

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 407**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4045 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/US2012/042174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12174061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12730099 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2720696**

54 Título: **Combinación de panobinostat y ruxolitinib en el tratamiento de cáncer, tal como una neoplasia mieloproliferativa**

30 Prioridad:

14.06.2011 US 201161496750 P
09.12.2011 US 201161568717 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BAFFERT, FABIENNE;
RADIMERSKI, THOMAS y
GADBAW, BRIAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 595 407 T3

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

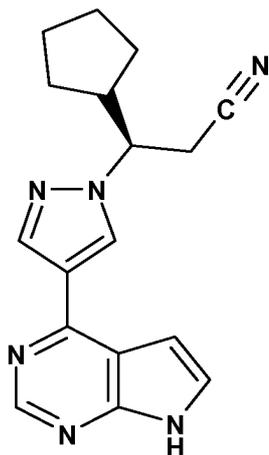
DESCRIPCIÓN

Combinación de panobinostat y ruxolitinib en el tratamiento de cáncer, tal como una neoplasia mieloproliferativa

Campo de la invención

La invención se refiere a una combinación, la cual comprende:

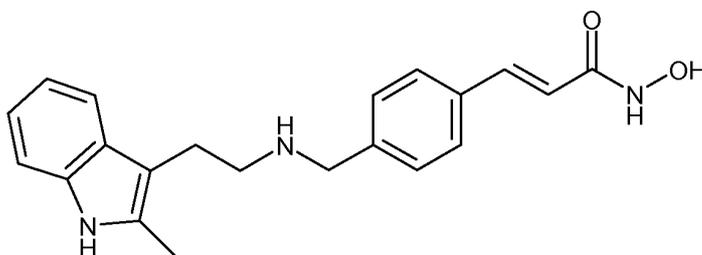
- 5 (a) Compuesto A (nombre: (R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d] pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo) de la Fórmula (A):



(A)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y

- 10 (b) Compuesto B (nombre: N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida) de la Fórmula (B):



(B),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

- 15 para su uso simultáneo, concurrente, separado o secuencial, especialmente para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tal combinación y a un método para tratar enfermedades proliferativas, en un mamífero, particularmente un ser humano, con tal combinación. El presente documento invención además también se refiere a un empaque o producto comercial que comprende tal combinación.

Antecedentes

- 20 Wang et al. informaron en un artículo (Blood, 2009) que el tratamiento con panobinostat (PS) disminuyó la autofosforilación, la expresión y la señalización aguas abajo de la JAK2V617F. El tratamiento con PS también interrumpió la asociación de la chaperona de la JAK2V617F con el hsp90, promoviendo la degradación proteasomal de la JAK2V617F. El PS también indujo la apoptosis de las células HEL92.1.7 y Ba/F3-JAK2V617F de eritroleucemia humana cultivadas que expresan JAK2V617F. El tratamiento con el inhibidor TG101209 de la tirosina quinasa JAK2 atenuó la autofosforilación de la JAK2V617F e indujo la apoptosis de las células HEL92.1.7 y Ba/F3-JAK2V617F. El
25 cotratamiento con PS y TG101209 disminuyó adicionalmente la señalización del JAK/STAT e indujo de manera sinérgica la apoptosis de las células HEL92.1.7 y Ba/F3-JAK2V617F. El cotratamiento con TG101209 y PS ejerció una citotoxicidad más grande frente a las células CD34+ primarias de la neoplasia mieloproliferativa que a las

células progenitoras hematopoyéticas CD34+ normales.

Las neoplasias mieloproliferativas (MPN) son un grupo de trastornos que causan una sobreproducción de células sanguíneas (plaquetas, glóbulos blancos y glóbulos rojos) en la médula ósea. Las MPN incluyen la policitemia vera (PV), trombocitemia primaria o esencial (ET), mielofibrosis primaria o idiopática, leucemia mielógena (mielocítica) crónica (CML), leucemia neutrofilica crónica (CNL), leucemia mielomonocítica juvenil (JML) y leucemia eosinofílica crónica (CEL)/síndrome hipereosinofílico (HES). Estos trastornos se agrupan juntos debido a que comparten algunas o todas las siguientes características: la participación de una célula progenitora hematopoyética multipotente, dominio del clon transformado sobre las células progenitoras hematopoyéticas no transformadas, sobreproducción de uno o más linajes hematopoyéticos en la ausencia de un estímulo definible, formación de colonias *in vitro* independiente del factor de crecimiento, hiper celularidad ósea, hiperplasia y displasia de megacariocitos, anomalías que implican predominantemente los cromosomas 1, 8, 9, 13, y 20, diátesis trombótica y hemorrágica, hematopoyesis extramedular exuberante y transformación espontánea a leucemia aguda o desarrollo de fibrosis de médula pero a una velocidad baja, en comparación con la velocidad en CML. La incidencia de las MPN varía ampliamente, variando desde aproximadamente 3 por cada 100.000 individuos mayores de 60 años anualmente para CML a 0,13 por cada 100.000 niños desde el nacimiento hasta los 14 años anualmente para JML (Vardiman JW et al., Blood 100(7): 2292-302, 2002).

En consecuencia, sigue habiendo una necesidad de nuevos tratamientos de MPN, así como otros cánceres.

Sumario de la invención

En el presente documento se proporciona una terapia de combinación que comprende un Compuesto A inhibidor de JAK de la Fórmula (A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y Compuesto B inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) de la Fórmula (B) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La terapia de combinación también es útil para el tratamiento de una variedad de cánceres. La terapia de combinación también es útil para el tratamiento de cualquier número de enfermedades asociadas con JAK y/o enfermedades asociadas con HDAC. El Compuesto A de la Fórmula (A) también se conoce como ruxolitinib. El Compuesto B de la Fórmula (B) también se conoce como panobinostat.

La terapia de combinación proporcionada en el presente documento es útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con JAK en un sujeto. En consecuencia, en un aspecto, se proporciona en el presente documento una composición para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición discutida anteriormente. En una realización, el cáncer es una neoplasia mieloproliferativa. Los ejemplos no limitantes de las neoplasias mieloproliferativas que se pueden tratar utilizando la terapia de combinación de la invención incluyen, pero sin limitación, leucemia mielóide crónica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria o idiopática (PMF), leucemia neutrofilica crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica, y leucemia mielógena crónica atípica.

En una realización de estas composiciones para su uso en el tratamiento, el sujeto es un ser humano.

En otra realización, el tratamiento comprende la co-administración del Compuesto A y Compuesto B.

En otra realización, el Compuesto A y el Compuesto B están en una formulación única o forma de dosificación unitaria.

En otra realización, el tratamiento comprende la administración del Compuesto A y Compuesto B sustancialmente al mismo tiempo, o en momentos diferentes.

En otra realización del método, el Compuesto A se administra al sujeto, seguido por la administración del Compuesto B.

En otra realización más, el Compuesto B se administra al sujeto, seguido por la administración del Compuesto A.

En otra realización de la composición para su uso en el tratamiento, el Compuesto A y/o el Compuesto B se administra en cantidades que no serían eficaces cuando uno o ambos se administran solos, sino que las cantidades son eficaces en combinación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el peso corporal durante el período de tratamiento con el Compuesto A y/o Compuesto B.

Las Figuras 2 y 3 muestran el efecto del tratamiento de los niveles de BioL después de 7 días de tratamiento, es decir, 11 días después de la inyección de células (el tratamiento se inició el día 4 después de la inyección de células).

La Figura 4 muestra el peso del bazo después de 8 días de tratamiento.

5 Las Figuras 5 y 6 muestran el resultado del análisis de marcador PD (extractos de bazo) 2 horas después de la terapia.

10 Las Figuras 7 y 8 muestran ratones hembra Balb/c trasplantados con células transducidas de médula ósea JAK2V617F, los cuales recibieron ya sea vehículo, Compuesto B a una dosis de 8 mg/kg i.p. (equivalente de base libre) en un programa M/W/F (lunes/miércoles/viernes) del Compuesto A a una dosis de 60 mg/kg (equivalente de base libre) q12h (cada 12 horas) o la combinación de ambos agentes durante 21 días consecutivos. El cambio en el peso corporal y el peso del bazo en el sacrificio se representan como media \pm SEM. N = 9/grupo. El valor promedio del peso de bazo normal de ratones Balb/c hembras está en el intervalo de 100 mg). *p <0,05 en el día de sacrificio (ANOVA de una vía seguido por una prueba de Dunnett o prueba de Tukey. La forma recíproca de los valores del peso del bazo se utilizó para el análisis estadístico).

15 Las Figuras 9-12 muestran ratones hembras Balb/c trasplantados con células transducidas de médula ósea mJAK2V617F-IRES-GFP, los cuales recibieron ya sea vehículos, Compuesto B a una dosis de 8 mg/kg i.p. (equivalente de base libre) en un programa M/W/F, del Compuesto A a una dosis bid (2 veces al día) de 60 mg/kg (equivalente de base libre) o la combinación de ambos agentes durante 21 días consecutivos. En el día de sacrificio, se recolectó sangre y se analizó con un analizador de sangre Sysmex. N = 7-9/grupo (algunas muestras no fueron susceptibles de analizarse en el grupo de combinación de Compuesto A/Compuesto B. 1 valor atípico se detectó en el grupo de vehículo (ID 3) y 1 valor atípico en el grupo de Compuesto A (ID 27) en el día de sacrificio basado en el análisis en el programa de valores atípicos Graph Pad Quick calcs (el análisis de datos se realizó con todos los valores). Figura 9: Hct;

20 La Figura 10: Conteo de reticulocitos; Figura 11: Conteo de plaquetas; Figura 12: Conteo de glóbulos blancos (WBC). *p < 0,05 en el día de sacrificio (ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett o prueba de Tukey para comparaciones múltiples sobre valores transformados log₁₀ para los conteos de WBC y PLT).

25 Las Figuras 13-16 muestran imágenes representativas de tinción de médula ósea de ratones hembras Balb/c que fueron trasplantados con células mJAK2V617F-IRES-GFP y tratados con el Compuesto B a una dosis de 8 mg/kg i.p. (equivalente de base libre) en un programa M/W/F, del Compuesto A a una dosis de 60 mg/kg (equivalente de base libre) q12h o la combinación de ambos agentes durante 21 días consecutivos.

30 Las Figuras 17-19 muestran imágenes representativas de tinción de bazo de ratones hembras Balb/c que fueron trasplantados con células mJAK2V617F-IRES-GFP y tratados con el Compuesto B a una dosis de 8 mg/kg i.p. (equivalente de base libre) en un programa M/W/F, del Compuesto A a una dosis de 60 mg/kg (equivalente de base libre) q12h o la combinación de ambos fármacos durante 21 días consecutivos.

35 La Figura 20 ilustra el diseño del estudio y los métodos.

La Figura 21 ilustra la longitud de bazo palpable con el tiempo en la cohorte 1.

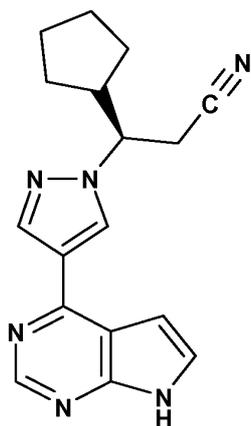
La Figura 22 ilustra la longitud de bazo palpable con el tiempo en la cohorte 2.

La Figura 23 ilustra la longitud de bazo palpable con el tiempo en la cohorte 3.

Descripción detallada

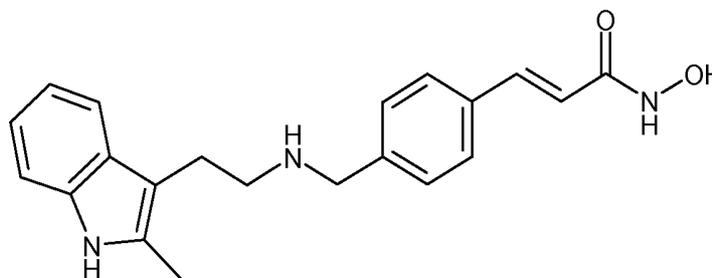
40 Se ha descubierto que la administración de una combinación de

(a) Compuesto A ((R)-3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo) de la Fórmula (A):



(A)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable; y
 (b) Compuesto B (N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1*H*-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida) de la
 Fórmula (B):



(B),

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10

proporciona efectos sinérgicos sorprendentes para el tratamiento del cáncer, en un sujeto. Este procedimiento - combinación o co-administración de los dos tipos de agentes - puede ser útil para el tratamiento de individuos que sufren de cáncer que no responden o son resistentes a las terapias actualmente disponibles. La terapia de combinación proporcionada en el presente documento también es útil para mejorar la eficacia y/o reducir los efectos secundarios de terapias contra el cáncer actualmente disponibles para los individuos que no responden a tales terapias.

15

Ciertos términos utilizados en el presente documento se describen a continuación. Los compuestos del presente documento invención se describen utilizando la nomenclatura estándar. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

El Compuesto A y sus sales farmacéuticamente aceptables del mismo se describen en la literatura, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 7.598.257. El Compuesto A también se conoce como ruxolitinib.

20

El Compuesto B y sus sales farmacéuticamente aceptables del mismo se describen en la literatura, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.833.384; 7.067.551; y 6.552.065. El Compuesto B también se conoce como panobinostat.

A menos que se especifique lo contrario, o claramente se indique por el texto, la referencia a compuestos útiles en la terapia de combinación de la invención incluye tanto la base libre de los compuestos, como todas las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos.

25

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere al ácido no tóxico o sales de metales alcalinotérreos de los compuestos de pirimidina de la invención. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de pirimidina, o haciendo reaccionar por separado las funciones base o ácido con un ácido o una base orgánica o inorgánica adecuada, respectivamente. Las sales representativas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencensulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, ciclopentanpropionato,

30

dodecilsulfato, etansulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemi-sulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etansulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluensulfonato y undecanoato. También, los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo, tales como cloruros, bromuros, y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. Los productos dispersables o solubles en aceite o agua se obtienen de este modo.

Los ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido metansulfónico, ácido succínico, ácido málico, ácido metansulfónico, ácido bencensulfónico, y ácido p-toluensulfónico, ácido cítrico, y aminoácidos tales como ácido aspártico y ácido glutámico.

Las sales de adición básicas se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de pirimidina, o por separado haciendo reaccionar porciones de ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco, o un amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y similares, así como también cationes de amonio no tóxico, amonio cuaternario, y amina, incluyendo, pero no limitado a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, piridina, picolina, trietanolamina y similares, y aminoácidos básicos tales como arginina, lisina y ornitina.

En el presente documento se proporciona una combinación para su uso en la terapia que comprende un Compuesto A inhibidor de JAK y Compuesto B inhibidor de HDAC. La administración de la combinación incluye la administración de la combinación en una formulación única o forma de dosificación unitaria, la administración de los agentes individuales de la combinación concurrentemente pero por separado, o la administración de los agentes individuales de la combinación secuencialmente por cualquier ruta adecuada. La dosificación de los agentes individuales de la combinación puede requerir la administración más frecuente de uno de los agentes en comparación con los otros agentes en la combinación. Por lo tanto, para permitir la dosificación apropiada, los productos farmacéuticos envasados pueden contener una o más formas de dosificación que contienen la combinación de agentes, y una o más formas de dosificación que contienen uno de la combinación de agentes, pero no los otros agentes de la combinación.

La expresión "formulación única" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un portador o vehículo único formulado para suministrar cantidades eficaces de ambos agentes terapéuticos a un paciente. El vehículo único se diseña para entregar una cantidad eficaz de cada uno de los agentes, junto con cualquiera de los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el vehículo es un comprimido, cápsula, píldora, o un parche. En otras realizaciones, el vehículo es una solución o una suspensión.

La expresión "dosis unitaria" se utiliza en el presente documento para significar la administración simultánea de ambos agentes juntos, en una forma de dosificación, al paciente a ser tratado. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es una formulación única. En ciertas realizaciones, la dosis unitaria incluye uno o más vehículos de modo que cada vehículo incluye una cantidad eficaz de al menos uno de los agentes junto con portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la dosis unitaria es uno o más comprimidos, cápsulas, píldoras, o parches administrados al paciente al mismo tiempo.

El término "tratar" se utiliza en el presente documento para significar mitigar; reducir o aliviar, al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto. Dentro del significado de la presente invención, el término "tratar" también denota, detener, retrasar el comienzo (*es decir*, el período anterior a la manifestación clínica de una enfermedad o síntoma de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollo o empeoramiento de un síntoma de una enfermedad.

El término "sujeto" se pretende que incluya animales. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, *por ejemplo*, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas, y animales no humanos transgénicos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano, *por ejemplo*, un ser humano que sufre de, está en riesgo de sufrir de, o potencialmente capaz de sufrir de mieloma múltiple.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa usualmente dentro del 20 %, más preferentemente dentro del 10 %, y más preferentemente aún dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Alternativamente, especialmente en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un logaritmo (*es*

decir, un orden de magnitud) preferentemente dentro de un factor de dos de un valor dado.

La combinación de agentes descrita en el presente documento exhibe un efecto sinérgico. El término “efecto sinérgico” tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la acción de dos agentes que producen un efecto, por ejemplo, que retrasan la progresión sintomática de cáncer o síntomas del mismo, que es mayor que la simple adición de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. Un efecto sinérgico se puede calcular, por ejemplo, utilizando métodos adecuados, tales como la ecuación de Sigmoid-Emax (Holford, N. H. G. y Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación de efecto mediano (Chou, T. C. y Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación referida anteriormente se puede aplicar a los datos experimentales para generar una gráfica correspondiente para ayudar en la evaluación de los efectos de la combinación de fármacos. Las gráficas correspondientes asociadas con las ecuaciones referidas anteriormente son la curva de concentración-efecto, curva de isoblograma y curva de índice de combinación, respectivamente.

Una “cantidad eficaz” de una combinación de agentes es una cantidad suficiente para proporcionar una mejora observable sobre los signos clínicamente observables de valor basal y síntomas del trastorno depresivo tratado con la combinación.

Una “forma de dosificación oral” incluye una forma de dosificación unitaria prescrita o propuesta para administración oral.

Combinación de Compuesto A y Compuesto B para su uso en el tratamiento

La invención proporciona una combinación de Compuesto A y Compuesto B para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con JAK como se define en las reivindicaciones, *por ejemplo*, cáncer, *por ejemplo*, neoplasias mieloproliferativas, en un individuo administrando al individuo una combinación de Compuesto A y Compuesto B.

En una realización, en el presente documento se proporcionan una combinación de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con JAK en un sujeto (por ejemplo, paciente) de manera que se administra al individuo en necesidad de tal tratamiento una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de una combinación de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma. Una enfermedad asociada con JAK puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que está directa o indirectamente ligada a la expresión o actividad de la JAK, incluyendo los niveles de actividad anormal y/o sobre-expresión. Una enfermedad asociada con JAK también puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que se puede prevenir, mejorar, o curar modulando la actividad de JAK.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades que involucran el sistema inmune incluyendo, por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos (por ejemplo, rechazo de aloinjertos y enfermedad de injerto contra huésped).

Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, diabetes tipo I, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, miastenia grave, nefropatías por inmunoglobulina, trastornos autoinmunes de la tiroides, y similares. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune es un trastorno de la piel bullosa autoinmune tales como pénfigo vulgar (PV) o penfigoide bulloso (BP).

Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen condiciones alérgicas tales como asma, alergias alimentarias, dermatitis atópica y rinitis. Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades virales tales como virus de Epstein Barr (EBV), Hepatitis B, Hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus de Varicela-Zoster (VZV) y Virus del Papiloma Humano (PHV).

Los ejemplos adicionales de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen trastornos de la piel tales como psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgaris), dermatitis atópica, erupción de la piel, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis por contacto o dermatitis alérgica por contacto). Por ejemplo, ciertas sustancias incluyendo algunos productos farmacéuticos cuando se aplican por vía tópica pueden causar sensibilización de la piel. En algunas realizaciones, el trastorno de la piel es tratado por la administración tópica de al menos un inhibidor de JAK de la invención.

En realizaciones adicionales, la enfermedad asociada con JAK es cáncer, incluyendo los caracterizados por tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman, el melanoma, *etc.*), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda, o mieloma múltiple), y cáncer de piel tal como linfoma cutáneo de células T (CTCL) y

linfoma cutáneo de células B. Los linfomas cutáneos de células T ejemplares incluyen síndrome de Sezary y micosis fungoide.

5 Las enfermedades asociadas con JAK pueden incluir, además, las caracterizadas por la expresión de una JAK2 mutante, tales como aquellas que tienen al menos una mutación en el dominio pseudo-cinasa (por ejemplo, JAK2V617F).

Las enfermedades asociadas con JAK pueden incluir, además, trastornos mieloproliferativos (MPD) tales como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), síndrome hipereosinofílico (HES), enfermedad sistémica de mastocitos (SMCD), y similares.

10 Las enfermedades asociadas con JAK adicionales incluyen inflamación y enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias ejemplares incluyen enfermedades inflamatorias del ojo (por ejemplo, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis, o enfermedad relacionada), enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio (por ejemplo, del tracto respiratorio superior incluyendo la nariz y senos paranasales, tales como rinitis o sinusitis o del tracto respiratorio inferior incluyendo bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y similares), miopatía inflamatoria tal como miocarditis, y otras enfermedades inflamatorias.

15 La terapia de combinación descrita en el presente documento se puede utilizar además para tratar lesiones por reperfusión de isquemia o una enfermedad o afección relacionada con un evento isquémico inflamatorio, tal como paro cardíaco o apoplejía. La terapia de combinación descrita en el presente documento se puede utilizar además para tratar la anorexia, caquexia, o fatiga tal como la que resulta de o está asociada con el cáncer. La terapia de combinación descrita en el presente documento se puede utilizar además para tratar la reestenosis, esclerodermis, o fibrosis. La terapia de combinación descrita en el presente documento se puede utilizar además para tratar afecciones asociadas con la hipoxia o astrogliosis tales como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer, o neurodegeneración.

20 En el presente documento se proporcionan un Compuesto A y Compuesto B para su uso en los métodos para tratar enfermedades, *por ejemplo*, un trastorno mieloproliferativo, administrando una cantidad eficaz del Compuesto A y Compuesto B a un individuo que sufre de una enfermedad. La cantidad de la combinación de agentes es eficaz para tratar la enfermedad. Es importante tener en cuenta los efectos sinérgicos de la combinación de agentes: a pesar de que uno o más de los agentes administrados solos a una dosificación particular pueden no ser eficaces, cuando se administran en combinación, a la misma dosificación de cada agente, el tratamiento es eficaz. Las dosis de uno o más de los agentes en la combinación, por lo tanto, pueden ser menores que las dosis aprobadas por la FDA de cada agente.

Dosificaciones

35 La dosis óptima de la combinación de agentes para su uso en el tratamiento de la enfermedad se puede determinar empíricamente para cada individuo utilizando los métodos conocidos y dependerá de una variedad de factores, incluyendo, aunque no limitado a, el grado de avance de la enfermedad; la edad, peso corporal, salud general, género y dieta del individuo; la hora y ruta de administración; y otros medicamentos que el individuo está tomando. Las dosificaciones óptimas se pueden establecer utilizando pruebas y procedimientos rutinarios que son bien conocidos en la técnica.

40 La cantidad de combinación de agentes que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del individuo tratado y del modo particular de administración. En algunas realizaciones, las formas de dosificación unitarias que contienen la combinación de agentes como se describe en el presente documento contendrán las cantidades de cada agente de la combinación que se administran típicamente cuando los agentes se administran solos.

45 La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo del compuesto utilizado y la afección particular a ser tratada o prevenida. En general, se prefiere el uso de la dosificación mínima que es suficiente para proporcionar terapia eficaz. Los pacientes generalmente pueden ser monitoreados para la eficacia terapéutica utilizando ensayos adecuados para la afección a ser tratada o prevenida, lo cual será familiar para los expertos en la materia.

La forma de dosificación se puede preparar por diversas técnicas convencionales de mezclado, trituración y fabricación fácilmente evidentes para los expertos en la química de formulaciones de fármacos.

50 La forma de dosificación oral que contiene la combinación de agentes o agentes individuales de la combinación de agentes puede estar en la forma de micro-comprimidos encerrados dentro de una cápsula, *por ejemplo*, una cápsula de gelatina. Para esto, se puede utilizar una cápsula de gelatina como se emplea en formulaciones farmacéuticas, tal como la cápsula de gelatina dura conocida como CAPSUGEL, disponible de Pfizer.

- Muchas de las formas de dosificación orales útiles en el presente documento contienen la combinación de agentes o agentes individuales de la combinación de agentes en la forma de partículas. Tales partículas se pueden comprimir en un comprimido, estar presentes en un elemento central de una forma de dosificación recubierta, tal como una forma de dosificación de sabor enmascarado, una forma de dosificación con recubrimiento prensado, o una forma de dosificación con recubrimiento entérico, o puede estar contenida en una cápsula, forma de dosificación de bomba osmótica, u otra forma de dosificación.
- Los compuestos de fármacos de la presente invención están presentes en las combinaciones, formas de dosificación, composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento en una relación en el intervalo de 100:1 a 1:100, más preferentemente de 1:1 a 1:100, y todavía más preferentemente de 1:10 a 1:100.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 5 mg BID, Panobinostat se administra 10 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 10 mg BID, Panobinostat se administra 10 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 15 mg BID, Panobinostat se administra 10 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 15 mg BID, Panobinostat se administra 15 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 15 mg BID, Panobinostat se administra 20 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 15 mg BID, Panobinostat se administra 25 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 15 mg BID, Panobinostat se administra 30 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 3-7 mg BID, Panobinostat se administra 8-12 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 8-12 mg BID, Panobinostat se administra 8-12 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 10-20 mg BID, Panobinostat se administra 8-12 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 10-20 mg BID, Panobinostat se administra 10-20 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 10-20 mg BID, Panobinostat se administra 10-30 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 10-20 mg BID, Panobinostat se administra 10-30 mg TIW QOW.
- En una realización, cuando se administra a un ser humano, Ruxolitinib se da 10-20 mg BID, Panobinostat se administra 20-40 mg TIW QOW.
- Las relaciones óptimas, dosificaciones individuales y combinadas, y concentraciones de los compuestos de fármacos que producen eficacia sin toxicidad se basan en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos a los sitios objetivo, y se determinan utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia.

Composiciones Farmacéuticas

- Las composiciones farmacéuticas o combinaciones proporcionadas en el presente documento se pueden analizar en estudios clínicos. Los estudios clínicos adecuados pueden ser, por ejemplo, estudios de escalación de dosis abiertos en pacientes con enfermedades proliferativas. Tales estudios prueban, en particular, el sinergismo de los

ingredientes activos de la combinación de la invención. Los efectos beneficiosos en enfermedades proliferativas se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios que son conocidos como tales los expertos en la materia. Tales estudios, en particular, pueden ser adecuados para comparar los efectos de una monoterapia utilizando los ingredientes activos y una combinación de la invención.

5 La administración de una combinación farmacéutica de la invención puede resultar no solo en un efecto beneficioso, *por ejemplo* un efecto terapéutico sinérgico, *por ejemplo*, con respecto al alivio, retraso de la progresión de o inhibición de los síntomas, sino también en efectos beneficiosos sorprendentes adicionales, *por ejemplo*, un menor número de efectos secundarios, y una calidad de vida mejorada o una morbilidad disminuida, en comparación con una monoterapia que aplica solo uno de los ingredientes farmacéuticamente activos utilizados en la combinación de la invención.

10 Un beneficio adicional puede ser que se pueden utilizar dosis inferiores de los ingredientes activos de la combinación de la invención, *por ejemplo*, que las dosificaciones necesitan no solo a menudo ser más pequeñas sino también se pueden aplicar con menos frecuencia, lo que puede disminuir la incidencia o gravedad de los efectos secundarios. Esto es de acuerdo con los deseos y requerimientos de los pacientes a ser tratados.

15 Un objetivo de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que puede ser conjuntamente terapéuticamente eficaz en la focalización o prevención del cáncer, *por ejemplo*, un trastorno mieloproliferativo. En esta composición, el Compuesto A y Compuesto 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 unitarias separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

20 Las composiciones farmacéuticas para la administración separada de ambos compuestos, o para la administración en una combinación fija, *es decir*, una composición galénica única que comprende ambos compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar de una manera conocida *per se* y son aquellas adecuadas para la administración enteral, tales como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo seres humanos, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un socio de combinación farmacológicamente activo solo, *por ejemplo*, como se indica anteriormente, o en combinación con uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para la aplicación enteral o parenteral.

Formulaciones

30 Las combinaciones de fármacos proporcionadas en el presente documento se pueden formular por una variedad de métodos evidentes para los expertos en la materia de la formulación farmacéutica. Las diversas propiedades de liberación descritas anteriormente se pueden lograr en una variedad de diferentes maneras. Las formulaciones adecuadas incluyen, *por ejemplo*, comprimidos, cápsulas, formulaciones con recubrimiento prensado, y otras formulaciones administradas fácilmente.

35 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden contener, *por ejemplo*, desde aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 99,9 %, preferentemente desde aproximadamente 1 % a aproximadamente 60 % de ingredientes activos. Las formulaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, *por ejemplo*, aquellas en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, o ampollas. Si no se indica lo contrario, estas se preparan de una manera conocida *per se*, *por ejemplo* por medio de procesos convencionales de mezclado, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución o liofilización. Se apreciará que el contenido unitario de un socio de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí mismo una cantidad eficaz puesto que la cantidad eficaz necesaria se puede lograr por la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

40 En particular, una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno del socio de combinación de la combinación de la invención se puede administrar simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como una combinación fija. *Por ejemplo*, la combinación para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la invención puede comprender (i) la administración del primer agente (a) en forma libre o forma de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) la administración de un agente (b) en forma libre o forma de sal farmacéuticamente aceptable, simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades conjuntamente terapéuticamente eficaces, preferentemente en cantidades sinérgicamente eficaces, *por ejemplo* en dosificaciones diarias o intermitentemente correspondientes a las cantidades descritas en el presente documento. Los socios de combinación individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el curso de la terapia o concurrentemente en formas de combinación divididas o únicas. La invención actual ha de entenderse como que abarca todos esos regímenes de tratamiento simultáneo o alternado y el término "administrar" se ha de interpretar en consecuencia.

55 La dosificación eficaz de cada uno de los socios de combinación empleados en la combinación de la invención

5 puede variar dependiendo de la composición farmacéutica o compuesto particular empleado, el modo de administración, la afección a tratar, la gravedad de la afección a ser tratada. Por lo tanto, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores incluyendo la ruta de administración y la función renal y hepática del paciente. Un clínico o médico de experiencia ordinaria puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de los ingredientes activos únicos requeridos para aliviar, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO A

10 Un estudio se llevó a cabo para probar la eficacia de la combinación del Compuesto A y Compuesto B en ratones SCID-beige inyectados i.v. (vena de la cola) con $1 \cdot 10^6$ células Ba/F3 EpoR JAK2V617F-luc clon 8.

Protocolo:

Animales:

15 80 ratones hembras Scid-beige, 18-22 g (8 grupos de 7 ratones, 24 excluidos al momento de la aleatorización)
Células: células Ba/F3 EpoR JAK2V617F-luc clon 8.

La captura de imágenes Xenogen de cuerpo completo se llevó a cabo en los días 4, 7, 9 y 11 después de la inyección de células. La aleatorización de los animales en los grupos de tratamiento se basó en la bioluminiscencia (BioL) en el día 4 después de la inyección de células.

El modelo de ratón y el protocolo se describen por Baffert et al., Mol. Cancer Ther; 9 (7), 1945, Julio de 2010.

20 Animal y Línea Celular:

Línea celular:	Ba/F3EpoR JAK2V617F-luc clon 8
Gen:	JAK2V617F
Nº. de Células/Sitio de inyección:	1×10^6 células en 200 μ l/inyección i.v. en la cola
Especie:	ratón
Cepa:	CB17/C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdcscid-lystbgN7, granjas Taconic (nombre completo Taconic)
Género:	hembra
Edad:	22-24 g
Número:	80 ratones

Preparación e inyección de células:

<u>Reactivos:</u>	RPMI1640 (Amined)
	10 % FCS (Amined)
	L-glutamina 2 mM (Amined)
	Puromicina, 1 μ g/ml (Sigma, lote 036K4073)
	Higromicina B, 100 μ g/ml (Invitrogen, lote B13871010)

25 Las células Ba/F3 EpoR JAK2V617F-luc se cultivaron en RPMI1640 suplementado con 10 % FCS, 1 % glutamina, puromicina (1 μ g/ml) e higromicina (100 μ g/ml). Las células se dividieron cada tres días (1:50), no más de dos semanas antes del experimento. El día antes de la inyección, las células se cultivaron sin antibióticos (para evitar cualquier posible retraso en el crecimiento celular *in vivo*).

El día de la inyección las células se recolectaron y se resuspendieron en amortiguador HBSS (10e6 células en 200 μ l). Las células se inyectaron en la vena de la cola utilizando una jeringa de tuberculina de 27G.

Definición del grupo:

ES 2 595 407 T3

Grupo 1 (7 ratones): grupo de vehículo (0,5 % HPMC po + D5W 5 % ip)

Grupo 2 (7 ratones): Compuesto B 5 mg/kg, 3 veces a la semana (M/W/F), ip + HPMC 05 % po

Grupo 3 (7 ratones): Compuesto B 10 mg/kg, 3 veces a la semana (M/W/F), ip + HPMC 0,5 % po

Grupo 4 (7 ratones): Compuesto B 15 mg/kg, 3 veces a la semana (M/W/F), ip + HPMC 0,5 % po

5 Grupo 5 (7 ratones): Compuesto A 79,2 mg/kg dos veces al día, po + D5W 5 % ip

Grupo 6 (7 ratones): Compuesto A 79,2 mg/kg dos veces al día, po + Compuesto B 5 mg/kg, 3 veces a la semana (M/W/F), ip

Grupo 7 (7 ratones): Compuesto A 79,2 mg/kg dos veces al día, po + Compuesto B 10 mg/kg, 3 veces a la semana (M/W/F), ip

10 Grupo 8 (7 ratones): Compuesto A 79,2 mg/kg dos veces al día, po + Compuesto B 15 mg/kg, 3 veces a la semana (M/W/F), ip

Los tratamientos se administran al mismo tiempo.

Compuestos:

15 El Compuesto A es una sal de monofosfato, 79,2 mg/kg (equivalente a 60 mg/kg de base libre), 10 ml/kg en HPMC Pharmacoat 603 0,5 %.

Formulación que contiene el Compuesto A: 522,7 mg del Compuesto A (en forma de sal de monofosfato) en 66 ml de HPMC Pharmacoat 603 0,5 %.

20 El Compuesto B está en forma de sal de ácido láctico, 15 mg/kg (equivalente a 11,90 mg/kg de base libre), 10 mg/kg (equivalente a 7,94 mg/kg de base libre) y 5 mg/kg (equivalente a 3,97 mg/kg de base libre), 10 ml/kg en D5W 5 % (B. Braun, lote 395147).

Formulación que contiene el Compuesto B: 15 mg de Compuesto B (en forma de sal de ácido láctico) en 10 ml de D5W 5 %, 10 mg en 10 ml de D5W 5 % y 5 mg en 10 ml de D5W 5 %, respectivamente.

Monitoreo y recolección de datos/muestra:

Los animales se identificarán por los transpondedores y se monitorearon diariamente.

25 La bioluminiscencia se registró utilizando la Cámara Xenogen (sistema de captura de imágenes no invasivo IVIS®, Caliper) en el día 4, día 7 y 10 después de la inyección de células bajo anestesia con isoflurano (3-5 % en volumen de isoflurano, 0,8 l/min de flujo de aire). Los animales se inyectaron i.p. con D-luciferina (Xenogen Corporation, ref. XR-1001), en 150 mg/kg (10 ml/kg de NaCl). Los ratones anestesiados luego se colocaron en la cámara de captura de imágenes para capturar imágenes 15 minutos después de la inyección de luciferina.

30 Parámetros de Xenogen: D/10seg/med/15min.

Los animales son aleatorizados en el día 4 y el tratamiento se inició durante al menos 6 días con base en el bienestar de los animales tratados con el vehículo.

35 El peso corporal (BW) y bienestar se registran en la hoja de puntuación. Los animales se sacrifican si el BW excede el 15 % en 2 días consecutivos. Todos los ratones se sacrifican si más del 50 % de los animales por grupo están muertos.

Sacrificio, recolección de muestras:

2 horas después de la última dosis del Compuesto A;
2 horas después de la última dosis del Compuesto B;

40

- El peso del bazo se registra en el sacrificio.
- Las muestras se recolectan y congelan en nitrógeno líquido y luego se mantienen a -80°C hasta su análisis:

ES 2 595 407 T3

- bazo, BM, sangre e hígado para el análisis PK
- bazo para el análisis de marcador PD (p-STAT5 (Compuesto A) y acetilación de proteína (Compuesto B)),
- esternón para análisis de marcador PD (p-STAT5 (Compuesto A)).

5 Resultados del Ejemplo A:

Las dosis se expresan como equivalente de base libre.

Las Tablas 1.1-1.8 muestran la bioluminiscencia en el momento de la aleatorización para los diferentes grupos.

Tabla 1.1

Grupo 1 Vehículo	Ratón nb	BioL día 4
24	1420	8,47E+05
21	2009	1,07E+06
70	2057	1,08E+06
76	6080	1,43E+06
75	7426	1,46E+06
29	4546	1,98E+06
6	7540	2,04E+06
Promedio		1,42E+06
Desv. Estándar		4,60E+05
Sem		1,74E+05

10

Tabla 1.2

Grupo 2 Compuesto B 4 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
47	1367	8,51E+05
22	2330	1,06E+06
58	4827	1,10E+06
26	8199	1,40E+06
61	5411	1,47E+06
17	6505	1,89E+06
62	3364	2,05E+06
Promedio		1,40E+06
Desv. Estándar		4,42E+05
Sem		1,67E+05

Tabla 1.3

Grupo 3 Compuesto B 8 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
19	313	8,52E+05
45	4578	1,06E+06
23	4191	1,10E+06
72	6127	1,39E+06
31	3335	1,50E+06
51	4942	1,86E+06

ES 2 595 407 T3

Grupo 3 Compuesto B 8 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
28	2809	2,06E+06
Promedio		1,40E+06
Desv. Estándar		4,40E+05
Sem		1,66E+05

Tabla 1.4

Grupo 4 Compuesto B 12 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
37	4716	8,69E+05
9	2896	1,02E+06
42	3748	1,10E+06
39	2934	1,37E+06
2	8255	1,51E+06
52	1671	1,81E+06
8	5002	2,10E+06
Promedio		1,40E+06
Desv. Estándar		4,45E+05
Sem		1,68E+05

Tabla 1.5

Grupo 5 Compuesto A 60 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
40	6132	8,80E+05
66	870	9,78E+05
18	5782	1,11E+06
69	5545	1,35E+06
48	9104	1,55E+06
71	3957	1,74E+06
14	8439	2,24E+06
Promedio		1,41E+06
Desv. Estándar		4,79E+05
Sem		1,81E+05

Tabla 1.6

Grupo 6 Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 4 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
63	4010	9,04E+05
13	2805	9,70E+05
11	3830	1,13E+06
54	6791	1,26E+06
55	6962	1,59E+06
12	3656	1,71E+06
15	2875	2,31E+06
Promedio		1,41E+06
Desv. Estándar		4,97E+05
Sem		1,88E+05

Tabla 1.7

Grupo 7 Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 8 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
27	3824	9,06E+05
65	5471	9,62E+05
49	2321	1,14E+06
57	1127	1,22E+06
30	6769	1,60E+06
32	2622	1,71E+06
79	1594	2,46E+06
Promedio		1,43E+06
Desv. Estándar		5,47E+05
Sem		2,07E+05

Tabla 1.8

Grupo 8 Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 12 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
41	2798	9,07E+05
33	7925	9,51E+05
73	5754	1,16E+06
38	2515	1,19E+06
77	8809	1,65E+06
20	6583	1,70E+06

Grupo 8 Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 12 mg/kg	Ratón nb	BioL día 4
7	5799	2,82E+06
Promedio		1,48E+06
Desv. Estándar		6,67E+05
Sem		2,52E+05

La Figura 1 muestra el peso corporal durante el período de tratamiento con el Compuesto A y/o Compuesto B. No hay un cambio importante en la tolerabilidad cuando se combinan el Compuesto A y Compuesto B.

5 Las Figuras 2 y 3 muestran el efecto del tratamiento de los niveles de BioL después de 7 días de tratamiento, es decir, día 11 después de la inyección de células (el tratamiento se inició el día 4 después de la inyección de células).

La Figura 4 muestra el peso del bazo después de 8 días de tratamiento.

Las Figuras 5 y 6 muestran el resultado del análisis de marcador PD (extractos de bazo) 2 horas después de la terapia.

La Tabla 2 muestra el efecto del tratamiento sobre el incremento fraccional en Biolux.

Tabla 2

Grupo	Vehículo	Compuesto B 4 mg/kg	Compuesto B 8 mg/kg	Compuesto B 12 mg/kg	Compuesto A 60 mg/kg	Compuesto A 60 mg/kg + Compuesto B 4 mg/kg	Compuesto A 60 mg/kg + Compuesto B 8 mg/kg	Compuesto A 60 mg/kg + Compuesto B 12 mg/kg
Cambio fraccional en Biolux	1767 ± 279	481 ± 83*	351 ± 48*	204 ± 51#*	717 ± 137*	388 ± 48*	267 ± 31#*	52 ± 9*#&
T/C último día (%)	100	27	20	11	40	22*	15+	3&

Notas:
 El cambio fraccional se calculó como: Biolux en el último día/biolux en el primer día.
 *, p < 0,05 vs grupo de control de vehículo
 #, p < 0,05 vs Compuesto A
 \$, p < 0,05 vs misma dosis de Compuesto B
 (ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey en los valores log transformados para múltiples comparaciones con todos los grupos)
 T/C se calculó como: (tratado/control) · 100
 De acuerdo con el método descrito en Clarke R, Breast Cancer Res Treat, 1997:
 ≠, se indica ligero antagonismo
 +, se indica ligero antagonismo o aditividad
 &, se indica ligera sinergia o aditividad

La Tabla 3 enlista los resultados del análisis de PK 2 horas después de la terapia.

Tratamiento	Sangre mmol/L		Bazo nmol/g		Higado nmol/g		BM* nmol/g	
	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B
Compuesto B 4 mg/kg 2 hr	-	BLQ	-	1,40 ± 0,19	-	0,18 ± 0,02	-	3,34 ± 0,35
Compuesto B 8 mg/kg 2 hr	-	BLQ	-	2,07 ± 0,20	-	0,25 ± 0,03	-	3,17 ± 0,36
Compuesto A 60 mg/kg 2 hr	1,96 ± 0,33	-	1,28 ± 0,28	-	4,54 ± 1,38	-	1,40 ± 0,65	-
Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 4 mg/kg 2 hr	2,78 ± 0,46	0,02 ± 0,01	1,15 ± 0,19	2,80 ± 0,37	3,49 ± 0,54	0,30 ± 0,05	2,59 ± 0,61	6,15 ± 0,61
Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 8 mg/kg 2 hr	2,23 ± 0,35	0,03 ± 0,00	1,02 ± 0,19	3,02 ± 0,25	2,91 ± 0,40	0,32 ± 0,02	1,92 ± 0,33	8,43 ± 0,94
Compuesto A 60 mg/kg Compuesto B 12 mg/kg 2 hr	2,72 ± 0,58	0,02 ± 0,01	1,61 ± 0,44	4,51 ± 0,57	3,87 ± 0,99	0,71 ± 0,03	2,29 ± 0,29	9,81 ± 1,17

Todas las dosis se expresan como equivalentes de base libre. BLQ: Por debajo del límite de cuantificación.
Resultados representados como media ± SEM. *Niveles de BM que deben tomarse con precaución debido a problemas con el cromatograma.

Los resultados anteriores indican que la combinación del Compuesto A y Compuesto B es tolerada en un modelo de ratón mecanicista de enfermedad leucémica impulsada por células Ba/F3 EpoR JAK2V617F-luc (pérdida de peso corporal comparable entre los grupos de mono-terapia con Compuesto B + grupos de combinación de Compuesto B + Compuesto A).

- 5 Cuando se evalúa la propagación de células leucémicas (lectura de Xenogen Biolux), la combinación del Compuesto A y Compuesto B a dosis de 60 mg/kg y 12 mg/kg, respectivamente, muestra una diferencia significativa en comparación con estos fármacos administrados como mono-terapia.

EJEMPLO B

- 10 La actividad y tolerabilidad del inhibidor de desacetilasa, Compuesto B, en combinación con el inhibidor de JAK1/2, Compuesto A, se evaluaron en el modelo de trasplante de médula ósea de JAK2V617F de la enfermedad tipo policitemia vera. La actividad de combinación en este modelo de enfermedad MPN se analizó a dosis de 8 mg/kg de Compuesto B y 60 mg/kg de Compuesto A. Como se muestra en detalle a continuación, la combinación del Compuesto B con el inhibidor de JAK1/2, Compuesto A, mostró mejora significativa en la esplenomegalia y médula ósea e histología del bazo en comparación con cada agente único.

15 Trasplante de médula ósea y análisis

Infección de médula ósea y trasplante

- Los experimentos de trasplante de médula ósea murina se realizaron esencialmente como se describe en Wernig et al. (Wernig, G., Mercher, T., OkabeR, et al. (2006) Expression of JAK2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 107: 4274-4281).
- 20 Brevemente, los ratones donantes Balb/c (6-8 semanas, Charles River, machos o hembras) fueron tratados 5 días antes del trasplante BM con 5-fluorouracilo (150 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich, cat n° F6627). Las células de médula ósea de ratones donantes fueron recolectadas por lavado de fémures y tibia. Después de la lisis de glóbulos rojos (StemCellTechnologies, Grenoble, Francia, cat n° 07800), las células nucleadas se cultivaron durante 24 horas en medio de trasplante (RPMI + 10% FCS + 25 ng/ml de IL3 (R&D Systems, Abington, Reino Unido, cat n° 403-ML), 25
- 25 ng/ml de IL-6 (R&D Systems cat n° 406-ML), y 50 ng/ml de Factor de Células Madre (SC F, Bioconcept, Allschwill, Suiza, cat n° D-63120). Al día siguiente, las células se colocaron en placas a 2×10^6 células/ml/cavidad en placas de 6 cavidades en la presencia de 1 ml de sobrenadante que contiene viriones de 293T transfectadas con 10 µg de vector p-MSCV-JAK2V617F-IRES-GFP (modificación del vector original, vector p-MSCV adquirido de Clontech) y 10 µg de vector PCL-ECO (Imgenex, cat n° 10045P). Después de dos infecciones por giro (2.500 rpm durante 90 min a
- 30 32 °C, Multifuge 1S-R, Heraeus) las células BM infectadas no seleccionadas se resuspendieron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) antes de la inyección de células ($1-3 \times 10^6$ dependiendo de la velocidad de infección) en la vena de la cola de ratones receptores hembra Balb/c letalmente irradiados (total de 9 Gy o 7 Gy) administrada como dos dosis de 4,5 o 3,5 Gy 4 horas de separación) utilizando un irradiador gamma BIOBEAM 8000, (BEBIG GmbH, Alemania).
- 35 Los animales fueron monitoreados diariamente y se sacrificaron en el caso de signos mayores de angustia (pérdida excesiva de peso corporal durante más de 2 días consecutivos sin mejora, combinada con letargo y piloerección).

Recolección de muestras y análisis

CBC y recolección de órganos

- 40 Se extrajo sangre de la vena de la cola o en el sacrificio de la vena cava con una aguja de 20G bajo anestesia con isoflurano (procedimiento terminal) y se analizó utilizando un contador automatizado de células sanguíneas completas y diferenciales (modo capilar utilizando dilución 1:5 en un analizador de sangre Sysmex, XT2000iV, Sysmex Digitana AG, Norderstedt, Alemania). Los bazos se pesaron para evaluar la esplenomegalia. La sangre, bazos, estermones, e hígados se recolectaron para farmacocinética, farmacodinámica.

Detección de células positivas a GFP en las muestras de sangre por citometría de flujo

- 45 Diez microlitros de sangre entera se utilizaron para detectar las células circulantes positivas a GFP. Brevemente, la sangre se distribuyó en una placa de fondo redondo de 96 cavidades (Costar, cat n° 3795) y los glóbulos rojos (RBC) se lisaron con 200 µl de amortiguador de lisis de glóbulos rojos (Sigma, cat n° R-7757). Después de un periodo de incubación de 7 min en la oscuridad en un agitador de placas, se centrifugaron las células (5 min., 300 g) y se desechó el sobrenadante por inversión de la placa. Después de 3 etapas de lavado en amortiguador FACS (solución salina amortiguada con fosfato (D-PBS), 3 % FBS y 0,02 % de azida de sodio), las células nucleadas se
- 50 resuspendieron en 200 µl de amortiguador FACS frío y se procesaron para la detección de GFP utilizando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania).

Histología (p-STAT5, Acetil-Histona H3, reticulina)

Los esternones y bazos se recolectaron, se fijaron en formalina, se recortaron, se incluyeron en parafina y se seccionaron a (nominalmente) 4 µm utilizando un microtomo.

5 La fibrosis de médula ósea se evaluó en el esternón utilizando un kit de impregnación de plata para fibras de reticulina (Bio-Optica, cat. 04-04080).

10 El marcador de PD p-STAT5 del Compuesto A y marcador de PD Histona Acetilada H3 del Compuesto B se evaluaron en el bazo y médula ósea. Brevemente, se removió el bazo en total, se pesó y colocó en una bandeja de disección. El bazo se cortó transversalmente en dos mitades y dos piezas iguales se tomaron de las partes medias utilizando un bisturí. No se dejó que las piezas del bazo excedieran 3-4 mm de espesor. Las piezas del bazo fueron transferidas a histocasetes etiquetados y fijados por inmersión en formalina amortiguada neutra (NBF) 10 % (v/v) a temperatura ambiente (pH 6,8-7,2) (J.T. Baker, Medite, Suiza). El volumen fijador fue de al menos diez veces en exceso en comparación con el volumen de tejido. Los esternones se removieron en total, se fijaron durante 48 horas en 10 % NBF a temperatura ambiente, luego se lavaron en PBS, se descalcificaron en EDTA-amortiguador de ácido cítrico pH 7,5 (Biocyc GmbH, Luckenwalde, Alemania) por 3x24h a 37 °C. Después de un último lavado en PBS, los tejidos se cortaron y colocaron con la superficie de interés hacia abajo en un histocasete universal seguido por el procesamiento en un TPC 15Duo (Centro de Procesamiento de Tejido) para parafinación. A partir de cada bloque de parafina de tejido, varias secciones de 3 µm de espesor se cortaron en un microtomo deslizante o giratorio (Mikrom International AG, Suiza), se extendieron en un baño de agua de 45 °C, montado en portaobjetos de microscopio (Polysine, VWR International, Leuven, Bélgica), y se secaron al aire en un horno a 37 °C durante la noche. Los portaobjetos de sección de tejido secos fueron sacados del horno y se colocaron en el estante de portaobjetos del aparato para tinción lineal COT20 (Medite, Suiza) para la tinción completamente automatizada con H&E (Hematoxilina y Eosina) tinción o se procesaron para tinción por inmunohistoquímica (IHC). Para la IHC, las muestras de sección de tejido se tiñeron con anticuerpo anti-fosfo de conejo STAT5 (clon C11C5), y anticuerpo anti-acetil histona de conejo H3 (Millipore, MA, EE.UU.) se cubrieron con cubreobjetos y se secaron al aire.

25 Para la evaluación histológica, la celularidad de BM se evaluó como hiper celularidad (3+), normocelularidad (2+), e hipocelularidad (1+). La arquitectura esplénica se evaluó como destruida (1+) o conservada (0). La presencia de células mieloides, eritroides y adipocitos se evaluó como 0, 1+, 2+, 3+ con base en la celularidad. Para la evaluación de p-STAT5, los datos de imágenes de portaobjetos digitales se generaron a partir de los portaobjetos de vidrio utilizando el escáner de portaobjetos Zeiss Mirax (Scan Software versión 1.12, Zeiss AG, Alemania) a un aumento final de 200x. La evaluación cuantitativa automatizada de portaobjetos completo de núcleos de células positivos y negativos a p-STAT5 se realizó utilizando el software Definiens eCognition (eCognition versión XD 1.5, Definiens AG, Alemania). Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos positivos a p-STAT5 de núcleos totales. La tinción de la histona acetilada H3 se clasificó como 1+, 2+, 3+ con base en la intensidad de la tinción y número de células positivas.

35 Análisis Western blot para lisina acetilada

Las muestras de bazo congeladas se homogeneizaron en amortiguador de lisis (amortiguador RIPA: Tris-HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, EGTA 6 mM pH 8,5, 1 % NP-40, NaF 20 mM suplementado con 0,1 % SDS, vanadato de sodio 2 mM, pirofosfato de sodio 10 mM y una tableta de cóctel de anti-proteasas (Roche catálogo nº 11836145001) utilizando un homogeneizador Polytron (IKA Labortechnik, Ultra-Turra T25, velocidad máxima durante 40 1 min.), manteniendo las muestras en hielo durante la homogeneización. Los homogeneizados luego se centrifugaron a 10.000 rpm (15 min., 4 °C), se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio y se congelaron a -80 °C. El contenido total de proteína de los homogeneizados se midió utilizando el kit de ensayo de proteína BCA (Novagen, catálogo nº 71285-3).

45 100 µg de proteínas totales de cada muestra se resolvieron por 4-12 % de geles de Nupage (Invitrogen, catálogo nº WG1402BX10) y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore ImmobilonTM, catálogo nº IPVH20200, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) por transferencia semiseca (BioRad, sistema de transferencia semiseca, catálogo nº 170-3940). Las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (5 % BSA, 0,1 % Tween-20 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por lavado durante 30 min en PBS que contiene 0,1 % Tween-20 con cambios cada 10 min. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de lisina anti-acetilada (anticuerpo policlonal de conejo de lisina anti-acetilada, Cell Signaling, catálogo nº 9441) diluido 1:1000 en PBS que contiene 0,1 % Tween-20 y 5 % leche durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la membrana se lavó 30 min en PBS que contiene 0,5 % Tween-20 con cambios cada 10 min y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP diluido 1:2000 en PBS que contiene 0,1 % Tween-20 y 1 % BSA. La membrana se lavó de nuevo como anteriormente y se desarrolló con ECL + (Amersham Biosciences, catálogo nº RPN 2132) para detectar la lisina acetilada en los extractos de bazo.

Detección de proteínas totales utilizando β-tubulina o GAPDH

5 Para la detección de niveles de β -tubulina total, la membrana se retiró en PBS que contiene 0,1 % Tween 20 y 2 % SDS durante 30 minutos a 60 °C, se lavó 4 a 5 veces en PBS que contiene 0,1 % Tween 20 y se incubó en anticuerpo primario anti- β -tubulina (anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -tubulina, Sigma, cat nº T-4026) diluido 1:5000 en PBS que contiene 0,1 % Tween 20 y 3 % BSA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la membrana se lavó 30 minutos en PBS que contiene 0,5 % Tween 20 con cambios cada 10 minutos y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP diluido 1:5000 en PBS que contiene 0,1 % Tween 20 y 1 % BSA. La membrana se lavó de nuevo como anteriormente y se desarrolló con ECL para detectar la proteína β -tubulina.

10 Se detectaron los niveles de GAPDH como sigue: las muestras se volvieron a cargar (40 μ g de proteínas totales y la membrana se incubó en anticuerpo primario anti-GAPDH (anticuerpo de conejo anti-GAPDH, Cell Signaling, cat nº 2118) diluido 1:5000 en PBS que contiene 0,1 % Tween 20 y 3 % BSA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la membrana se lavó 30 minutos en PBS que contiene 0,5 % Tween 20 con cambios cada 10 minutos y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (GE Healthcare, cat nº NA931) diluido 1:1000 en PBS que contiene 0,1 % Tween 20 y 1% BSA. La membrana se lavó de nuevo como anteriormente, y se desarrolló con ECL para detectar la proteína GAPDH en extractos de bazo.

Bioanalítica (LC/MS-MS) para la cuantificación del Compuesto A y Compuesto B

20 Las concentraciones del Compuesto A y Compuesto B en plasma y tejidos se determinaron simultáneamente mediante un ensayo de UPLC/MS-MS. Los tejidos se homogeneizaron en un volumen igual de HPLC-agua (agua para cromatografía, Merck) utilizando el sistema Fast Prep®-24 (M.P. Biomedicals, Irvine, CA, EE.UU.). Después de la adición de 25 μ l de mezcla estándar interna (1 μ g/ml) a alícuotas analíticas (25 μ l) de homogenizados de sangre o tejidos, las proteínas se precipitaron mediante la adición de 200 μ l de acetonitrilo. Los sobrenadantes se transfirieron en un vial fresco. Después de la evaporación a sequedad, las muestras se volvieron a disolver en 60 μ l de acetonitrilo/agua (1/1 v/v). Una alícuota (5 μ l) de esta solución se separó en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters™ 1,7 μ m de tamaño de partícula, 2,1 x 50 mm) con una fase móvil que consiste de una mezcla de 0,1 % ácido fórmico en agua (solvente A) y 0,1 % ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B). La programación de gradiente se utilizó con una velocidad de flujo de 600 μ l/min. Después del equilibrio con 95 % solvente A, 5 μ l de la muestra se inyectaron. Después de un período de latencia de 0,25 min la muestra se eluyó con un gradiente lineal de 5 – 100 % solvente B durante un período de 0,65 minutos seguido por una retención de 0,35 min. La columna se preparó para la siguiente muestra mediante reequilibrio durante 0,25 min a las condiciones de partida. El eluyente de columna se introdujo directamente en la fuente de iones del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TQDTM (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.), controlado por el software Masslynx™ 4.1. El monitoreo de reacción múltiple por ionización positiva por electropulverización (ESI+) se utilizó para la detección MS/MS del analito. Se utilizó la transición de precursor a ion de producto de 307,0 -> m/z 186,0 para el Compuesto A. Simultáneamente, se registró la transición de precursor a ion de producto de 350,1 -> m/z 142,9 para el Compuesto B. El límite de cuantificación (LOQ) para ambos compuestos fue ajustado a 9 ng/ml y 9 ng/g para el plasma y tejidos, respectivamente (CV y desviación general menor de 30 %). El análisis de regresión y cálculos adicionales se realizaron con QuanLynx™ 4.1 (Micromass) y Excel™ 2007 (Microsoft). Las concentraciones de muestras desconocidas se volvieron a calcular con base en las relaciones de área pico de analito/IS de una curva de calibración construida utilizando muestras de calibración adicionadas en sangre o tejido testigo obtenidos de animales tratados con vehículo.

Condiciones de Mantenimiento

45 Ratonos Balb/cByJlco (C. River, Francia) se mantuvieron en jaulas de autoclave (un máximo de 5 animales por jaula). El ciclo de luz/oscuridad fue como sigue: 12 horas de oscuridad, 12 horas de luz (luz desde las 6:30 am a 6:30 pm). Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento gamma irradiado humedecido y agua tratada en autoclave con antibióticos (BACTRIM a una concentración final de 4 mg DE Sulfametoxazolima, 0,8 mg de Trimetoprim), Roche Pharma AG, Reinach, Suiza), 5 ml en 250 ml de agua potable) para ayudar a la recuperación de los animales después de la irradiación y evitar infecciones durante las primeras 2 semanas después del trasplante.

Compuestos de Prueba y formulación

50 El Compuesto B se administró como sal de lactato por inyección intravenosa o intraperitoneal. La sal láctica del Compuesto B se formuló en D5W isotónica (5 % dextrosa, B. Braun, Lote 395147) a una concentración de 1,5 mg/ml, 1 mg/ml y 0,5 mg/ml, respectivamente. La solución fue estable durante 10 días a temperatura ambiente. El tratamiento se administró 3 veces a la semana a un volumen de 10 ml/kg. Las dosis finales equivalentes de base libre fueron, respectivamente, 11,90, 7,94 y 3,97 mg/kg. En las figuras, estas dosis se reportan como valores enteros.

55 La sal de mono-fosfato del Compuesto A se formuló en 0,5 % HPMC (Pharmacoat 603, Dow Chemical Plaqueline, EE.UU.) a una concentración de 7,9 mg/ml. La solución fue estable a temperatura ambiente durante 4 días. El

tratamiento se administró bid a un volumen de 10 ml/kg. La dosis final equivalente de base libre fue de 60 mg/kg.

Los dos compuestos se administraron al mismo tiempo.

Estadística

5 Los resultados mostrados en las figuras y tablas representan las medias \pm SEM. El cambio de porcentaje en los pesos corporales y valores absolutos o valores transformados (log 10, u otro tal como se especifica) para los pesos del bazo, conteos de reticulocitos, WBC, Hct y datos histológicos se analizaron por la prueba t no apareada o prueba de Suma de Rangos para comparar un grupo de tratamiento único con un grupo de vehículo o ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett para comparar los grupos de tratamiento con el grupo de vehículo. Se hicieron múltiples comparaciones utilizando la prueba de Tukey. Todas las comparaciones se hicieron en el día de sacrificio.
10 El nivel de significancia se estableció a $p < 0,05$. Los cálculos se realizaron utilizando GraphPad Prism para Windows (GraphPad Software Inc).

Resultados del Ejemplo B:

Eficacia In vivo y tolerabilidad del Compuesto A y Compuesto B en combinación

15 Para probar la hipótesis de que la eficacia del Compuesto B podría mejorarse mediante la combinación con el Compuesto A, los ratones Balb/c trasplantados con células de médula ósea transducidas JAK2V617F se trataron con el Compuesto A en combinación con el Compuesto A inhibidor de JAK1/2. Una dosis que produce una eficacia intermedia fue elegida para el Compuesto A para evaluar el impacto de diferentes dosis del Compuesto B en combinación con el Compuesto A inhibidor de JAK.

20 Los ratones fueron aleatorizados el día 27 después del BMT con base en los valores de Hct (67 % en promedio en este experimento, N = 9/grupo) y tratados con el Compuesto B (8 mg/kg, 3x/semana MWF, i.p.) y Compuesto A (60 mg/kg, q12h, p.o.) como agentes únicos o combinados. El Compuesto B solo mostró alguna pérdida de peso corporal (-5 % en promedio). Esta pérdida de peso corporal fue significativamente mayor cuando el Compuesto B se combinó con el Compuesto A (-10 % en promedio, Figura 7 y Tabla 4). El Compuesto B administrado solo redujo el peso del bazo pero no a la normalidad. El Compuesto A mostró tendencia a una reducción en el peso del bazo pero con alta variabilidad (intervalo de 67 a 1153 mg). La combinación mejoró la eficacia en términos de peso/volumen del bazo, que fue normalizado o incluso estuvo por debajo del intervalo histórico normal (en 6/9 animales) después de 3 semanas de tratamiento (Figura 8 y Tabla 4). La combinación mostró una tendencia para efecto más fuerte sobre el conteo de reticulocitos (con valores muy bajos observados para algunos animales $< 0,1 \times 10^{12}/L$) pero este efecto no fue significativamente diferente de los grupos tratados con agente único. El conteo de WBC se redujo
25 cuando el Compuesto B fue administrado solo y en combinación con el Compuesto A (a pesar de la ausencia de leucocitosis en este experimento excepto por 1 animal en el grupo de vehículo y 1 animal en el grupo de Compuesto A). El conteo de PLT se vio afectado por el tratamiento con el Compuesto B solo y en combinación con el Compuesto A (Figura 11). Se observó una tendencia a una reducción en la lectura sustituta de carga de alelo (células circulantes positivas a GFP) en este estudio para el Compuesto y los grupos de combinación (Tabla 4).

35 Se observó una disminución de hiper celularidad de médula ósea para todos los grupos de tratamiento con fármaco (Combinación > Compuesto A = Compuesto B). El tratamiento mejoró la arquitectura esplénica con el efecto más fuerte observado en el grupo de combinación (Combinación > Compuesto A > Compuesto B). A pesar de la alta variabilidad, el Compuesto A y los grupos de combinación mostraron una tendencia a reducir el índice de fibrosis, como se evalúa por tinción de reticulina en secciones de esternón.

40 La evaluación de marcador de PD por IHC mostró una clara reducción en el marcador p-STAT5 en el tratamiento con el Compuesto A como un agente único y en combinación con el Compuesto B. Un claro aumento se vio para la histona acetilada H3, como lectura sustituta para la inhibición de desacetilasa, en el tratamiento con el Compuesto B solo o en combinación.

Las Figuras 13-19 representan las imágenes de médula ósea y/o bazo bajo diferentes métodos de tinción.

45 No hubo un impacto importante del régimen de combinación en la exposición de los compuestos en los tejidos (Tabla 5).

Este ejemplo demuestra que la combinación de los Compuestos A y B mejoró la eficacia en términos de peso/volumen del bazo.

Tabla 4. Resultados en el día de sacrificio

Tratamiento	Cambio de BW (%) (media ± SEM)	Peso del bazo (mg) (media ± SEM)	WBC (x 10 ⁹ /L) (media ± SEM)	PLT (x 10 ⁹ /L) (media ± SEM)	Conteos de reticulitos (x 10 ¹² /L) (media ± SEM)	Hct (%) (media ± SEM)	Células recirculantes positivas a GFP (%)
Vehículo D5W i.p. y HPMC 0,5 % p.o. 10 mg/kg	2,01 ± 1,18	519,9 ± 121,8	53,0 ± 41,9 (11,15 ± 0,76)	628,6 ± 54,2	0,57 ± 0,11	66,5 ± 4,2	33,4 ± 9,1
Compuesto B (3 veces a la semana, ip, 8 mg/kg)	-4,57 ± 1,14*	222,0 ± 92,3*	3,88 ± 0,94*	374,4 ± 28,6*	0,24 ± 0,10*	52,2 ± 3,1*	20,4 ± 6,6
Compuesto A (q12h, po, 60 mg/kg)	0,45 ± 0,94	346,1 ± 127,9	22,2 ± 14,7 (7,46 ± 0,82)	695,9 ± 93,6	0,42 ± 0,09	59,4 ± 3,9	34,0 ± 9,6
Combinación Compuesto B (8 mg/kg) + Compuesto A (60 mg/kg)	-9,52 ± 0,55*	71,9 ± 8,6*†#	2,41 ± 0,48** (N = 7)	280,1 ± 28,0*# (N = 7)	0,11 ± 0,04* (N = 7)	51,5 ± 3,6* (N = 7)	16,8 ± 4,3 (N = 7)

Ratones hembra Balb/c trasplantados con células transducidas de médula ósea JAK2V617F recibieron ya sea vehículo, Compuesto B a una dosis de 8 mg/kg i.p. (equivalente de base libre) en un programa M/W/F, Compuesto A a una dosis de 60 mg/kg (equivalente de base libre) q12h o la combinación de ambos agentes durante 21 días consecutivos. Los cambios en el peso corporal y peso del bazo en el sacrificio se representan como media ± SEM. N = 7-9/grupo. * p < 0,05 vs vehículo, # p < 0,05 vs Compuesto A, † p < 0,05 vs Compuesto B en el día de sacrificio (ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett o la prueba de Tukey. La forma recíproca de los valores de peso del bazo y valores transformados de log₁₀ para conteos de WBC y PLT se utilizó para el análisis estadístico). 1 valor atípico en los grupos de vehículo (388,3 x 10⁹/l) y Compuesto A (139,9 x 10⁹/l) para conteos de WBC se detectó nuevos valores de media ± SEM sin valores atípicos dados entre paréntesis.

Tabla 5. Niveles después de la terapia

Tratamiento	Sangre µmol/L		Bazo nmol/g		Hígado nmol/g		BM nmol/g	
	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto A	Compuesto B
Compuesto B 8 mg/kg 2 h	-	0.035 ± 0.010	-	10.045 ± 1.674	-	0.264 ± 0.045	-	2.704 ± 0.345
Compuesto A 60 mg/kg 2 h	8.176 ± 1.584	-	2.566 ± 0.346	-	6.537 ± 1.071	±	2.223 ± 0.393	-
Combinación Compuesto A y B 2 h	4.114 ± 0.979	0.006 ± 0.004	1.575 ± 0.312	15.317 ± 1387	3.568 ± 0.730	0.33 ± 0.039	1.469 ± 0.318	4.398 ± 0.413

- 5 Los animales en los grupos de dosificación respectivos se sacrificaron 2 horas después de la dosis final del Compuesto B y/o Compuesto A y la sangre, bazo, médula ósea e hígado se muestrearon para el análisis PK. Las dosis se reportan en la presente como equivalente de base libre. La tabla muestra niveles medios del Compuesto B y Compuesto A en la sangre [µmol/l] y tejidos [nmol/g] ± SEM. N = 9/grupo.

EJEMPLO C

Ensayo Clínico

5 Un estudio de hallazgo de dosis, de grupo único, multicéntrico, abierto, Fase 1b para evaluar la seguridad y farmacocinética de la combinación oral de panobinostat y ruxolitinib en pacientes con mielofibrosis primaria (PMF), vera-mielofibrosis post-policitemia (PP-MF) o trombocitemia-mielofibrosis post-esencial (PET-MF) está en progreso.

La Figura 20 ilustra el diseño del estudio y métodos.

Este ensayo tiene por objeto establecer uno o más de lo siguiente:

- 10 (1) Establecer la MTD y/o RPIID de la combinación de ruxolitinib y panobinostat en pacientes con MF;
 (2) Evaluar la seguridad de la co-administración oral de ruxolitinib y panobinostat a los pacientes con MF;
 (3) Caracterizar la farmacocinética de ruxolitinib a dosis variables, - como agente único, y cuando se administra en combinación con panobinostat a pacientes con MF; y/o
 (4) Caracterizar la farmacocinética de panobinostat, a dosis variables en combinación con ruxolitinib en pacientes con MF.

Criterios de inclusión:

- 15 A. Los pacientes tenían un diagnóstico documentado de PMF, PPV-MF, o PET-MF, sin considerar su estado de mutación de JAK2 V617F
 B. Guiado por los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO) para PMF, el estudio incluye pacientes designados como Intermedio 1, 2, o de alto riesgo por los criterios del Sistema Internacional de Puntaje de Pronóstico (IPSS) y que tienen esplenomegalia palpable ≥ 5 cm por debajo del reborde costal
 20 C. Los pacientes deben haber tenido al menos 1 de los siguientes factores de riesgo

- a. Presencia de síntomas constitucionales (pérdida de peso > 10 % del valor basal en el año que precede al ciclo 1, día 1 [C1D1], fiebre inexplicable, o sudoración nocturna excesiva que persiste por más de 1 mes)
 b. Anemia marcada (hemoglobina < 10 g/dL0 demostrada en la visita de selección)
 c. Leucocitosis (historial del conteo de glóbulos blancos $> 25 \times 10^9/l$)
 25 d. Blastos circulantes > 1 %

- D. La escalación de la dosis es guiada por un modelo de regresión logística Bayesiana con control de sobredosis y dependerá de las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) en el primer ciclo así como también otros hallazgos de seguridad
 E. Cada cohorte de dosificación consistió de ≥ 3 pacientes evaluables
 30 F. Los datos de ≥ 9 pacientes a cualquier nivel de dosis dado serán requeridos para determinar la RP2D y/o MTD
 G. Las muestras de sangre seriales recolectadas después de una dosis única de ruxolitinib solo en el día 1 y en combinación con panobinostat en los días 2 y 6 se evaluaron para las concentraciones en plasma por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
 H. Los parámetros farmacocinéticos se derivaron usando el análisis no compartimental

35 Resultados:

7 cohortes se proponen en el estudio. El estudio aún está en curso, sólo los datos de las Cohortes 1-3 están disponibles hasta la fecha.

La Tabla 6 muestra el número de pacientes y el subtipo de enfermedad para las Cohortes 1-3.

La Figura 21 ilustra la longitud del bazo palpable con el tiempo en la Cohorte 1.

40 La Tabla 7 muestra la mejor respuesta de longitud de bazo palpable y respuesta de síntomas en la Cohorte 1.

La Figura 22 muestra la longitud del bazo palpable con el tiempo en la Cohorte 2.

La Tabla 8 muestra la mejor respuesta de longitud de bazo palpable y respuesta de síntomas en la Cohorte 2.

La Figura 23 ilustra la longitud de bazo palpable con el tiempo en la Cohorte 3.

La Tabla 9 muestra la mejor respuesta de longitud de bazo palpable y respuesta de síntomas en la Cohorte 3.

La Tabla 10 reporta los eventos adversos Grado 3 dentro de las Cohortes de 1-3 con relación sospechosa a los tratamientos de estudio. No ha habido DLT o SAE observados en la cohorte 1 o cohorte 3. En la cohorte 2, se reportó 1 DLT de trombocitopenia de grado 4. También hubo 1 SAE de náusea de grado 3 y diarrea de grado 3. No se han observado anomalías EKG clínicamente significativas hasta la fecha.

5 **Tabla 6. Dosificaciones de Ruxolitinib y Panobinostat en las Cohortes 1, 2, y 3**

La escalación de la dosis es guiada por un modelo de regresión logística Bayesiana con control de sobredosis y dependerá de las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) en cada ciclo, así como también otros hallazgos de seguridad. Cada cohorte de dosificación consistió de ≥ 3 pacientes evaluables. Los datos de ≥ 9 pacientes a cualquier nivel de dosis dado serán requeridos para determinar la RP2D y/o MTD

10 Las muestras de sangre seriales recolectadas después de una dosis única de ruxolitinib solo en el día 1 y en combinación con panobinostat en los días 2 y 6 se evaluaron para las concentraciones en plasma por LC-MS/MS

Los parámetros PK fueron derivados usando el análisis no compartimental

Cohorte	n° de pacientes por subtipo de enfermedad			n° de pacientes totales	Dosificación terapéutica	
	PMF	PET-MF	PPV-MF		Ruxolitinib	Panobinostat
1	2	3	0	5	5 mg BID	10 mg TIW/QOW
2	3	2	3	8	10 mg BID	10 mg TIW/QOW
3	3	2	0	5	15 mg BID	10 mg TIW/QOW

Tabla 7. Mejor Respuesta de Longitud de Bazo Palpable y Respuesta de Síntomas en la Cohorte 1

	Cambio en los Síntomas Constitucionales			
	Mejor respuesta de longitud de bazo palpable	10 % pérdida de peso de BL	Sudoración nocturna que persiste por > 1 mes	Fiebre inexplicables > 37,5 °C que persiste por > 1 mes
Cohorte 1 (n = 5) Datos de los perfiles de pacientes				
Paciente 1	100 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 2	56 % reducción	Sin cambio	Resuelta	--
Paciente 3 ^a	23 % incremento	--	Resuelta	Resuelta
Paciente 4	50 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 5	26 % reducción	Sin cambio	Resuelta	--

15 ^a El paciente experimentó un aumento de recuento de blastocitos y se sacó del estudio para someterse a trasplante de células madre

Tabla 8. Mejor Respuesta de Longitud de Bazo Palpable y Respuesta de Síntomas en la Cohorte 2				
	Cambio en los Síntomas Constitucionales			
	Mejor Respuesta de Longitud de Bazo Palpable	10% Pérdida de Peso de BL	Sudoración Nocturna Que Persiste por > 1 Mes	Fiebre Inexplicables > 37,5 °C Que Persiste por > 1 Mes
Cohorte 2 (n = 8) Datos de los perfiles de pacientes				
Paciente 6	60 % reducción	Sin cambio	--	--
Paciente 7	27 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 8	62 % reducción	--	Resuelta	--

Tabla 8. Mejor Respuesta de Longitud de Bazo Palpable y Respuesta de Síntomas en la Cohorte 2

Cambio en los Síntomas Constitucionales				
	Mejor Respuesta de Longitud de Bazo Palpable	10% Pérdida de Peso de BL	Sudoración Nocturna Que Persiste por > 1 Mes	Fiebre Inexplicables > 37,5 °C Que Persiste por > 1 Mes
	Mejor Respuesta de Longitud de Bazo Palpable	10% Pérdida de Peso de BL	Sudoración Nocturna Que Persiste por > 1 Mes	Fiebre Inexplicables > 37,5 °C Que Persiste por > 1 Mes
Paciente 9 ^a	8 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 10	84 % reducción	Sin cambio	Resuelta	--
Paciente 11	30 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 12	10 % reducción	Sin cambio	Resuelta	--
Paciente 13	40% reducción	Sin cambio	Resuelta	--

^aEl paciente experimentó trombocitopenia de grado 4 y fue retirado del estudio debido a los criterios de DLT

Tabla 9. Mejor respuesta de longitud de bazo palpable y respuesta de síntomas en la Cohorte 3 (los guiones indican que este síntoma no está presente en el valor basal)

	Mejor respuesta de longitud de bazo palpable	Cambio en los Síntomas Constitucionales		
		10 % pérdida de peso de BL	Sudoración nocturna que persiste por > 1 mes	Fiebre inexplicables > 37,5°C que persiste por > 1 mes
Cohorte 3 (n = 5) Datos de los perfiles de pacientes				
Paciente 14	38 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 15	9 % reducción	--	Resuelta	--
Paciente 16a	100 % reducción	Sin cambio	--	--
Paciente 17	53 % reducción	Sin cambio	--	--
Paciente 18	64 % reducción	No reportado en la entrada en el estudio		

5 **Tabla 10. Eventos adversos de grado 3/4 dentro de las Cohortes 1, 2 y 3 con relación sospechosa al tratamiento del estudio^{a, b}**

Cohorte 1 PAN 10 mg RUX 5 mg N = 5	Cohorte 2 PAN 10 mg RUX 10 mg N = 8	Cohorte 3 PAN 10 mg RUX 15 mg N = 5	Todos los grupos de dosis N = 18
---	--	--	-------------------------------------

Total

Sangre y trastornos del sistema linfático totales, n

Trombocitopenia, n

Anemia, n

Trastornos gastrointestinales totales, n

Diarrea, n

Náuseas, n

PAN, panobinostat; RUX, ruxolitinib

a Los pacientes con múltiples eventos adversos dentro de una clase de órganos del sistema primario fueron contados una sola vez en la fila de totales.

b Los pacientes con múltiples ocurrencias de un AE bajo un mismo tratamiento son contados una sola vez en la categoría AE para ese tratamiento.

No ha habido DLT o SAE observados en la cohorte 1 o cohorte 3

En la cohorte 2, hubo 1 DLT de trombocitopenia de grado 4 reportada
También hubo 1 SAE de náuseas de grado 3 y diarrea de grado 3
No se han observado anomalías EKG clínicamente significativas hasta la fecha

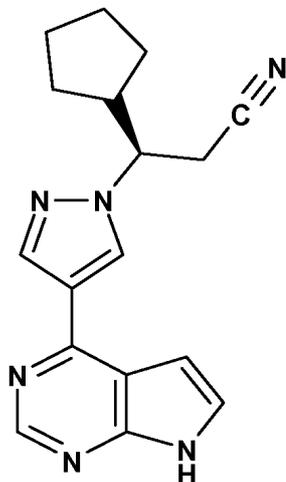
- 5 El estudio clínico hasta la fecha muestra que la combinación de ruxolitinib y panobinostat parece ser bien tolerada con actividad prometedora. Las bajas tasas de anemia y trombocitopenia de grado 3/4 se han observado a las dosis de ruxolitinib y panobinostat exploradas hasta el momento. Los primeros datos sugieren que no hay interacción de fármaco potencial entre ruxolitinib y panobinostat. Las cohortes adicionales establecerán la estrategia de dosificación óptima para esta combinación prometedora en el tratamiento de pacientes con MF.

10 **Lista de abreviaturas:**

Abreviatura	Descripción
Bid	Dos veces al día
BMT	Trasplante de médula ósea
TIW	Tres veces a la semana
QOW	Cada dos semanas
CBC	Conteo sanguíneo completo
FACS	Clasificador de células activadas por fluorescencia
FBS	Suero bovino fetal
FCS	Suero de ternera fetal
5-FU	5-Fluorouracilo
GFP	Proteína fluorescente verde
Gy	Gray
Hct	Hematocrito
H&E	Tinción con Hematoxilina/Eosina
H	horas
IHC	Inmunohistoquímica
i.p.	Inyección intraperitoneal
i.v.	Inyección intravenosa
IS	Estándar interno
mIL3	Interleucina 3 murina
mIL6	Interleucina 6 murina
min	minutos
JAK1/2	Janus cinasa 1/2
MPN	Neoplasia mieloproliferativa
MWF	Programa de Lunes/Miércoles/Viernes
PD	Farmacodinámica
PK	Farmacocinética
PLT	Plaquetas
PV	Policitemia vera
p.o.	Por os
RBC	Glóbulos rojos
SCF	Factor de Células Madre
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
VHC	Vehículo
WBC	Glóbulos blancos
Wt	Tipo silvestre

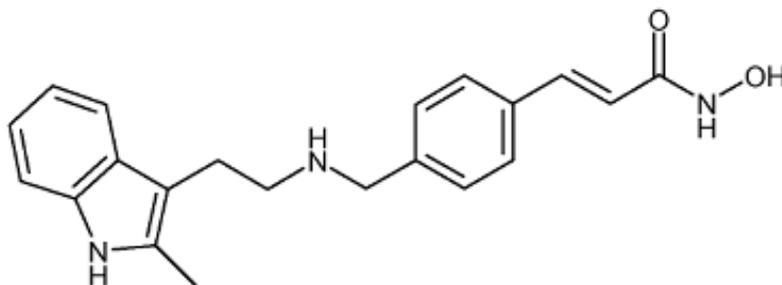
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende el Compuesto A ((R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1-H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo) de la Fórmula (A):



(A)

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
El compuesto B (N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida) de la Fórmula (B):



(B),

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer, en el que el cáncer es neoplasia mieloproliferativa o mieloma múltiple.

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente portador(es) farmacéuticamente aceptable(s).

15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición está en una formulación única o forma de dosificación unitaria.

4. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer es mieloma múltiple.

20 5. La composición para su uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer es una neoplasia mieloproliferativa.

6. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la neoplasia mieloproliferativa se selecciona del grupo que consiste de leucemia mieloide crónica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria o idiopática (PMF), leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica, leucemia mielógena crónica atípica.

25 7. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que la composición es para administrarse a un ser humano.

8. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el Compuesto A y Compuesto B son para co-administrarse.
9. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el Compuesto A y Compuesto B están en una formulación única o forma de dosificación unitaria.
- 5 10. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el Compuesto A y Compuesto B son para administrarse sustancialmente al mismo tiempo.
11. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el Compuesto A y Compuesto B son para administrarse en diferentes momentos.
- 10 12. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que el Compuesto A y Compuesto B están en formulaciones separadas o formas de dosificación unitarias.

Figura 1

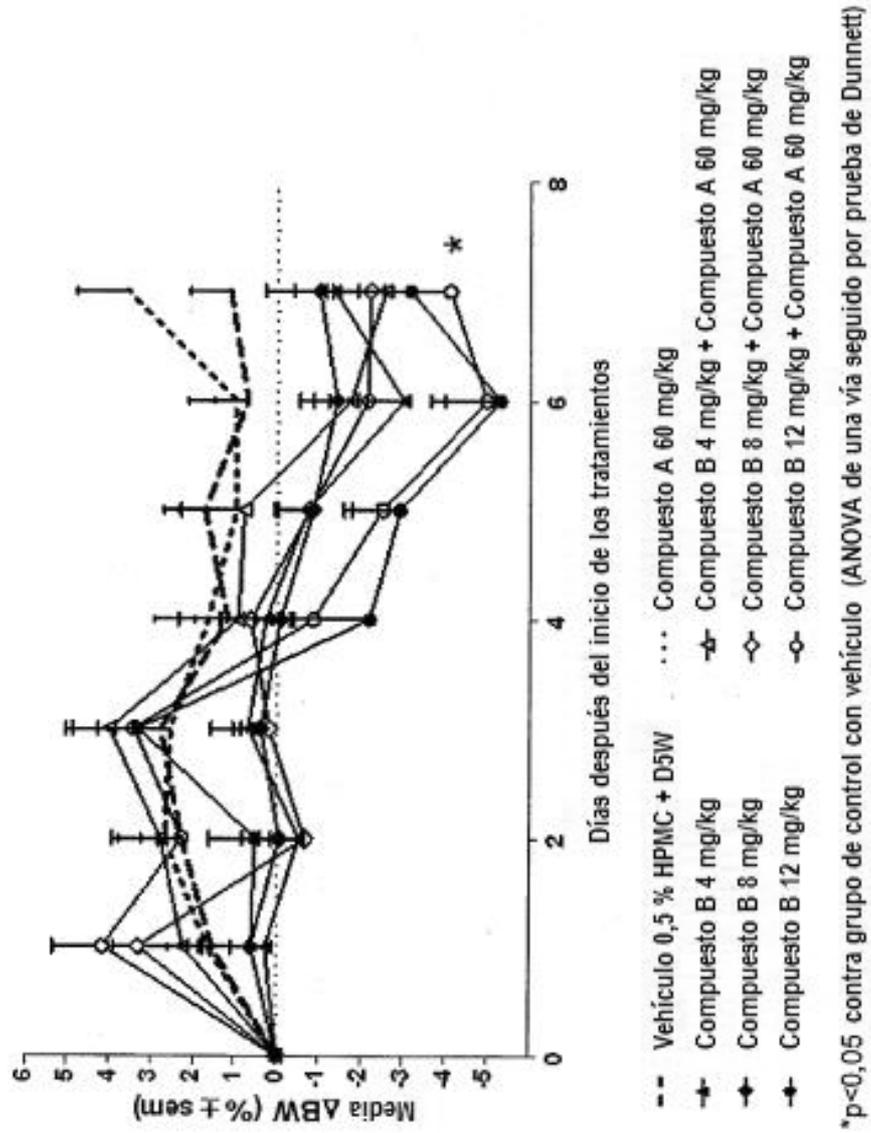


Figura 2

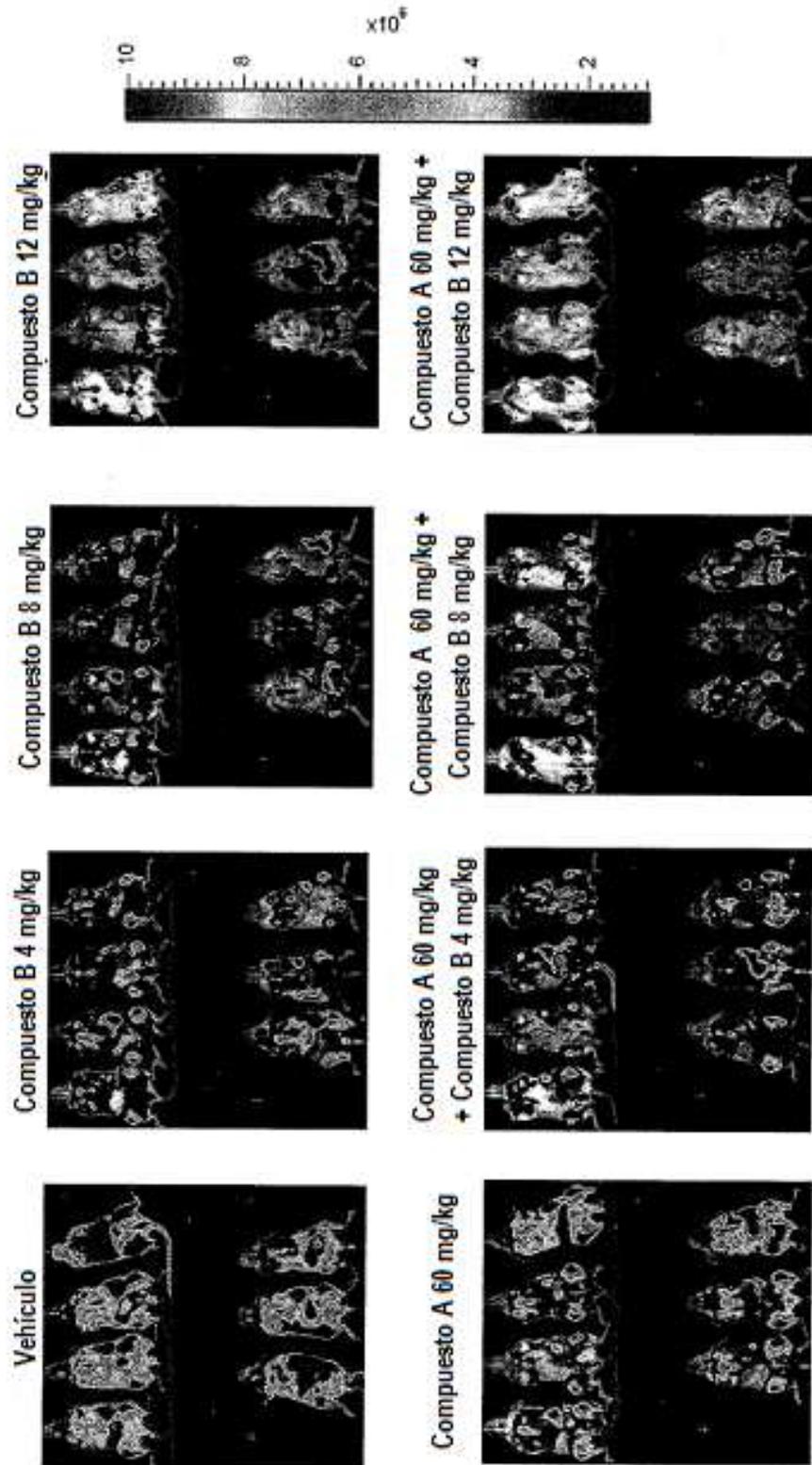


Figura 3

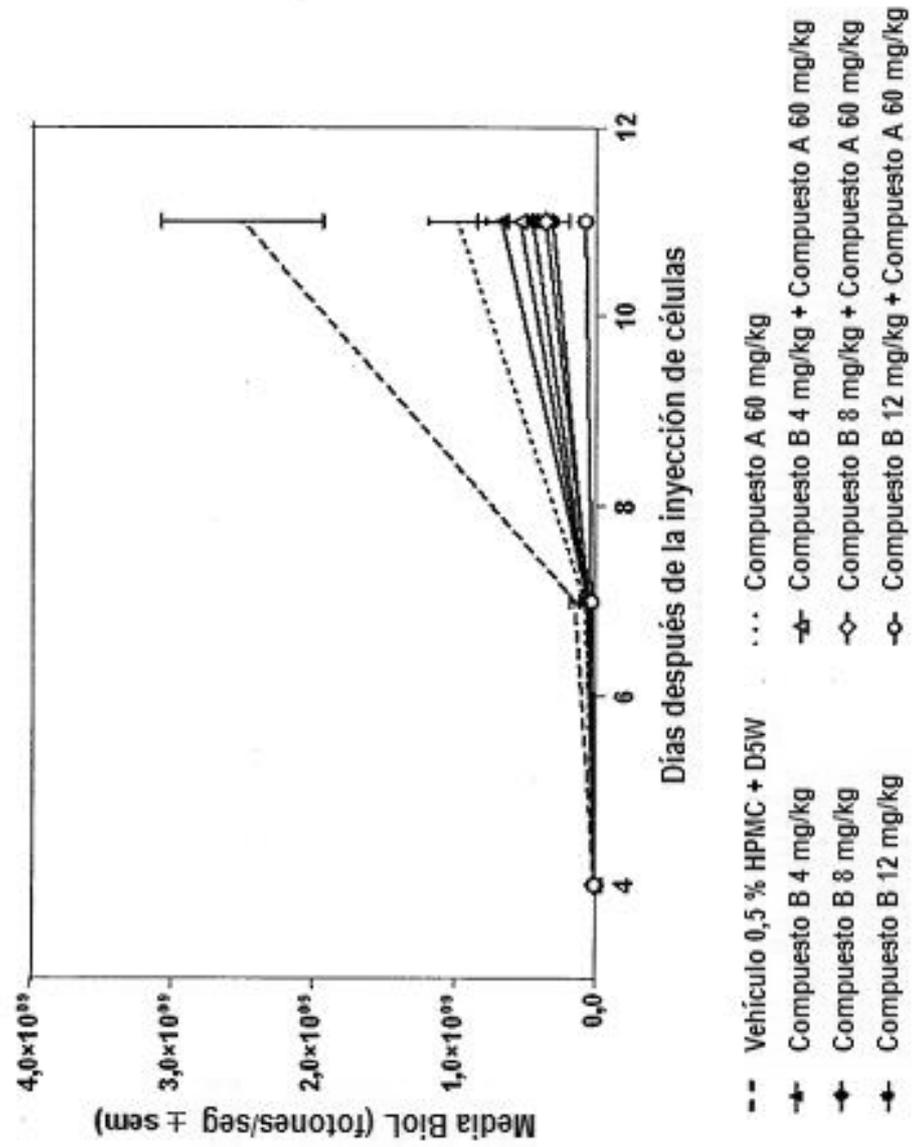
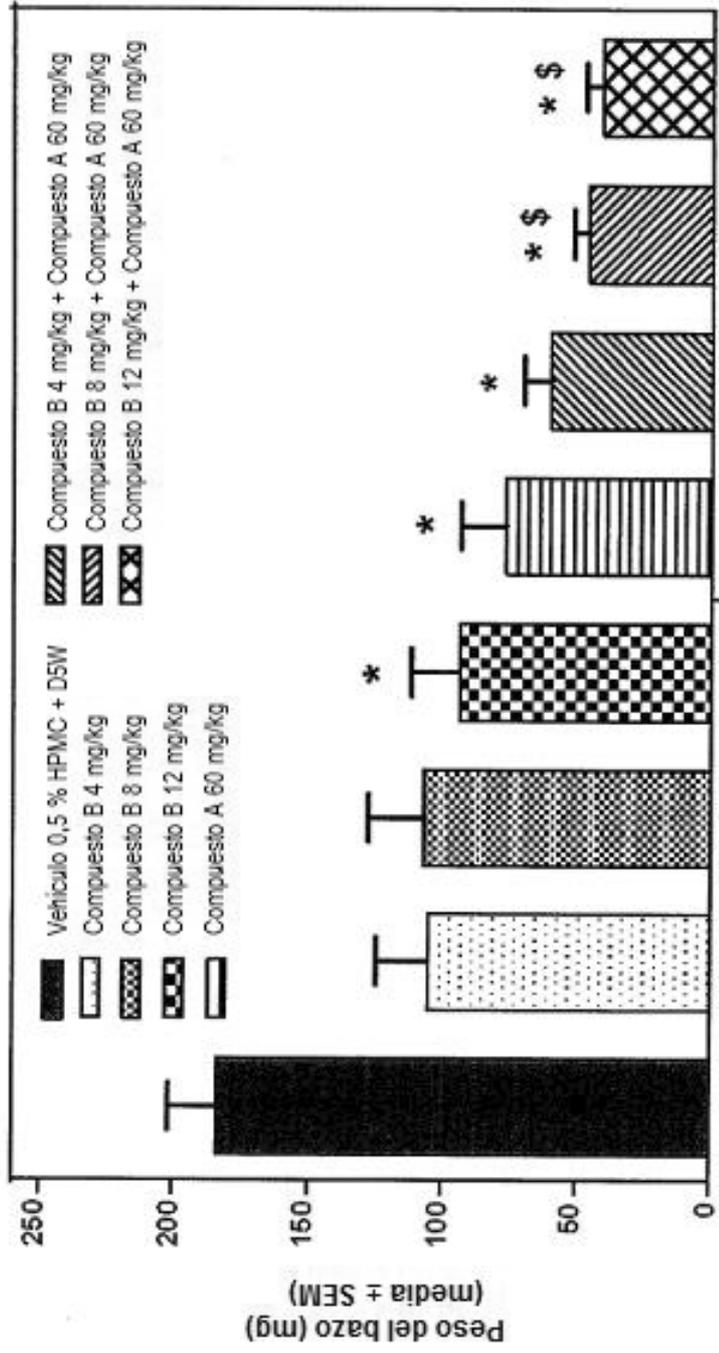


Figura 4



*p<0,05 contra grupo de control con vehículo
 \$p<0,05 contra Compuesto B misma dosis

Nota: análisis estadístico hecho en valores transformados log con ANOVA de una vía seguido por prueba de Tukey para múltiples comparaciones con todos los grupos

Figura 5

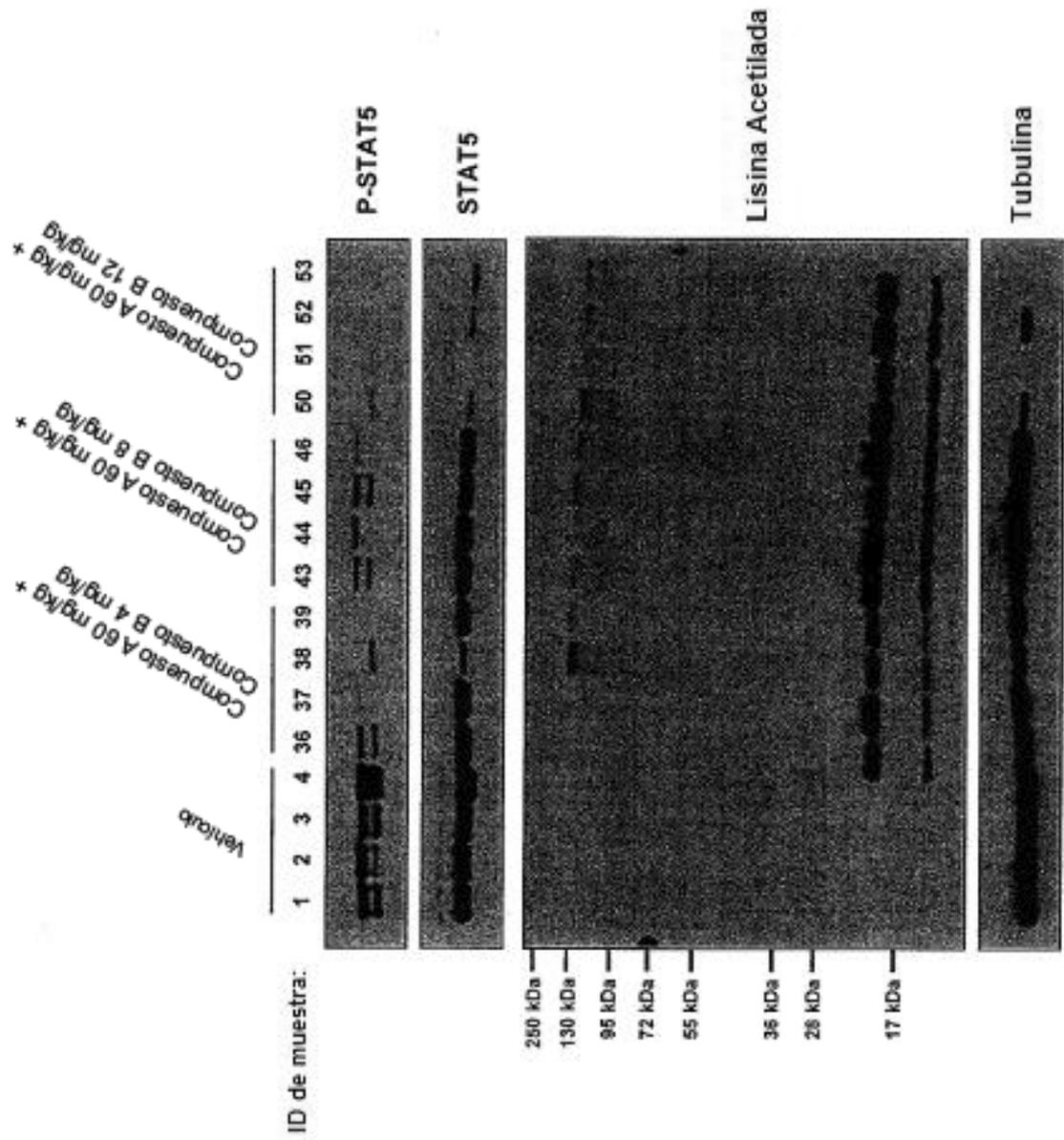


Figura 6

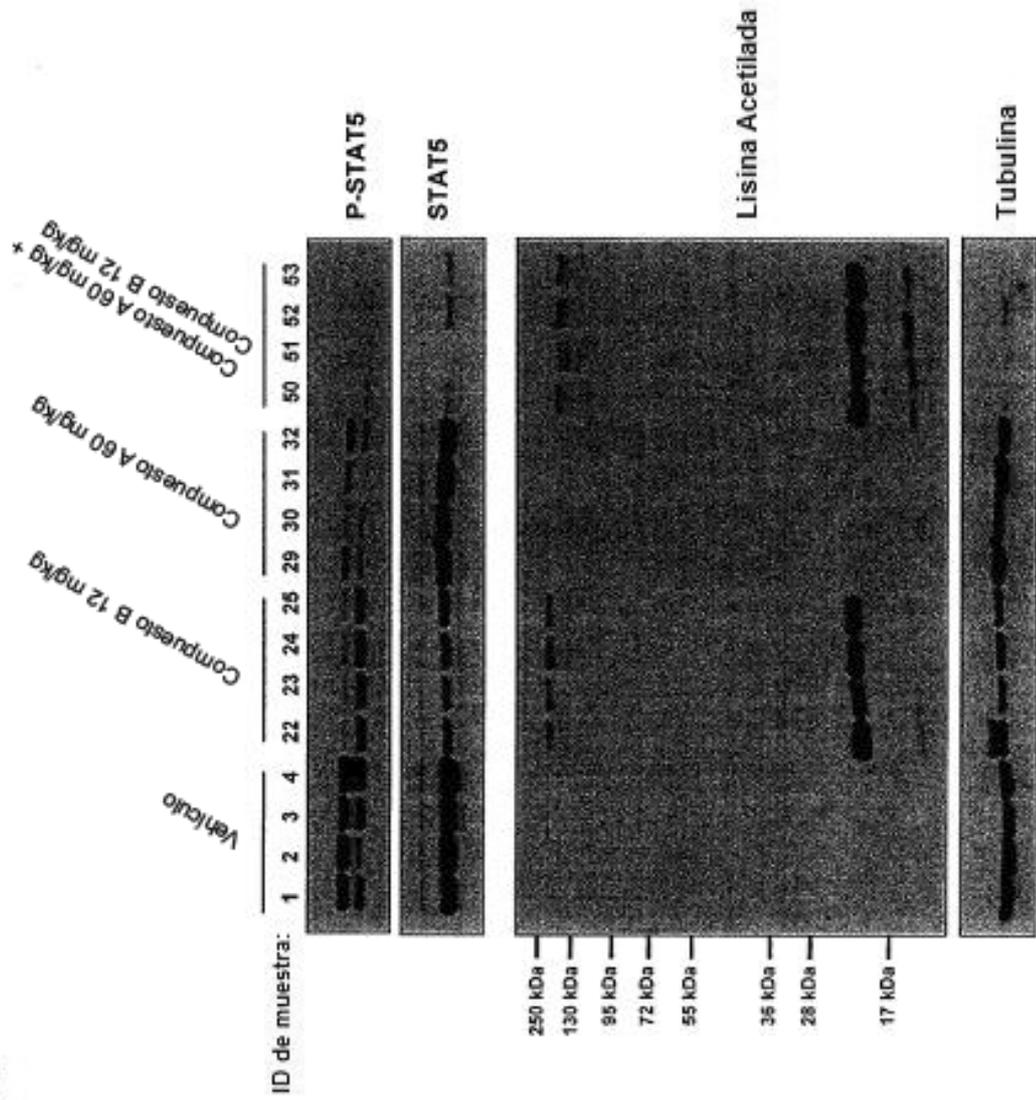


Figura 7 Cambio del peso corporal después de la terapia

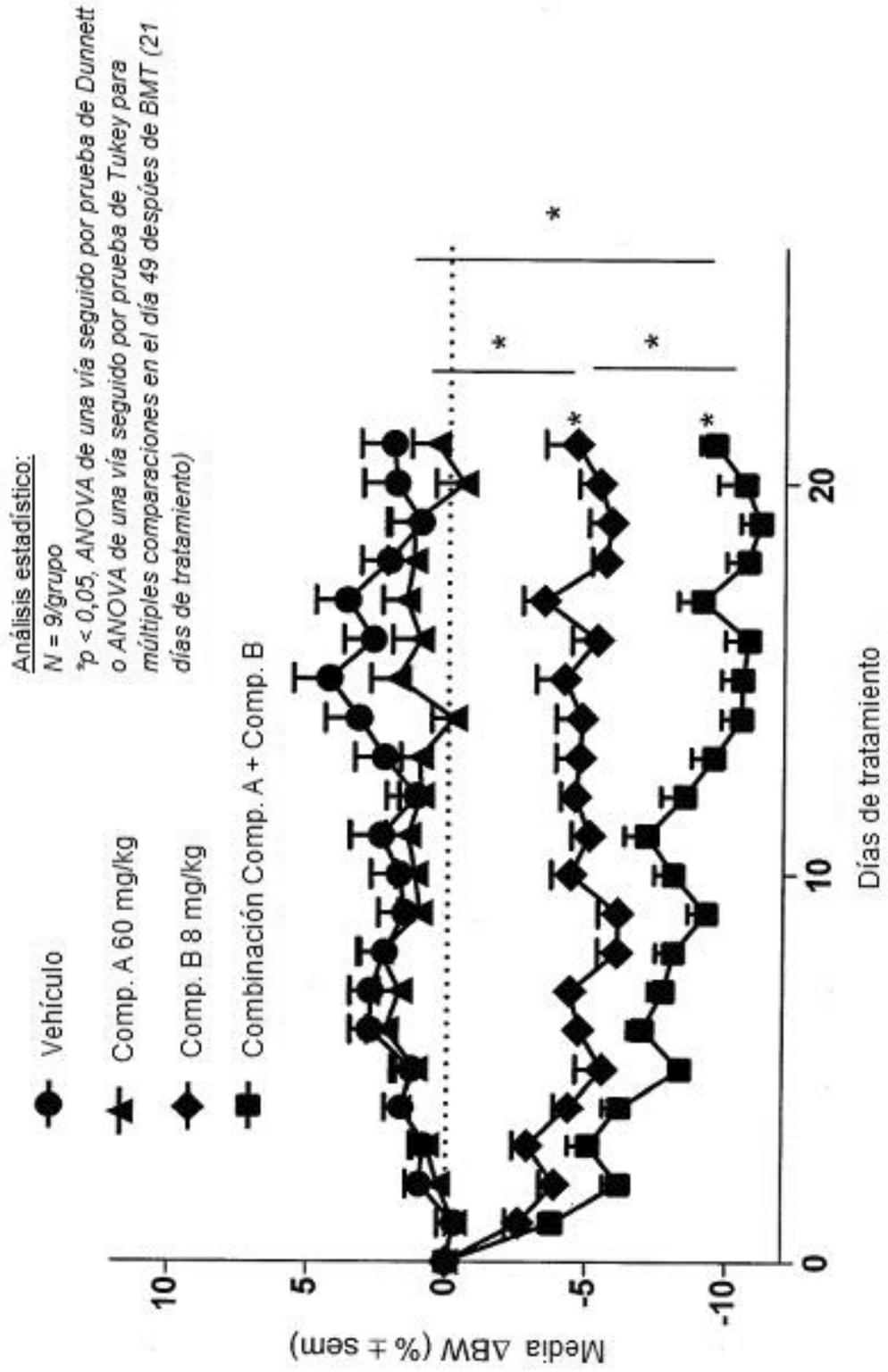
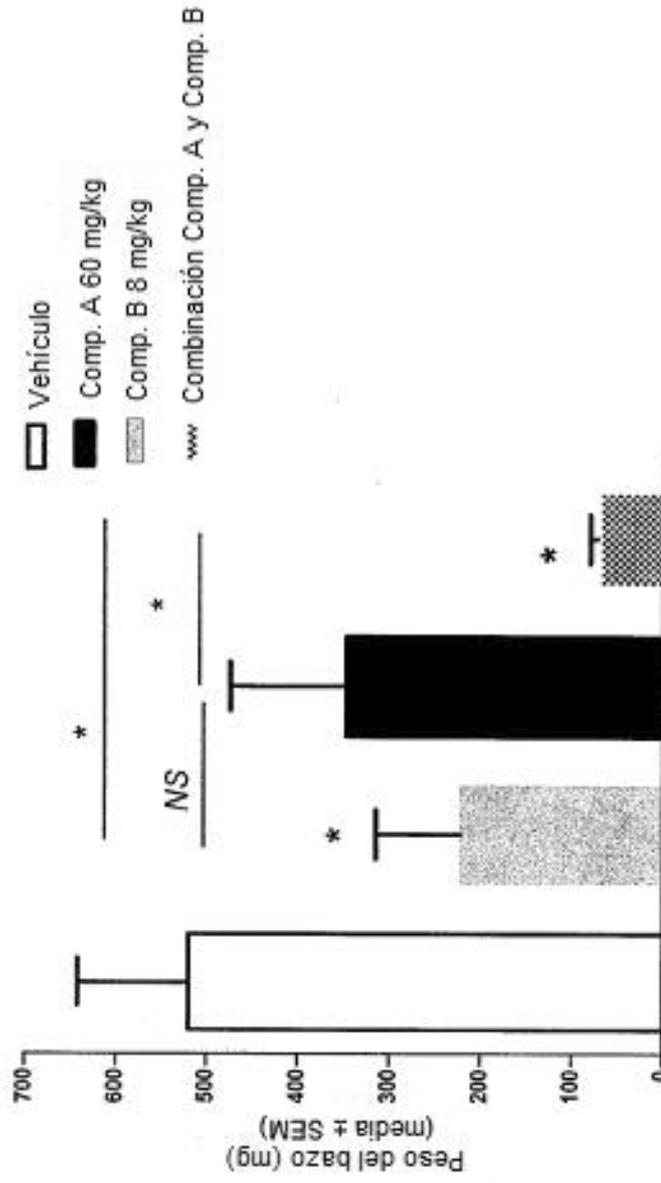


Figura 8

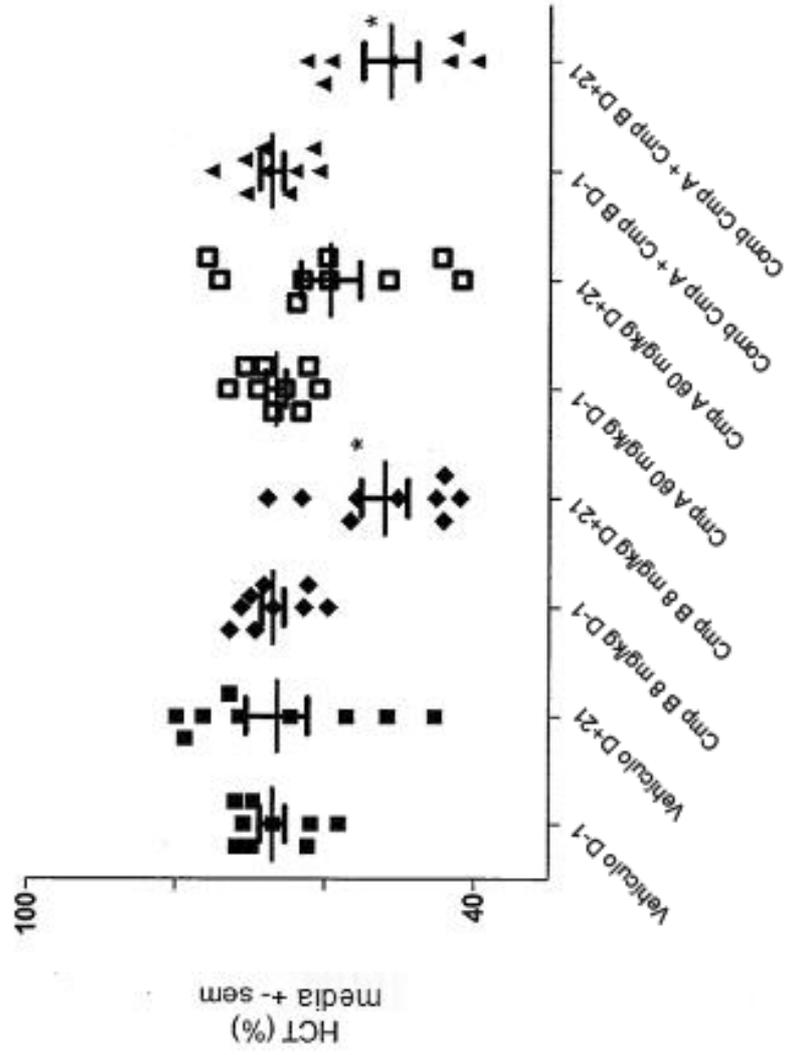
Efecto del tratamiento en esplenomegalia en ratones trasplantados con mJAK2^{V617F}



Análisis estadístico:

*p < 0,05 ANOVA de una vía en valores transformados seguido por prueba de Dunnett o un ANOVA de una vía seguido por prueba de Tukey para múltiple comparación

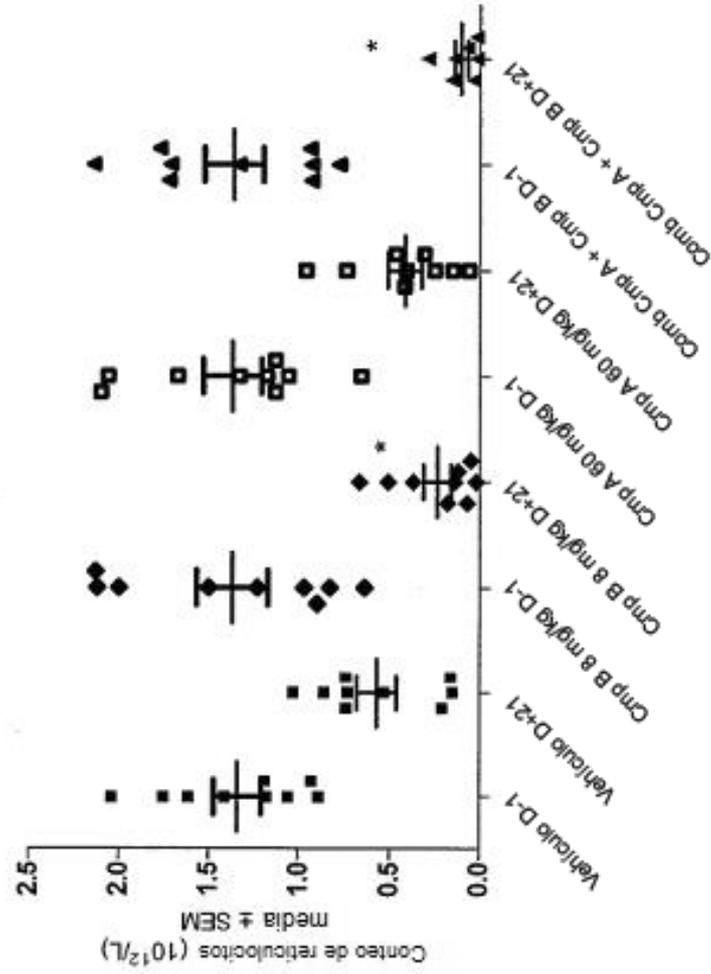
Figura 9



Análisis estadístico:

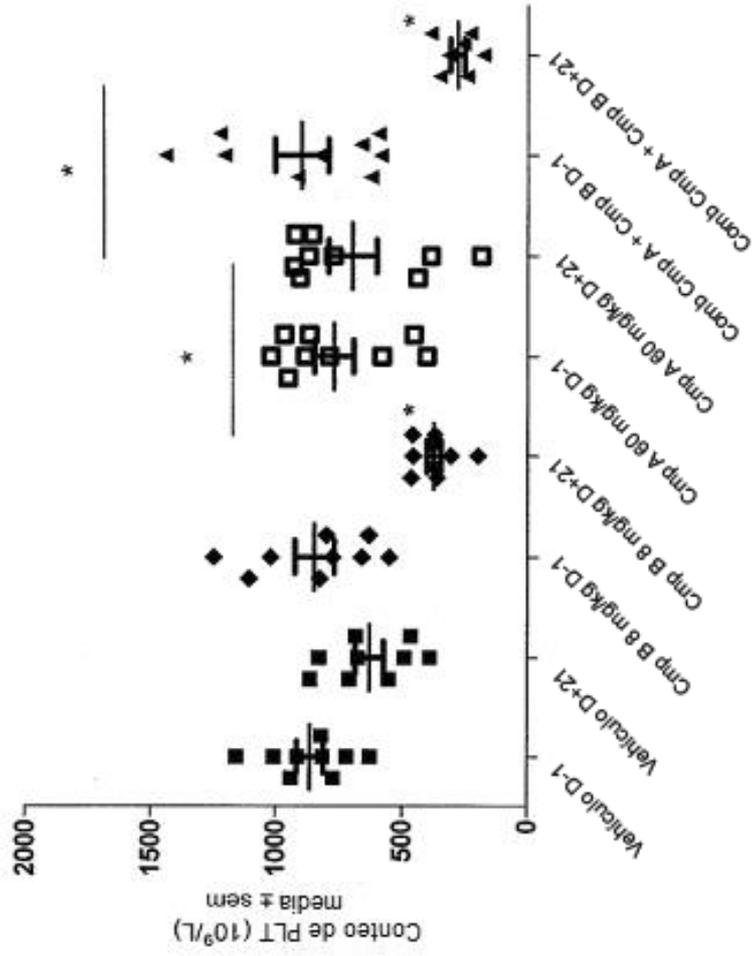
N= 9/grupo 7 muestras estuvieron disponibles para el análisis para el grupo de combinación *p < 0,05 vs. grupo de vehículo, ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett en el día del sacrificio NS entre los tratamientos únicos y combinados

Figura 10



Análisis estadístico:
 N= 9/grupo 7 muestras estuvieron disponibles para el análisis para el grupo de combinación
 *p < 0,05 vs. grupo de vehículo, ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett en el día del sacrificio NS entre los tratamientos únicos y combinados

Figura 11

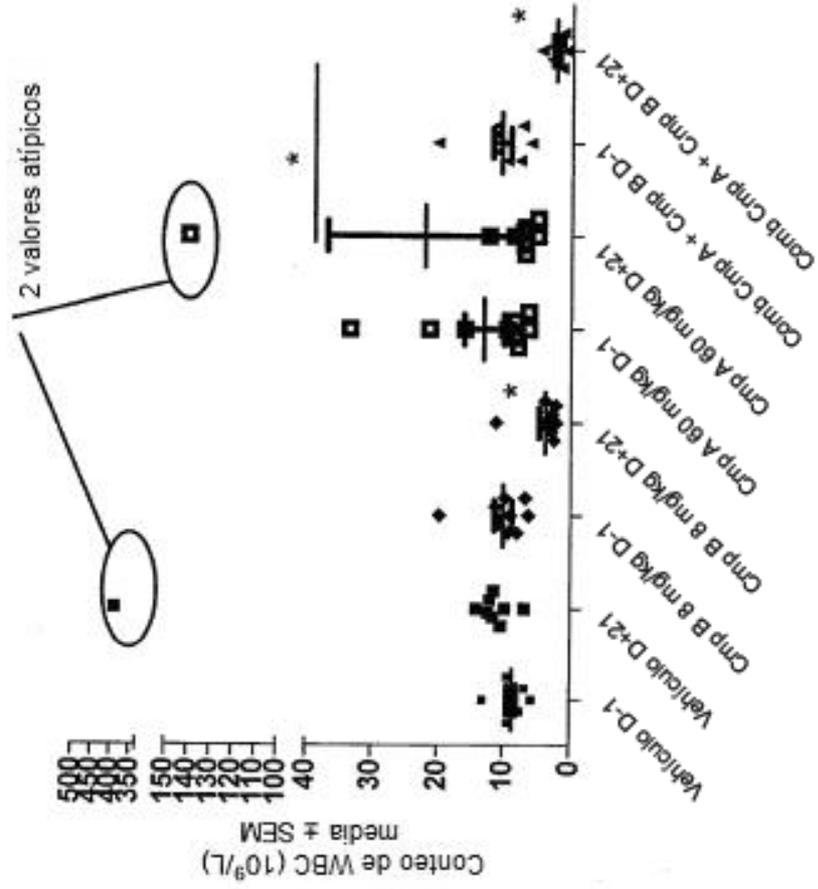


Análisis estadístico:

N= 9/grupo 7 muestras estuvieron disponibles para el análisis para el grupo de combinación

*p < 0,05, ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett o prueba de Tukey para múltiples comparaciones en valores transformados log en el día del sacrificio

Figura 12



Análisis estadístico:

N = 9/grupo 7 muestras estuvieron disponibles para el grupo de combinación

*p < 0.05 ANOVA de una vía seguido por prueba de Dunnett en valores transformados log o ANOVA de una vía seguido por prueba de Tukey para múltiples comparaciones en el día del sacrificio

Figura 13

Tinción con H&E, Imágenes de médula ósea

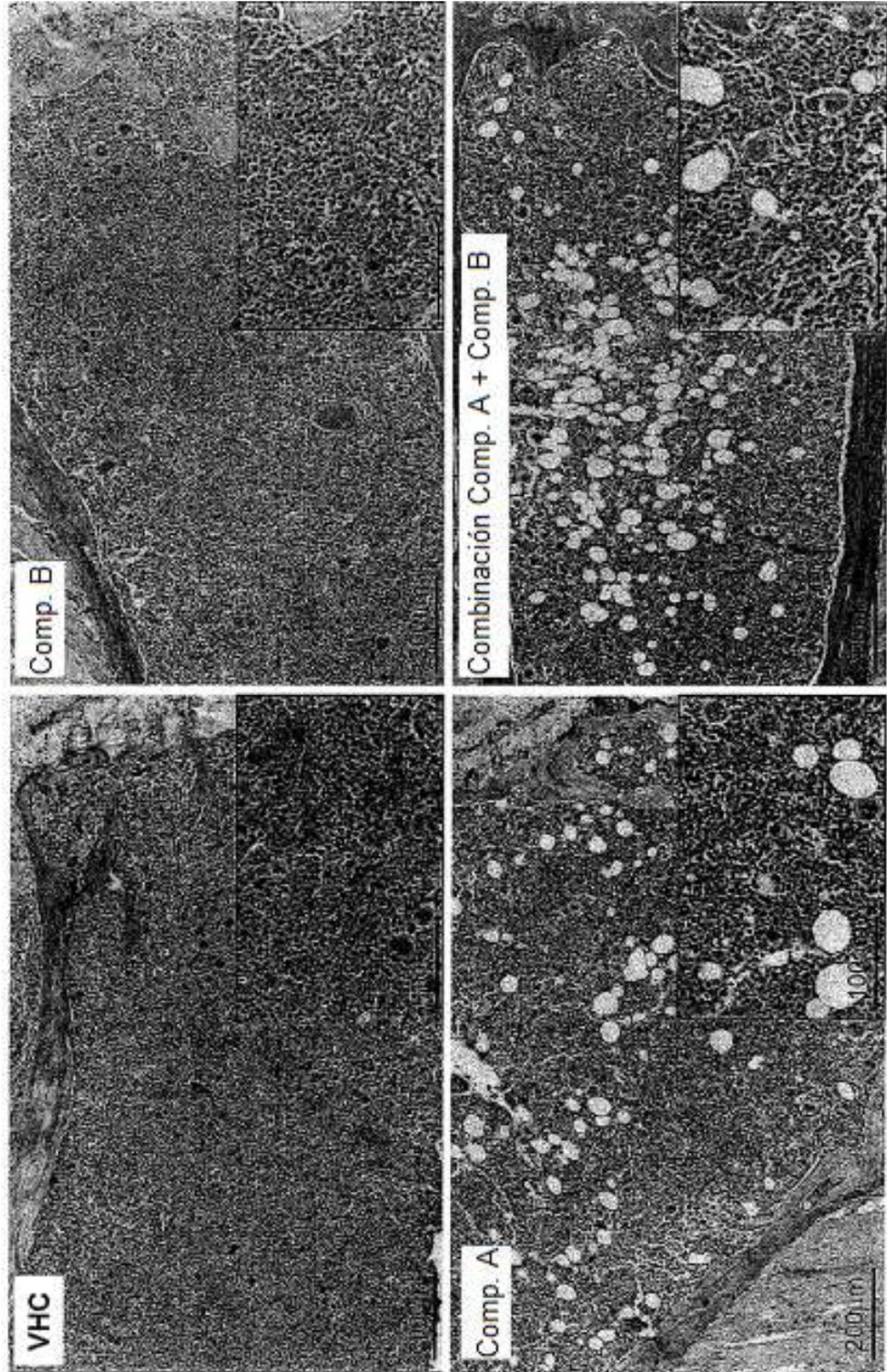


Figura 14
Tinción con reticulina, Imágenes de médula ósea

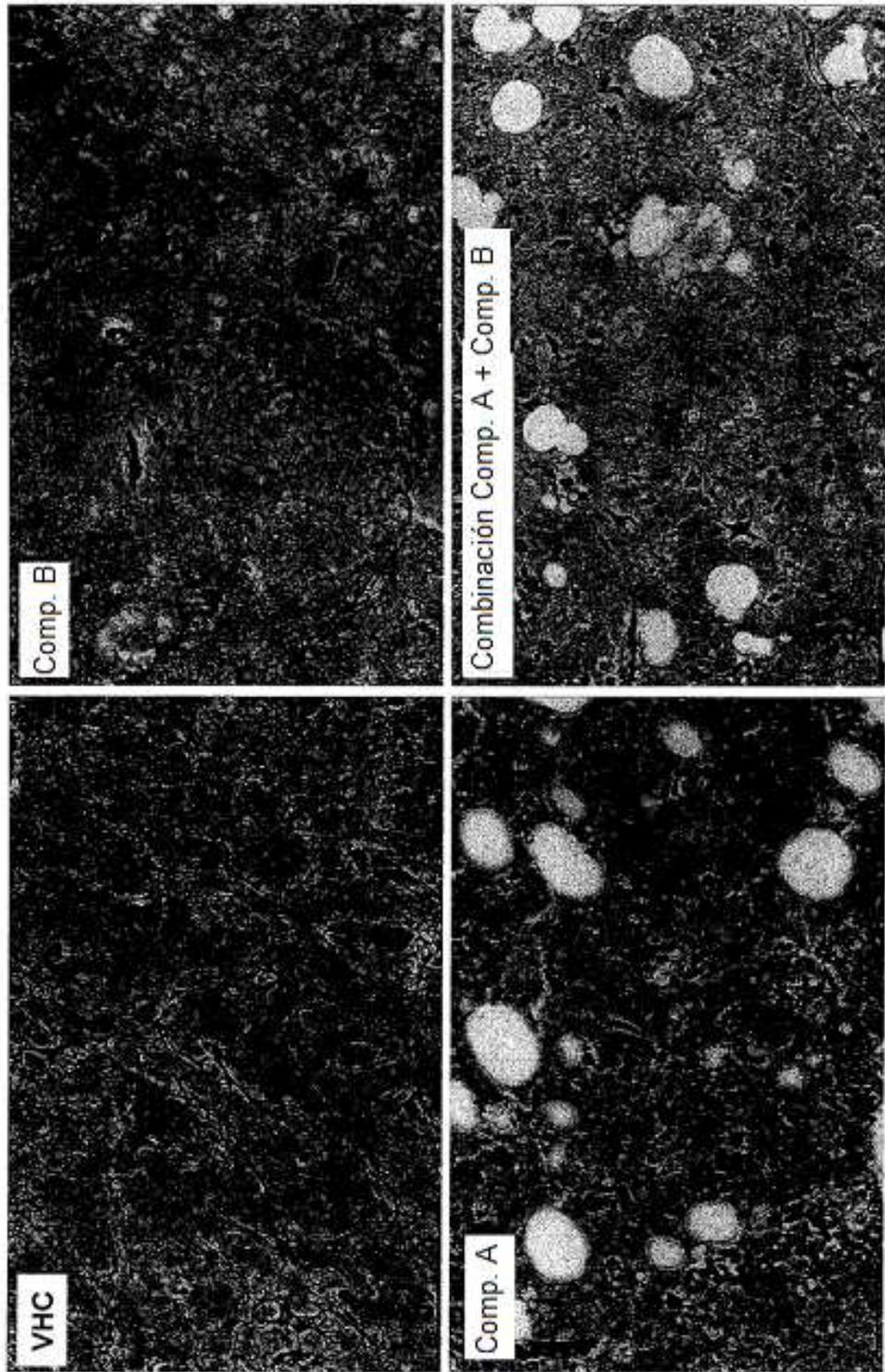


Figura 15
Stat5p, Imágenes de médula ósea

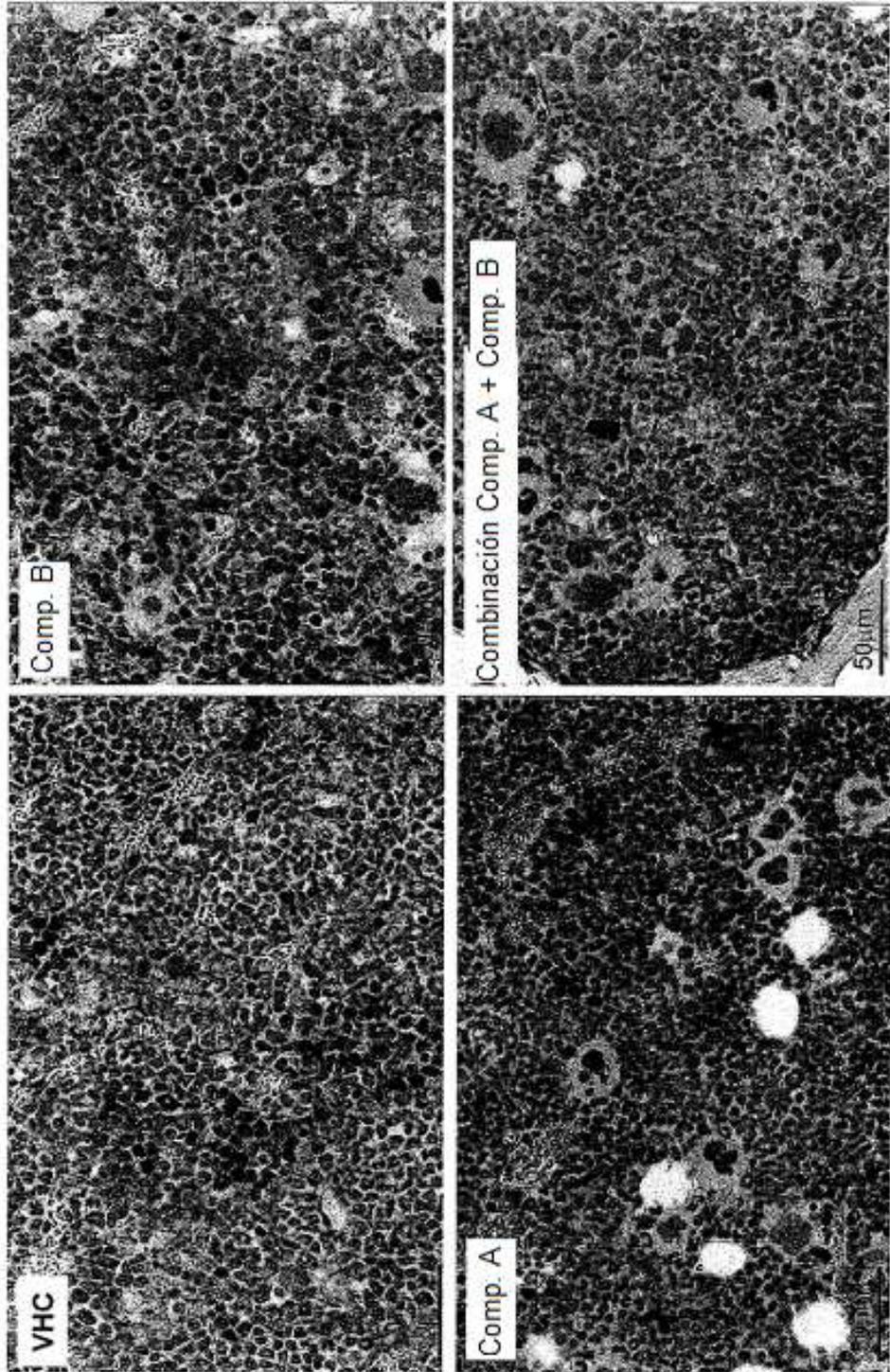


Figura 16
Ac Histona H3, Imágenes de Médula Ósea

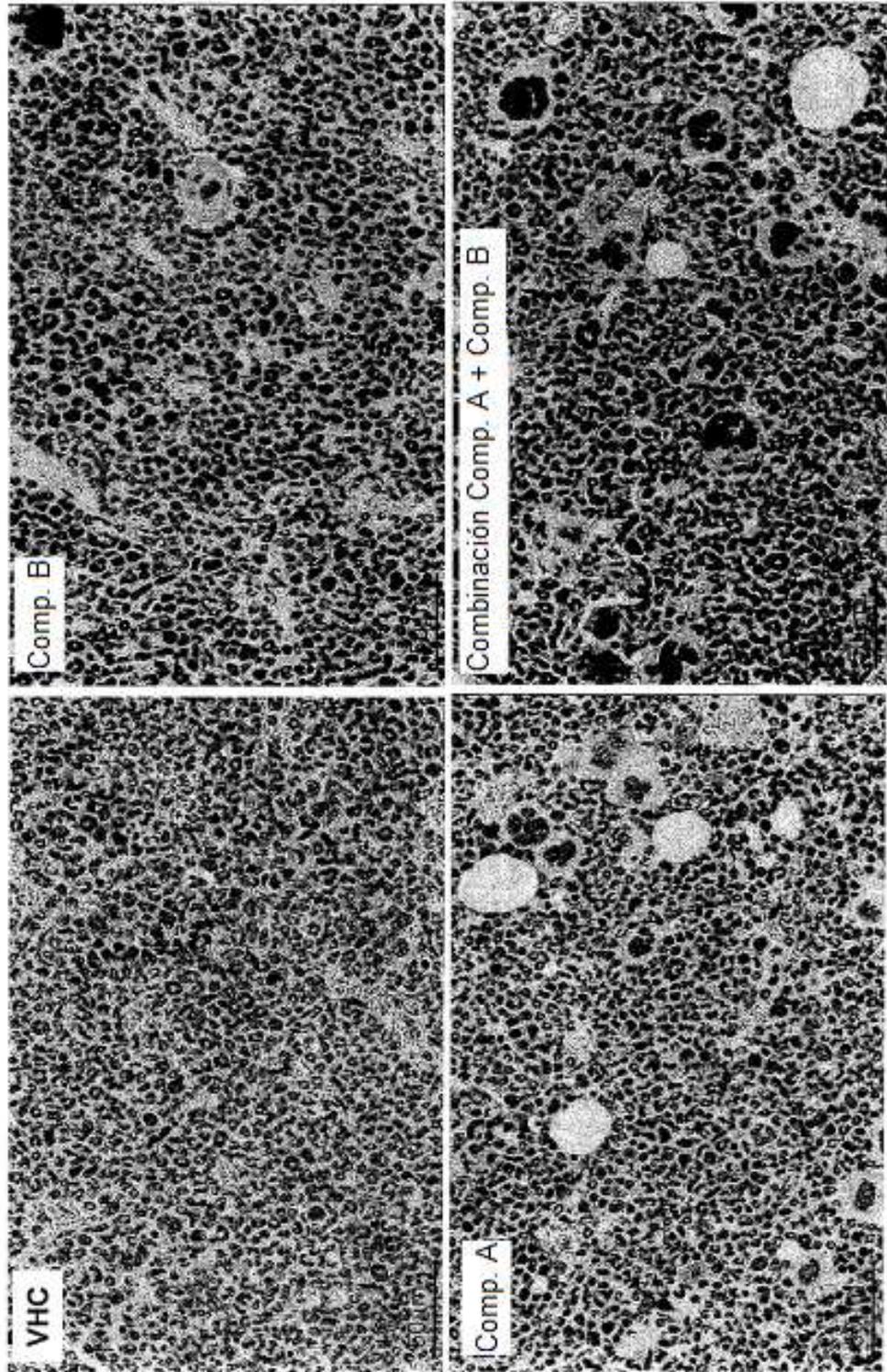


Figura 17
Tinción con H&E, Imágenes del bazo

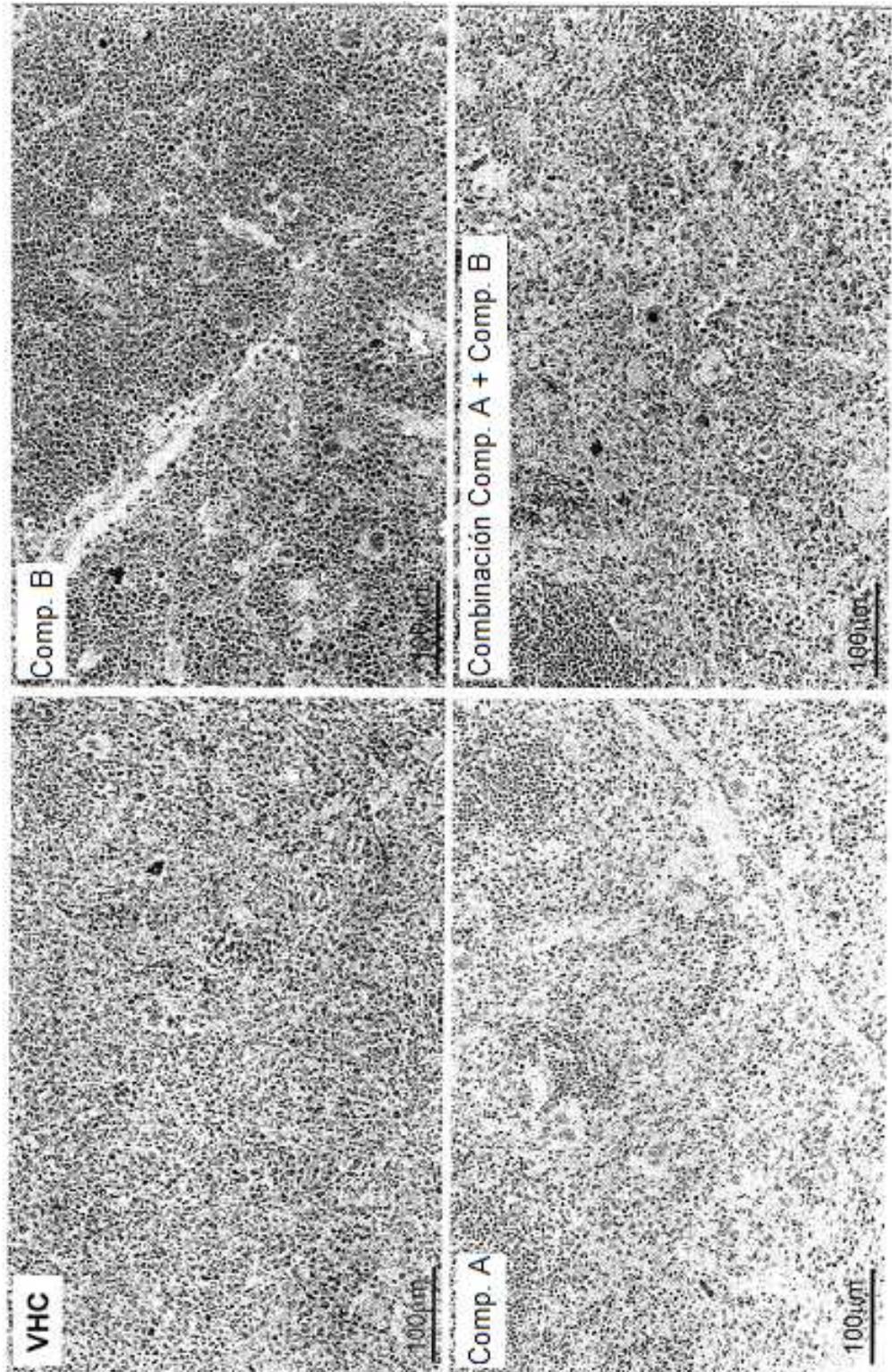


Figura 18
Stat5p, imágenes del bazo

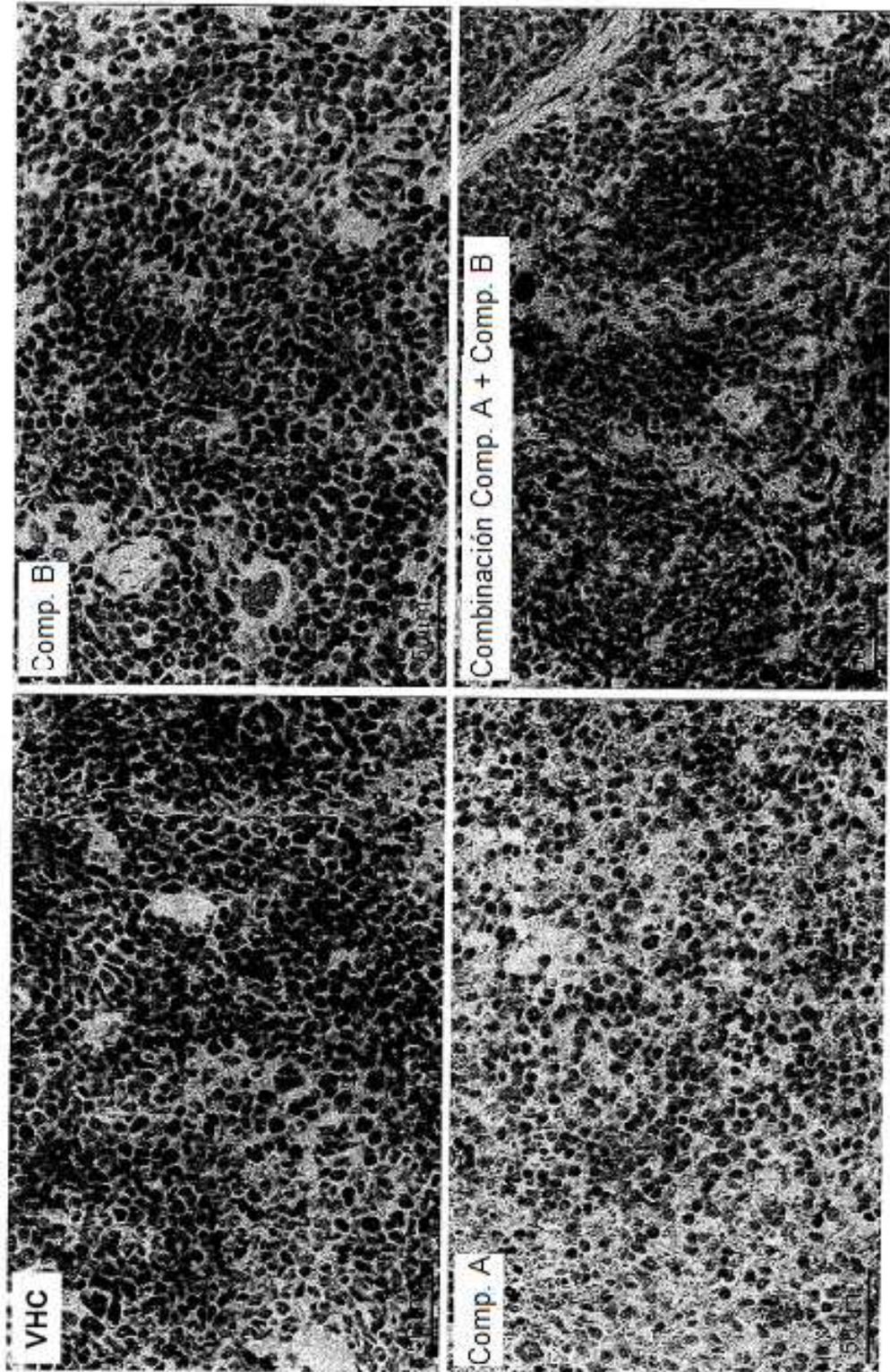


Figura 19
Ac Histona H3, imágenes del bazo

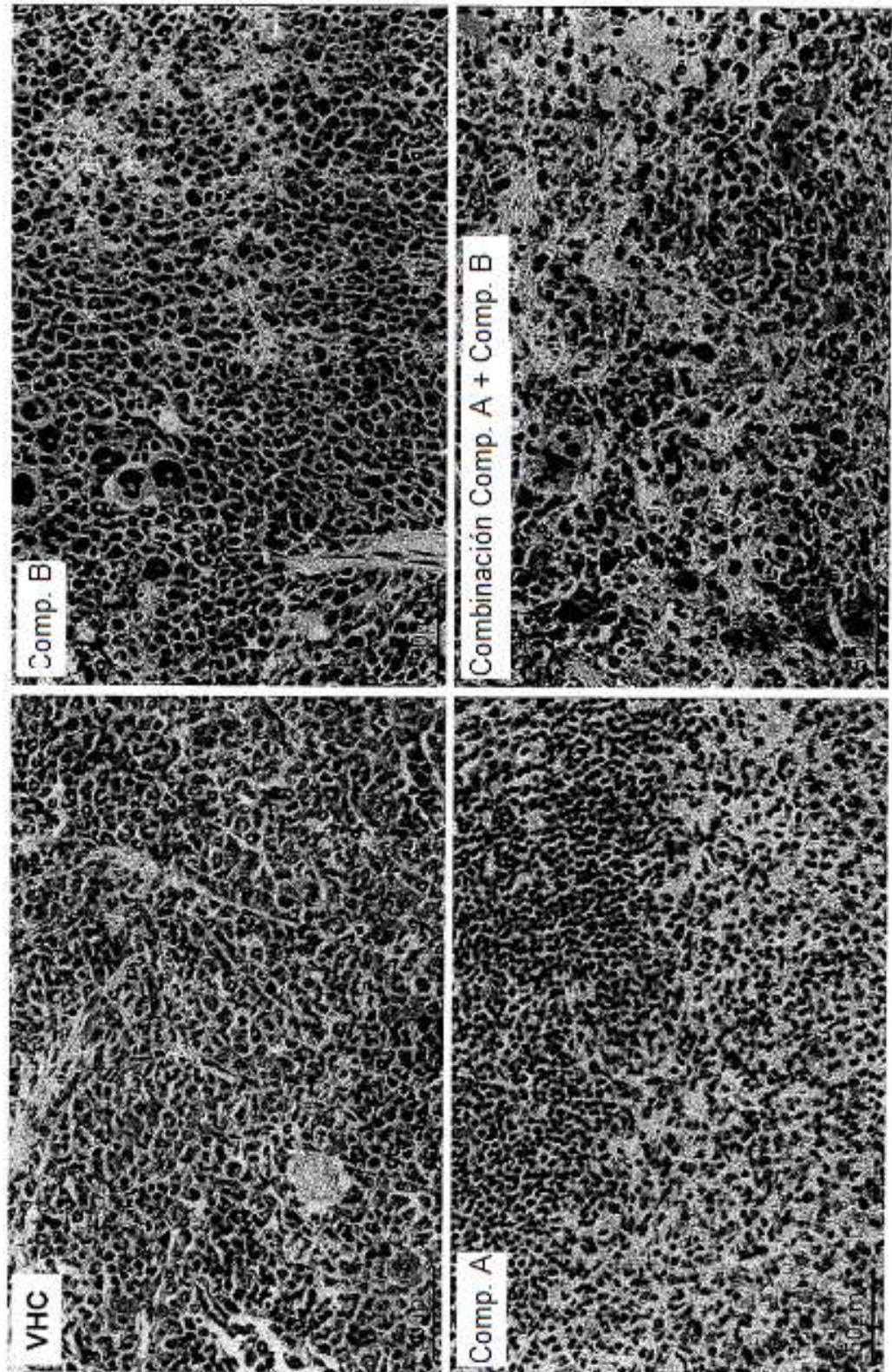
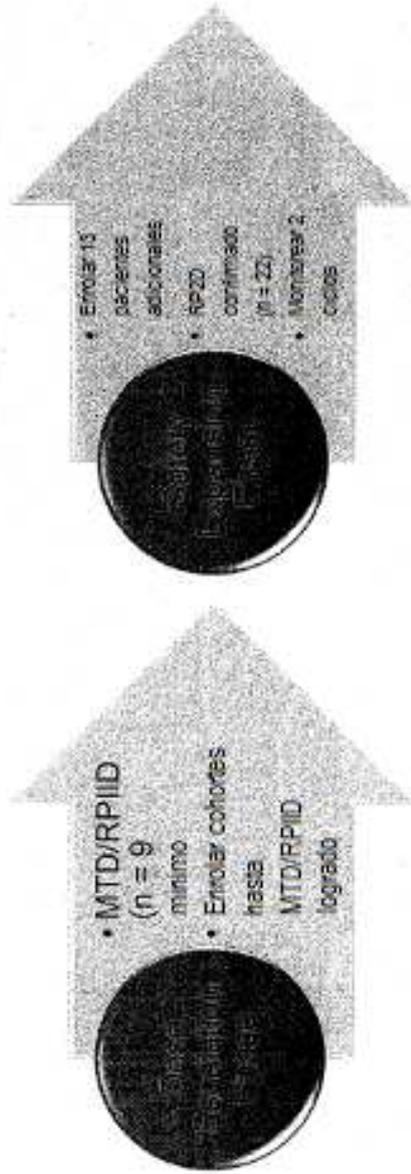


Figura 20, Diseño de Estudio de Ensayo de Fase 1b y Métodos



Nivel de Dosis Propuesta	Dosis de tratamiento de combinación propuesta
1	Ruxolitinib 5 mg BID, Panobinostat 10 mg TIW QOW
2	Ruxolitinib 10 mg BID, Panobinostat 10 mg TIW QOW
3	Ruxolitinib 15 mg BID, Panobinostat 10 mg TIW QOW
4	Ruxolitinib 15 mg BID, Panobinostat 15 mg TIW QOW
5	Ruxolitinib 15 mg BID, Panobinostat 20 mg TIW QOW
6	Ruxolitinib 15 mg BID, Panobinostat 25 mg TIW QOW
7	Ruxolitinib 15 mg BID, Panobinostat 30 mg TIW QOW

MTD = Dosis máxima tolerada; RP2D = Dosis de fase 2 recomendada

Figura 21. Longitud del Bazo Palpable Sobre Tiempo en la Cohorte 1

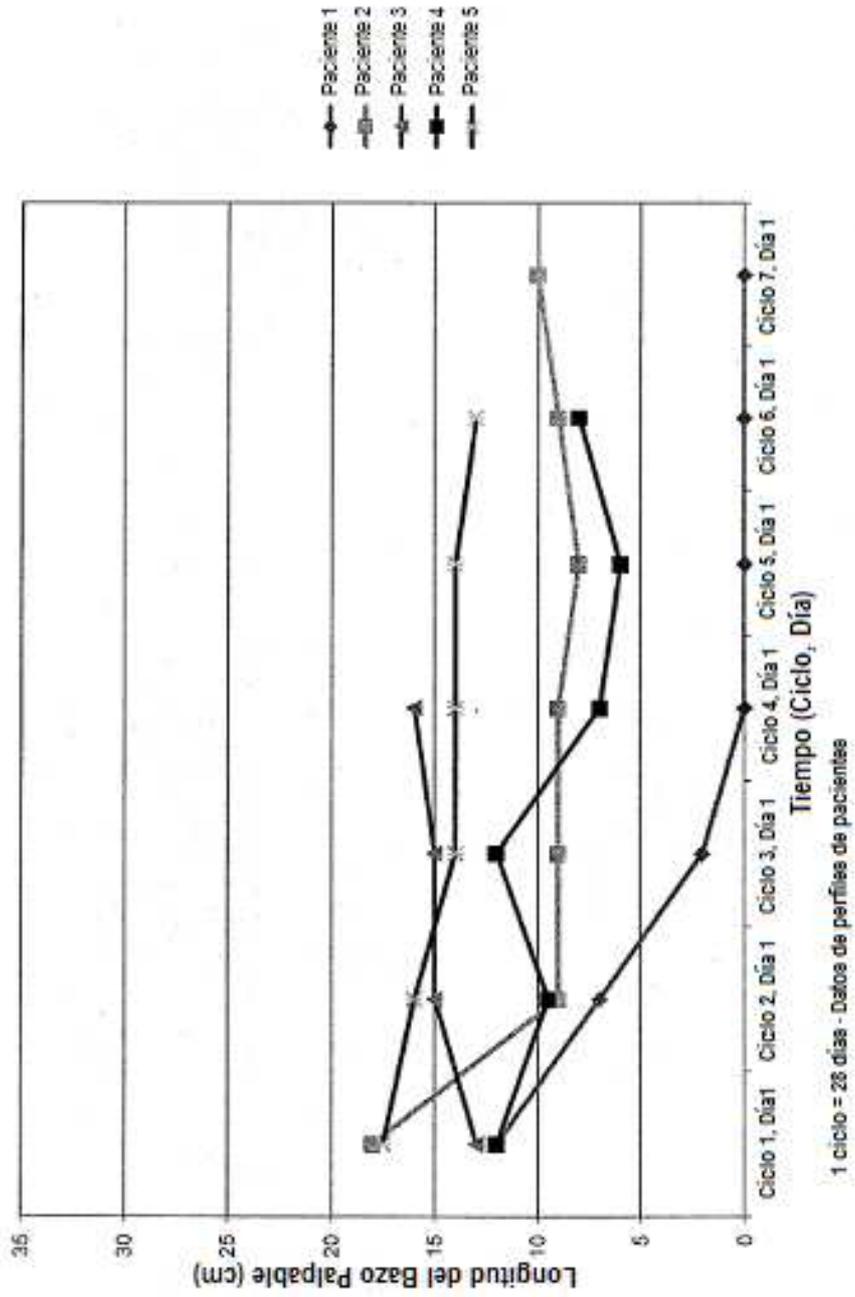
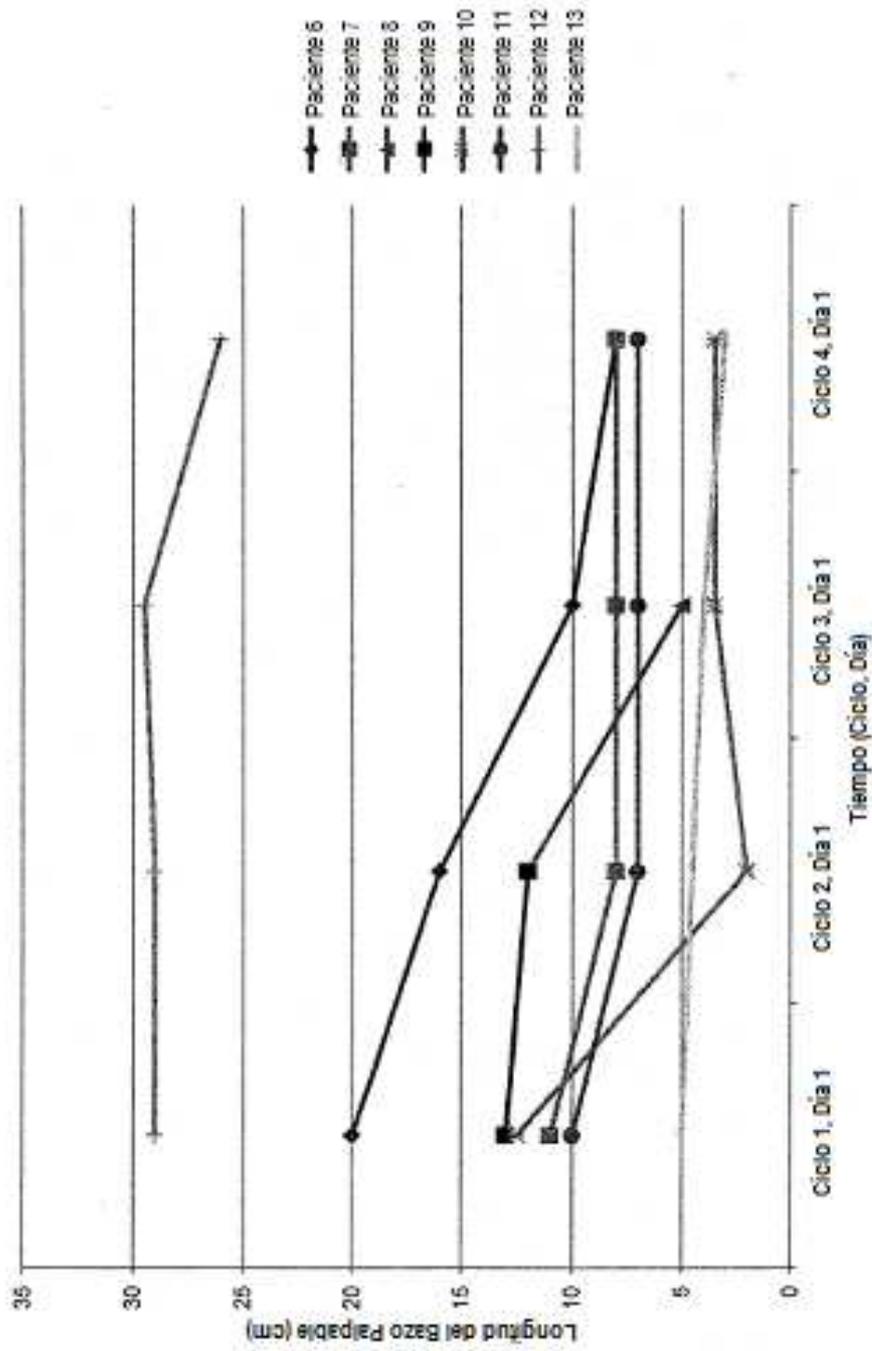


Figura 22. Longitud del Bazo Palpable Sobre Tiempo en la Cohorte 2



1 ciclo = 28 días - Datos de perfiles de pacientes

Figura 23, Longitud del Bazo Palpable Sobre Tiempo en la Cohorte 3

