líneas de células Ramos y Raji que representan leucemia/linfoma de Burkitt o líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda 697 y RS4-11 con 0,6 30 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M o 10 μ M de FTY720 produjeron inhibición dependiente de la dosis de células viables con aumento concomitante en células anexina V⁺ y/o YP⁺ como se mide por citometría de flujo (Fig. 2). La citotoxicidad mediada por FTY720 en cada una de estas líneas celulares dependió del tiempo, observándose el máximo efecto como muy tarde 48 horas después del tratamiento. El efecto dependiente de la dosis y el tiempo de la disminución inducida por FTY720 en células viables se reflejó adicionalmente en el ensayo de MTT paralelo (datos no 35 mostrados). También se obtuvieron resultados similares en la línea celular RS11.4 (datos no mostrados).

[0056] Se informa de que los linfocitos B de LLC son resistentes a apoptosis *in vivo*. Para analizar sistémicamente los efectos de FTY720 sobre linfocitos B de LLC, las células CD19⁺ purificadas de pacientes con LLC de linfocitos B se incubaron con concentraciones crecientes de FTY720 que oscilaban de 0, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 5 ó 40 10 μ M. Los efectos citotóxicos se determinaron independientemente por citometría de flujo usando yoduro de propidio (YP) y reactivos FITC conjugados con anexina V. Las poblaciones que excluyeron tanto tinción con YP como anexina V-FITC se consideraron viables. Se consideró que las células anexina V⁺YP⁺, anexina V⁺YP⁺ o V⁻YP⁺ fueron apoptóticas. La incubación de linfocitos B de LLC con FTY720 produjo disminución dependiente de la dosis y el tiempo en la viabilidad de linfocitos B CD19⁺ de 15 pacientes con LLC (p<0,0001 cuando se comparó con 45 grupos sin tratar y tratados con 10 μ M). El efecto de FTY720 dependió del tiempo, ya que una reducción significativa coherente en la viabilidad ya se observó 24 h en modo dependiente de la dosis, que indica posibles mecanismos citotóxicos tempranos (Fig. 3). De acuerdo con la elevada muerte celular, las células tratadas con FTY720 también presentaron viabilidad disminuida como se ha mostrado por ensayos de MTT (datos no mostrados).

[0057] La apoptosis inducida por FTY720 en células de LLC no depende de la activación de caspasas, las cisteína proteasas de la familia CED3/ICE. Varios agentes terapéuticos tales como glucocorticoides y agentes 50 quimioterapéuticos tales como fludarabina, clorambucilo y 2-cloro-2-desoxiadenosina inducen citotoxicidad celular en células de LLC mediante la activación de caspasas, las cisteína proteasas de la familia CED3/ICE. La inhibición de estas caspasas produce la derogación de la apoptosis mediada por los estímulos citotóxicos. Para determinar si la 55 activación de caspasas participa en la muerte celular inducida por FTY720 en células de LLC primarias, los presentes inventores pretrataron células de LLC CD19⁺ antes del tratamiento con FTY720 con un inhibidor de caspasas de amplio espectro z-VAD-fmk. Como se muestra en la Figura 4a, las concentraciones de z-VAD-fmk (150 μ M) que rescataron eficazmente la apoptosis inducida por fludarabina fracasaron en prevenir la apoptosis inducida por FTY720 [n=5; p=0,001 - fludarabina frente a fludarabina más Z-VAD-fmk; p=0,99 - FTY720 frente a FTY720+Z-

VAD-fmk). La activación de caspasas produce la escisión de proteínas celulares clave que incluyen poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) y caspasa 3, 8 y 9. De acuerdo con la incapacidad de z-VAD-fmk para rescatar apoptosis inducida por FTY720, el análisis de transferencia Western de lisados preparados a partir de linfocitos B CD19+ de pacientes con LLC 24 y 48 horas después del tratamiento con FTY720 fracasó en revelar la escisión de PARP (Fig. 5 4b). Además, las caspasas 3, 8 y 9 también permanecieron en formas precursoras, demostrando la ausencia de activación de caspasas en células tratadas con FTY720. Similar a las células de LLC, la citotoxicidad inducida por FTY720 en la línea de linfocitos B Raji no estuvo acompañada de la activación de la caspasa 3, 8 ó 9 o rescatada por z-VAD-fmk (datos no mostrados).

10 **[0058] La apoptosis inducida por FTY720 es independiente de Bcl-2.** El proto-oncogén Bcl-2 se expresa en exceso en linfocitos B de LLC. La resistencia a apoptosis participa a los altos niveles de expresión de Bcl-2 en estas células. La disminución de la viabilidad celular durante condiciones de cultivo *in vitro* o en respuesta a tratamiento con agentes citotóxicos establece una correlación con la regulación por disminución de la expresión de Bcl-2. Además, la expresión en exceso constitutiva de Bcl-2 en líneas celulares produce resistencia a apoptosis. Con
15 el fin de determinar si la expresión sostenida de Bcl-2 producirá protección de la apoptosis inducida por FTY720, células 697 establemente transfectadas con neomicina que llevaban vector o vector de expresión de Bcl-2 se probaron con concentraciones crecientes de FTY720 a las 24, 48 y 72 horas. Como se muestra en la Figura 5, FTY720 indujo niveles comparables de citotoxicidad celular en tanto la línea celular 697-neo de control como 697-Bcl-2 con respecto a la expresión de la línea celular a las 24 horas (Fig. 5). También se observaron efectos similares de FTY720 en cultivos prolongados a las 48 y 72 h probados (datos no mostrados) Además, el análisis de transferencia Western de extracto de proteína en las células de alta expresión de Bcl-2 no se alteró en respuesta a
20 tratamiento con FTY720, que indica que la citotoxicidad celular mediada por FTY720 es independiente de los niveles de expresión de Bcl-2 (datos no mostrados).

25 **[0059] La apoptosis mediada por FTY720 depende de la activación de PP2A en células de LLC.** Se ha mostrado que FTY720 induce la activación de PP2A en varias líneas celulares que incluyen linfocitos T Jurkat. Con el fin de determinar si FTY720 indujo la activación de la enzima PP2A en linfocitos B CD19+ de pacientes con LLC, se trataron con FTY720 10 μ M durante 0, 1, 2, 3, 4 y 15 h y la actividad de PP2A en los lisados se cuantificó usando un ensayo funcional tras la inmunoprecipitación de enzima PP2A. Como se ha informado previamente en otros
30 sistemas, FTY720 indujo un aumento coherente de 2-3 veces en la activación de PP2A, observándose la respuesta pico 4 horas después del tratamiento (Fig. 6a). La actividad de PP2A inducida por FTY720 está asociada a la activación de la enzima PP2A como pretratamiento de células de LLC con ácido okadaico 5 nM, una concentración que se ha mostrado que inhibe la actividad de la proteína fosfatasa en células, produjo la inhibición de la activación de PP2A inducida por FTY720 nada menos que 3 veces (Fig. 6b). Además, la apoptosis inducida por FTY720
35 depende de la activación de PP2A, ya que concentraciones de ácido okadaico que produjeron la inhibición de la activación de PP2A inducida por FTY720 también produjeron la inhibición de citotoxicidad celular inducida por FTY720 (Fig. 6c). También se observó un fenómeno similar en la línea de linfocitos B Ramos. FTY720 indujo la activación de PP2A en la línea celular Ramos ya a las 3 horas, y esta actividad de PP2A inducida se inhibió por ácido okadaico (Fig. 7a-b). El pretratamiento de células Ramos con ácido okadaico produjo la inhibición de la
40 apoptosis inducida por FTY720, que indica una función para la activación de PP2A inducida por FTY720 en citotoxicidad celular (Fig. 7c)

[0060] Evaluación *in vivo* de FTY720 en un modelo de ratón de xenoinjerto de SCID de tumor maligno de linfocitos B. Con el fin de determinar el efecto *in vivo* de FTY720 en prevenir el crecimiento tumoral de linfocitos
45 B, los presentes inventores usaron el modelo de ratón SCID de xenoinjerto de leucemia/linfoma diseminado inoculado en células Raji. La inyección intravenosa de células Raji en ratones SCID produjo la infiltración de células neoplásicas en diversos sistemas de órgano que incluyen médula ósea, bazo, ganglios linfáticos y sistema nervioso central (CNS) como se reveló por análisis histológico de secciones de tejido. El análisis de citometría de flujo de células de la médula ósea de estos ratones presentó la presencia de células CD19⁺ humanas y CD20⁺ humanas. Se
50 observó infiltración multifocal de células neoplásicas en las meninges asociada a parálisis de la pata trasera entre 17-21 días en todos los ratones inyectados con células Raji de control analizados. El injerto funcional reproducible y fidedigno de células Raji favoreció este modelo para investigar la eficacia terapéutica *in vivo* de FTY720, usando tiempo de parálisis de las extremidades traseras/tiempo de supervivencia como punto final primario para la evaluación. La mediana del tiempo de supervivencia para ratones tratados con FTY720 fue 47 días (IC del 95% 39-
55 53). Esto es significativamente prolongado en comparación con los controles de placebo (18 días, IC del 95% 17-19; FTY720 frente a placebo P<0,0001). Después de un periodo de seguimiento de 200 días, 4 de los 12 ratones tratados con FTY720 pudieron sobrevivir sin signos de enfermedad que incluyen pérdida de peso corporal, letargia, pelaje áspero o parálisis de las extremidades traseras (Fig. 8).

[0061] Los estudios descritos en el Ejemplo 1 demuestran que FTY720 es un potente agente citotóxico para tumores malignos linfoides que incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y linfoma de linfocitos B. Estos estudios se derivan de una amplia gama de líneas celulares y células tumorales primarias de pacientes con LLC. Y, lo que es más importante, los datos de los presentes inventores demuestran que FTY720 es diferente de muchos agentes terapéuticos actualmente en estudio en tumores malignos linfoides. Primero, FTY720 media en la citotoxicidad celular que no depende de la activación de la cascada de caspasas como se demuestra en tanto células de LLC primarias como líneas celulares linfoblásticas. Segundo, FTY720 media en su efecto citotóxico independiente de la expresión de Bcl-2, un hallazgo que es relativamente poco común entre la mayoría de los agentes terapéuticos usados para tratar tumor maligno linfoide. Finalmente, el efecto biológico de FTY720 sobre células de LLA y de LLC parece explicarse en parte por la activación de PP2A y posiblemente otras fosfatasa que distinguen de otros agentes terapéuticos actualmente usados en estas enfermedades. Estos datos *in vitro* que demuestran un mecanismo de acción novedoso y posible eficacia terapéutica prometedora están adicionalmente respaldados por datos *in vivo* en un modelo de células de leucemia diseminadas de xenoinjerto en el que FTY720 prolonga significativamente la supervivencia y cura un subconjunto de ratones. Considerados juntos, los datos de los presentes inventores proporcionan un fuerte respaldo para el uso de FTY720 para el tratamiento de LLA y LLC de linfocitos B.

[0062] La capacidad de FTY720 para mediar en la muerte independiente de caspasas en células de LLA y LLC es diferente de la previamente informada. Dos estudios separados que examinan tanto la línea celular de linfoblastos T Jurkat como múltiples líneas de células de mieloma sugirieron que la activación de caspasas era importante. Aunque los presentes inventores encontraron líneas celulares linfoblásticas Raji y 697 y muestras de pacientes con LLC primaria que eran independientes de caspasas como se describe en el presente documento, la posterior investigación de la línea celular Ramos demuestra que la activación de caspasas es importante para la muerte mediada por FTY720. En general, estos datos sugieren que el tratamiento con FTY720 pueden mediar en apoptosis celular en mecanismos dependientes e independientes de caspasas que dependen del tipo de célula. La citotoxicidad independiente de caspasas en estas células indica mecanismos alternativos de citotoxicidad por FTY720 en células de LLC.

[0063] Se ha mostrado que FTY720 media en la activación de la enzima PP2A en linfocitos T Jurkat. De acuerdo con los informes previos, FTY720 indujo activación dependiente del tiempo de la actividad enzimática de PP2A en LLC y líneas de linfocitos B. Además, la actividad de PP2A inducida por FTY720 puede bloquearse por ácido okadaico, un inhibidor de PP2A. De acuerdo con una función para la activación de PP2A inducida por FTY720 en la inducción de apoptosis, concentraciones de ácido okadaico que inhibieron la activación de PP2A inducida por FTY720 también produjeron la inhibición parcial de la apoptosis inducida por FTY720. Esto sugiere una función para PP2A activada u otras fosfatasa activadas por este agente en apoptosis inducida por FTY720 de células de LLC y de linfoblasto.

[0064] Hasta este punto, FTY720 se ha desarrollado únicamente como un agente inmunosupresor para la prevención de rechazo de trasplante de órgano. La toxicidad en estudios de fase I, II y III de FTY720 ha sido relativamente común y corriente con respecto a toxicidades limitantes de dosis observadas con muchas terapias anticancerígenas. La evaluación *in vitro* e *in vivo* de los presentes inventores de FTY720 en leucemia linfocítica aguda y crónica sugiere que este agente puede tener posible beneficio terapéutico en estas enfermedades. Es bastante posible que la dosis terapéutica para activar PP2A y promover la apoptosis sea diferente de la dosis de inmunosupresor usada en los estudios de trasplante de órgano realizados hasta la fecha. Los datos de inducción de la actividad de PP2A de los presentes inventores que se producen poco después del tratamiento con FTY720 en células de LLC primarias correspondientes a las concentraciones que producen la apoptosis proporciona un biomarcador para acompañar el aumento de dosis de fase I en esta enfermedad.

[0065] En conclusión, los datos *in vitro* e *in vivo* de los presentes inventores demuestran que FTY720 presenta potentes propiedades anticrecimiento y pro-apoptósicas en tumores malignos linfoides, y se han observado buenos resultados en células de LLA y de LLC.

[0066] EJEMPLO 2 (no parte de la invención)

[0067] FTY720 inhibe la proliferación de varias líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA). Se expusieron cultivos celulares durante 48 horas a control de vehículo y concentraciones crecientes de FTY720, y posteriormente se sometieron a ensayo de MTS por instrucciones del fabricante. Se muestran las concentraciones medias (Fig. 9A) a las que la proliferación se inhibió el 50% (CI50) y curvas de dosis representativas (Fig. 9B).

[0068] FTY720 induce apoptosis en líneas celulares de LMA. Se expusieron cultivos celulares a control de vehículo y dosis crecientes de FTY720 durante 48 horas. Entonces, las células se tiñeron con anexina V (AnV) y yoduro de propidio (YP) y se analizaron usando citometría de flujo rutinaria. El porcentaje de células viables (AnV⁻ YP⁻), células que experimentan apoptosis (AnV⁺ YP⁻) y células necróticas (AnV⁺ YP⁺) se representan para cada línea celular estudiada en la Fig. 10A. En la Fig. 10B se muestran representaciones representativas para la línea celular MV411.

[0069] FTY720 no produce detención del ciclo celular en líneas celulares de LMA. Se trataron suspensiones de células con control de vehículo, 1 uM, y FTY720 10 uM durante 48 horas. Después de la fijación en etanol, las muestras se tiñeron con yoduro de propidio y se evaluaron para contenido de ADN. Se representa el porcentaje de células en subG1, G1, S y G2-M para cada línea celular (Fig. 11A), con representaciones representativas más adelante para MV411 (Fig. 11B). Aunque no se observa detención del ciclo celular, la inducción de apoptosis se observa por el aumento de la fracción de sub G1 con tratamiento con FTY720.

[0070] El derivado D2 de FTY720 muestra citotoxicidad similar a la del compuesto parental. Usando ensayo de MTS se examinó la inhibición de la proliferación celular para diversos derivados. Mientras que D1 parece ser ligeramente menos eficaz, líneas celulares de LMA muestran sensibilidad similar a D2, un derivado menos inmunosupresor (Fig. 12).

20 **[0071] EJEMPLO 3**

[0072] Ciclina D1 expresada en exceso y Akt constitutivamente fosforilada participan en la patogénesis de linfoma de células del manto (LCM). Los presentes inventores describen aquí FTY720, un agente inmunosupresor actualmente en estudios de fase III, que media en la apoptosis dependiente del tiempo y de la dosis en células primarias de LCM y líneas celulares. El tratamiento con FTY720 produjo la modulación por disminución dependiente del tiempo de niveles de proteínas ciclina D1 y Akt, eligiendo así como diana dos moléculas críticas relevantes para enfermedad en linfoma de células del manto. La apoptosis inducida por FTY720 produjo procesamiento de PARP y modulación por disminución de Mcl-1 y se inhibió por inhibidor de pan-caspasa, z-VAD-fmk. De acuerdo con la modulación de ciclina D1, FTY720 indujo la desregulación del ciclo celular asociada a la acumulación de células en fase G0/G1 y G2/M del ciclo celular con disminución concomitante en la entrada de fase S. Estos resultados proporcionan la primera prueba de un posible uso de FTY720 en la elección como diana de moléculas de ciclina D1 y Akt implicadas en la patogénesis de linfoma de células del manto.

[0073] El linfoma de células del manto es una forma agresiva de tumor maligno de linfocitos B caracterizada por la acumulación anormal de células CD20+CD22+IgM+IgD+CD5+B en ganglios linfáticos, bazo, médula ósea y/o sangre. El linfoma de células del manto representa el 6% de todos los linfomas no Hodgkin y, aunque el tratamiento con agentes quimioterapéuticos es inicialmente eficaz, prácticamente todos los pacientes recaen con mediana de la supervivencia de 3 años. Previamente se ha revisado una variedad de terapias basadas en combinación, que incluyen trasplante de citoblastos autólogos o terapias que eligen diana tales como rituximab, bortezomib, CCI779 y otras terapias. La patogénesis de la enfermedad se atribuye a Ser/Thr cinasa constitutivamente activa, Akt4, una ruta de supervivencia asociada a actividad de fosfatasa defectuosa y regulación por incremento de ciclina D1 asociada a translocalización cromosómica t(11;14)(q13;q32) entre IgH y genes de Bcl-1. Las desregulación de proteínas anti y pro-apoptóticas también participa en esta enfermedad. Los agentes que eligen como diana todas estas rutas tienen posible uso como medicina terapéutica para LCM.

[0074] FTY720, [(clorhidrato de 2-amino-2,3-propano-1,3-diol)], es un compuesto sintético producido por la modificación de un inmunodepresor natural, ISP-1, que recientemente se demostró que presentaba actividad *in vitro* contra mieloma múltiple. FTY720 está actualmente en ensayos clínicos de fase III como inmunodepresor para rechazo de trasplante renal. Los presentes inventores informan aquí de pruebas de efectos tóxicos de FTY720 que eligen como diana la modulación por disminución de ciclina D1 y Akt, dos dianas críticas que participan en la patogénesis de LCM. Estos datos sugieren en general que FTY720 podría ser prometedor como agente terapéutico para el tratamiento de linfoma de células del manto.

55 **[0075] Materiales y procedimientos**

[0076] Se aislaron células de LCM primarias de PBMC (con consentimiento informado del paciente bajo un protocolo autorizado por IRB) como se ha descrito antes. Todos los pacientes con LCM se identificaron como se ha explicado brevemente por la clasificación de la Organización mundial de la salud (OMS). Las líneas celulares de pacientes con linfoma de células del manto (Mino y Jeko) se obtuvieron del Dr. Raymond Lai. Las células primarias o

- líneas celulares de LCM se incubaron en medio RPMI 1640, complementado con 10%-20% de suero bovino fetal inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y penicilina (100 U/ml)/estreptomycin (100 g/ml) a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. FTY720 se sintetizó como se ha descrito previamente. La toxicidad se determinó por citometría de flujo usando tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio (YP). Las células apoptóticas se identificaron como células anexina V+ y/o YP+. Se consideró que las células que excluyeron tanto FITC como YP eran viables. La transferencia Western se realizó como se ha descrito previamente usando los anticuerpos indicados. Los anticuerpos para PARP (Ab-2) y caspasa 9 se compraron de Oncogene/Calbiochem/EMD Biosciences (San Diego, CA). Ciclina D1, Akt, actina, Mcl-1, pERK, ERK y Bcl-2 se obtuvieron de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA).
- 10 **[0077]** FTY720 induce la apoptosis en líneas celulares de LCM y muestras de paciente primarias: la incubación de células de LCM primarias, líneas celulares de LCM Mino o Jeko con concentraciones crecientes de FTY720 produjeron disminución dependiente de la dosis de células viables (anexina V/YP⁺) con aumento concomitante en células apoptóticas (anexina V⁺ y anexina V⁺YP⁺) o muertas (células YP⁺) (Fig. 13a y datos no mostrados). Los valores de CI50 de FTY720 calculados usando el modelo inhibidor sigmoide WinNolin mostró 10,67
15 μM , 4,46 μM y 11,86 μM en células de LCM primarias, Jeko y Mino, respectivamente. Varios agentes terapéuticos, que incluyen fludarabina, clorambucilo, 2-cloro-2-desoxiadenosina y glucocorticoides, inducen toxicidad en tumores malignos de linfocitos B mediante caspasas activantes, las cisteína proteasas de la familia CED3/ICE. La inhibición de estas caspasas produce la abolición de apoptosis mediada por los estímulos tóxicos. Para determinar si la activación de caspasas participa en citotoxicidad inducida por FTY720 en LCM, los presentes inventores pretrataron
20 células Mino con el inhibidor de caspasas de amplio espectro 150 μM z-VAD-fmk. Como se muestra en la Fig. 13b, las concentraciones de z-VAD-fmk que produjeron ~50% de reducción en la apoptosis inducida por fludarabina también expresaron ~50% de reducción de la apoptosis inducida por FTY720 en células Mino [fludarabina frente a fludarabina+z-VAD-fmk; $p < 0,0001$, $n = 3$; FTY720 frente a FTY720+z-VAD-fmk; $p < 0,0001$, $n = 3$]. La activación de caspasas produce la escisión de proteínas celulares clave que incluyen poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP). De acuerdo con las capacidad de z-VAD-fmk para rescatar la apoptosis inducida por FTY720, el análisis de
25 transferencia de lisados preparados a partir de células Mino 24 h después del tratamiento con FTY720 mostró procesamiento de PARP comparable a los niveles observados con fludarabina que se ha mostrado que activa la cascada de caspasas (Fig. 13b, panel derecho).
- 30 **[0078]** La apoptosis inducida por FTY720 está asociada a la modulación por disminución de ciclina D1 y Akt. La patogénesis de LCM se atribuye a la expresión en exceso de la proteína ciclina D1. Para determinar si la apoptosis inducida por FTY720 está mediada por la modulación de estas dianas relevantes para la patogénesis de la enfermedad, los presentes inventores evaluaron el efecto de FTY720 sobre los niveles de las proteínas ciclina D1, p-Akt y Akt por análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos en células de LCM primarias y líneas
35 celulares. El tratamiento de células de LCM primarias con FTY720 produjo regulación por disminución dependiente del tiempo de la proteína ciclina D1, observada ya 8 h después del tratamiento (35%), que aumentó progresivamente al 70% en 24 h (panel izquierdo, 2a). También se observó reducción similar en ciclina D1 en la línea de células Mino, aunque con cinética retrasada con inhibición pronunciada observada ya a las 24 h con inhibición máxima a las 48 h después del tratamiento (Fig. 14c). Akt fosforilada (p-Akt) participa en la patogénesis de LCM en células primarias de
40 pacientes con LCM. De acuerdo con la modulación de la ruta de Akt en LCM primaria, FTY720 también indujo la disminución en p-Akt. La p-Akt disminuida se atribuye a la disminución selectiva en niveles de proteínas Akt observados a las 24 horas (panel derecho de la Fig. 14a). De forma interesante, la regulación por disminución inducida por FTY720 es selectiva para ciclina D1 y Akt y a un menor grado Mcl-1, pero no Bcl-2 o actina (Fig. 14b). La regulación por disminución inducida por FTY720 de ciclina D1 y Akt indicó que FTY720 elige como diana dos de
45 las moléculas más críticas asociadas a la patogénesis de LCM.
- [0079]** La expresión de la ciclina D1 desregulada contribuye a defectos del ciclo celular en células de LCM. Para determinar si la modulación por disminución de ciclina D1 inducida por FTY720 produjo defectos en la progresión del ciclo celular, células Mino se trataron con FTY720 durante 12, 24 y 48 h y se sometieron a análisis del
50 ciclo celular por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 14d, el tratamiento con FTY720 produjo entrada disminuida dependiente de la dosis y del tiempo en la fase S del ciclo celular. Por tanto, en comparación con el control de vehículo, el tratamiento con FTY720 produjo ~48% de reducción en células en fase S. Esta disminución en la fase S en la entrada se refleja adicionalmente por la acumulación de células en fase G1 del ciclo celular.
- 55 **[0080]** Se ha mostrado que FTY720 fosforilada sirve de ligando para cuatro de los cinco receptores de esfingosina-1-fosfato (SIPR). La unión de FTY720 acelera la recirculación de linfocitos periféricos al ganglio linfático y la activación de SIPR conduce a la fosforilación de cinasa 1/2 relacionada con la señal extracelular (ERK1/2). Para determinar si FTY720 influyó en el estado de fosforilación de ERK-1, células Mino se trataron con FTY720 y el estado de fosforilación de ERK1/2 se analizó por análisis de transferencia Western usando anticuerpos para fosfo

ERK-1/2 y ERK1/2. Como se muestra en la Fig. 14e, FTY720 indujo la fosforilación de ERK1/2 ya 2 h después del tratamiento que aumentó en un modo dependiente del tiempo, observándose la máxima fosforilación ya a las 4 h, que se mantuvo incluso hasta 10 h desde que se probó. Los datos sugieren que FTY720 podría activar receptores de S1P y posteriormente activar ERK. También se observó fosforilación de ERK1/2 dependiente del tiempo inducida por FTY720 similar en la línea celular Jeko (datos no mostrados). La activación inducida por FTY720 de la ruta de señalización de Ras-Raf-MAP cinasa que produce la activación de serina/treonina cinasa puede contribuir a la fosforilación de ERK1/2. De acuerdo con la hipótesis, se ha informado que la fosforilación de ERK1/2 se produce en células tratadas con esfingosina-1-fosfato, que comparte similitud estructural con FTY72014. Queda por probar la función de la fosforilación de Erk1/2 inducida por FTY720 en tanto toxicidad, desregulación de proteínas tales como ciclina D1 o Akt y/o células de acumulación en G1 con disminución concomitante en la fase S. Sin embargo, estos estudios han identificado las proteínas ciclina D1 y Akt como dos posibles biomarcadores para la sensibilidad de FTY720 en células de pacientes con LCM. En conclusión, estos estudios proporcionan pruebas del posible uso de FTY720 como potente agente elegido como diana contra la ciclina D1 y Akt desreguladas en LCM.

REIVINDICACIONES

1. Clorhidrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para tratar un tumor maligno linfoide en un sujeto, en el que el tumor
5 maligno linfoide es linfoma de células del manto (LCM).
2. El producto de la reivindicación 1, en el que el sujeto es resistente a otros tratamientos.
3. El producto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sujeto es un sujeto humano.
10
4. Clorhidrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para prevenir un tumor maligno linfoide en un sujeto en riesgo de desarrollar un tumor maligno linfoide, en el que el tumor maligno linfoide es linfoma de células del manto (LCM).
- 15 5. El producto de la reivindicación 4, en el que el sujeto es un sujeto humano.
6. Uso de clorhidrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un tumor maligno linfoide en un sujeto, en el que el tumor maligno linfoide es linfoma de células del manto (LCM).
20
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el sujeto es un sujeto humano.
8. Uso según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el medicamento es para el tratamiento, y en el que el sujeto es resistente a otros tratamientos.
25

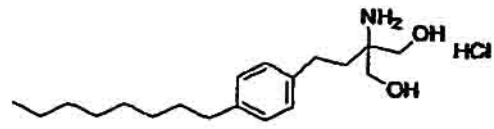


Figura 1

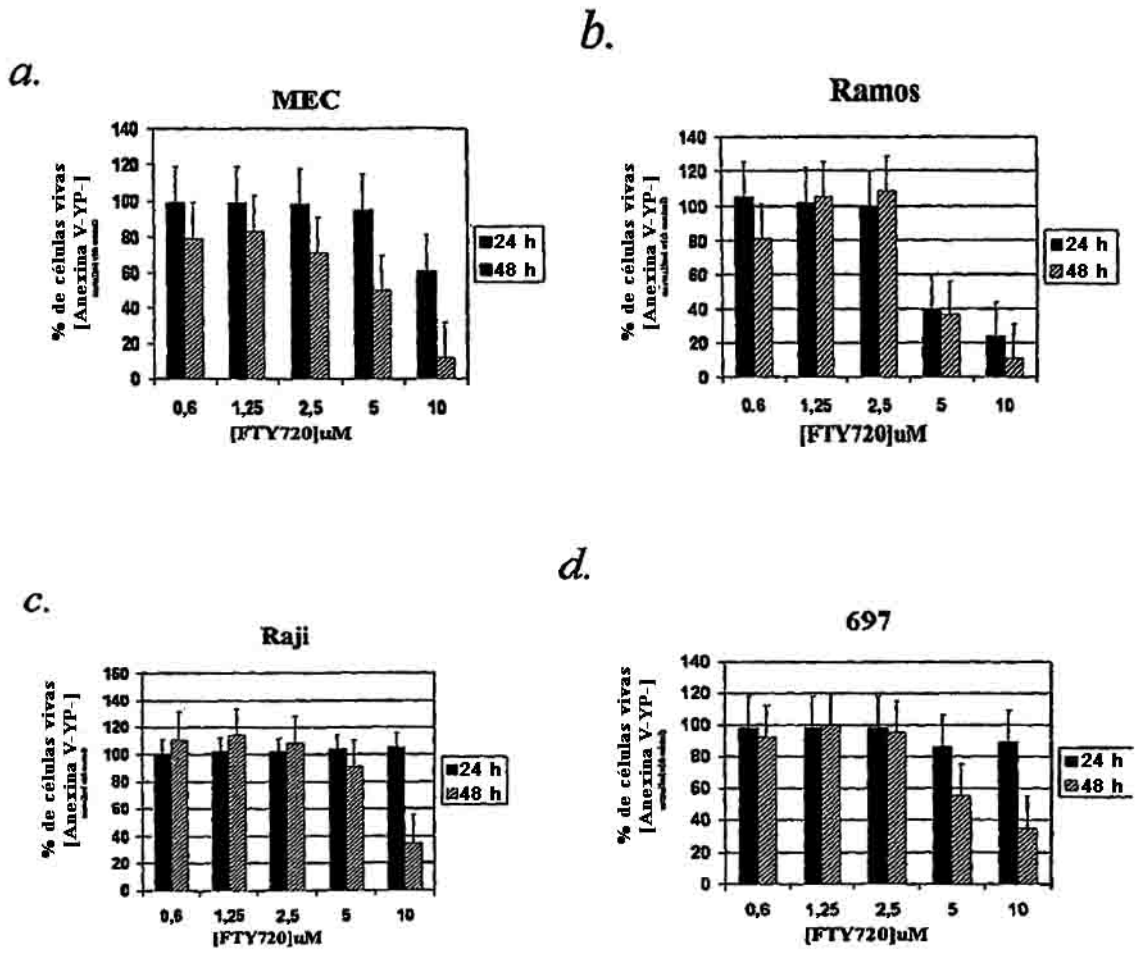


Figura 2

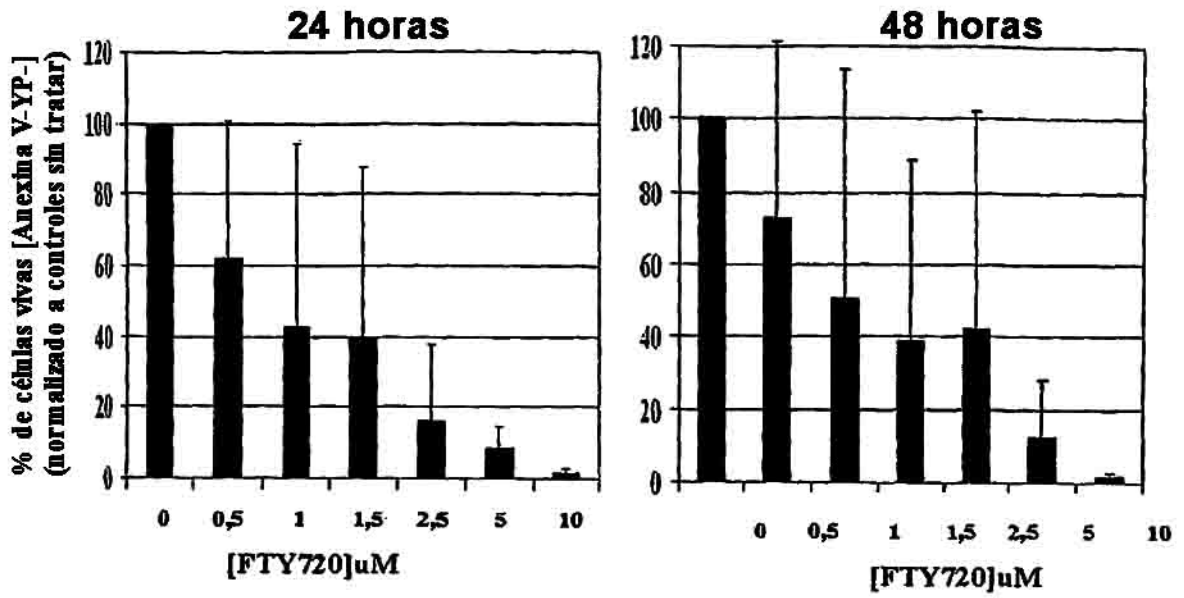


Figura 3

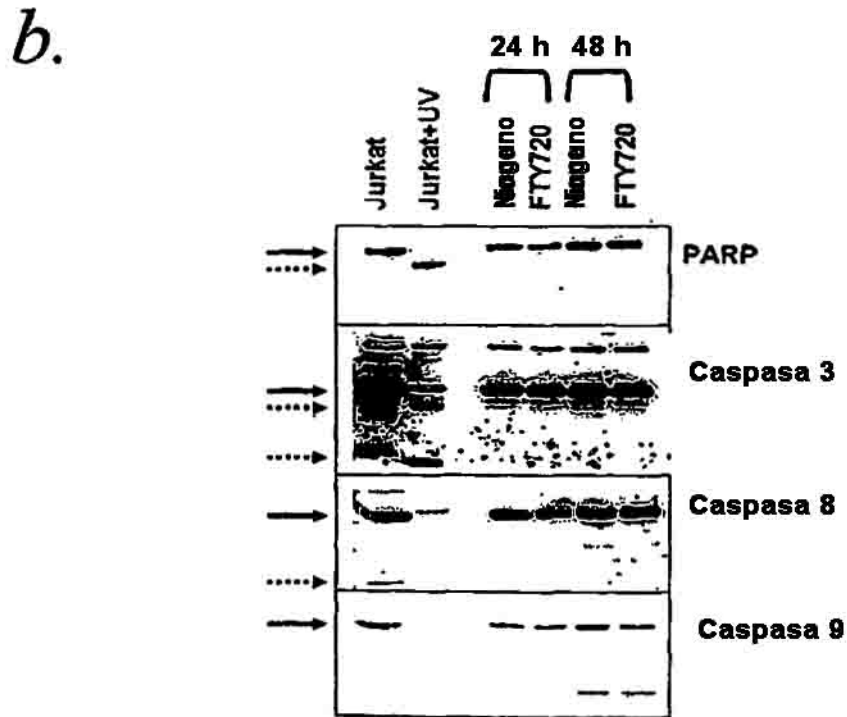
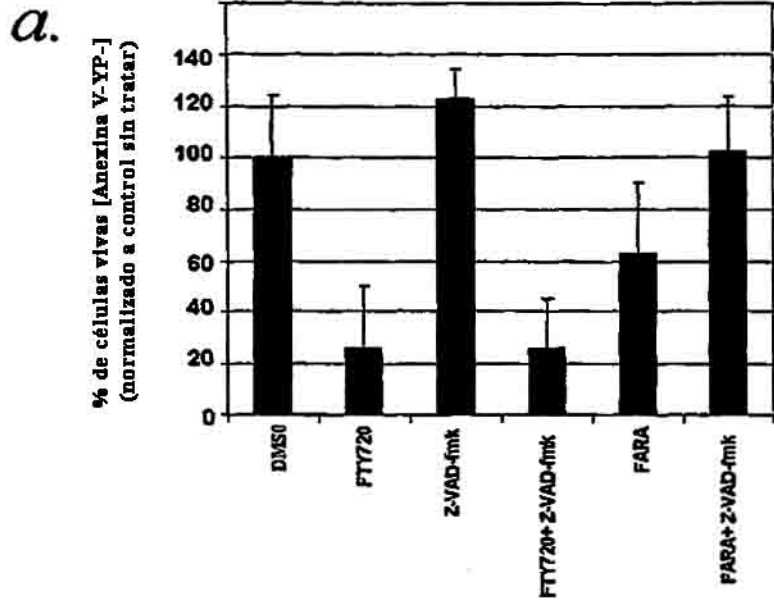


Figura 4

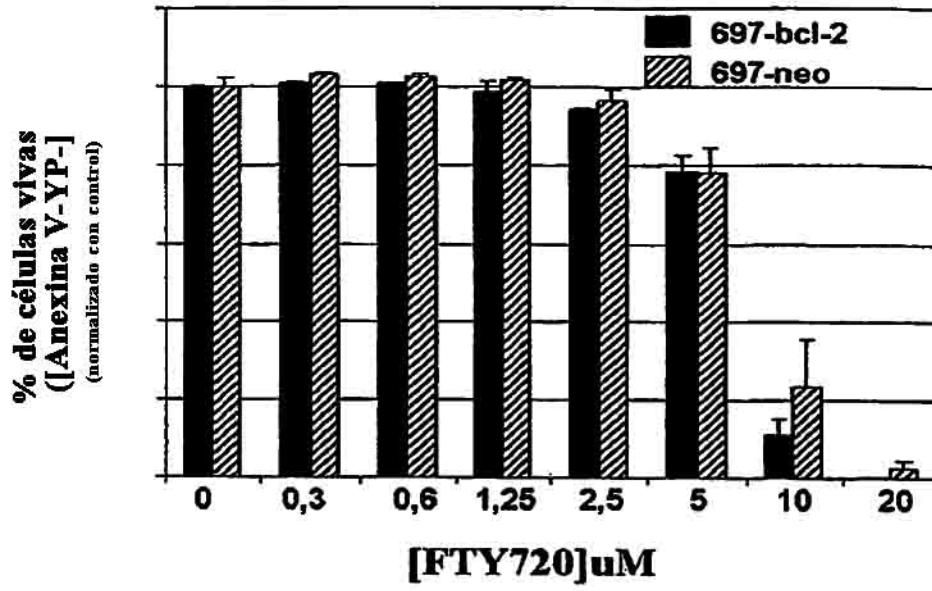
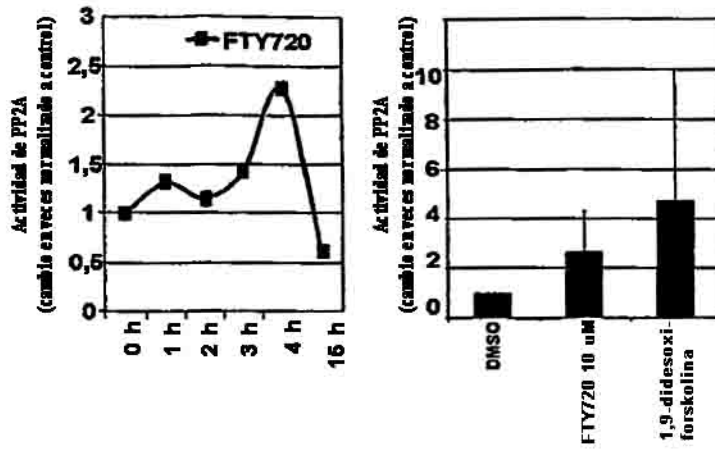
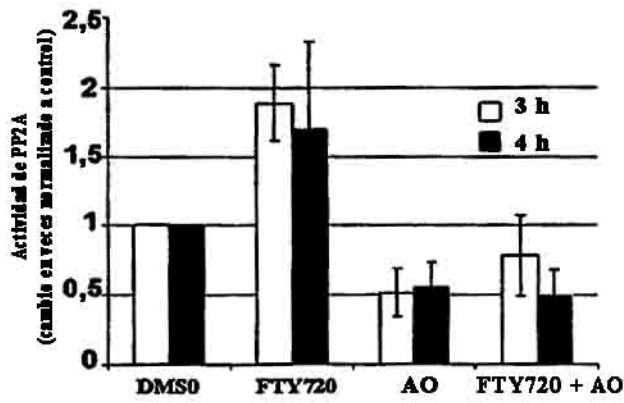


Figura 5

a.



b.



c.

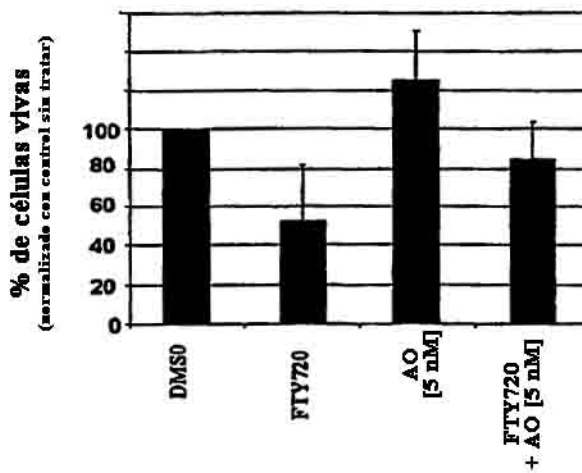
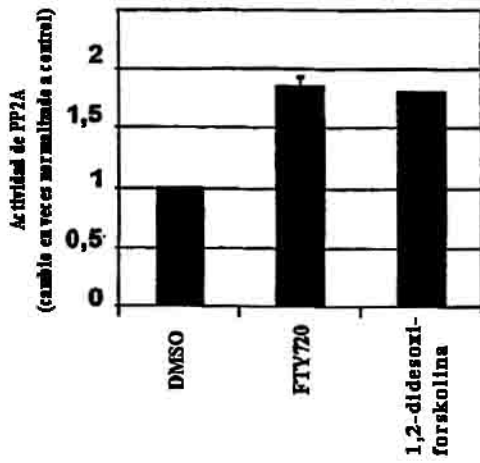
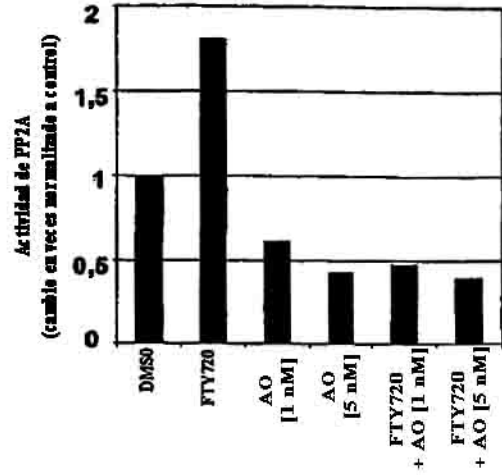


Figura 6

a.



b.



c.

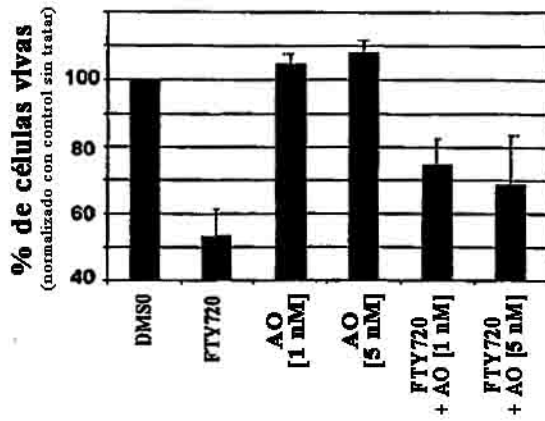


Figura 7

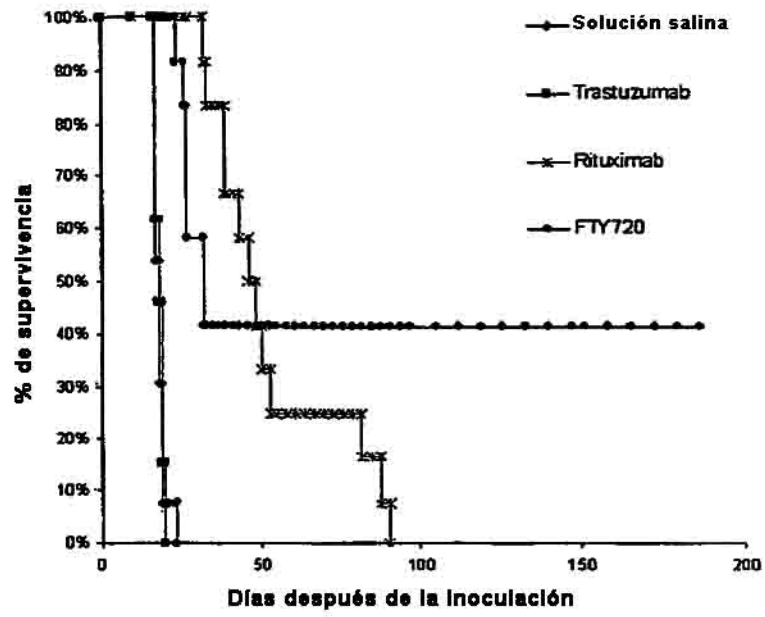


Figura 8

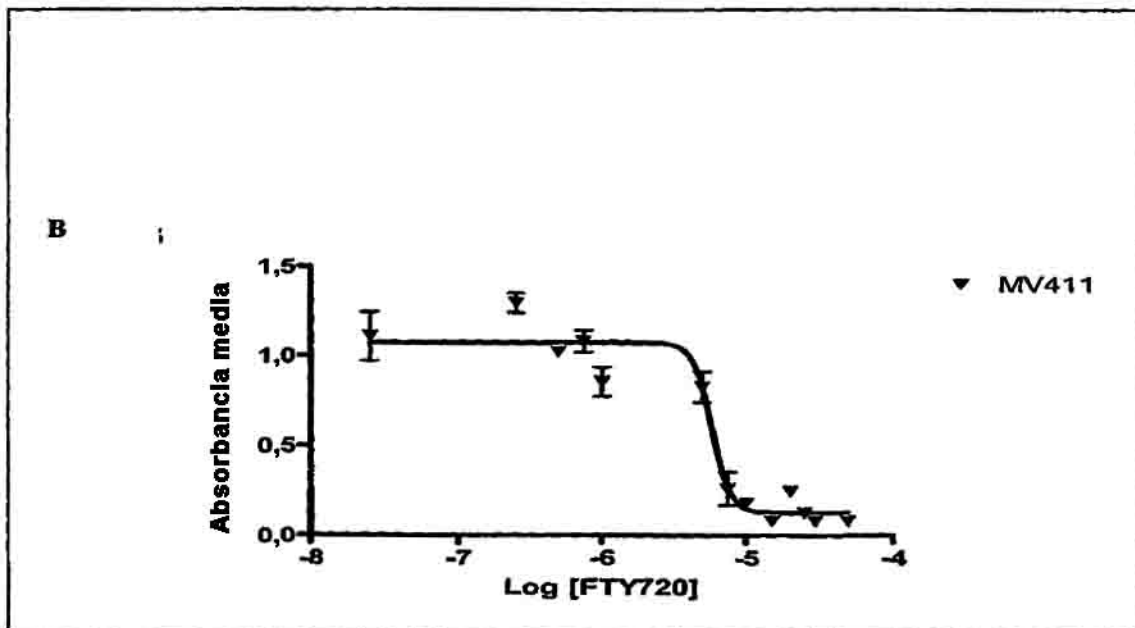
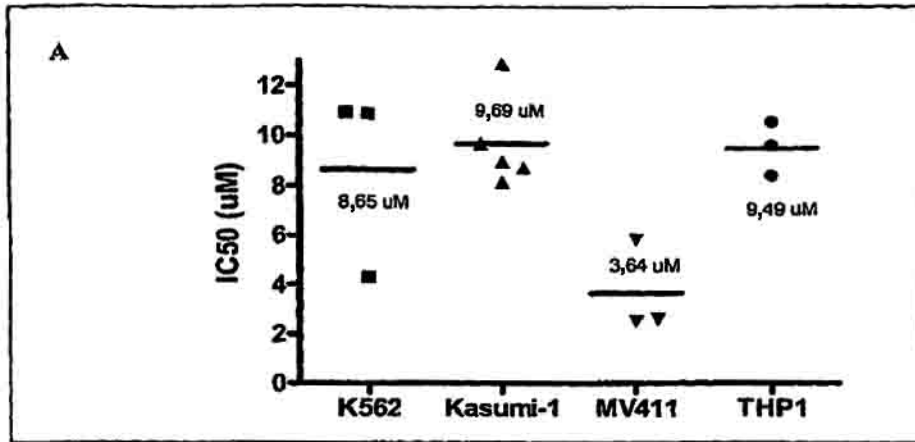


Figura 9

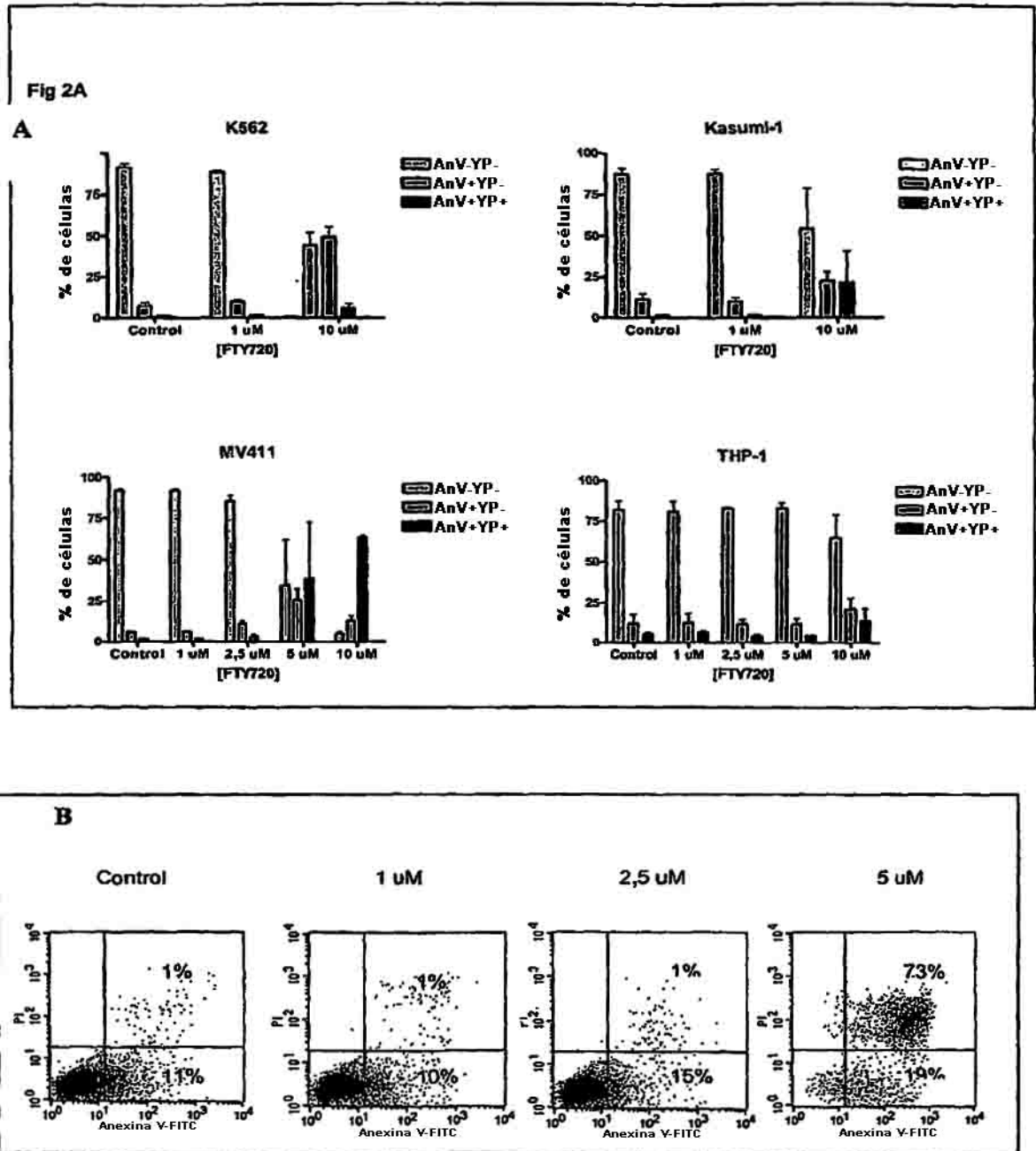


Figura 10

Fig 3A

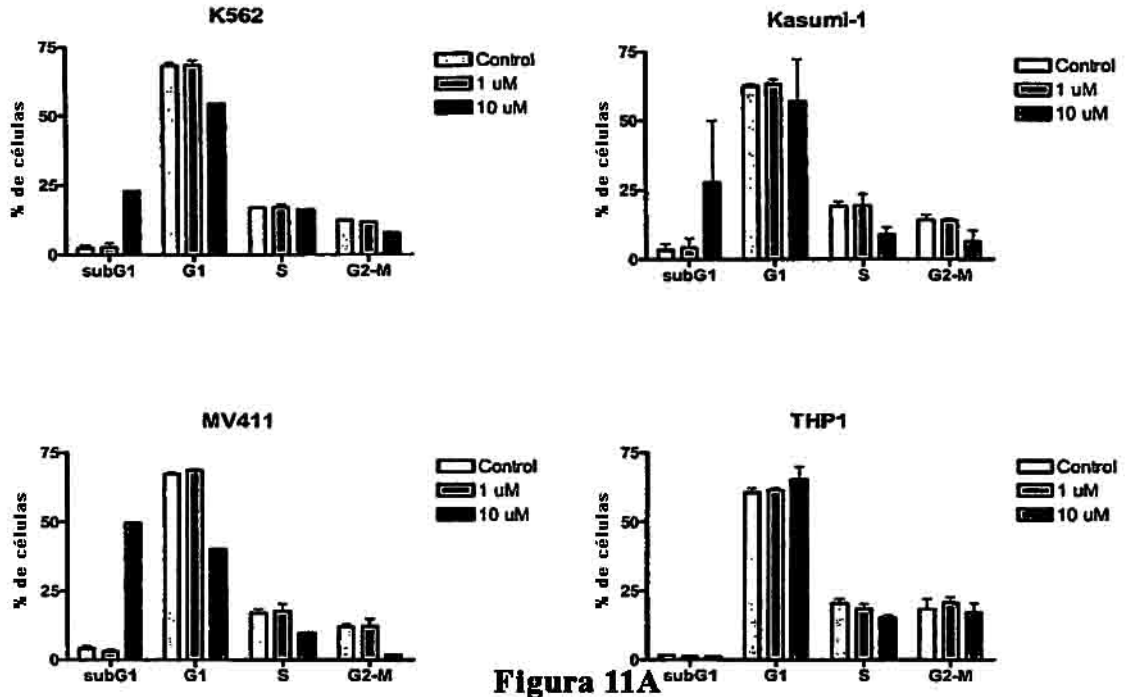


Figura 11A

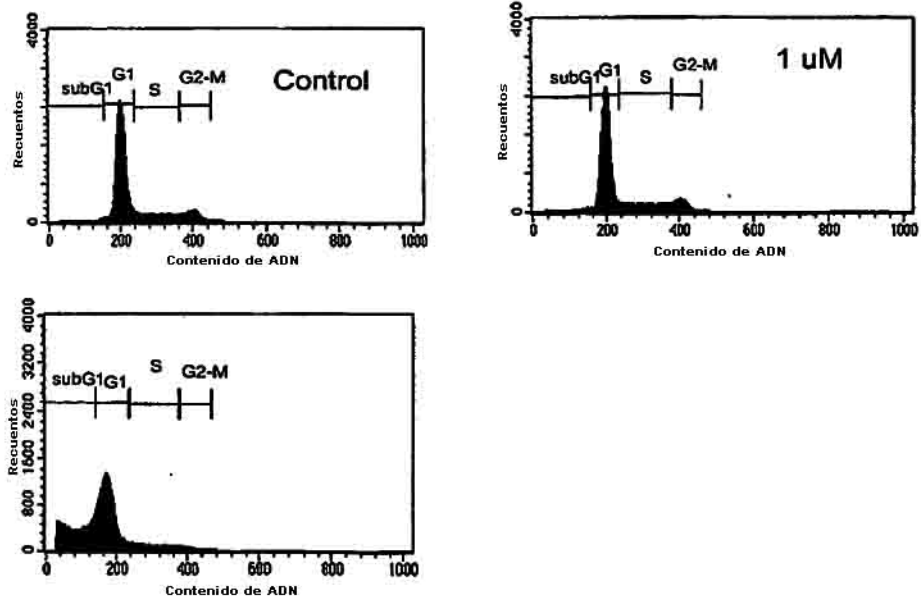


Figura 11B

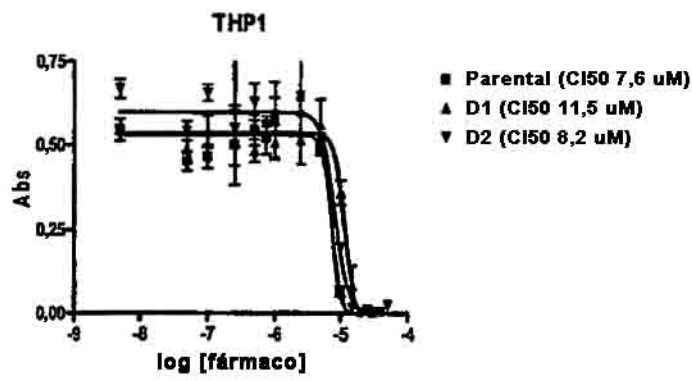
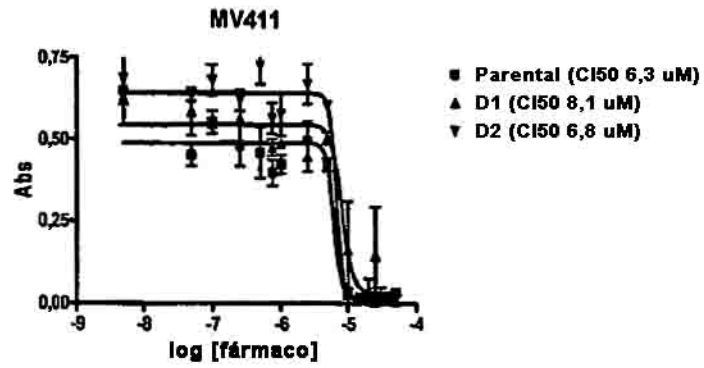


Figura 12

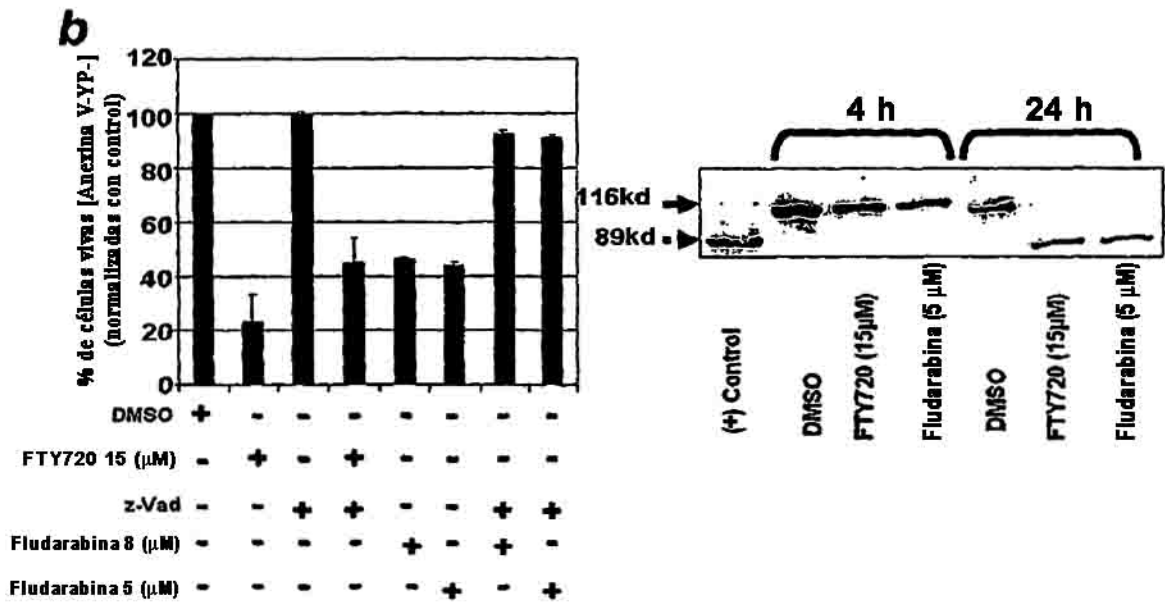
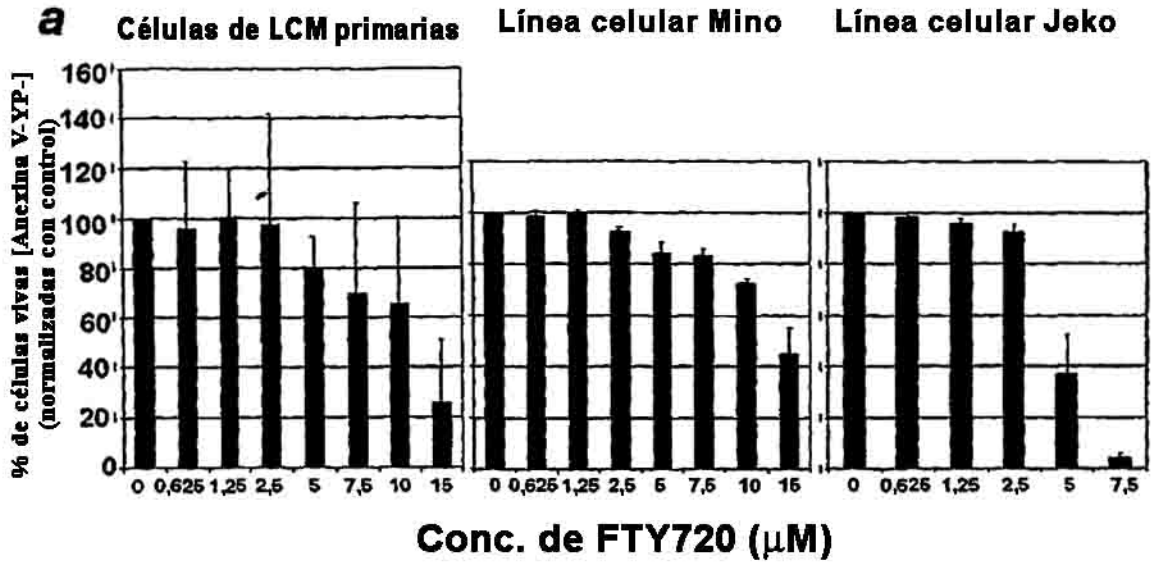
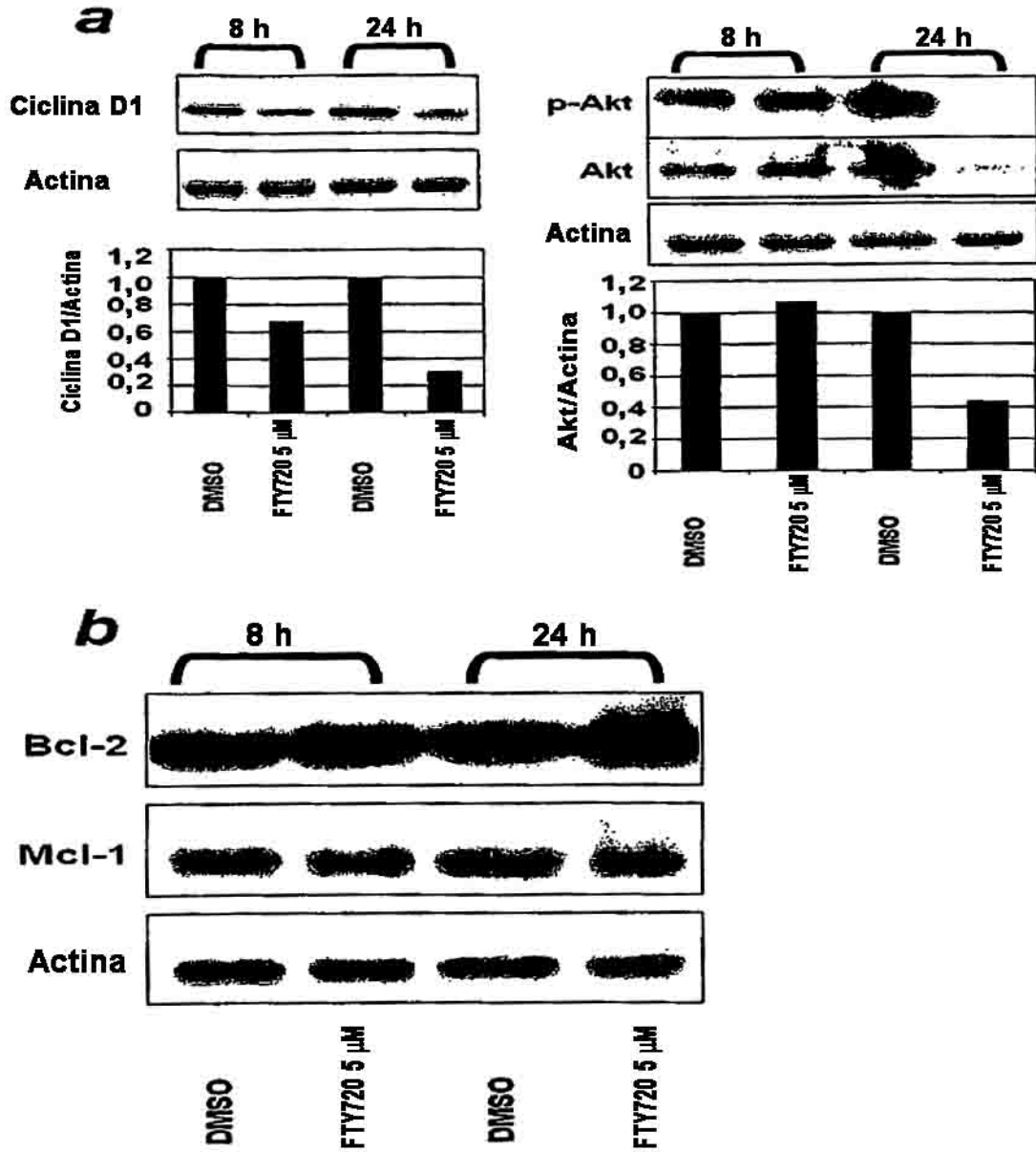


Figura 13



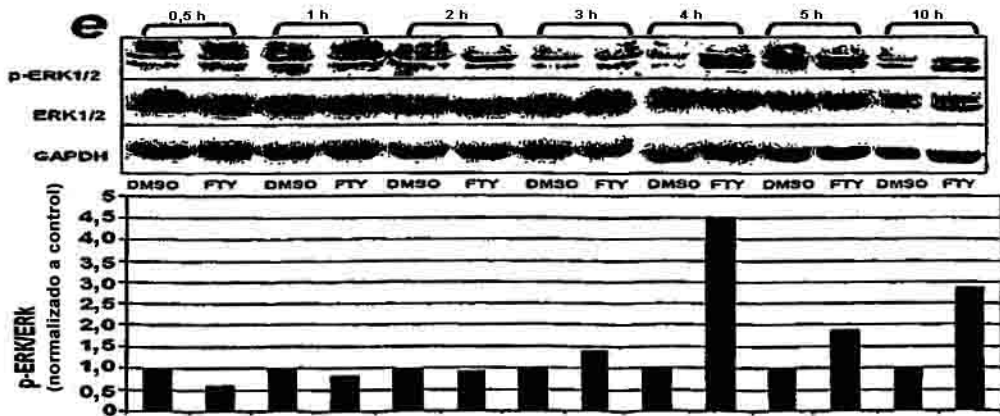
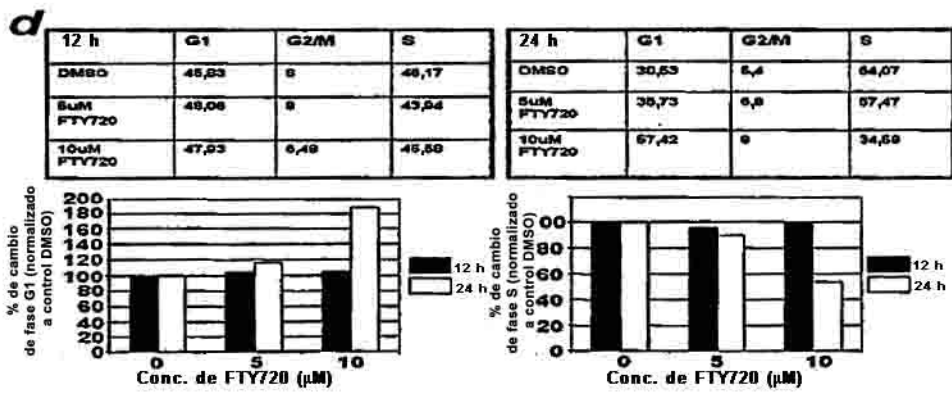
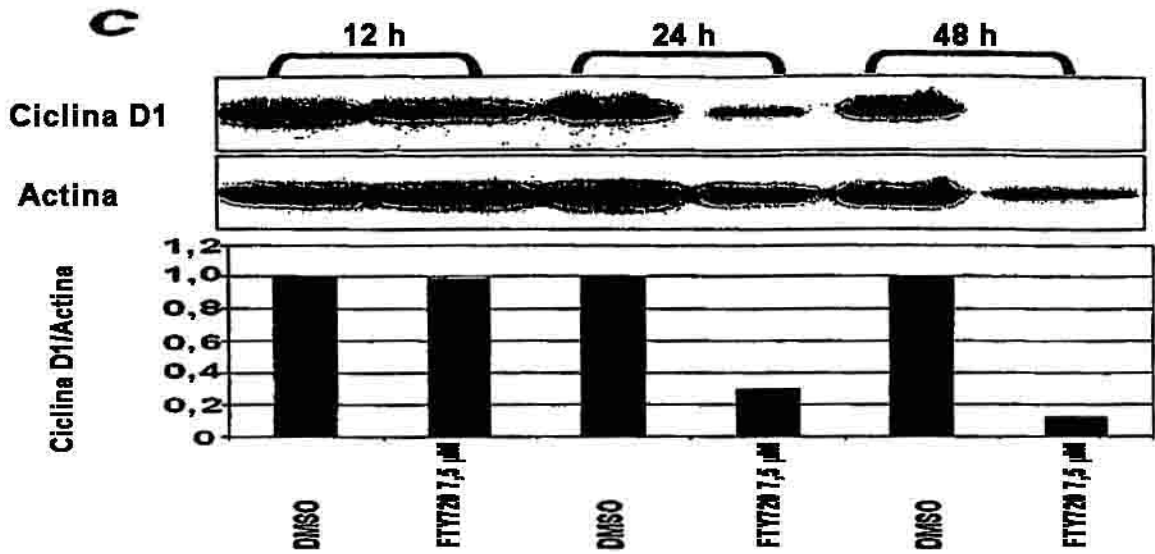


Figura 14 (c, d, e)