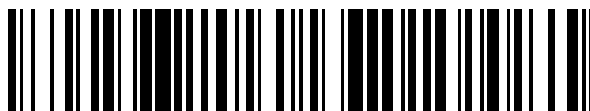


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 719**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2009** **PCT/US2009/064471**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010** **WO10057048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009** **E 09760383 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2355828**

54 Título: **Terapias para neoplasias hematológicas**

30 Prioridad:

24.02.2009 US 155057 P

04.08.2009 US 231278 P

22.05.2009 US 180768 P

13.11.2008 US 114434 P

23.09.2009 US 245196 P

06.01.2009 US 142845 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2018

73 Titular/es:

GILEAD CALISTOGA LLC (100.0%)

333 Lakeside Drive

Foster City. CA 94404, US

72 Inventor/es:

GALLATIN, MICHAEL, W.;

ULRICH, ROGER, G. y

GIESE, NEILL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 674 719 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

Terapias para neoplasias hematológicas

Campo técnico de la invención

Campo técnico

- 5 La invención está en el campo de la terapéutica y la química médica. En particular, la invención se refiere a usos de ciertos derivados de quinazolina para el tratamiento de neoplasias hematológicas y ciertas otras afecciones.

Estado de la técnica

- 10 La señalización celular a través de fosfoinosítidos 3'-fosforilados ha sido implicada en una variedad de procesos celulares, por ejemplo, transformación neoplásica, señalización del factor de crecimiento, inflamación e inmunidad. La enzima responsable de generar estos productos fosforilados de señalización, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa; PI3K), se identificó originalmente como una actividad asociada con las oncoproteínas virales y las tirosina quinasas del receptor del factor de crecimiento que fosforila el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados en el 3'-hidroxilo del anillo de inositol.

- 15 Se cree que la activación de PI 3-quinasa está implicada en un intervalo de respuestas celulares que incluyen crecimiento celular, diferenciación y apoptosis.

- 20 La purificación inicial y la clonación molecular de PI 3-quinasa revelaron que era un heterodímero que constaba de las subunidades p85 y p110. Se han identificado cuatro PI3K de clase I distintas, denominadas PI3K α , β , δ y γ , cada una de las cuales consiste en una subunidad catalítica distinta de 110 kDa y una subunidad reguladora. Más específicamente, tres de las subunidades catalíticas, es decir, p110 α , p110 β y p110 δ , interactúan cada una con la misma subunidad reguladora, p85; mientras que p110 γ interactúa con una subunidad reguladora distinta, p101. Los patrones de expresión de cada una de estas PI3K en células y tejidos humanos también son distintos.

- 25 La identificación de la isoforma p110 δ de la PI 3-quinasa se describe en Chantry y col., J Biol Chem, 272: 19236-41 (1997). Se observó que la isoforma p110 δ humana se expresa de una manera restringida en los tejidos. Se expresa a niveles elevados en linfocitos y tejidos linfoides, lo que sugiere que la proteína podría desempeñar un papel en la señalización mediada por PI3-quinasa en el sistema inmune. La isoforma p110 β de PI3K también puede jugar un papel en la señalización mediada por PI3K en ciertos cánceres.

Existe la necesidad de un tratamiento relacionado con trastornos mediados por PI3K relacionados con cánceres, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes.

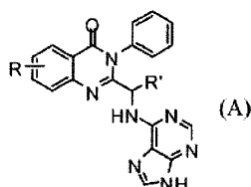
El documento WO 2005/113556 divulga compuestos que inhiben la actividad de PI3K δ .

- 30 Los documentos WO 2005/117889 y US 2006106038 divulgan métodos para tratar y/o prevenir la proliferación aberrante de células hematopoyéticas que comprenden inhibir selectivamente la actividad de PI3K δ en células hematopoyéticas.

Resumen

- 35 La presente invención esta dirigida a un compuesto de fórmula A para uso en un método de tratamiento de una neoplasia hematológica en un ser humano, en el que el método comprende la administración simultánea o secuencial de bortezomib,

en el que la fórmula A es



- 40 en la que R es H, halo o alquilo C1-C6; y R' es alquilo C1-C6; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en la que el compuesto opcionalmente se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

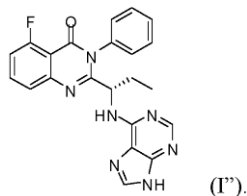
- 45 La presente divulgación proporciona una clase de compuestos de tipo quinazolinona y un método para usar estos compuestos en el tratamiento de enfermedades cancerígenas, inflamatorias y autoinmunes. En particular, los cánceres que son neoplasias hematológicas, tales como leucemia y linfoma, se tratan mediante los métodos de la presente invención. También se divulgan métodos para usar los compuestos de quinazolinona en combinación con otros tratamientos terapéuticos en pacientes que lo necesitan.

En una realización, el compuesto es predominantemente el enantiómero S.

En algunas de las realizaciones anteriores, R es flúor (F) y está unido a la posición 5 o 6 del anillo de quinazolinilo.

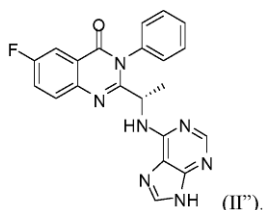
En algunas de las realizaciones anteriores, R es H o F; y R' es metilo, etilo o propilo.

En algunas realizaciones, el compuesto es



5

En algunas realizaciones, el compuesto es



La enfermedad autoinmune puede ser rinitis alérgica, asma, EPOC o artritis reumatoide.

En algunas de las realizaciones anteriores, la neoplasia hematológica es leucemia.

10 En algunas de las realizaciones anteriores, la neoplasia hematológica es linfoma.

En algunas de las realizaciones anteriores, la neoplasia hematológica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular, macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma de células B y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

15 En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es leucemia linfocítica aguda (ALL).

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML).

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es leucemia linfocítica crónica (CLL).

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es mieloma múltiple (MM).

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es linfoma de células B.

20 En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es ALL de células B o de células T.

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es linfoma de Hodgkin.

En algunas de las realizaciones anteriores, el cáncer es cáncer de mama, pulmón, colon, próstata u ovario.

25 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario al tratamiento de quimioterapia, o en recaída después del tratamiento con quimioterapia.

El agente terapéutico adicional es un inhibidor de proteasoma.

En algunas de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico adicional se combina con el compuesto de Fórmula A.

El agente terapéutico adicional es bortezomib.

30 En alguna de las divulgaciones anteriores, el compuesto se prepara para administración con al menos un grupo de al menos dos agentes, en el que dicho grupo de agentes se selecciona de los grupos que consisten en a-q,

a) CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona);

b) R CHOP (rituximab CHOP);

- c) hiperCVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina hiperfraccionados);
- d) R-hiperCVAD (rituximab-hiperCVAD);
- e) FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona);
- f) R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona);
- 5 g) bortezomib y rituximab;
- h) temsirolimus y rituximab;
- i) temsirolimus y Velcade®;
- j) Tositumomab con yodo-131 (Bexxar®) y CHOP;
- k) CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona);
- 10 l) R-CVP (rituximab-CVP);
- m) ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido);
- n) R-ICE (rituximab-ICE);
- o) FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab);
- p) FR (fludarabina, rituximab); y
- 15 q) D.T. PACE (dexametasona, talidomida, cisplatino, Adriamycin®, ciclofosfamida, etopósido).
- En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto de fórmula A está presente en una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula A y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario al tratamiento de quimioterapia o en recaída después del tratamiento con quimioterapia.
- 20 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene un cáncer que expresa constitutivamente la actividad de fosforilación de Akt.
- En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene un cáncer con alta actividad de p110δ y baja actividad de p110α.
- 25 En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto mantiene una concentración media en sangre por encima del nivel de CE50 para la activación de PI3Kδ y por debajo del nivel de activación de EC50 PI3Kγ en basófilos durante un período de al menos 12 horas desde la administración del compuesto.
- En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto mantiene una concentración media en plasma sanguíneo entre 100 nM y 1100 nM durante un período de al menos 12 horas desde la administración del compuesto.
- En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es resistente a tratamientos quimioterapéuticos estándar.
- 30 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene al menos un ganglio linfático agrandado.
- En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos dos tratamientos de quimioterapia estándar o experimentales que tenían al menos dos tratamientos de quimioterapia anteriores.
- En algunas de las realizaciones anteriores, cada tratamiento de quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en fludarabina, agentes alquilantes, rituximab, alemtuzumab y los tratamientos a-q enumerados anteriormente.
- 35 Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra un resumen gráfico del crecimiento celular de mieloma múltiple (MM) como una función de concentraciones variables de citoquinas IGF-1 e IL-6 en combinación con el compuesto I, usando células LB.
- La Figura 2 muestra un resumen gráfico del crecimiento celular de células de mieloma múltiple (MM) en función de concentraciones variables del compuesto I y la presencia o ausencia de células del estroma de médula ósea (BMSC) después de 48 horas.
- 40 La Figura 3 muestra un resumen gráfico de la apoptosis de las células de Leucemia Linfocítica Crónica (CLL) en función de concentraciones variables del compuesto de fórmula I.

- La Figura 4 muestra un cuadro de resumen del efecto del compuesto I sobre la viabilidad celular, la reducción en la fosforilación de Akt (Ser473) y la activación de caspasa 3 en varias líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda (ALL).
- 5 La Figura 5 muestra un resumen del efecto del compuesto I en el ciclo celular de líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda (ALL).
- La Figura 6 muestra un resumen gráfico del efecto de concentraciones variables del compuesto I sobre el crecimiento celular en líneas celulares de cáncer de mama T47D y HS-578T a las 48 horas y 72 horas.
- La Figura 7 muestra un resumen gráfico del efecto de concentraciones variables del compuesto I sobre el crecimiento celular de las líneas celulares ováricas IGROV-1 y OVCAR-3 a las 48 horas y 72 horas.
- 10 La Figura 8 muestra un resumen del efecto del compuesto I sobre la fosforilación de Akt en muchas líneas celulares de leucemia y linfoma.
- La Figura 9 muestra imágenes de SDS-PAGE y el despliegue de Akt y pAkt en diversas líneas celulares de cáncer hematopoyético en función de la presencia o ausencia del compuesto I, que muestra que el compuesto I inhibe la fosforilación de Akt.
- 15 La Figura 10 muestra resúmenes gráficos de poblaciones de células apoptóticas y viables en líneas celulares de cáncer de mama en función de concentraciones variables del compuesto de fórmula I, lo que demuestra que el compuesto induce la apoptosis.
- La Figura 11 muestra la concentración del compuesto I en la sangre de un sujeto humano sano durante 12 horas después de la administración oral de dosis de 50, 100 y 200 mg de dicho compuesto.
- 20 La Figura 12 muestra la comparación de áreas de lesión en un paciente humano diagnosticado con linfoma de células del manto después de 28 días (1 ciclo) de tratamiento con el compuesto I y las áreas de lesión antes del tratamiento.
- La Figura 13 muestra el ALC (recuento absoluto de linfocitos) en la sangre de un paciente durante un período de 4 semanas después de 28 días (1 ciclo) de tratamiento con el compuesto de fórmula I.
- 25 La Figura 14 muestra la concentración del compuesto I en la sangre de pacientes con y sin linfoma de células del manto (MCL) durante 6 horas después de la administración (50 mg dos veces al día, BID) el día 28, en comparación con la concentración en sangre de un voluntario sano normal el día 7 (D7) usando el mismo programa de dosificación o dosificación con 100 mg BID del compuesto I.
- La Figura 15 muestra la expresión de la isoforma de PI3K en un panel de líneas celulares de linfoma y leucemia.
- 30 La Figura 16A muestra los datos de viabilidad celular y apoptosis en líneas celulares de leucemia expuestas al compuesto I. En la Figura 16B, la tinción con Anexina indica un aumento en la apoptosis en las células tratadas.
- Las Figuras 17A-D muestran resultados de PAGE de diferente expresión de isoforma de PI3K en células de pacientes con CLL.
- La Figura 18 muestra la inducción de la escisión de (A) caspasa 3 y (B) PARP en presencia del compuesto I.
- 35 La Figura 19 muestra un aumento de la apoptosis de células de leucemia linfocítica crónica (CLL) de pacientes de pronóstico pobre causadas por la exposición al compuesto I, lo que demuestra que el compuesto I es eficaz en pacientes resistentes a fármacos.
- La Figura 20 muestra un aumento de la apoptosis de células de leucemia linfocítica crónica (CLL) de pacientes refractarios/recidivantes causada por la exposición al compuesto de fórmula I.
- 40 La Figura 21 muestra los resultados de la producción de Fosfo-Akt en ausencia o presencia de 0,1; 1,0; 10 μ M del compuesto I.
- La Figura 22 muestra resultados de citometría de flujo relacionados con la señalización de PI3K en basófilos, demostrando que (B) anti-FC ϵ R1 o (C) fMLP aumenta la expresión de CD63 en comparación con ninguna estimulación (A).
- 45 La Figura 23 muestra la inhibición de la inhibición de PI3K por el compuesto I en basófilos, y demuestra que el compuesto I es especialmente eficaz en la inhibición de la expresión de CD63 inducida por una ruta p110 δ , pero también efectiva en la concentración micromolar para inhibir la expresión inducida por una ruta p110 γ .
- La Figura 24 muestra los datos farmacocinéticos de (A) administración de dosis única del compuesto I a diferentes dosis en voluntarios sanos, y (B) un perfil farmacocinético que mantiene una dosis efectiva durante un período de 12 horas. La Figura 25 muestra los efectos de varias dosis de compuesto I en (A) niveles de glucosa y (B) niveles de insulina, exhibiendo poca actividad fuera del objetivo.
- 50

- La Figura 26A muestra la expresión de la isoforma PI3K en un panel de líneas celulares de DLBCL.
- La Figura 26B muestra una imagen de SDS-PAGE de pAkt en líneas celulares de DLBCL en presencia o ausencia del compuesto I.
- 5 La Figura 27 muestra los efectos de una concentración 10 μ M del compuesto I sobre la fosforilación de Akt y S6 en líneas celulares de ALL en SDS-PAGE.
- La Figura 28 muestra una reducción dependiente de la dosis de fosforilación de Akt, S6 y GSK-3 β después del tratamiento con una serie de diluciones del compuesto I.
- La Figura 29 muestra los efectos dependientes de la dosis del compuesto I en líneas celulares de ALL en la subregulación de cFLIP, escisión de caspasa 3 y escisión de PARP.
- 10 La Figura 30 muestra la expresión de p110 δ en A) líneas celulares MM y B) células de MM de pacientes; y C) en células MM.1S y LB.
- La Figura 31A muestra la expresión de p110 δ de células LB e INA-6 transfectadas con ARNpi de p110 δ (Si) o ARNpi de control (simulación).
- 15 La Figura 31B muestra un gráfico del crecimiento de células INA-6 después de la transfección con ARNpi de p110 δ (Si) o ARNpi de control (simulación).
- La Figura 31C muestra el % de células viables cultivadas con o sin compuesto I durante 48 horas.
- La Figura 31D muestra el porcentaje de células de MM viables después de ser cultivadas con el compuesto I a concentraciones de 0 a 20 μ M durante 48 horas.
- 20 La Figura 31E muestra el porcentaje de células mononucleares de sangre periférica viables de donantes sanos después de ser cultivadas con el compuesto I a diferentes concentraciones durante 72 horas.
- La Figura 31F muestra resultados de inmunotransferencia de lisados de células INA-6 cultivadas con el compuesto I (0-5 μ M) durante 120 horas.
- 25 La Figura 32 muestra los perfiles de expresión de inmunotransferencia AKT y ERK después del cultivo de A) células INA-6 con el compuesto I o LY294002 durante 12 horas; B) células INA-6 y MM.1S con el compuesto I a diferentes concentraciones durante 6 horas; C) células LB e INA-6 con el compuesto I durante 0-6 horas.
- La Figura 33A muestra imágenes de microscopía electrónica fluorescente y de transmisión de células INA-6 y LB MM tratadas con el compuesto I durante 6 horas y acumulación de LC3; las flechas indican autofagosomas.
- La Figura 33B muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células INA-6 tratadas con 5 μ M del compuesto I o privación de suero durante 6 horas.
- 30 La Figura 33C muestra inmunotransferencias de los niveles de proteína LC3 y beclina1 de células INA-6 tratadas con o sin compuesto I y 3-MA (3-metil-adenina, inhibidor conocido de autofagia).
- La Figura 33D muestra el porcentaje de crecimiento de las células LB positivas para p110 δ después del tratamiento con hasta 100 μ M de 3-MA durante 24 horas.
- 35 La Figura 34 muestra los niveles de inhibición del crecimiento de A) células LB o B) células INA-6 cultivadas conjuntamente con 0, 5 y 10 μ M del compuesto I en presencia o ausencia de cantidades variables de IL-6 o IGF-1; Leyenda: medio de control (■); compuesto I a 5,0 μ M (▨) o 10 μ M (□).
- Las Figuras 34C y 34D muestran la inhibición del crecimiento de células de MM en presencia de BMSC. Leyenda solo para 34C: medio de control (□), compuesto I 2,5 μ M (▨), 5 μ M (▩) y 10 μ M (■).
- 40 La Figura 34E muestra inmunotransferencias de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de BMSC cultivadas con el compuesto I o medio de control durante 48 horas.
- La Figura 34F muestra inmunotransferencias de los perfiles de expresión de AKT y ERK en células INA-6 tratadas con el compuesto I cultivadas con o sin BMSC.
- La Figura 34G muestra el % de crecimiento de células BMSC en dos pacientes diferentes después de cultivar con el compuesto I durante 48 horas.
- 45 La Figura 35A muestra imágenes microscópicas de HuVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) cultivadas con 0, 1 y 10 μ M del compuesto I durante 8 horas y se evaluó la formación de microtúbulos.
- La Figura 35B muestra un diagrama de barras que resume la formación del tubo de células endoteliales en células

HuVEC tratadas con el compuesto I.

La Figura 35C muestra un gráfico que representa el porcentaje de crecimiento de células HuVEC en función de la concentración creciente de cultivo del compuesto I.

5 La Figura 35D muestra la disminución de la expresión de Akt y ERK de los lisados de células HuVEC después de ser cultivadas con el compuesto I durante 8 horas.

La Figura 36A muestra el volumen tumoral en ratones SCID con xenoinjertos de MM humanos tratados con 0, 10 mg/kg o 30 mg/kg de compuesto II en función del tiempo, mostrando actividad intensa *in vivo* en el tumor de xenoinjerto humano

10 La Figura 36B muestra una fotografía que compara el tumor de xenoinjertos de MM humanos en un ratón tratado con el compuesto II durante 12 días con un ratón de control.

La Figura 36C muestra la tasa de supervivencia de ratones SCID con xenoinjertos de MM humanos tratados con 0, 10 y 30 mg/kg de compuesto II a lo largo del tiempo.

15 La Figura 36D muestra imágenes del análisis inmunohistoquímico de tumores recogidos de un ratón tratado con el compuesto II en comparación con el control; en donde las células positivas para CD31 y P-AKT son de color marrón oscuro.

La Figura 36E muestra inmunotransferencias que detectan los niveles de PDK-1 y AKT de tejidos tumorales recogidos de ratones tratados con el compuesto II en comparación con un control.

La Figura 36F muestra un gráfico de los niveles de sIL6R medidos en ratones con 0, 10 mg/kg o 30 mg/kg de compuesto II durante un período de 4 semanas de tratamiento como se determinó por ELISA.

20 La Figura 37A muestra el % de células LB o INA-6 MM viables después del tratamiento con el compuesto I con cantidades variables de bortezomib (B); Leyenda: medio (■), compuesto I 1.25 μ M (■), 2.5 μ M (■), o 5,0 μ M (□).

La Figura 37B muestra inmunotransferencias que comparan los niveles de fosforilación de AKT en células INA-6 tratadas durante 6 horas con el compuesto I y/o bortezomib.

25 La Figura 38 muestra (A) la expresión de la isoforma de PI3K en un panel de líneas celulares de linfoma folicular; (B) reducción en la expresión de pAkt, Akt, pS6 y S6 después de la exposición al compuesto I; y (C) aumento en la escisión de PARP y caspasa-3 después de la exposición al compuesto I de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 39 muestra (A) cantidades de señalización constitutiva de PI3K en células de MCL primarias en diversas cantidades de compuesto I; (B) reducción en la producción de pAkt en líneas celulares de MCL que contienen un factor de supervivencia y cantidades variables del compuesto I.

30 La Figura 40 muestra una imagen axilar de tomografía computarizada de una linfadenopatía voluminosa en un paciente con CLL (A) antes del tratamiento con el compuesto I y (B) después de 1 ciclo de tratamiento con el compuesto I.

Modos de llevar a cabo la invención

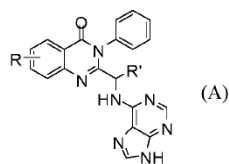
35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, las anotaciones y otros términos o terminología científica usados en la presente memoria pretenden tener los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen aquí para mayor claridad y/o para referencia rápida, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente memoria son bien entendidos y comúnmente empleados usando metodología convencional por los expertos en la técnica. Según 40 corresponda, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado generalmente se llevan a cabo de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se indique lo contrario.

45 La discusión de los métodos generales dados en este documento está destinada únicamente con fines ilustrativos. Otros métodos y realizaciones alternativas serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta divulgación.

Un grupo de elementos vinculados con la conjunción "o" no debe leerse como que requiere exclusividad mutua entre ese grupo, sino que también debe leerse como "y/o" a menos que se indique expresamente lo contrario. Aunque los ítems, elementos o componentes de la invención pueden describirse o reivindicarse en singular, se contempla que el plural está dentro del alcance de la misma a menos que se especifique explícitamente la limitación al singular.

50 La invención es como se define en las reivindicaciones. La divulgación proporciona métodos que se relacionan con una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer y enfermedades inflamatorias. En un aspecto, la divulgación

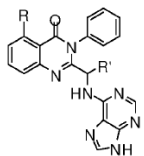
proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad autoinmune en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un compuesto de fórmula A



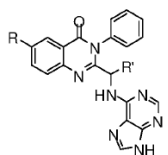
5 en la que R es H, halo o alquilo C1-C6; R' es alquilo C1-C6; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular, halo es F; y R' es metilo, etilo o propilo.

En una realización particular, R está unido a la posición 5 del anillo de quinazolinilo, que tiene la estructura



En una realización particular, R está unido a la posición 6 del anillo de quinazolinilo, que tiene la estructura

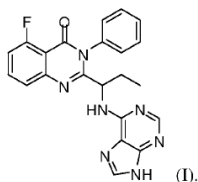


10

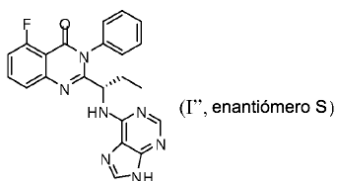
El término "compuesto" usado en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un compuesto de fórmula A, tal como compuesto I, compuesto II, o un enantiómero, tal como I' o II', o una mezcla enantiomérica.

15

El "compuesto de fórmula I" o "compuesto I" se refiere al compuesto químico 5-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona, estructura de fórmula I:

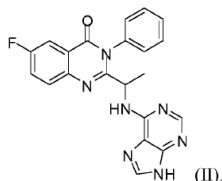


El enantiómero S del compuesto I se muestra aquí, denominado I':

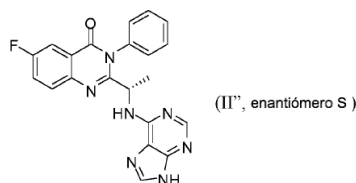


20

El "compuesto de fórmula II" o "compuesto II" se refiere al compuesto químico 2-(1-(9H-purin-6-ilamino)etil)-6-fluoro-3-fenilquinazolin-4(3H)-ona, estructura de fórmula II:



El enantiómero S del compuesto II se muestra aquí, denominado II':



En una realización, el compuesto de fórmula A es un compuesto de fórmula I. En otra realización, el compuesto de fórmula A es un compuesto de fórmula II. En ciertas realizaciones, el compuesto es una mezcla racémica de enantiómeros R y S. En ciertas realizaciones, el compuesto se usa como una mezcla de enantiómeros, y a menudo está enriquecido con el enantiómero S. En algunas realizaciones, el compuesto es predominantemente el enantiómero S. En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula A, usado en los métodos descritos en este documento es al menos 80% de enantiómero S. En ciertas realizaciones, el compuesto está compuesto principalmente por el enantiómero S, en el que el compuesto comprende al menos 66-95%, o 85-99% del enantiómero S. En algunas realizaciones, el compuesto tiene un exceso enantiomérico (e.e.) de al menos 90% o al menos 95% de enantiómero S. En algunas realizaciones, el compuesto tiene un exceso enantiomérico de S (e.e.) de al menos 98% o al menos 99%. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende al menos 95% del enantiómero S. En los experimentos celulares y de pacientes proporcionados en la sección de Ejemplos, la muestra del compuesto I usado tenía más del 95% de enantiómero S.

En realizaciones específicas, el compuesto de fórmula I o II, para uso en los métodos descritos en este documento es al menos 80% de enantiómero S. En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula I o II está compuesto principalmente por el enantiómero S, en el que el compuesto comprende al menos 66-95%, o 85-99% del enantiómero S. En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula I o II tiene un exceso enantiomérico (e.e.) de al menos 90% o al menos 95% de enantiómero S. En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula I o II tiene un exceso enantiomérico S (e.e.) de al menos 98% o al menos 99%. En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula I o II comprende al menos 95% del enantiómero S. En los experimentos celulares y de pacientes proporcionados en la sección de Ejemplos, la muestra del compuesto I usado tenía más del 95% de enantiómero S.

En una realización particular, el compuesto inhibe selectivamente p110δ de PI3K en comparación con otras isoformas de PI3K.

La enfermedad autoinmune puede ser rinitis alérgica, asma, EPOC o artritis reumatoide.

El cáncer es una neoplasia hematológica. En una realización particular, la neoplasia hematológica es leucemia o linfoma.

En algunas realizaciones, el linfoma es una neoplasia de células B maduras (periféricas). En realizaciones específicas, la neoplasia de células B maduras se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño de células B; Leucemia prolinfocítica de células B; Linfoma linfoplasmacítico; Linfoma de la zona marginal, tal como linfoma de células B de la zona marginal esplénica (+/- linfocitos vellosos), linfoma de la zona marginal nodal (+/células B monocitoides) y linfoma de células B de la zona marginal extranodal del tipo de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT); Leucemia de células pilosas; Mieloma/plasmacitoma de células plasmáticas; Linfoma folicular, centro del folículo; Linfoma de células del manto; Linfoma difuso de células B de células grandes (que incluye linfoma mediastinal de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes y linfoma de efusión primario); y el linfoma de Burkitt/leucemia de células de Burkitt.

En algunas realizaciones, el linfoma se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular, macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) o linfoma de células B y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

En una realización particular adicional, la leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL). La leucemia linfocítica aguda también se conoce como leucemia linfoblástica aguda y se pueden usar indistintamente en este documento. Ambos términos describen un tipo de cáncer que comienza con los glóbulos blancos, los linfocitos, en la médula ósea.

En algunas realizaciones, el linfoma no Hodgkin (NHL) cae en una de dos categorías, NHL agresivo o NHL indolente. El NHL agresivo es de rápido crecimiento y puede conducir a la muerte de un paciente relativamente rápido. La supervivencia sin tratamiento se puede medir en meses o incluso semanas. Los ejemplos de NHL agresivo incluyen neoplasmas de células B, linfoma difuso de células B grandes, neoplasmas de células T/NK, linfoma anaplásico de células grandes, linfomas de células T periféricas, linfoma/leucemia precursor linfoblástico de células B, leucemia/linfoma precursor linfoblástico T, linfoma de Burkitt, linfoma/leucemia de células T en adultos (HTLV1+), linfoma primario del SNC, linfoma de células del manto, trastorno linfoproliferativo polimórfico posterior al trasplante (PTLD), linfoma relacionado con el SIDA, linfoma histiocítico verdadero y linfoma blástico de células NK. El tipo más común de NHL agresivo es el linfoma difuso de células grandes.

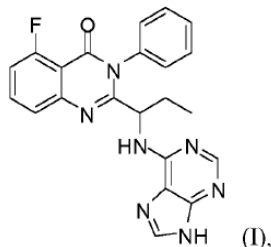
El NHL indolente es de crecimiento lento y no muestra síntomas obvios para la mayoría de los pacientes hasta que la

- enfermedad ha progresado hasta una etapa avanzada. La supervivencia no tratada de pacientes con NHL indolente puede medirse en años. Los ejemplos no limitantes incluyen linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal (tal como linfoma de la zona marginal extranodal (también tejido linfoide asociado a mucosa - linfoma MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal (linfoma de células B monocitoide), linfoma esplénico de la zona marginal) y linfoma linfoplasmacítico (macroglubulinemia de Waldenstrom).
- En algunos casos, puede producirse una transformación histológica, por ejemplo, el NHL indolente en pacientes puede convertirse en NHL agresivo.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos para uso en métodos de tratamiento de un paciente con NHL agresivo o NHL indolente.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos para uso en métodos de tratamiento de un paciente con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en linfoma de células del manto (MCL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de la zona marginal.
- En algunas realizaciones, los compuestos para uso se administran a pacientes con afecciones recurrentes o refractarias.
- En otra realización, el cáncer es cáncer de mama, pulmón, colon o próstata.
- En una realización particular, el cáncer o la enfermedad autoinmune se asocia con actividad de PI3K anormal en comparación con la actividad de PI3K en un sujeto sin cáncer o sin una enfermedad autoinmune.
- En una realización particular, el sujeto preferido es refractario al tratamiento de quimioterapia, o en recaída después del tratamiento con quimioterapia. En una realización alternativa, el sujeto es nuevamente un paciente.
- En una realización particular, el método comprende reducir el nivel de actividad de PI3Kδ en dicho paciente.
- El sujeto es un sujeto humano.
- Los sujetos que se someten a tratamiento con agentes terapéuticos conocidos pueden experimentar resistencia al tratamiento. Por ejemplo, aunque el bortezomib fue aprobado por la FDA para el MM reincidente/refractario, reincidente y recién diagnosticado, algunos pacientes no responden y otros adquieren resistencia al bortezomib. En algunas realizaciones, el compuesto de quinazolinona descrito en la presente memoria aumenta sinérgicamente la eficacia de un agente terapéutico conocido. Los compuestos descritos en este documento pueden aumentar cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en este documento. En realizaciones más específicas, los compuestos descritos en la presente memoria aumentan sinérgicamente los inhibidores del proteasoma. En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es resistente al tratamiento quimioterapéutico. En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es resistente a los inhibidores del proteasoma. En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es resistente a bortezomib o carfilzomib. En un ejemplo, los compuestos descritos en la presente memoria aumentan sinérgicamente la citotoxicidad de MM inducida por bortezomib. Sin estar limitados por la teoría, en algunas realizaciones, los compuestos discutidos en este documento inhiben la fosforilación de AKT inducida por bortezomib. En algunas realizaciones, los compuestos para uso en métodos descritos en la presente memoria se usan para superar la resistencia al tratamiento con el inhibidor de proteasoma. En algunas realizaciones, la invención proporciona un compuesto para uso en un método para tratar un sujeto que es resistente o ha desarrollado resistencia a agentes terapéuticos.
- Aunque no está obligado por la teoría, los efectos sinérgicos entre un compuesto de fórmula A y terapias convencionales se pueden atribuir a la capacidad del compuesto de la invención para inducir la movilización de células tumorales hacia la circulación periférica. La inducción de la circulación periférica de las células tumorales aumenta la capacidad de la terapia convencional para actuar y neutralizar más eficazmente el tumor. Esta sinergia ha sido demostrada en pacientes con CLL.
- Por consiguiente, el método comprende administrar además de un compuesto de fórmula A a un paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional y/o un procedimiento terapéutico seleccionado para tratar dicho cáncer o enfermedad autoinmune en dicho paciente. El "agente terapéutico" puede referirse a uno o más compuestos, tal como se usa en el presente documento. El agente terapéutico puede ser un fármaco para quimioterapia estándar o experimental. El agente terapéutico puede comprender una combinación de más de un fármaco para quimioterapia. Las combinaciones típicas de medicamentos para quimioterapia se enumeran como a-q en este documento. Se puede elegir un agente terapéutico particular dependiendo del tipo de enfermedad que está siendo tratada. Ejemplos no limitantes de tratamientos quimioterapéuticos convencionales para enfermedades hematológicas particulares se describen en secciones posteriores. En una realización particular, la invención proporciona compuestos para uso en un método para tratar a un paciente con cáncer hematopoyético, por ejemplo, un paciente con CLL, con bortezomib y un compuesto de fórmula A (por ejemplo, fórmula I, II, I' o II'), donde la combinación proporciona un efecto sinérgico.
- En la divulgación, dicho agente terapéutico se selecciona del siguiente grupo que consiste en bortezomib (Velcade®),

carfilzomib (PR-171), PR-047, disulfiram, lactacistina, PS-519, eponemicina, epoxomicina, aclacinomicina, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, inhibidores del tripéptido vinilsulfona, ritonavir, PI-083, (+/-)-7-metilomuralida, (-)-7-metilomuralida, perifosina, rituximab, citrato de sildenafil (Viagra®), CC-5103, talidomida, epratuzumab (anticuerpo humanizado hLL2-anti-CD22), simvastatina, enzastaurina, Campath-1H®, dexametasona, DT PACE, oblimersen, antineoplaston A10, antineoplaston AS2-1, alemtuzumab, beta aletina, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina liposomal PEGilada, prednisona, prednisolona, cladribina, sulfato de vincristina, fludarabina, filgrastim, melfalán, interferón alfa recombinante, carmustina, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, etopósido, melfalán, dolastatina 10, anticuerpo monoclonal MN-14 con indio In 111, epratuzumab humanizado con itrio Y90, globulina antitímocito, busulfán, ciclosporina, metotrexato, mofetil micofenolato, linfocitos alogénicos terapéuticos, ibritumomab tiuxetano con itrio Y90, sirolimus, tacrolimus, carboplatino, tiotepa, paclitaxel, aldesleuquina, interferón alfa recombinante, docetaxel, ifosfamida, mesna, interleuquina-12 recombinante, interleucina-11 recombinante, inhibidor ABT-263 de la proteína de la familia Bcl-2, denileuquina diftotox, tanespimicina, everolimus, pegfilgrastim, vorinostat, alvocidib, ligando recombinante flt3, trombopoyetina humana recombinante, células asesinas activadas por linfoquina, trihidrato de amifostina, aminocamptotecina, clorhidrato de irinotecano, acetato de caspofungina, clofarabina, epoetina alfa, nelarabina, pentostatina, sargramostim, ditartrato de vinorelbina, vacuna peptídica análoga WT-1, vacuna peptídica WT1 126-134, fenretinida, ixabepilona, oxaliplatino, anticuerpo monoclonal CD19, anticuerpo monoclonal CD20, ácidos grasos omega-3, clorhidrato de mitoxantrona, acetato de octreótido, tositumomab y tositumomab con yodo I 131, motexafina gadolinio, trióxido de arsénico, tipifamib, HSPPC-96 derivado del tumor autólogo humano, veltuzumab, briostatina 1, anticuerpos monoclonales anti-CD20, clorambucilo, pentostatina, lumiliximab, apolizumab, Anti-CD40 y Ofatumumab, o una combinación de los mismos. La combinación de agentes terapéuticos se usa en terapias actuales y experimentales tales como las combinaciones a-q enumeradas anteriormente.

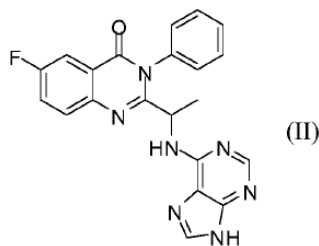
El agente terapéutico es un inhibidor de proteasoma. Los inhibidores de proteasoma incluyen compuestos naturales y sintéticos. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del proteasoma incluyen bortezomib, (ácido [(1R)-3-metil-1-((2S)-3-fenil-2-[(pirazin-2-ilcarbonil)amino]propanoil)amino)butilo]borónico), que es comercializado como 'Velcade®' por Millennium Pharmaceuticals; carfilzomib (PR-171) y el análogo oral, PR-047, ambos desarrollados por Proteolix, Inc. Otros ejemplos de inhibidores del proteasoma incluyen disulfiram; lactacistina; compuestos sintéticos tales como PS-519, eponemicina, epoxomicina y aclacinomicina; inhibidores de calpaína, tales como CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341; inhibidores del tripéptido de la sulfona de vinilo; ritonavir; PI-083; (+/-)-7-metilomuralida; y (-)-7-metilomuralida. En realizaciones particulares, el compuesto de fórmula A se administra en combinación con bortezomib o carfilzomib. En realizaciones más particulares, el compuesto de fórmula I se administra en combinación con bortezomib o carfilzomib. En otras realizaciones particulares, el compuesto de fórmula II se administra en combinación con bortezomib o carfilzomib.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición está enriquecida con el enantiómero S.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición está enriquecida con el enantiómero S.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto para uso en un método para tratar el mieloma múltiple (MM) en un paciente que comprende administrar una combinación de un compuesto de fórmula A y un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la fórmula A es el compuesto I o II. En realizaciones específicas, la fórmula A es el

compuesto I". En otras realizaciones, la fórmula A es el compuesto II". El agente terapéutico adicional es un inhibidor de proteasoma. El agente terapéutico adicional es bortezomib. En una realización específica, el compuesto para uso en el método para tratar el mieloma múltiple en un paciente comprende administrar el compuesto I" con bortezomib. En una realización específica, el método para tratar el mieloma múltiple en un paciente comprende administrar el compuesto II" con bortezomib. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 60%. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 70%. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 80%. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 90%. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 95%. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 98%. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto I" o II" tiene un exceso enantiomérico de al menos 99%.

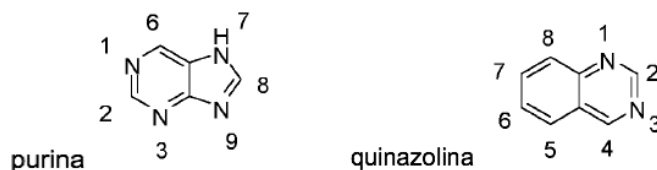
En un aspecto particular de la divulgación, se administra una combinación de agentes terapéuticos con un compuesto de Fórmula A, en el que dicha combinación se selecciona del grupo que consiste en

- 15 a) CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona);
b) R-CHOP (rituximab-CHOP);
c) hiperCVAD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorrubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina);
d) R-hiperCVAD (rituximab-hiperCVAD);
e) FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona);
- 20 f) R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona);
g) bortezomib y rituximab;
h) temsirolimus y rituximab;
i) temsirolimus y Velcade®;
j) Tositumomab con yodo 131 (Bexxar®) y CHOP;
- 25 k) CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona);
l) R-CVP (rituximab-CVP);
m) ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido);
n) R-ICE (rituximab-ICE);
o) FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab);
- 30 p) FR (fludarabina, rituximab); y
q) D.T. PACE (dexametasona, talidomida, cisplatino, Adriamycin®, ciclofosfamida, etopósido).

En aspectos alternativos de la divulgación, el compuesto se usa en combinación con un procedimiento terapéutico. En particular, el procedimiento terapéutico se selecciona del grupo que consiste en trasplante de células madre de sangre periférica, trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas, trasplante de médula ósea autóloga, terapia con anticuerpos, terapia biológica, terapia con inhibidor enzimático, irradiación corporal total, infusión de células madre, ablación de médula ósea con soporte de células madre, trasplante de células madre de sangre periférica tratadas *in vitro*, trasplante de sangre del cordón umbilical, técnica inmunoenzimática, método de tinción inmunohistoquímica, estudio farmacológico, terapia con rayos gamma con cobalto 60 de bajo LET, bleomicina, cirugía convencional, terapia con radiación, quimioterapia de dosis alta y trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas no mieloablativas.

40 En un aspecto particular de la divulgación, el método comprende además obtener una muestra biológica de dicho paciente; y analizar dicha muestra biológica con un procedimiento analítico seleccionado del grupo que consiste en análisis de química sanguínea, análisis de translocación cromosómica, biopsia con aguja, hibridación de fluorescencia *in situ*, análisis con biomarcador de laboratorio, método de tinción inmunohistoquímica, citometría de flujo o una combinación de los mismos.

45 Para fines de nomenclatura, los componentes de quinazolinilo y purinilo del compuesto están numerados en consecuencia:



Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye radicales hidrocarbilo monovalentes de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos, y combinaciones de estos, que contienen solo C y H cuando están no sustituidos. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, isobutilo, ciclohexilo, ciclopentiletilo y similares. El número total de átomos de carbono en cada uno de tales grupos se describe a veces en la presente memoria, por ejemplo, cuando el grupo puede contener hasta diez átomos de carbono, se puede representar como 1-10C o como C1-C10 o C1-10.

"Halo", como se usa en el presente documento, incluye flúor, cloro, bromo y yodo. Flúor y cloro son a menudo preferidos.

El término "inhibidor de PI3K δ selectivo" o "inhibidor de PI3K β selectivo", etc., como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que inhibe la isozima PI3K δ o PI3K β , respectivamente, más eficazmente que al menos otras isozimas de la familia PI3K. El inhibidor selectivo también puede ser activo contra otras isozimas de PI3K, pero requiere concentraciones más altas para lograr el mismo grado de inhibición de las otras isozimas. "Selectivo" también se puede usar para describir un compuesto que inhibe una PI3-quinasa particular más que un compuesto comparable. Se entiende que un compuesto "inhibidor de PI3K δ selectivo" es más selectivo para PI3K δ que los compuestos designados convencional y genéricamente como inhibidores de PI3K, por ejemplo, wortmanina o LY294002. Concomitantemente, la wortmanina y LY294002 se consideran "inhibidores no selectivos de PI3K". Los compuestos de cualquier tipo que regulan selectivamente negativamente la expresión o actividad de PI3K δ se pueden usar como inhibidores selectivos de PI3K δ . Además, los compuestos de cualquier tipo que regulan selectivamente negativamente la expresión o actividad de PI3K δ y que poseen propiedades farmacológicas aceptables pueden usarse como inhibidores selectivos de PI3K δ . Sin estar limitados por la teoría, dirigir la inhibición de p110 delta con un compuesto de la invención proporciona un nuevo enfoque para el tratamiento de neoplasias hematológicas porque este método inhibe la señalización constitutiva que da como resultado la destrucción directa de la célula tumoral. Además, sin estar limitados por la teoría, la inhibición de p110 delta reprime las señales microambientales que son cruciales para la migración, supervivencia y proliferación de células tumorales.

En una realización alternativa, los compuestos de cualquier tipo que regulan selectivamente negativamente la expresión o actividad de PI3K β pueden usarse como inhibidores selectivos de PI3K β en la invención. Además, los compuestos de cualquier tipo que regulan selectivamente negativamente la expresión o actividad de PI3K β y que poseen propiedades farmacológicas aceptables pueden usarse como inhibidores selectivos de PI3K β en la invención.

"Tratamiento" como se usa en el presente documento se refiere a inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo; aliviar el trastorno, es decir, provocar su regresión; o mejorar el trastorno, es decir, reducir la gravedad de al menos uno de los síntomas asociados con el trastorno. En algunas realizaciones, "tratar" se refiere a evitar que se produzca un trastorno en un animal que puede estar predispuesto al trastorno, pero que aún no se ha diagnosticado que lo tenga. "Trastorno" pretende abarcar trastornos médicos, enfermedades, afecciones, síndromes y similares, sin limitación.

"Enfermedad autoinmune" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier grupo de trastornos en los que la lesión tisular está asociada con respuestas humorales o mediadas por células a los propios constituyentes del cuerpo.

En otro aspecto, la invención incluye un compuesto para usar en un método para suprimir una función de basófilos y/o mastocitos, y de ese modo permitir el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una actividad basófila y/o de mastocitos excesiva o indeseable. Se puede usar un compuesto de la invención que inhibe selectivamente la expresión o actividad de la fosfatidilinositol 3-quinasa delta (PI3K δ) en los basófilos y/o mastocitos. Preferiblemente, el método emplea un inhibidor de PI3K δ en una cantidad suficiente para inhibir la liberación estimulada de histamina por los basófilos y/o los mastocitos. Por consiguiente, el uso de tales compuestos y otros inhibidores selectivos de PI3K δ puede ser valioso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por liberación de histamina, es decir, trastornos alérgicos, incluidos trastornos tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, ARDS, enfisema y trastornos relacionados.

La presente divulgación permite métodos para tratar enfermedades tales como enfermedades artríticas, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis monoarticular, osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis; enfermedad de Behçet; sepsis, choque séptico, choque endotóxico, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva y síndrome de choque tóxico; síndrome de lesión de órgano múltiple secundario a septicemia, trauma o hemorragia; trastornos oftálmicos tales como conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, uveítis y oftalmopatía asociada a tiroides; granuloma eosinofílico; trastornos pulmonares o respiratorios como asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica, ARDS, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), silicosis, sarcoidosis pulmonar, pleuresía, alveolitis, vasculitis, enfisema, neumonía, bronquiectasia y toxicidad pulmonar por oxígeno; lesión por reperusión del miocardio, cerebro o extremidades; fibrosis tal como fibrosis quística; formación de queloides o formación de tejido cicatricial; aterosclerosis; enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis

autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes y síndrome de Reynaud; y trastornos de rechazo de trasplantes tales como enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y rechazo de aloinjerto; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad inflamatoria intestinal crónica (CIBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrosante; dermatosis inflamatoria tal como dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis o urticaria; fiebre y mialgias debido a una infección; trastornos inflamatorios del sistema nervioso central o periférico tales como meningitis, encefalitis y lesión cerebral o de la médula espinal debido a un trauma menor; síndrome de Sjogren; enfermedades que implican diapedesis leucocitaria; hepatitis alcohólica; neumonía bacteriana; enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo; choque hipovolémico; diabetes mellitus tipo I; hipersensibilidad aguda y retrasada; estados de enfermedad debidos a discrasia leucocitaria y metástasis; lesión térmica; síndromes asociados a transfusión de granulocitos; y toxicidad inducida por citoquinas.

El método puede tener utilidad en el tratamiento de sujetos que están o pueden estar sujetos a lesión por reperfusión, es decir, lesión resultante de situaciones en las que un tejido u órgano experimenta un período de isquemia seguido de reperfusión. El término "isquemia" se refiere a la anemia tisular localizada debido a la obstrucción de la entrada de sangre arterial. La isquemia transitoria seguida de reperfusión da como resultado la activación de neutrófilos y la trans migración a través del endotelio de los vasos sanguíneos en el área afectada. La acumulación de neutrófilos activados a su vez da como resultado la generación de metabolitos de oxígeno reactivos, que dañan los componentes del tejido u órgano afectado. Este fenómeno de "lesión por reperfusión" se asocia comúnmente con afecciones tales como apoplejía vascular (que incluye isquemia global y focal), choque hemorrágico, isquemia o infarto de miocardio, trasplante de órganos y vasoespasmo cerebral. Para ilustrar, la lesión por reperfusión ocurre al finalizar los procedimientos de bypass cardíaco o durante un paro cardíaco cuando el corazón, una vez que se previene la recepción de sangre, comienza a reperfundirse. Se espera que la inhibición de la actividad de PI3K dé como resultado cantidades reducidas de lesión por reperfusión en tales situaciones.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos para uso en métodos para tratar un tumor sólido. En realizaciones específicas, el cáncer es cáncer de mama, pulmón, colon o próstata. En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos para uso en métodos para tratar un tumor sólido que está asociado con actividad de señalización celular anormal o indeseable mediada por PI3K β . En ciertas realizaciones, un tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de páncreas; cáncer de vejiga; cáncer colorrectal; cáncer de mama, incluido cáncer de mama metastásico; cáncer de próstata, incluido el cáncer de próstata dependiente de andrógenos e independiente de andrógenos; cáncer renal, que incluye, por ejemplo, carcinoma de células renales metastásico; cáncer hepatocelular; cáncer de pulmón, que incluye, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma bronquioloalveolar (BAC) y adenocarcinoma de pulmón; cáncer de ovario, que incluye, por ejemplo, cáncer peritoneal epitelial o primario progresivo; cáncer de cuello uterino; cáncer gástrico; cáncer de esófago; cáncer de cabeza y cuello, que incluye, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; melanoma; cáncer neuroendocrino, incluidos tumores neuroendocrinos metastásicos; tumores cerebrales, que incluyen, por ejemplo, glioma, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma multiforme de adulto y astrocitoma anaplásico de adulto; cáncer de hueso; y sarcoma de tejidos blandos.

Se ha encontrado que la ablación genética de p110 δ da como resultado un fenotipo leve restringido al sistema inmune. Las observaciones generales incluyen organismos que son fértiles sin grandes anomalías anatómicas o de comportamiento. Un examen histológico reveló que los órganos principales parecen normales. La actividad total de PI3K clase I se redujo 30-50% en las células B y T. Además, no se observó un aumento en la susceptibilidad a las infecciones. Además, el efecto en el sistema hematopoyético incluye recuentos de células sanguíneas periféricas normales, la aparición de hipoplasia linfóide y la falta de centros germinales en el bazo y los ganglios linfáticos, un número reducido de progenitores de B220 + IgM + células B en la médula ósea, un nivel reducido de la inmunoglobulina sérica y el desarrollo normal de las células T en el timo.

La ablación genética de p110 δ afecta la señalización de células B y mieloides, que es importante para la oncogénesis. En particular, la señalización, el desarrollo, la proliferación y la supervivencia de la tirosina quinasa se ven afectados en las células mieloides. La función de las células B es la más afectada e incluye la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la respuesta a los factores de supervivencia de las células B (BCR, CD40, IL-4, quimioquinas). Por lo tanto, la invención incluye compuestos para uso en métodos para tratar estados de enfermedad en los que una o más de estas funciones mieloides y de células B son anormales o indeseables.

Un inhibidor pan PI3K que se dirige a un nivel molecular p110 α , p110 β , p110 δ , p110 γ , (hVPS34, mTOR, ADN-PK y otros), a su vez se dirige a todos los tejidos. La posible indicación clínica incluye cáncer, pero los eventos adversos clínicos incluyen hiperinsulinemia en pacientes con cáncer. La ventaja de un inhibidor selectivo de p110 δ que se dirige a células mediadoras de inflamación y células cancerosas, donde la indicación clínica potencial incluye cáncer, artritis reumatoide, asma, alergias y EPOC, es que el tratamiento es bien tolerado y se evitan los efectos secundarios como la hiperinsulinemia. Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar pacientes que tienen resistencia a la insulina, o diabetes tipo 2, para cáncer, artritis reumatoide, asma, alergias, COPD u otras afecciones tratables con los compuestos de la invención. Para los pacientes que necesitan dicho tratamiento que tienen condiciones o tendencias de insulina excesivas, los compuestos de la divulgación son particularmente ventajosos con respecto a los inhibidores de pan-PI3K. En ciertos aspectos, se prefiere un compuesto de fórmula I o I' porque proporciona beneficios terapéuticos para tratar neoplasias hematológicas sin afectar negativamente a la señalización de insulina.

En una realización, la invención se refiere a compuestos para uso en métodos de inhibición de p110δ de PI3K. En otra realización, la invención se refiere a compuestos para uso en métodos de inhibición de p110β o p110γ de PI3K.

En ciertas realizaciones, el método descrito en la presente invención tiene poca o ninguna actividad fuera del objetivo. En particular, el compuesto de fórmula I usado en el método muestra poca actividad contra más de 300 proteína quinasas incluyendo las resumidas en la Tabla 3 del Ejemplo 16. En ciertas realizaciones, el método descrito aquí tiene efectos de hiperinsulinemia mínimos o nulos en pacientes con cáncer en comparación con los métodos que comprenden la administración de inhibidores de pan-PI3K. En ciertas realizaciones, el método descrito en este documento es útil para seleccionar células que median en la fosforilación de Akt, porque los compuestos de Fórmula A inhiben la fosforilación de Akt. Por lo tanto, se pueden seleccionar pacientes adecuados para el tratamiento con los compuestos de la invención, en una realización, seleccionando un paciente que presente una fosforilación de Akt elevada asociada con un cáncer hematopoyético tal como linfoma, leucemia o mieloma múltiple.

Los métodos en el presente documento evitan responsabilidades fuera de objetivo y se caracterizan por resultados negativos en cribados gram de receptores, que no tienen inhibición de hERG ni inhibición significativa de P450.

Otra ventaja de la invención es la ausencia de efectos adversos cardiovasculares, respiratorios o del sistema nervioso central como se demuestra en estudios de farmacología de seguridad. Además, un estudio de toxicidad de 28 días en ratas y perros demostró un alto índice terapéutico, por ejemplo, un NOAEL (nivel de efecto adverso no observable) >> 10 μM. Esta es la dosis experimental más alta de un compuesto químico a la cual no hay un aumento estadísticamente o biológicamente significativo en la frecuencia o severidad de un efecto toxicológico entre un grupo expuesto y su control apropiado. Los efectos adversos se definen como cualquier efecto que produzca un deterioro funcional y/o lesiones patológicas que puedan afectar el rendimiento de todo el organismo o que reduzcan la capacidad del organismo para responder a un desafío adicional.

En otro aspecto, los métodos no son genotóxicos en una batería estándar de pruebas.

Otra ventaja de la invención es que la selectividad del compuesto para una o dos isoformas de PI3K da como resultado un perfil de seguridad mejorado sobre los compuestos que tienen inhibición de pan-PI3K. En otra ventaja más, el compuesto I tiene un perfil farmacocinético favorable con buena cobertura objetivo, y sin efectos adversos sobre los niveles de glucosa o insulina, y es bien tolerado a dosis superiores a las dosis terapéuticas comúnmente usadas por voluntarios sanos normales. Otra ventaja de la invención incluye la capacidad de tratar una amplia gama de neoplasias hematológicas como se demuestra mediante los ejemplos de este documento.

Los compuestos para los métodos de la invención se dirigen al tratamiento de una neoplasia hematológica. En realizaciones específicas, la neoplasia hematológica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL). En ciertas realizaciones, el linfoma no Hodgkin se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes (LDBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) y linfoma linfoplasmacítico.

PI3K está implicada en muchas neoplasias hematológicas y se ha establecido una prueba preclínica de concepto relacionada con el tratamiento con el compuesto I. La siguiente tabla resume neoplasias hematológicas particulares y el método de acción sobre célula primaria del paciente o la línea celular de enfermedad.

Indicación	Efectos de los compuestos de fórmula A
	Células primarias del paciente
Leucemia linfocítica crónica (CLL)	Induce la apoptosis
	Bloquea los factores de supervivencia
	Células primarias del paciente
Leucemia mielógena aguda (AML)	Bloquea la señalización de PI3K
	Inhibe la proliferación
	Líneas celulares
Leucemia linfocítica aguda (ALL)	Bloquea la señalización de PI3K
	Induce la apoptosis
Linfomas no Hodgkin (NHL) (MCL, DLBCL, FL)	Líneas celulares
	Bloquea la señalización de PI3K

Mieloma múltiple (MM)	Induce la apoptosis Células primarias del paciente P110δ sobreexpresado en 24/24 muestras Induce la apoptosis
-----------------------	--

Los datos proporcionados en este documento demuestran que los compuestos para usar en la invención son útiles para tratar linfomas y leucemias. Los linfomas y las leucemias generalmente expresan la isoforma delta de p110 selectivamente, por ejemplo, la Figura 15 demuestra que p110δ es prevalente en la mayoría de las líneas celulares de linfoma, mientras que p110α generalmente no se observa. Además, los datos presentados en la Figura 16A muestran que los cultivos celulares de seis líneas celulares de leucemia diferentes eran sensibles al Compuesto I, y se vieron fuertemente afectados por concentraciones 5-10 micromolares de este compuesto. Las Figuras 8 y 9 soportan el compuesto I mientras reducen la producción de Akt (Ser473) en varias líneas celulares.

La CLL, por ejemplo, produce principalmente p110δ y en menor medida p110γ con fines de señalización, por lo que se espera que los compuestos que inhiben p110δ y/o p110γ presenten citotoxicidad selectiva hacia estas células. En el Ejemplo 3, por ejemplo, se muestra citotoxicidad dependiente de la dosis para el compuesto I (Figura 3) en células de CLL, incluyendo células tomadas de pacientes de pronóstico pobre (Figura 19), y células de pacientes que se muestran resistentes a otros tratamientos de CLL (Figura 20). Además, el Ejemplo 13 y la Figura 13 demuestran que el compuesto I administrado a un paciente con CLL a una velocidad de 50 mg BID durante un ciclo de 28 días proporciona un efecto terapéutico significativo. Se observa una disminución del porcentaje de concentración de ALC en los linfocitos. Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona compuestos para usar en métodos para tratar pacientes con CLL con CLL resistente a fármacos usando compuestos de Fórmula A. Por otro lado, el Ejemplo 17 sugiere que una línea celular de fibroblastos que depende principalmente de p110α para señalización no era sensible al Compuesto I. Por lo tanto, en un aspecto, la selección del paciente puede incluir la exclusión de pacientes que tienen un cáncer que depende principalmente de p110α para la señalización.

Los compuestos de Fórmula A también son útiles para tratar el linfoma, que incluye linfomas tanto de células B como de células T. Los datos en la Figura 4 demuestran que seis líneas celulares de ALL diferentes eran sensibles al Compuesto I, lo que causó una reducción significativa en la viabilidad celular en las seis líneas celulares.

La Figura 12 y el Ejemplo 12 demuestran que los pacientes con linfoma de células de manto tratados con 50 mg BID del Compuesto I durante 28 días experimentaron en promedio una disminución del 44% en la carga tumoral. Además, la Figura 14 demuestra que un paciente con MCL al final del ciclo de 28 días experimentó niveles plasmáticos similares del Compuesto I después de la administración de una dosis de 50 mg a la observada en un voluntario sano normal (NHV); por lo tanto, el compuesto no se acumula excesivamente en el transcurso de un ciclo de tratamiento, ni el paciente se vuelve tolerante por un metabolismo aumentado en el transcurso de un ciclo de tratamiento.

Además, los compuestos de Fórmula A, o Fórmula I, son útiles para tratar cánceres hematopoyéticos que expresan constitutivamente la actividad de fosforilación de Akt. El Ejemplo 8 y las Figuras 8 y 9 enumeran líneas celulares de cáncer que demuestran la fosforilación de Akt constitutiva, que incluyen linfomas de células B, linfomas de células T, ALL, histiocitosis maligna, DLBCL y AML. La exposición de la célula al compuesto I da como resultado la reducción de la fosforilación de Akt. Véase también el Ejemplo 19, que muestra que la fosforilación constitutiva de Akt fue inhibida por el Compuesto I en 13 de 13 líneas celulares.

En ciertas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido. En realizaciones específicas, el cáncer es cáncer de mama, ovario, pulmón, colon o próstata. La Figura 6, por ejemplo, muestra que el Compuesto I reduce la proliferación celular de dos líneas celulares de cáncer de mama, y la Figura 10 ilustra la citotoxicidad para tres líneas celulares de cáncer de mama diferentes. De manera similar, la Figura 7 demuestra que el Compuesto I es citotóxico para dos líneas celulares de cáncer de ovario.

Para el tratamiento de un tumor sólido, es ventajoso usar un compuesto de Fórmula A que exprese buena actividad (por ejemplo, IC₅₀ menos de aproximadamente 1 μM, y preferiblemente menos de aproximadamente 250 nM, véase el Ejemplo 15) contra p110β, ya que los tumores sólidos a menudo utilizan esta isoenzima en lugar de o más que p110δ. Por lo tanto, se prefiere un compuesto de fórmula A que tenga una IC₅₀ inferior a aproximadamente 250 nM para el tratamiento de un tumor sólido; el compuesto I, I', II o II' es adecuado para este uso, como se demuestra en la presente invención.

En algunas realizaciones, el sujeto para los tratamientos descritos en este documento como uno que ha sido diagnosticado con al menos una de las afecciones descritas en este documento como tratables mediante el uso de un compuesto de Fórmula A. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado con un cáncer nombrado en este documento, y ha demostrado ser refractario al tratamiento con al menos un agente quimioterapéutico convencional. Por ejemplo, los pacientes que no han respondido a tratamientos tales como inhibidores del proteasoma, trasplante autólogo de células madre, regímenes CHOP, rituximab, fludarabina, alemtuzumab, análogos de nucleósidos anticancerosos

convencionales y agentes alquilantes responden frecuentemente a los métodos de tratamiento descritos en este documento. Por lo tanto, en una realización, los tratamientos de la invención se dirigen a pacientes que han recibido uno o más de dichos tratamientos.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos para uso en los métodos de la invención se dirigen a enfermedades relacionadas con células B o linfocitos B. Las células B juegan un papel en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes.

10 Los compuestos de Fórmula A (particularmente Fórmulas I, I', II y II') son adecuados para tratar una variedad de sujetos que tienen las afecciones descritas en la presente memoria, especialmente cánceres hematológicos en seres humanos. En algunas realizaciones, el sujeto seleccionado para el tratamiento de una neoplasia hematológica que es un sujeto que experimenta una recaída después de otros tratamientos o es refractario a otros tratamientos. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona para el tratamiento de una neoplasia hematológica que es resistente a otros fármacos contra el cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona para el tratamiento de una neoplasia hematológica que exhibe un alto nivel de actividad de p110δ. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona para el tratamiento de una neoplasia hematológica que exhibe un nivel relativamente bajo de actividad de p110α. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona para el tratamiento de una neoplasia hematológica que expresa constitutivamente la actividad de fosforilación de Akt.

20 En una realización, los compuestos para uso en un método descrito en este documento comprenden administrar a un sujeto un compuesto de fórmula A descrito en este documento, en combinación con una terapia usada para tratar cáncer. "Terapia" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, es un tratamiento de cáncer por cualquier forma de tratamiento convencional o experimental bien conocida usada para tratar el cáncer que no incluye el uso de un compuesto de fórmula A. En ciertas realizaciones, la combinación de un compuesto de fórmula A con una terapia convencional o experimental usada para tratar el cáncer proporciona resultados de tratamiento beneficiosos y/o deseables superiores a los resultados obtenidos por el tratamiento sin la combinación. Las terapias usadas para tratar el cáncer o una enfermedad autoinmune son bien conocidas por una persona con experiencia ordinaria en la técnica y se describen en la bibliografía. Las terapias incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, combinaciones de quimioterapia, terapias biológicas, inmunoterapia, radioinmunoterapia y el uso de anticuerpos monoclonales y vacunas.

25 En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto de fórmula A se administra simultáneamente con o durante el período de administración de la terapia. En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto de fórmula A se administra simultáneamente con el otro tratamiento quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula A se administra antes o después de la administración de la terapia.

30 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos una quimioterapia estándar o experimental. En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos dos quimioterapias estándar o experimentales. En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos tres quimioterapias estándar o experimentales. En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos cuatro quimioterapias estándar o experimentales.

35 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos una quimioterapia estándar o experimental seleccionada del grupo que consiste en fludarabina, rituximab, agentes alquilantes, alemtuzumab y los tratamientos de quimioterapia a-q enumerados anteriormente.

40 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos dos quimioterapias estándar o experimentales seleccionadas del grupo que consiste en fludarabina, rituximab, agentes alquilantes, alemtuzumab y los tratamientos quimioterapéuticos a-q enumerados anteriormente.

En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos tres quimioterapias estándar o experimentales seleccionadas del grupo que consiste en fludarabina, rituximab, agentes alquilantes, alemtuzumab y los tratamientos de quimioterapia a-q enumerados anteriormente.

45 En algunas de las realizaciones anteriores, el sujeto es refractario a al menos cuatro quimioterapias estándar o experimentales seleccionadas del grupo que consiste en fludarabina, rituximab, agentes alquilantes, alemtuzumab y los tratamientos quimioterapéuticos a-q enumerados anteriormente.

50 Los detalles exactos con respecto a la administración de la combinación se pueden determinar experimentalmente. El refinamiento de la secuencia y el momento de administrar un compuesto de fórmula A con una terapia seleccionada se adaptarán al sujeto individual, la naturaleza de la afección a tratar en el sujeto y, generalmente, al juicio del facultativo que lo atiende.

55 Ejemplos no limitativos de terapia experimental o estándar se describen a continuación. Además, el tratamiento de ciertos linfomas se revisa en Cheson, B.D., Leonard, J.P., "Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma" The New England Journal of Medicine 2008, 359(6), páginas 613-626; y Wierda, W.G., "Current and Investigational Therapies for Patients with CLL" Hematology 2006, páginas 285-294. Los patrones de incidencia de linfoma en los Estados Unidos se describen en Morton, L.M., et al., "Lymphoma Incidence Patterns by WHO Subtype in the United States, 1992-2001" Blood 2006, 107(1), páginas 265-276.

El tratamiento de linfomas no Hodgkin, especialmente de origen en células B, incluye, pero no se limita a, el uso de anticuerpos monoclonales, enfoques de quimioterapia estándar (por ejemplo, CHOP, CVP, FCM, MCP y similares), radioinmunoterapia y combinaciones de los mismos, especialmente la integración de una terapia de anticuerpos con quimioterapia.

- 5 Los ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales no conjugados para cánceres de linfoma no Hodgkin/células B incluyen rituximab, alemtuzumab, anticuerpos anti-CD20 humanos o humanizados, lumiliximab, anti-TRAIL, bevacizumab, galiximab, epratuzumab, SGN-40, y anti-CD74. Los ejemplos no limitantes de agentes de anticuerpos experimentales usados en el tratamiento de cánceres de linfoma no Hodgkin/células B incluyen ofatumumab, ha20, PRO131921, alemtuzumab, galiximab, SGN-40, CHIR-12.12, epratuzumab, lumiliximab, apolizumab, milatuzumab y bevacizumab. Cualquiera de los anticuerpos monoclonales puede combinarse con rituximab, fludarabina o un agente/régimen de quimioterapia.

- 10 Los ejemplos no limitantes de regímenes estándar de quimioterapia para cánceres de linfoma no Hodgkin/células B incluyen CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona), CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), MCP (mitoxantrona, clorambucilo y prednisolona), R-CHOP (rituximab más CHOP), R-FCM (rituximab más FCM), R-CVP (rituximab más CVP) y R-MCP (R-MCP).

- 15 Los ejemplos no limitantes de radioinmunoterapia para cánceres de linfoma no Hodgkin/células B incluyen ibritumomab tiuxetano marcado con itrio 90 y tositumomab marcado con yodo 131. Estos agentes terapéuticos están aprobados para su uso en sujetos con linfoma folicular o de bajo grado recidivante o refractario.

- 20 Los tratamientos terapéuticos para el linfoma de células del manto incluyen quimioterapias de combinación tales como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), hiperCVAD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina) y FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona). Además, estos regímenes se pueden complementar con el anticuerpo monoclonal rituximab (Rituxan) para formar terapias de combinación R-CHOP, hiperCVAD-R y R-FCM. Otros enfoques incluyen la combinación de cualquiera de las terapias mencionadas anteriormente con el trasplante de células madre o el tratamiento con ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido).

- 25 Otro enfoque para tratar el linfoma de células del manto incluye inmunoterapia tal como el uso de anticuerpos monoclonales como rituximab (Rituxan). Rituximab también es efectivo contra otros cánceres de células B indolentes, incluidos linfoma de zona marginal, WM, CLL y linfoma linfocítico pequeño. Una combinación de rituximab y agentes de quimioterapia es especialmente efectiva. Un enfoque modificado es la radioinmunoterapia, en la que un anticuerpo monoclonal se combina con una partícula de radioisótopo, tal como tositumomab con yodo-131 (Bexxar®) y ibritumomab tiuxetano con itrio-90 (Zevalin®). En otro ejemplo, Bexxar® se usa en tratamiento secuencial con CHOP. Otro ejemplo de inmunoterapia incluye el uso de vacunas contra el cáncer, que se basa en la composición genética del tumor de un paciente individual. Un ejemplo de vacuna contra el linfoma es GTOP-99 (MyVax®).

- 30 Otro enfoque para tratar el linfoma de células del manto incluye el trasplante autólogo de células madre acoplado con altas dosis de quimioterapia.

- 35 Otro enfoque para tratar el linfoma de células del manto incluye la administración de inhibidores del proteasoma, tales como Velcade® (bortezomib o PS-341), o agentes antiangiogénesis, tales como talidomida, especialmente en combinación con Rituxan. Otro enfoque de tratamiento es administrar medicamentos que conducen a la degradación de la proteína Bcl-2 y aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a la quimioterapia, tal como oblimersen (Genasense) en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Otro enfoque de tratamiento incluye la administración de inhibidores de mTOR, que puede conducir a la inhibición del crecimiento celular e incluso a la muerte celular; un ejemplo no limitante es Temsirolimus (CCI-779) y Temsirolimus en combinación con Rituxan®, Velcade® u otros agentes quimioterapéuticos.

- 40 Se han divulgado otras terapias recientes para MCL (Nature Reviews; Jares, P. 2007). Los ejemplos no limitantes incluyen Flavopiridol, PD0332991, R-roscovitina (Seliciclib, CYC202), estiril sulfonas, Obatoclax (GX15-070), TRAIL, anticuerpos Anti-TRAIL DR4 y DR5, Temsirolimus (CCI-779), Everolimus (RAD001), BMS-345541, curcumina, vorinostat (SAHA), talidomida, lenalidomida (Revlimid®, CC-5013) y geldanamycin (17-AAG).

- 45 Los ejemplos no limitantes de otros agentes terapéuticos usados para tratar la macroglobulinemia de Waldenstrom incluyen perifosina, bortezomib (Velcade®), rituximab, citrato de sildenafil (Viagra®), CC-5103, talidomida, epratuzumab (anticuerpo humanizado hLL2 anti-CD22), simvastatina, enzastaurina, campath-1H, dexametasona, DT PACE, oblimersen, antineoplastona A10, antineoplastona AS2-1, alemtuzumab, beta aletina, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina, prednisona, sulfato de vincristina, fludarabina, filgrastim, melfalán, interferón alfa recombinante, carmustina, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, etopósido, melfalán, dolastatina 10, anticuerpo monoclonal MN-14 con indio In11, epratuzumab humanizado con itrio Y90, globulina anti-timocito, busulfán, ciclosporina, metotrexato, mofetil micofenolato, linfocitos alogénicos terapéuticos, ibritumomab tiuxetano con itrio Y90, sirolimus, tacrolimus, carboplatino, tiotepa, paclitaxel, aldesleuquina, interferón alfa recombinante, docetaxel, ifosfamida, mesna, interleuquina-12 recombinante, interleucina-11 recombinante, inhibidor ABT-263 de la proteína de la familia Bcl-2, denileuquina diftotox, tanespimicina, everolimus, pegfilgrastim, vorinostat, alvocidib, ligando recombinante flt3, trombopoyetina humana

recombinante, células asesinas activadas por linfoquina, trihidrato de amifostina, aminocamptotecina, clorhidrato de irinotecano, acetato de caspofungina, clofarabina, epoetina alfa, nelarabina, pentostatina, sargramostim, ditartrato de vinorelbina, vacuna peptídica análoga WT-1, vacuna peptídica WT1 126-134, fenretinida, ixabepilona, oxaliplatino, anticuerpo monoclonal CD19, anticuerpo monoclonal CD20, ácidos grasos omega-3, clorhidrato de mitoxantrona, acetato de octreótido, tositumomab y tositumomab con yodo I 131, motexafina gadolinio, trióxido de arsénico, tipifarnib, HSPPC-96 derivado del tumor autólogo humano, veltuzumab, briostatina 1, y clorhidrato de doxorubicina liposomal PEGilada, y cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de otros agentes terapéuticos usados para tratar terapias con fármacos para el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (Blood 2005 Abramson, J.) incluyen ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, anticuerpos monoclonales anti-CD20, etopósido, bleomicina, muchos de los agentes enumerados para Waldenstrom, y cualquier combinación de los mismos, como ICE y R-ICE.

Los ejemplos no limitantes de procedimientos terapéuticos usados para tratar la macroglobulinemia de Waldenstrom incluyen trasplante de células madre de sangre periférica, trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas, trasplante autólogo de médula ósea, terapia de anticuerpos, terapia biológica, terapia inhibidora de enzimas, irradiación corporal total, infusión de células madre, ablación de médula ósea con soporte de células madre, trasplante de células madre de sangre periférica tratadas *in vitro*, trasplante de sangre del cordón umbilical, técnica de inmunoenzimas, estudio farmacológico, terapia con rayos gamma con cobalto-60 de bajo LET, bleomicina, cirugía convencional, radioterapia y trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas no mieloablativas.

Los ejemplos no limitantes de otros agentes terapéuticos usados para tratar la leucemia linfocítica crónica (Spectrum, 2006, Fernandes, D.) incluyen clorambucil (Leukeran), ciclofosfamida (Cyloxan, Endoxan, Endoxana, Cyclostin), fludarabina (Fludara), Pentostatina (Nipent), Cladribina (Leustarin), Doxorubicina (Adriamycin®, Adriblastina), Vincristina (Oncovin), Prednisona, Prednisolona, Alemtuzumab (Campath, MabCampath), muchos de los agentes enumerados para Waldenstrom, y quimioterapia combinada y quimioinmunoterapia, incluida el régimen común de combinación: CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); R-CVP (rituximab-CVP); ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido); R-ICE (rituximab-ICE); FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab); y FR (fludarabina, rituximab).

En ciertas realizaciones, el método comprende administrar además de un compuesto de I o II a dicho paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico y/o procedimiento terapéutico seleccionado para tratar dicho cáncer o enfermedad autoinmune en dicho paciente. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar además de un compuesto de I o II a dicho paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en a) CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona); b) R-CHOP (rituximab-CHOP); c) hiperCVAD (ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato, citarabina); d) R-hiperCVAD (rituximab-hiperCVAD); e) FCM (fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona); f) R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona); g) bortezomib y rituximab; h) temsirolimus y rituximab; i) temsirolimus y Velcade®; j) Tositumomab con yodo-131 (Bexxar®) y CHOP; k) CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); l) R-CVP (rituximab-CVP); m) ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido); n) R-ICE (rituximab-ICE); o) FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab); y p) FR (fludarabina, rituximab).

Los compuestos para uso en la invención se pueden formular para administración a un sujeto animal usando técnicas de formulación comúnmente conocidas en el arte. Las formulaciones que son adecuadas para modos particulares de administración y para los compuestos de fórmula A se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Se puede administrar un compuesto para uso en un método de tratamiento de la presente invención como el producto químico puro, pero típicamente es preferible administrar el compuesto en forma de una composición o formulación farmacéutica. De acuerdo con esto, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para uso en un método de tratamiento que comprende un compuesto de fórmula A y un portador adyuvante o vehículo farmacéutico biocompatible. La composición puede incluir el compuesto de Fórmula A como única fracción activa o en combinación con otros agentes, tales como oligo o polinucleótidos, oligo o polipéptidos, fármacos u hormonas mezcladas con un excipiente o excipientes u otros portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores y otros ingredientes pueden considerarse farmacéuticamente aceptables en la medida en que sean compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas se formulan para contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, y opcionalmente pueden comprender excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La modalidad de administración generalmente determinará la naturaleza del portador. Por ejemplo, las formulaciones para administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Los portadores adecuados para administración parenteral se pueden seleccionar entre solución salina, solución salina regulada, dextrosa, agua y otras soluciones fisiológicamente compatibles. Los vehículos preferidos para administración parenteral son reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente regulada. Para la administración tisular o celular, se usan penetrantes apropiados para la barrera particular a permear en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para preparaciones que comprenden proteínas, la formulación puede incluir materiales estabilizantes, tales como polioles (por ejemplo, sacarosa) y/o tensioactivos (por

ejemplo, tensioactivos no iónicos) y similares.

Alternativamente, las formulaciones para uso parenteral pueden comprender dispersiones o suspensiones de los compuestos activos preparados como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo y ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Los polímeros acuosos que proporcionan solubilización sensible al pH y/o liberación sostenida del agente activo también pueden usarse como revestimientos o estructuras de matriz, por ejemplo, polímeros metacrílicos, tales como la serie Eudragit® disponible a través de Rohm America Inc. (Piscataway, N.J.). También se pueden usar emulsiones, por ejemplo, dispersiones de aceite en agua y agua en aceite, opcionalmente estabilizadas mediante un agente emulsionante o dispersante (materiales de superficie activa; tensioactivos). Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilén sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, goma tragacanto y mezclas de los mismos.

Los liposomas que contienen el compuesto activo de Fórmula A también se pueden emplear para administración parenteral. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Las composiciones en forma de liposoma también pueden contener otros ingredientes, tales como estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos incluyen fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*, vol. XIV, página 33, Academic Press, Nueva York (1976).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de Fórmula A en dosis adecuadas para administración oral pueden formularse usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, capsulas lisas, grageas, pastillas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, elixires, suspensiones o polvos. Para ilustrar, las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Las formulaciones orales pueden emplear portadores líquidos de tipo similar a los descritos para uso parenteral, por ejemplo, soluciones acuosas reguladas, suspensiones y similares.

Las formulaciones orales preferidas incluyen comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina. Estas preparaciones pueden contener uno o más excipientes, que incluyen, sin limitación:

a) diluyentes, tales como azúcares, que incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol;

b) aglutinantes, tales como silicato de magnesio y aluminio, almidón de maíz, trigo, arroz, patata, etc.;

c) materiales de celulosa, tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica, polivinil pirrolidona, gomas, tales como goma arábiga y goma tragacanto, y proteínas, tales como gelatina y colágeno;

d) agentes disgregantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, almidones, agar, ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio, o composiciones efervescentes;

e) lubricantes, tales como sílice, talco, ácido esteárico o su sal de magnesio o calcio, y polietilenglicol;

f) saborizantes y edulcorantes;

g) colorantes o pigmentos, por ejemplo, para identificar el producto o para caracterizar la cantidad (dosificación) del compuesto activo; y

h) otros ingredientes, tales como conservantes, estabilizadores, agentes de hinchamiento, agentes emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y reguladores.

En algunas formulaciones orales preferidas, la composición farmacéutica comprende al menos uno de los materiales del grupo (a) anterior, o al menos un material del grupo (b) anterior, o al menos un material del grupo (c) anterior, o al menos un material del grupo (d) anterior, o al menos un material del grupo (e) anterior. Preferiblemente, la composición comprende al menos un material de cada uno de los dos grupos seleccionados de los grupos (a) - (e) anteriores.

Las cápsulas de gelatina incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con rellenos, aglutinantes, lubricantes y/o estabilizantes, etc. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en fluidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Los núcleos de grageas se pueden proporcionar con recubrimientos adecuados tales como soluciones de azúcar

concentradas, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes.

La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal del compuesto activo. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que las correspondientes formas de ácidos o bases libres. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Los compuestos que contienen fracciones ácidas pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con cationes adecuados. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, cationes de metal alcalino (por ejemplo, sodio o potasio) y alcalinotérreos (por ejemplo, calcio o magnesio).

Los compuestos de fórmula estructural (A) que contienen fracciones básicas pueden formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con ácidos adecuados. Por ejemplo, Berge, et al., describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J Pharm Sci, 66: 1 (1977). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y purificación de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido adecuado.

Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, canforolsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxiitanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato o sulfato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato o hidrogenofosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico, y ácido cítrico.

Los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de alquilo de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo; y otros. Se obtienen así productos que tienen solubilidad o dispersabilidad modificada.

Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada. Por consiguiente, también se contempla un artículo de fabricación, tal como un recipiente que comprende una forma de dosificación de un compuesto de la invención y una etiqueta que contiene instrucciones para el uso del compuesto. Los kits también se contemplan en la invención. Por ejemplo, el kit puede comprender una forma de dosificación de una composición farmacéutica y un prospecto que contiene instrucciones para el uso de la composición en el tratamiento de una afección médica. En cualquier caso, las condiciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de trastornos inflamatorios, cáncer, etc.

Métodos de administración

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula A se pueden administrar al sujeto por cualquier método convencional, que incluye técnicas enteral y parenteral. Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en las que la composición se administra por una vía diferente a la del tracto gastrointestinal, por ejemplo, inyecciones intravenosas, intraarterial, intraperitoneal, intramedular, intramuscular, intraarticular, intratecal e intraventricular. Las modalidades de administración enteral incluyen, por ejemplo, administración oral (incluso bucal y sublingual) y rectal. Las modalidades de administración transepitelial incluyen, por ejemplo, administración transmucosal y administración transdérmica. La administración transmucosal incluye, por ejemplo, administración enteral, así como administración nasal, por inhalación y por vía pulmonar profunda; administración vaginal; y administración rectal. La administración transdérmica incluye modalidades transdérmicas o transcutáneas pasivas o activas, que incluyen, por ejemplo, parches y dispositivos de iontoforesis, así como la aplicación tópica de pastas, bálsamos o ungüentos. La administración parenteral también puede realizarse usando una técnica de alta presión, por ejemplo, POWDERJECT^{MR}.

Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de composiciones de depósito (reservorio), bombas osmóticas y similares. Una vía de administración preferida para el tratamiento de la inflamación puede ser la administración local o tópica para trastornos localizados tales como artritis o administración sistémica para trastornos distribuidos, por ejemplo, administración intravenosa para lesión por reperusión o para afecciones sistémicas tales como septicemia. Para otras enfermedades, incluyendo aquellas que implican el tracto respiratorio, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y enfisema, la administración puede realizarse por inhalación o administración pulmonar profunda de aerosoles, atomizadores, polvos y similares.

En algunas realizaciones anteriores, el compuesto de fórmula A se administra antes, durante o después de la administración de quimioterapia, radioterapia y/o cirugía. La formulación y la vía de administración elegidas se adaptarán al sujeto individual, la naturaleza de la afección que se tratará en el sujeto y, en general, al juicio del profesional que lo atiende.

- El índice terapéutico del compuesto de fórmula A puede potenciarse modificando o derivatizando los compuestos para la administración dirigida a células cancerosas que expresan un marcador que identifica las células como tales. Por ejemplo, los compuestos se pueden unir a un anticuerpo que reconoce un marcador que es selectivo o específico para células cancerosas, de modo que los compuestos se llevan a la vecindad de las células para ejercer sus efectos localmente, como se describió previamente (véase, por ejemplo, Pietersz, et al., Immunol Rev, 129: 57 (1992); Trail, et al., Science, 261: 212 (1993) y Rowlinson-Busza, et al., Curr Opin Oncol, 4: 1142 (1992).) La administración de estos compuestos dirigida a tumores aumenta el beneficio terapéutico al, entre otras cosas, minimizar las posibles toxicidades inespecíficas que pueden resultar de la radioterapia o la quimioterapia. En otro aspecto, el compuesto de fórmula A y los radioisótopos o agentes quimioterapéuticos pueden conjugarse con el mismo anticuerpo antitumoral.
- Las características del agente en sí mismo y la formulación del agente pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* del agente administrado. Dicha información farmacocinética y farmacodinámica puede recopilarse a través de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, después confirmados en humanos durante el transcurso de ensayos clínicos. De este modo, para cualquier compuesto usado en la invención, una dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos bioquímicos y/o basados en células. Luego, la dosificación puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante deseable que module la expresión o actividad de una isoforma de PI3K particular o una combinación de isoformas. A medida que se realicen estudios en humanos, surgirá más información con respecto a los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento de diversas enfermedades y afecciones.
- Aunque los compuestos de la invención son bien tolerados, un ejemplo de un límite para la dosificación de tratamiento son las pruebas de función hepática (LFT) elevadas. LFT implica pruebas de bioquímica clínica estándar en el suero o plasma del paciente para proporcionar información sobre el estado del hígado de un paciente. Los niveles, como alanina transaminasa, aspartato transaminasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina y gamma glutamil transpeptidasa, que están fuera del intervalo normal pueden indicar una posible toxicidad hepática. La dosificación del compuesto terapéutico puede ajustarse para evitar o reducir los valores elevados de la prueba de función hepática y el potencial posterior de toxicidad hepática. Por ejemplo, un sujeto puede recibir dosis crecientes de un compuesto. A una cierta cantidad de dosis, el sujeto comienza a desarrollar niveles elevados de LFT fuera de un intervalo normal, lo que indica toxicidad hepática potencial a esa dosis. En respuesta, la dosificación puede reducirse a una cantidad tal que los niveles de LFT se reduzcan a un intervalo aceptable según lo juzgado por el médico tratante, por ejemplo, un nivel que se encuentra en el intervalo normal para el sujeto que se está tratando, o dentro de aproximadamente el 25% al 50% de lo normal. Por lo tanto, las pruebas de función hepática se pueden usar para valorar la dosis de administración de un compuesto.
- La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el "índice terapéutico", que típicamente se expresa como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos, es decir, la dosis tóxica es sustancialmente mayor que la dosis efectiva. Los datos obtenidos de dichos ensayos de cultivo celular y estudios en animales adicionales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad.
- La dosificación puede estar limitada por síntomas de toxicidad relacionados con el tratamiento. Dichos síntomas además de pruebas de función hepática elevada incluyen anemia, visión borrosa, diarrea, vómitos, fatiga, mucositis, edema periférico, pirexia, neuropatía periférica, derrame pleural, sudores nocturnos y ortopnea, o una combinación de los mismos. En una cierta cantidad de dosis, si el sujeto desarrolla niveles intolerables de tales síntomas, la dosificación puede reducirse de manera que el evento adverso se elimine y deje de ser adverso o se reduzca a un nivel aceptable según lo juzgue un médico tratante.
- Otra consideración para determinar la dosis apropiada de compuesto para un paciente es la concentración deseada que circula en el plasma sanguíneo. En una realización particular, la concentración de compuesto en la sangre está entre 40-3.000 ng/mL durante un período de 12 horas desde el momento de la administración. En otra realización particular, la concentración del compuesto en la sangre está entre 75-2.000 ng/mL durante un período de 12 horas desde el momento de la administración. En otra realización particular, la concentración del compuesto en la sangre está entre 500-2.000 ng/mL durante un período de 12 horas desde el momento de la administración. En una realización preferida, la concentración del compuesto en la sangre está entre 40-3.000 ng/mL durante un período de 12 horas desde el momento de la administración, en donde el compuesto es una fórmula de I, I', II o II' y es administrado por vía oral en una cantidad de aproximadamente 50 mg, 100 mg o 200 mg. En una realización preferida, la concentración de compuesto en la sangre está entre 40-3.000 ng/mL durante un período de 12 horas desde el momento de la administración, en donde el compuesto es una fórmula de I y se administra por vía oral en una cantidad de aproximadamente 50 mg, 100 mg o 200 mg. En una realización preferida, la concentración de compuesto en la sangre está entre 40-3.000 ng/mL durante un período de 12 horas desde el momento de la administración, en donde el compuesto es una fórmula de II y se administra por vía oral en una cantidad de aproximadamente 50 mg, 100 mg o 200 mg. En algunas de las realizaciones anteriores, la concentración máxima en el plasma sanguíneo se alcanza dentro de las dos horas de la administración.

En ciertas realizaciones, la dosificación del compuesto de Fórmula I o II se selecciona para producir una concentración plasmática de fármaco de aproximadamente 10 nM o más durante un período de 8 a 12 horas, en promedio, y para proporcionar concentración máxima en plasma de aproximadamente 500 nM o superior, preferiblemente de aproximadamente 1.000 nM o superior. En ciertas realizaciones, la dosificación del compuesto de Fórmula I o II se selecciona para producir una concentración plasmática de fármaco de aproximadamente 100 nM o más durante un período de 8 a 12 horas, en promedio, y para proporcionar una concentración plasmática máxima de aproximadamente 500 nM o superior, preferiblemente alrededor de 1.000 nM o superior. En ciertas realizaciones, la dosificación del compuesto de Fórmula I o II se selecciona para producir una concentración plasmática de fármaco de aproximadamente 200 nM o más durante un período de 8 a 12 horas, en promedio, y para proporcionar una concentración plasmática máxima de aproximadamente 500 nM o superior, preferiblemente alrededor de 1.000 nM o superior.

En ciertas realizaciones, la dosificación del compuesto de Fórmula I o II se selecciona para producir una concentración en plasma en la que la concentración mínima del compuesto está en el intervalo en el que se observa un efecto terapéutico, tal como apoptosis de células cancerosas. En ciertas realizaciones, la dosificación del compuesto de Fórmula I o II se selecciona para producir una concentración mínima en plasma igual o superior a EC_{50} de activación de la isoforma PI3K δ en plasma sanguíneo. En ciertas realizaciones, la dosificación del compuesto de Fórmula I o II se selecciona para producir una concentración mínima en sangre superior al nivel de EC_{50} para la activación de PI3K δ y por debajo del nivel de EC_{50} para la activación de PI3K γ en una célula durante un período de al menos 12 horas desde la administración del compuesto. Por ejemplo, si el valor de EC_{50} para la activación de basófilos de PI3K δ es 65 nM y el valor de EC_{50} para la activación de basófilos de PI3K γ es de 1.100 nM en plasma sanguíneo completo, entonces la dosificación del compuesto seleccionado proporciona una concentración mínima en plasma del compuesto entre 60 nM y 1.100 nM durante un período de 8-12 horas desde la administración del compuesto. De forma similar, se puede seleccionar una dosis para producir una concentración mínima en sangre por encima del nivel de EC_{50} para la activación de basófilos de PI3K δ y por debajo del nivel de EC_{50} para la activación de basófilos de PI3K α , β o γ . Los valores de EC_{50} para la activación o inhibición de la isoforma de PI3K *in vivo* pueden ser determinados por una persona con una experiencia normal en la técnica. En realizaciones alternativas, el intervalo superior de la concentración mínima del fármaco puede exceder y no está limitado por el valor de EC_{50} de la isoforma PI3K γ , α o β en el plasma sanguíneo. Además, el intervalo de concentración en sangre del fármaco está en un nivel que es terapéuticamente beneficioso en el tratamiento de la neoplasia hematológica, mientras que minimiza los efectos secundarios indeseables.

Por ejemplo, aunque son selectivos en delta, los compuestos pueden exhibir actividad suficiente en p110 γ para ser clínicamente útiles, es decir, para ser eficaces en un cáncer que depende de p110 γ para señalización, porque un nivel en plasma por encima de la dosis efectiva para inhibición de p110 γ se puede lograr siendo aún selectivo en relación con otras isoformas, particularmente la isoforma alfa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la dosificación del compuesto se selecciona para producir una concentración en sangre efectiva para inhibir selectivamente p110 δ y p110 γ .

En algunas realizaciones, la dosificación del compuesto proporciona una concentración mínima en plasma sanguíneo entre 65 nM y 1.100 nM durante un período de 8 a 12 horas desde la administración del compuesto. En algunas realizaciones anteriores, el período es al menos 12 horas desde la administración del compuesto.

En una realización particular, el compuesto se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.

En una realización particular, el compuesto se administra a una dosis de 20-500 mg/día. En una realización particular, el compuesto se administra a una dosis de 50-250 mg/día.

En una realización particular, el compuesto se administra a una dosis de 25 a 150 mg por dosis, y se administran dos dosis por día (por ejemplo, dosificación BID con dosis de 25 a 150 mg). En una realización preferida, un sujeto se trata con 50 mg a 100 mg de un compuesto de fórmula A dos veces al día.

En una realización particular, el método comprende administrar a dicho paciente una dosis diaria inicial de 20-500 mg del compuesto y aumentar dicha dosis en incrementos hasta que se logre la eficacia clínica. Se pueden usar incrementos de aproximadamente 25, 50 o 100 mg para aumentar la dosis. La dosis puede aumentarse diariamente, día por medio, dos veces por semana o una vez por semana.

En una realización particular, el método comprende continuar tratando a dicho paciente administrando la misma dosis del compuesto con la cual se logra la eficacia clínica o reduciendo dicha dosis en incrementos hasta un nivel en el que se puede mantener la eficacia.

En una realización particular, el método comprende administrar a dicho paciente una dosis diaria inicial de 20-500 mg del compuesto y aumentar dicha dosis hasta una dosificación total de 50-400 mg por día durante al menos 6 días. Opcionalmente, la dosificación puede aumentarse adicionalmente hasta aproximadamente 750 mg/día.

En una realización particular, el compuesto se administra al menos dos veces al día.

En una realización particular, el compuesto se administra por vía oral, intravenosa o por inhalación. Preferiblemente, el compuesto se administra por vía oral. En algunas realizaciones, se administra por vía oral a una dosificación de aproximadamente 50 mg BID o a una dosificación de aproximadamente 100 mg BID.

Se puede usar cualquier régimen de administración eficaz que regule el tiempo y la secuencia de las dosis. Las dosis del agente incluyen preferiblemente unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad eficaz del agente. Como se usa en el presente documento, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de PI3Kδ y/o derivar un cambio mensurable en un parámetro fisiológico del sujeto mediante la administración de una o más de las unidades de dosificación farmacéutica. La "cantidad efectiva" también puede referirse a la cantidad requerida para mejorar una enfermedad o trastorno en un sujeto.

Los intervalos de dosificación adecuados para los compuestos de fórmula A varían de acuerdo con estas consideraciones, pero en general, los compuestos se administran en el intervalo de 10,0 µg/kg-15 mg/kg de peso corporal; 1,0 µg/kg-10 mg/kg de peso corporal, o 0,5 mg/kg-5 mg/kg de peso corporal. Para un sujeto humano de 70 kg típico, por lo tanto, el intervalo de dosificación es de 700 µg-1050 mg; 70 µg-700 mg; o 35 mg-350 mg por dosis, y se pueden administrar dos o más dosis por día. Las dosis pueden ser mayores cuando los compuestos se administran por vía oral o transdérmica en comparación con, por ejemplo, administración i.v. La toxicidad reducida de un compuesto de fórmula A, permite la administración terapéutica de dosis relativamente altas. En algunas de las realizaciones anteriores, es adecuada la administración oral de hasta 750 mg/día de un compuesto de la invención. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula A a una dosis de 50 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula A a una dosis de 100 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula A a una dosis de 200 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula A a una dosis de 350 mg BID. En realizaciones específicas, para el tratamiento de leucemias, linfomas y mieloma múltiple, a menudo es adecuada una dosificación de aproximadamente 50-350 mg por dosis, administrada por vía oral una vez o preferiblemente dos veces por día.

En algunas de las realizaciones anteriores, es adecuada la administración oral de hasta 750 mg/día de compuesto I" o II". En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula I" o II" a una dosis de 50 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula I" o II" a una dosis de 100 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula I" o II" a una dosis de 200 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, se administra un compuesto de fórmula I" o II" a una dosis de 350 mg BID. En algunas de las realizaciones anteriores, para el tratamiento de leucemias, linfomas y mieloma múltiple, a menudo es adecuada una dosificación de aproximadamente 50-350 mg por dosis de un compuesto de fórmula I" o II", administrado por vía oral una vez o preferiblemente dos veces por día.

Los compuestos se pueden administrar como una única dosis de bolo, una dosis a lo largo del tiempo, tal como mediante administración i.v. o transdérmica, o en dosis múltiples.

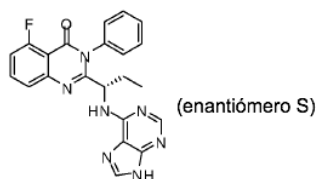
La dosificación puede continuar durante al menos siete días. En algunas realizaciones, la dosificación diaria se continúa durante aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, la dosificación se continúa durante aproximadamente 28 días y luego se suspende durante al menos 7 días. En algunas realizaciones, un ciclo completo es la dosificación diaria continua durante 28 días. La evaluación de una respuesta clínica en el paciente se puede medir después de cada ciclo. Los resultados clínicos pueden usarse para tomar la decisión de aumentar, disminuir, descontinuar o mantener la dosis.

Dependiendo de la vía de administración, se puede calcular una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, el área superficial corporal o el tamaño del órgano. El médico tratante determinará el régimen de dosificación final de acuerdo con una buena práctica médica, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del agente, la identidad y gravedad del estado de la enfermedad, la capacidad de respuesta del paciente, la edad, la condición, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, y la gravedad de cualquier infección. Los factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen el tiempo y la frecuencia de administración, combinaciones de medicamentos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. El experto en la técnica realiza rutinariamente refinamiento adicional de la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cualquiera de las formulaciones mencionadas en la presente memoria sin excesiva experimentación, especialmente a la luz de la información de dosificación y los ensayos divulgados, así como los datos farmacocinéticos observados en ensayos clínicos en humanos. Se pueden determinar las dosificaciones apropiadas mediante el uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra junto con los datos de respuesta a la dosis.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del compuesto de Fórmula A y la ruta de administración. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la fracción activa o para mantener el efecto deseado. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una sola dosis, múltiples dosis discretas, infusión continua, depósitos de liberación sostenida, o combinaciones de los mismos, según se requiera para mantener el nivel mínimo deseado del compuesto. Las composiciones farmacéuticas de acción corta (es decir, semivida corta) se pueden administrar una vez al día o más de una vez al día (por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día). Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas. Las bombas, como las bombas subcutáneas, intraperitoneales o subdurales, pueden preferirse para la infusión continua.

Los sujetos que responderán favorablemente a la invención incluyen sujetos médicos y veterinarios en general, que incluyen pacientes humanos. Entre otros sujetos para los que la invención es útil están gatos, perros, animales grandes, aves como pollos, y similares. En general, cualquier sujeto que se beneficiaría de un compuesto de fórmula A es

- apropiado para la administración del compuesto de la invención. En algunas realizaciones anteriores, el paciente tiene una característica citogenética de del(17p) o del(11q). En algunas realizaciones anteriores, el paciente tiene una linfadenopatía. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en un paciente. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía después de un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en al menos 10% después de un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en al menos un 25% después de un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en al menos 30% después de un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en al menos 40% después de un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en al menos 50% después de un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones anteriores, el uso del compuesto I, I", II o II" reduce el tamaño de una linfadenopatía en al menos un 75% después de un ciclo de tratamiento.
- En un aspecto, la invención proporciona un compuesto para uso en un método para tratar una afección, que comprende administrar un compuesto de fórmula I, II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más agentes terapéuticos a un sujeto que necesita tal tratamiento, en donde la condición es un cáncer. El agente terapéutico es un inhibidor del proteasoma. El agente terapéutico es bortezomib. La condición es una neoplasia hematológica. En realizaciones preferidas, la afección se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma difuso de células B grandes, ALL de células B, ALL de células T y Linfoma de Hodgkin. En realizaciones preferidas, el compuesto está compuesto sustancialmente por el enantiómero S. En realizaciones específicas, el compuesto comprende al menos 95% del enantiómero S. En algunas de las realizaciones anteriores, la administración de dicho compuesto y agente terapéutico proporciona un beneficio sinérgico superior a los resultados obtenidos sin la combinación del compuesto y el agente terapéutico.
- Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención. En los ejemplos siguientes, las referencias al 'compuesto de fórmula I' o 'compuesto I' se refieren al enantiómero S mostrado aquí, y las muestras usadas para estos ejemplos exhibieron un 98,2% de e.e., según se midió por métodos de HPLC quiral:



Además, un análisis de este compuesto revela las siguientes características del material:

Prueba	Resultado de la prueba
Apariencia	Polvo ligeramente blanquecino
¹ H-RMN	Espectro ajustado a la referencia
Ensayo de HPLC	98,1% (Anhidro, libre de solvente)
Pureza quiral (HPLC)	98,2% de ee

Prueba	Resultado de la prueba
Residuo de Ignición	0,11%
Espectroscopía Infrarroja (FTIR)	Espectro de acuerdo con la referencia
¹³ C-RMN	Espectro ajustado a la referencia

(continuación)

Prueba	Resultado de la prueba
--------	------------------------

Análisis del tamaño de partícula	Diámetro medio: 11,3 µm
Agua (Karl Fischer coulométrico)	0,56%

Apropiadamente o prueba	Resultado de la prueba		
Análisis elemental % de C, H, F, N		Esperado	Encontrado
	% de C	63,3	63,5
	% de H	4,4	4,4
	% de N	23,5	23,1
	% de F	4,5	4,5

Ejemplo 1 (Referencia)

Inhibición del crecimiento celular en células de MM

- 5 Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I inhibe los efectos estimuladores del crecimiento celular de las citoquinas (IGF-1 e IL-6) en células de mieloma múltiple (MM). Las células LB (línea celular de mieloma mielomonocítica) se cultivaron durante 48 horas con medio de control; con el compuesto de fórmula I, en presencia o ausencia de IL-6 o IGF-1. El efecto inhibidor del compuesto de fórmula I sobre el crecimiento de células de MM se evaluó midiendo la absorbancia del colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrasodio (MTT; Chemicon International). Las células se pulsaron con 10 µL de 5 mg/mL de MTT a cada poz durante las últimas 4 horas del cultivo de 48 horas, seguido de 100 µL de isopropanol que contenía HCl 0,04 N. La absorbancia se midió a 570/630 nm usando un espectrofotómetro (Molecular Devices). Un resumen de los resultados se muestra en la Figura 1. La exposición de 0,625 µM-2,5 µM del Compuesto I inhibe el crecimiento de células de MM incluso en presencia de citoquinas estimuladoras del crecimiento celular.

15 Ejemplo 2 (Referencia)

Efecto de BMSC sobre la citotoxicidad

- 20 Este ejemplo demuestra que las células estromales de médula ósea (BMSC) no protegen contra la citotoxicidad de las células LB inducidas por el compuesto I. Las células LB se cultivaron con medio de control y con el compuesto de fórmula I durante 48 horas, en presencia o ausencia de BMSC. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo de captación de [³H]-timidina. Todos los datos representan la media (± SD) del experimento por triplicado. Un resumen de los resultados se muestra en la Figura 2. El crecimiento de células LB se reduce después de la exposición a 0,625 µM - 10 µM del compuesto I incluso en presencia de BMSC.

Ejemplo 3 (Referencia)

Efecto del compuesto en la apoptosis de las células de CLL

- 25 Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I induce apoptosis en células de leucemia linfocítica crónica (CLL) del paciente. Se obtuvo sangre periférica de pacientes con CLL-B a través del CLL Research Consortium de la Universidad Estatal de Ohio. Las células primarias positivas para CD19 se aislaron usando Rosette-Sep (StemCell Technologies). Las células se mantuvieron en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mmol/L de L-glutamina y penicilina (100 unidades/mL)/estreptomicina (100 µg/mL; Invitrogen) a 37°C, 5% de CO₂ y alta humedad. Después de la incubación con el compuesto de fórmula I o medio durante 96 horas, se lavaron 5x10⁵ células con PBS y luego se resuspendieron en regulador de unión (10 mmol/L de HEPES/NaOH, pH 7,4, 150 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1,8 mmol/L CaCl₂) que contiene 2 µL de patrón de anexina V-FITC (BioWhittaker, Inc) y 10 µL de 20 µg/mL de PI (Sigma). Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en un área protegida contra la luz, las muestras se cuantificaron mediante citometría de flujo en un FACScan^{MR} (Becton Dickinson).

El tratamiento de las células del paciente con CLL con el compuesto I da como resultado la apoptosis y el resultado parece ser dependiente de la dosis, como se observa en la Figura 3.

Se observó apoptosis inducida por el Compuesto I en células de CLL de pacientes de pronóstico pobre, como lo indican los datos en la Figura 19.

- 40 También se observó que la apoptosis inducida por el Compuesto I era eficaz en células de CLL de pacientes

refractarios/recidivantes como se muestra en la Figura 20.

Ejemplo 4 (Referencia)

Efecto del compuesto en las líneas celulares de ALL

5 Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I da como resultado una reducción de la fosforilación de Akt y una
disminución en la proliferación celular acompañada de muerte celular en las líneas celulares leucémicas T-ALL y B-ALL
(Leucemia linfoblástica aguda). Los ensayos de viabilidad de las líneas celulares se realizaron usando el ensayo
AlamarBlue (Invitrogen). Se colocaron células (1×10^6 por pozo) en un volumen de 100 μ L en una placa de fondo plano
de 96 pozos y se añadió el compuesto de fórmula I (100 μ L por pozo a una concentración final de 2x) o medio solo a las
10 placas. Todos fueron realizados por cuadruplicado. Las células se incubaron durante tiempos fijos (48 horas). Después
de la incubación, se añadieron 10 μ L de AlamarBlue® a cada pozo. Las células se incubaron durante 4 horas y se
obtuvo la densidad óptica a 530-560 nm usando un lector de placas SpectraMax® M5 2001. La viabilidad celular se
expresó como un porcentaje de absorción entre las células tratadas/muestra de control. Estos resultados se resumen en
la tabla que se muestra en la Figura 4. La exposición al compuesto I da como resultado una reducción sustancial de la
viabilidad celular en una variedad de líneas celulares de ALL, así como una reducción en la fosforilación de Akt.

15 Ejemplo 5 (Referencia)

Efecto del compuesto sobre el ciclo celular de ALL

Este ejemplo demuestra que el tratamiento de la línea celular CCRF-SB de leucemia linfoblástica aguda (ALL) con el
compuesto de fórmula I da como resultado la detención del ciclo celular en G0/G1. Análisis representativo de
clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de células CCRF-SB teñidas con yoduro de propidio en
20 condiciones normales de crecimiento, y crecimiento en presencia del compuesto de fórmula I. El porcentaje promedio de
células en las fases G₀-G₁, S y G₂-M se calcula en la tabla debajo de los histogramas. Los resultados se muestran en la
Figura 5.

Ejemplo 6 (Referencia)

Inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama

25 Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.
Las líneas celulares T47D y HS-578T se hicieron crecer en presencia de suero más las concentraciones indicadas del
compuesto de fórmula I. La proliferación se midió en pozos por triplicado mediante placas de 96 pozos con el ensayo
AlamarBlue® (Invitrogen). Los resultados de los ensayos de proliferación se expresan como los valores medios de
porcentaje celular y se muestran en la Figura 6.

30 Ejemplo 7 (Referencia)

Inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer de ovario

Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de ovario.
Las líneas celulares IGROV-1 y OVCAR-3 se hicieron crecer en presencia de suero más las concentraciones indicadas
del compuesto de fórmula I. La proliferación se midió en pozos por triplicado mediante placas de 96 pozos con ensayo
35 AlamarBlue (Invitrogen). Los resultados de los ensayos de proliferación se expresan como los valores medios del
porcentaje celular y se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 8 (Referencia)

Reducción de la fosforilación de Akt

40 Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I reduce la fosforilación de Akt constitutiva en líneas celulares
tumoraes hematopoyéticas que exhiben fosforilación de Akt constitutiva. Se evaluó un panel grande de líneas celulares
de leucemia y linfoma para la fosforilación de Akt constitutiva. Estas líneas celulares representan el linfoma B, el linfoma
T, ALL, histiocitosis maligna, DLBCL y AML. Las líneas celulares que demostraron la fosforilación de Akt independiente
del suero se trataron con el compuesto de fórmula I durante 2 horas. Posteriormente, las células se lisaron, se
45 fraccionaron por tamaño y se inmunotransfirieron con anticuerpos dirigidos contra fosfo-Akt (Ser473). Los resultados se
muestran en la Figura 8. Se logró la reducción en Akt (Ser473) para todas las líneas celulares después de la exposición
al compuesto I.

Ejemplo 9 (Referencia)

Compuesto I eficaz en DLBCL

50 Este ejemplo proporciona evidencia de que el compuesto I bloquea la señalización de PI3K e induce la apoptosis en
células de linfoma difuso de células B grandes. P110 δ se expresa en líneas celulares de DLBCL como se muestra en la
Figura 26A. La Figura 26B muestra que la exposición al compuesto I reduce los niveles de pAKT en varias líneas

celulares de DLBCL.

Ejemplo 10 (Referencia)

Inducción de Apoptosis en células de cáncer de mama

5 Este ejemplo demuestra que el compuesto de fórmula I induce la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama. Las células HS-578T, T47D y MCF7 se trataron con el compuesto de fórmula I o las correspondientes concentraciones de DMSO durante 24 horas. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con anexina V-FITC/7AAD. Abajo a la izquierda, células viables (negativo para Anexina V-FITC/PI); abajo a la derecha, células apoptóticas tempranas (únicamente positiva para Anexina V-FITC); arriba a la derecha, células apoptóticas intermedias y tardías (doblemente positivas para Anexina V-FITC/7AAD); y arriba a la izquierda, apoptótica/necrótica tardía (solamente positivo para 7AAD). Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante a excepción del cuadrante inferior izquierdo (células viables). Un experimento representativo de tres experimentos diferentes que dieron resultados similares se muestra en la Figura 10.

Ejemplo 11 (Referencia)

Niveles de sangre en estado estable el día 7 en voluntarios sanos

15 Este ejemplo proporciona datos relacionados con la concentración del compuesto de fórmula I en la sangre de un sujeto humano sano el día 7. La concentración se controló durante un período de 12 horas, después de la administración oral de 50, 100 o 200 mg BID del compuesto de fórmula I en el día 7 del estudio. La Figura 11 sigue la concentración en plasma del fármaco durante un período de 12 horas desde la administración. La concentración máxima de fármaco se alcanza dentro de las dos horas para todas las dosis. La administración de 50, 100 o 200 mg BID de dicho compuesto da como resultado un nivel de concentración que excede la concentración de EC₅₀ de PI3Kδ en basófilos durante al menos 12 horas.

25 Además, se llevaron a cabo estudios de dosis única en los que se administraron 17-400 mg del compuesto de fórmula I en voluntarios sanos. La concentración del compuesto en la sangre se midió durante 24 horas desde la administración y los resultados se muestran en la Figura 24A. Aproximadamente a las 6 horas, la concentración del compuesto I en la sangre para todas las dosis administradas es al menos aproximadamente 100 nM. Aproximadamente a las 12 horas, la concentración del compuesto I en la sangre para dosis de 50 mg y superiores es superior a 50 nM. La concentración máxima del compuesto I en la sangre se alcanza dentro de las 2 horas de la administración.

30 En otro experimento, la concentración media del compuesto I se midió el séptimo día de dosificación de 50 mg BID en voluntarios sanos (N = 6). La concentración mínima media fue mayor que la EC₅₀ para PI3Kδ y la concentración máxima media fue inferior a la EC₅₀ para PI3Kγ como se determinó en el ensayo de activación de basófilos en sangre completa, Figura 24B. Este ejemplo demuestra que el intervalo de concentración del compuesto I administrado a 50 mg BID está en un nivel que está por encima de la ED₅₀ del nivel de activación de basófilos de PI3Kδ, pero inferior a la ED₅₀ mínima del nivel de activación del nivel de basófilos de PI3Kγ en sangre completa durante al menos 12 horas.

35 La Tabla 1, a continuación, proporciona una visión general de los sujetos en el estudio, en la que se administra una dosis única (SD) o dosis múltiple (MD) del compuesto de fórmula I a un sujeto en cantidades variables. Los valores "n" se refieren al número de sujetos en cada grupo.

Tabla 1

Cohorte	Régimen	Compuesto I	Placebo
1 (n = 8)	SD	17 mg (n = 6)	Placebo (n = 2)
2 (n = 8)	SD	50 mg (n = 6)	Placebo (n = 2)
3 (n = 8)	SD	125 mg (n = 6)	Placebo (n = 2)
4 (n = 8)	SD	250 mg (n = 6)	Placebo (n = 2)
5 (n = 8)	SD	400 mg (n = 6)	Placebo (n = 2)
6 (n = 8)	MD	50 mg BID x 7 d (n = 6)	Placebo BID x 7 d (n = 2)
7 (n = 8)	MD	100mg BID x 7d (n = 6)	Placebo BID x 7 d (n = 2)
8 (n = 8)	MD	200mg BID x 7d (n = 6)	Placebo BID x 7 d (n = 2)

Ejemplo 12 (Referencia)

Efecto sobre las lesiones en un paciente con linfoma de células del manto

5 Este ejemplo proporciona datos relacionados con el área de lesiones de un paciente con linfoma de células del manto después de 1 ciclo de tratamiento (28 días) con el compuesto de fórmula I. El área de 6 lesiones se midió antes del tratamiento y después de un ciclo de tratamiento. La respuesta a los 28 días de la administración oral de 50 mg BID del compuesto de fórmula I, da como resultado una disminución del área de la lesión en comparación con el área antes del tratamiento y representa una disminución del 44% en la carga tumoral. Los resultados se resumen en un gráfico de barras que se encuentra en la Figura 12.

Ejemplo 13 (Referencia)

10 Respuesta de un paciente con CLL al tratamiento

15 Este ejemplo proporciona datos relacionados con la concentración de recuento absoluto de linfocitos (ALC) en la sangre de un paciente con CLL después de 1 ciclo (28 días) de tratamiento con administración oral del compuesto de fórmula I. La concentración de ALC en sangre se midió durante un período de 4 semanas después de completar un ciclo de tratamiento. Se observó una disminución del 55% en la linfocitosis y una disminución del 38% en la linfadenopatía como resultado del tratamiento. Se observa una marcada disminución en la concentración de ALC entre la semana 1 y la semana 2, Figura 13.

Ejemplo 14 (Referencia)

Comparación del paciente del linfoma con el voluntario sano

20 Este ejemplo proporciona datos que comparan la concentración del compuesto de fórmula I en un paciente con linfoma con voluntarios sanos normales. El día 28 de la administración oral de 50 mg BID del compuesto en un paciente con linfoma de células del manto, se midió la concentración del compuesto en sangre durante un período de 6 horas después de la administración. También se observó la concentración de 50 y 100 mg de administración oral en voluntarios sanos normales el día 7 de administración. Los resultados se resumen en la Figura 14. Por lo tanto, el compuesto no se acumula excesivamente en el transcurso de un ciclo de tratamiento, ni el paciente se vuelve tolerante por el metabolismo incrementado a lo largo del ciclo de tratamiento.

Ejemplo 15 (Referencia)

Actividad del compuesto I en diversas quinasas

30 Este ejemplo muestra el perfil de IC₅₀ del compuesto I a través de clases de quinasas como se resume en la Tabla 2. Aunque especialmente activo en p110δ, el compuesto I también fue activo en p110γ e incluso lo suficientemente activo como para ser terapéuticamente útil en dosis no tóxicas contra p110β, debido al alto nivel demostrado de NOAEL del compuesto; mientras que exhiben poca actividad en fosfoinositida quinasas de Clase II-V. Por lo tanto, aunque los compuestos son selectivos en delta, los compuestos pueden exhibir actividad suficiente en p110γ para ser clínicamente útiles, es decir, ser eficaces en un cáncer que depende de p110γ para la señalización, porque se puede lograr un nivel plasmático por encima de la dosis efectiva para la inhibición de p110γ mientras que sigue siendo selectivo en relación con otras isoformas, particularmente la isoforma alfa.

Tabla 2

Compuesto	PI3K clase I, IC ₅₀ (nM)					PI3K clase II, IC ₅₀ (nM)	PI3K clase III, IC ₅₀ (nM)	PI3K clase IV, IC ₅₀ (nM)		Otras fosfoinositida quinasas
	p110 α	p110 β	p110 δ	p110 γ				AND-PK	mTOR	
I	435	128	1	14		Cilbeta	hVPS34	6.729	>10 ³	>10 ³
NVP-BEZ-235	19	293	63	267		3	6	1	2	ND
Novartis										ND
Ensayo Adapta de InvitroGen										
* ND = no determinado										

Ejemplo 16 (Referencia)

No hay actividad fuera del objetivo del Compuesto I en el cribado de proteína quinasa de todo el kinoma

Este ejemplo demuestra que el compuesto I tiene poca o ninguna actividad fuera del objetivo en un cribado de proteína quinasa en todo el kinoma. Utilizando Ambit KINOMEscan^{MR}, un cribado de todo el genoma de más de 350 proteína quinasa no detectó ninguna actividad a 10 μ M. Los ejemplos de algunas quinasa en el cribado se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

Ejemplos de quinasa relevantes en el cribado				
ABL	FGFR1	JAK1	P38MAPK	S6K
AKT	VEGFR1	JAK2	PDGFR	SLK
ALK	FLT3	JNK1	PIM	SRC
BLK	FRK	KIT	PKA	SYK
BRAF	FYN	LCK	PKC	TAK
BTK	HCK	LYN	PLK	TIE
CDK	HER2	MAPK	RAF	TRK
CSF1R	ICK	MEK	RET	TYK
EGFR	IGF1-R	MET	ROCK	YES
EPH	ITK	MLK	ROS	ZAP70

Ejemplo 17 (Referencia)

10 Selectividad del Compuesto I para p110 δ

Este ejemplo demuestra que el compuesto I es selectivo para p110 δ medido en ensayos basados en células específicas de isoforma.

Se sembraron fibroblastos Swiss-3T3 y RAW-264 en una placa de cultivo tisular de 96 pozos y se dejó que alcanzaran al menos un 90% de confluencia. Las células se privaron de alimento y se trataron con diluciones en serie o vehículo del compuesto I durante 2 horas y se estimularon con PDGF o C5a, respectivamente. La fosforilación de Akt y la AKT total se detectaron mediante ELISA. Las células B purificadas se trataron ya sea con vehículo o con diluciones en serie del compuesto I durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de IgM antihumana purificada de cabra. Los resultados se expresan como la incorporación relativa de [³H] timidina inducida por entrecruzamiento de IgM.

Tabla 4

EC ₅₀ de PI3K α (nM)	EC ₅₀ de PI3K δ (nM)	EC ₅₀ de PI3K γ (nM)
Línea celular de Fibroblastos	Células B primarias	Línea celular de Monocitos
PDGF indujo pAKT	proliferación mediada por BCR	C5a indujo pAKT
>20.000 (n=12)	6 (n=6)	3.894 (n=11)

Ejemplo 18 (Referencia)

Expresión de p110 δ en líneas celulares de leucemia y linfoma

Este ejemplo demuestra que p110 δ de PI3K se expresa altamente en una amplia gama de líneas celulares de leucemia y linfoma.

p110δ de PI3K promueve la proliferación y la supervivencia en una amplia gama de líneas celulares de leucemia y linfoma. Entre los tipos de células investigadas se encuentran MCL, DLBCL, AML, ALL y CML

La expresión de p110 α, β, γ y δ de PI3K en un panel de líneas celulares de linfoma y leucemia se demuestra en la Figura 15. Las proteínas de 10⁶ células se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos para las isoformas α, β, γ y δ. Las proteínas p110 recombinantes purificadas se usaron como controles. Se usaron anticuerpos anti-actina para evaluar la misma carga de las muestras. p110δ se expresó consistentemente en un nivel alto, mientras que otras isoformas p110 fueron muy variables. Se sabe que p110δ de PI3K se expresa uniformemente en células de AML de pacientes como lo discuten Sujobert, et al., Blood 2005 106 (3), 1063-1066.

Ejemplo 19 (Referencia)

Efecto inhibitorio del Compuesto I sobre p110δ

El ejemplo 19 muestra la inhibición del compuesto I de p110δ que bloquea la señalización de PI3K en líneas celulares de leucemia y de linfoma con activación de la ruta constitutiva.

La ruta de PI3K se desregula con frecuencia en líneas celulares de leucemia y linfoma. Se encontró que 48% de las líneas celulares, o 13 de 27, tenían p-AKT constitutivo. Además, la activación de la ruta PI3K depende de p110δ. Se descubrió que el compuesto I inhibía la fosforilación de AKT constitutiva en 13 de 13 líneas celulares.

Los resultados de PAGE de la Figura 9 demuestran que la fosforilación constitutiva de AKT se inhibió por la presencia del compuesto I en cada una de las 11 líneas celulares, incluidos los linfomas de células B y de células T. Las células se incubaron durante 2 horas con 10 μM del compuesto I. Los lisados celulares se corrieron en SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PDVF y se sondearon con anticuerpos apropiados. Se descubrió que el compuesto I inhibía la fosforilación de AKT constitutiva en 11 de 11 líneas celulares. En la Figura 27 se muestran datos adicionales de líneas celulares para líneas celulares T-ALL y B-ALL. Una disminución en la fosforilación de Akt y S6 después de la exposición a un intervalo de concentraciones del compuesto I (0,1 μM a 10 μM), fue cuantificada por densitometría, expresada como el porcentaje de cambio, Figura 28.

Ejemplo 20 (Referencia)

El Compuesto I inhibe la proliferación y la apoptosis en líneas celulares de leucemia

El ejemplo 20 demuestra que el compuesto I inhibe la proliferación e induce apoptosis en líneas celulares de leucemia. Las Figuras 16A-B muestran que el tratamiento con el compuesto I durante 24 horas reduce la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis.

Ensayos de proliferación (AlamarBlue®) en líneas celulares de ALL cultivadas en presencia de suero FBS al 10% y se hicieron las mediciones a las 24 horas. La proliferación se midió en pozos por triplicado en placas de 96 pozos. La inhibición de la señalización de PI3K por el compuesto I dio como resultado un bloque de progresión del ciclo celular y/o muerte celular. En cada una de las seis líneas celulares de leucemia, la viabilidad se redujo en un 40-50% con concentraciones 10 micromolares del compuesto I, Figura 16A.

Inducción de la apoptosis por el compuesto I. Las células se trataron con DMSO (vehículo), 1 μM o 10 μM de compuesto I durante 24 horas. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con anexina V-FITC/7AAD. Un experimento representativo de diferentes experimentos que dieron resultados similares se muestra en la Figura 16B.

Ejemplo 21 (Referencia)

Expresión de p110δ en células de CLL

Este ejemplo demuestra la expresión de p110δ de PI3K y de la isoforma p110 δ en células de CLL del paciente.

Las rutas de señalización mediadas por PI3K han sido implicadas en CLL. Estas rutas juegan un papel en la proliferación celular, la prevención de la apoptosis y la migración celular. Se han hecho esfuerzos para determinar la expresión de la isoforma de PI3K en las células de CLL del paciente.

Los datos demográficos del paciente con CLL se resumen a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos demográficos del paciente CLL

(Total (N = 24))	
I) Anomalías citogenéticas	
13q14.3	58%

11q22.3	33%
17p13.1	20%
Trisomía 12	12%
II) Historial del tratamiento	
Refractario a Fludarabina	29%
desconocido	54%
III) Estado de IgVH	
Mutado	33%
Sin mutar	33%
desconocido	33%

Las imágenes PAGE de la Figura 17A-D comparan la expresión de p110 α , p110 δ , p110 β y p110 γ en células de CLL de pacientes A-E. p110 δ y p110 δ se expresan en cada paciente en comparación con las otras isoformas de PI3K.

Ejemplo 22 (Referencia)

5 El compuesto I induce la escisión de la caspasa 3 y de PARP

Este ejemplo demuestra que el compuesto I indujo la escisión de caspasa 3 y PARP. Las Figuras 18A-B muestran los resultados de la escisión de caspasa 3 y PARP (poli (ADP) ribosa polimerasa) en presencia de 1, 10 μ M del compuesto I o 25 μ M de LY294002.

- 10 Experimentos adicionales proporcionan evidencia de que el compuesto I induce la escisión de caspasa 2 y la de PARP. Las células se cultivaron con el compuesto I o vehículo solo durante 24 horas. Posteriormente, las células se lisaron y se fraccionaron por tamaño y se inmunotransfirieron con anticuerpo dirigido contra FLIP, Figura 29. Adicionalmente, se añadieron lisados celulares completos a placas de 4 puntos de 96 pozos multipunto a MDS (Meso Scale Diagnostics), recubiertas con caspasa-3 total, caspasa-3 escindida, PARP escindida y BSA. Las proteínas se detectaron con anticuerpos marcados con reactivo SULFO-TAG y se cuantificaron. Se obtuvo una respuesta dependiente de la dosis en la escisión de caspasa 3 y PARP tras la exposición a 5 o 10 μ M del compuesto I.

Ejemplo 23 (Referencia)

El Compuesto I bloquea la señalización PI3K

- 20 Este ejemplo demuestra que el compuesto I bloquea la señalización de PI3K en células de AML del paciente. PI3K δ está implicado en la señalización en células de pacientes con AML. La Figura 21 muestra los resultados de la producción de fosfo-Akt en ausencia o presencia de 0,1, 1,0, 10 μ M del compuesto I. Esto proporciona evidencia de que el compuesto I reduce la producción de fosfo-Akt en células de AML del paciente.

Ejemplo 24 (Referencia)

Medición de la señalización de PI3K en basófilos que se encuentran en sangre completa

- 25 Este ejemplo demuestra un ensayo de sangre completa para medir la señalización de PI3K en basófilos utilizando citometría de flujo mediante la inducción de la expresión de superficie de CD63.

La inhibición de la señalización de PI3K en basófilos permite que el compuesto I sea un marcador farmacodinámico útil. La señalización de PI3K se controla mediante la expresión de superficie de CD63. En particular, p110 δ media la señalización de FC ϵ R1 y p110 γ media la señalización del receptor de fMLP. El análisis de citometría de flujo de la expresión de CD63 mediada por PI3K en basófilos comprende las siguientes etapas secuenciales:

- 30 1. Recolección de sangre periférica
2. Estimulación de basófilos (fMLP o Mab Anti-FC ϵ R1)
3. Marcación de basófilos (Anti-CCR3-FITC y Anti-CD63-PE)
4. Lisado y fijación de células

5. Análisis por citometría de flujo

Las Figuras 22A-C comparan los resultados de A) sin estimulación, B) estimulación con anti-FCεR1, o C) estimulación con fMLP.

- 5 La Figura 23 muestra que el compuesto I es especialmente activo cuando la señalización mediada por p110δ es más importante, pero también es relativamente activa cuando se utiliza p110γ: se logró una reducción del 50% en la expresión de SD63 a << 1 μM para la prueba de p110δ, y aproximadamente 10 μM para la prueba de p110γ. La activación de basófilos se midió en sangre humana completa utilizando el kit Flow2 CAST®. Las muestras de sangre completa se trataron ya sea con vehículo o con diluciones en serie del compuesto I antes de la activación de los basófilos con mAb anti-FcεRI o fMLP. Las células se tiñeron con la combinación de los mAb CD63-FITC anti-humano y CCR3-PE anti-humano. El porcentaje de células positivas para CD63 dentro de la población cerrada de basófilos se determinó en diferentes grupos de tratamiento y se normalizó con el control del vehículo.

Ejemplo 25 (Referencia)

El compuesto I reduce la linfadenopatía en pacientes con CLL

- 15 Este ejemplo proporciona evidencia de la reducción en el tamaño de una linfadenopatía voluminosa en un paciente con CLL con un del(17p). Un paciente con del(17p) tenía una linfadenopatía axilar, cuyas imágenes se obtuvieron por tomografía computarizada (TC) para proporcionar una medida basal de 5,9 cm x 4,1 cm, Figura 40A. Después de un ciclo de tratamiento con el compuesto I, la linfadenopatía se redujo a una dimensión de 3,8 x 1,8 cm, Figura 40B. Un ciclo de tratamiento fue de 28 días de dosificación oral continua a 200 mg BID o 350 mg BID del compuesto I.

Ejemplo 26 (Referencia)

- 20 Efecto limitado del compuesto I sobre los niveles de glucosa e insulina de un sujeto

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con el compuesto I tiene poco o ningún efecto sobre los niveles de glucosa e insulina. El compuesto I se administró en cantidades de 50-200 mg BID a un sujeto durante un período de hasta 10 días. Se midieron las concentraciones de glucosa e insulina en sangre a lo largo del tiempo y se compararon con los resultados del placebo como se muestra en las Figuras 25A-B.

- 25 La concentración de glucosa en sangre permaneció estable después de 10 días de tratamiento incluso con la mayor cantidad de dosificación del compuesto I. Los niveles de insulina permanecieron dentro del intervalo normal después de 7 días de tratamiento con el compuesto I. Esto proporciona evidencia de que el compuesto I tiene poco o ningún efecto en los niveles de glucosa e insulina.

Ejemplo 27

- 30 Materiales y métodos

Este ejemplo proporciona información sobre materiales y métodos para llevar a cabo los experimentos descritos en los Ejemplos 28-35 que se refieren al uso del compuesto I en el tratamiento del mieloma múltiple.

Materiales

- 35 El compuesto I inhibidor de p110δ y el compuesto II fueron proporcionados por Calistoga Pharmaceuticals, (Seattle, WA). La muestra del compuesto I y II utilizada era más del 95% del enantiómero S. El compuesto I se disolvió en dimetilsulfóxido a 10 mM y se almacenó a -20°C durante el estudio *in vitro*. El compuesto II se disolvió en 1% de carboxi metilcelulosa (CMC)/0,5% de Tween 80 y se almacenó a 4°C para el estudio *in vivo*. Los P110 α, β, γ y δ recombinantes humanos se reconstituyeron con solución salina regulada con fosfato (PBS) estéril que contenía 0,1% de BSA. Bortezomib fue proporcionado por Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA). La 3-metiladenina se adquirió a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cultivo de células

- 45 Las líneas celulares de MM humana sensibles a Dex (MM.1S) y resistentes (MM.1R) fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Steven Rosen (Northwestern University, Chicago, IL). Las líneas celulares de MM humana H929, RPMI8226 y U266 se obtuvieron a través American Type Culture Collection (Manassas, VA). El Dr. William Dalton (Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, FL) proporcionó amablemente líneas celulares resistentes a Melfalan RPMI-LR5 y doxorubicina (Dox) resistentes a RPMI-Dox40. Las células de leucemia de células plasmáticas OPM1 fueron proporcionadas por el Dr. Edward Thompson (Universidad de Texas Medical Branch, Galveston). El Dr. Renate Burger (Universidad de Kiel, Kiel, Alemania) proporcionó la línea celular INA-6 de MM humana dependiente de IL-6. La línea celular de MM humana LB se estableció en el laboratorio. El análisis fenotípico no reveló anomalías citogenéticas.
- 50 El análisis fenotípico se muestra en la tabla 6. Perfil de expresión de CD de la línea celular LB, definido por análisis de citometría de flujo.

Tabla 6

Expresión de LB	
Marcador de CD	% de expresión
CD3	5,5%
CD19	61,7%
CD20	97,2%
CD38	54,1%
CD40	96,8%
CD49e	5,9%
CD70	98,0%
CD138	96,3%

5 Todas las líneas celulares de MM se cultivaron en medio RPMI1640. Se cultivaron células estromales de médula ósea (BMSC) en la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM) (Sigma) que contiene suero bovino fetal al 15%, L-glutamina 2 mM (Life Technologies), penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (Life Technologies). Las muestras de sangre recogidas de voluntarios sanos se procesaron mediante gradiente de Ficoll-Paque^{MR} para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMNC). Las células de MM y BM del paciente se obtuvieron a partir de muestras de BM después de obtener el consentimiento informado según la Declaración de Helsinki y la aprobación de la Junta de Revisión Institucional del Instituto del Cáncer Dana-Farber (Boston, MA). Las células mononucleares de BM se separaron usando sedimentación de densidad Ficoll-Paque^{MR}, y las células plasmáticas se purificaron (> 95% CD138+) mediante selección positiva con microperlas de separación de células activadas magnéticamente anti-CD138 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células tumorales también se purificaron de BM de pacientes con MM usando el sistema de selección negativo RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá).

Ensayo de inhibición del crecimiento

15 El efecto inhibitor del crecimiento del compuesto I sobre el crecimiento de líneas celulares de MM, PBMC y BMSC se evaluó midiendo la absorbancia del colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrasodio (MTT); Chemicon International, Temecula, CA).

Efecto del compuesto I en el crecimiento de células paracrinas de MM en la BM

20 Se cultivaron células de MM (2 x 10⁴ células/pozo) durante 48 horas en placas de 96 pozos recubiertas con BMSC (Costar, Cambridge, MA), en presencia o ausencia de fármaco. La síntesis de ADN se midió por captación de [³H]-timidina (Perkin-Elmer, Boston, MA), añadiendo [³H]-timidina (0,5 µCi/pozo) durante las últimas 8 horas de los cultivos de 48 horas. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

Desactivación transitoria de la expresión de P110δ

25 Las células INA-6 y las células LB se transfectaron transitoriamente con ARNpi ON-TARGET plus SMART pool de P110δ o dúplex de control no específico (Dharmacon Lafayette, Co) usando Kit V Cell Line Nucleofector (Amaxa Biosystems Gaithersburg, MD).

Inmunofluorescencia

30 Se sedimentaron células de MM viables (2,5 x 10⁴) en portaobjetos de vidrio mediante centrifugación a 500 rpm durante 5 minutos utilizando un sistema cytospin (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA). Las células se fijaron con acetona absoluta fría y metanol durante 10 minutos. Después de la fijación, las células se lavaron en solución salina regulada con fosfato (PBS) y luego se bloquearon durante 60 min con FBS al 5% en PBS. Los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anti-CD138 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a 4°C durante 24 horas, se lavaron en PBS, se incubaron con IgG anti-ratón de cabra durante 1 hora 4°C y se analizaron usando microscopía de fluorescencia Nikon E800.

Detección y cuantificación de organelos vesiculares ácidos (AVO) con tinción de naranja de acridina.

35 La autofagia se caracterizó por el secuestro de proteínas citoplasmáticas y el desarrollo de AVO. Para detectar y cuantificar AVO en células tratadas con el compuesto I o 3MA, se realizó tinción vital durante 15 minutos con naranja de acridina a una concentración final de 1 µg/mL. Las muestras se examinaron con un microscopio de fluorescencia.

Ensayo de angiogénesis

La actividad antiangiogénica del compuesto I se determinó usando un kit de ensayo de angiogénesis *in vitro* (Chemicon, Temecula, CA). HUVEC y los medios de crecimiento endotelial se obtuvieron de Lonza (Walkersville, MD, EE. UU.). HUVEC se cultivaron con el compuesto I en gel de matriz polimerizado a 37°C. Después de 8 horas, la formación del tubo se evaluó usando microscopía Leica DM IL (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se analizó con el software IM50 (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, Reino Unido). Se visualizó la migración y reordenamiento de células HUVEC y se contó el número de puntos de ramificación.

Transferencia Western

Se cultivaron células de MM con o sin el compuesto I; se recogieron; se lavaron; y se lisaron usando regulador de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), Na_3VO_4 2 mM, NaF 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (5 mg/mL). Los lisados de células enteras se sometieron a separación por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa pura (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se inmunotransfirieron con Ab anti-AKT, fosfo(p)-AKT (Ser473, Thr308), ERK1/2, P-ERK1/2, P-PDK1, STAT, P-STAT, P-FKRHL, P-70S6K, LC3, y PI3K/p110 α (Cell Signaling Danvers, MA); Ab anti-p110 β , PI3K/p110 δ , gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), α -tubulina y actina (Santa Cruz Biotechnology, CA); y Ab anti-p110 γ (Alexis, San Diego, CA); y anti-LC3 (Abgent, San Diego, CA).

ELISA

La secreción de citoquinas por las BMSC humanas cultivadas conjuntamente con células de MM se evaluó mediante ELISA. Las BMSC se cultivaron en placas de 96 pozos con concentraciones variables del compuesto I, con o sin células INA-6. Después de 48 horas, los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80°C. Las citoquinas se midieron utilizando kits de desarrollo de ELISA por parejas (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

Disposición de citoquina humana

Los niveles de citoquina en sobrenadantes de cultivo se evaluaron usando Panel A de arreglos de anticuerpos perfiladores del proteoma (R&D Systems, Minneapolis, MN), los sobrenadantes de cocultivos con BMSC se incubaron durante 4 horas con membranas dispuestas con Ab contra 37 citoquinas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Modelos de xenoinjerto murino de MM humano

Se adquirieron ratones CB17 SCID (48-54 días de edad) a través de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto del Cáncer Dana-Farber. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 3×10^6 células LB en 100 μL de RPMI-1640. Cuando los tumores eran palpables, los ratones se asignaron a los grupos de tratamiento que recibían 10 mg/kg o 30 mg/kg por sonda dos veces al día; y 7 ratones en el grupo de control que reciben vehículo solamente. Se realizaron mediciones con calibrador de los diámetros de los tumores perpendiculares más grandes día de por medio para estimar el volumen del tumor usando la siguiente fórmula que representa el volumen tridimensional de una elipse: $4/3 \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{longitud}/2)$. Los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 2 cm o los ratones parecían moribundos. La supervivencia se evaluó desde el primer día de tratamiento hasta la muerte. El crecimiento tumoral se evaluó usando medidas con calibrador desde el primer día de tratamiento hasta el día del primer sacrificio, que fue el día 12 para el grupo de control y los días 17 y 19 para los grupos de tratamiento. Las imágenes se capturaron con una cámara canon IXY digital 700. El análisis *ex vivo* de imágenes de tumores se capturó con un microscopio LEICA DM IL y una cámara LEICA DFC300 FX a 40 u/0,60 (Leica, Heidelberg, Alemania).

Se implantaron injertos de hueso fetal humano en ratones CB17 SCID (SCID-hu). Cuatro semanas después de la implantación ósea, se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células INA-6 directamente en la cavidad de la BM humana en el injerto en un volumen final de 100 μL de medio RPMI-1640. Se usó un aumento en los niveles del receptor de IL-6 humana soluble (shuIL-6R) de células INA-6 como un indicador de crecimiento de células de MM y carga de enfermedad en ratones SCID-hu. Los ratones desarrollaron shuIL-6R sérico medible aproximadamente 4 semanas después de la inyección de células INA-6, y luego recibieron 10 o 30 mg/kg de fármaco o vehículo solamente diariamente durante 7 semanas. Se recogieron muestras de sangre y se evaluaron los niveles de shuIL-6R usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, R&D Systems, Minneapolis MN).

Análisis estadístico

La significancia estadística se determinó mediante pruebas de comparación múltiple de Dunn. El nivel mínimo de significancia fue $p < 0,05$. La supervivencia se evaluó usando curvas de Kaplan-Meier y análisis de intervalo logarítmico. El efecto combinado del compuesto I y bortezumib se analizó por análisis de isoblograma usando el programa de software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO); un índice de combinación (CI) $< 0,7$ indica un efecto sinérgico.

Ejemplo 28 (Referencia)

Expresión de p110 delta en células de MM

Este ejemplo demuestra que p110δ se expresa altamente en células de MM del paciente. Para evaluar la expresión de PI3K/p110, se utilizó Ab contra las proteínas PI3K/p110 α, β, γ y δ recombinantes humanas con inmunoreactividad específica contra estas isoformas. La expresión de p110δ en 11 líneas celulares de MM (MM.1S, OPM1, OPM2, RPMI8226, DOX40, LR5, MM.1R, U266, INA-6, H929 y LB), así como 24 muestras de MM del paciente se evaluaron y las inmunotransferencias se muestran en la Figuras 30A y 30B. La Figura 30A muestra la expresión de p110 α, β, γ y δ en líneas celulares de MM detectadas mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos. MAb anti-α-tubulina sirvió como control de carga. p110δ en células de MM del paciente se detectó mediante inmunotransferencia usando anticuerpo anti-P110δ (Figura 30B).

El MAb anti-GAPDH sirvió como control de carga. Las células INA-6 y LB expresaban fuertemente p110δ, mientras que MM.1S, OPM1, MM.1R, Dox40, U266 o H929 carecían de expresión de p110δ (Figura 30A).

La expresión de p110δ en células MM.1S y LB se confirmó mediante análisis de inmunofluorescencia (Figura 30C). Las proteínas P110 α, β, γ, y δ recombinantes humanas en regulador de muestra SDS se calentaron durante 3 minutos antes de la carga en gel (10-20 µg por carril). Se detectaron proteínas P110 α, β, γ, δ humanas recombinantes por análisis de inmunotransferencia. Los niveles de P110δ se midieron en células MM.1S y LB usando anticuerpos secundarios conjugados con FITC específicos de P110δ. P110δ teñido de verde, y los ácidos nucleicos (DAPI) teñidos de azul.

La transferencia Western no reveló correlación entre la expresión de p110δ y la expresión de las otras isoformas (α, β y γ). De manera importante, todas las células de MM de los pacientes también expresaban p110δ (Figura 30B).

Ejemplo 29 (Referencia)

Citotoxicidad del compuesto I en células de MM

Este ejemplo demuestra que el compuesto I tiene citotoxicidad selectiva contra las células con p110δ. Específicamente, el compuesto I indujo potentemente citotoxicidad en células de MM positivas para p110δ, así como en células primarias de MM de pacientes sin citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos, lo que sugiere un índice terapéutico favorable.

Se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento de inactivación de p110δ en células de MM. Las células LB e INA-6 se transfectaron con ARNpi de P110δ (Si) o ARNpi de control (Simulación). Después de 24 horas, se determinó la expresión de P110δ mediante análisis de transferencia Western, véase la Figura 31A. Las células INA-6 fueron transfectadas con ARNpi de p110δ o ARNpi de control, y luego cultivadas durante 72 horas. El crecimiento celular se evaluó mediante ensayo de MTT, véase la Figura 31B. Los datos indican la media ± desviación estándar de los cultivos por triplicado, expresada como el doble del control. La transfección con ARNpi de p110δ, pero no ARNpi simulado, subreguló p110δ e inhibió el crecimiento de células de MM a las 72 horas (Figura 31A y 31B). Se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento del compuesto I inhibitor de moléculas pequeñas específicas de p110δ en líneas celulares de MM, PBMC y células de MM del paciente.

El compuesto I indujo citotoxicidad contra células de MM, LB e INA-6 (positivas para p110δ) de una manera dependiente de la dosis y del tiempo; por el contrario, se observó una citotoxicidad mínima en líneas celulares negativas para p110δ (Figura 31C). La leyenda para la Figura 31C: Las células de MM LB (□), INA-6 (Δ), RPMI 8226 (○), OPM2 (◇), H929 (●), U266 (◆), RPMI-LR5 (▲) y OPM1 (■) se cultivaron con o sin compuesto I durante 48 horas.

De manera importante, el compuesto I también indujo citotoxicidad contra células de MM del paciente (Figura 31D), sin citotoxicidad en PBMC de 4 voluntarios sanos a concentraciones de hasta 20 µM (Figura 31E). Las células de MM de los pacientes aisladas de BM por selección negativa se cultivaron con el compuesto I durante 48 horas. Las células mononucleares de sangre periférica aisladas de donantes sanos se cultivaron con el compuesto I durante 72 horas. Los datos representan la viabilidad media ± SD, evaluada por ensayo de MTT de cultivos por triplicado, expresada como porcentaje de controles no tratados. Estos resultados sugieren fuertemente que la sensibilidad al compuesto I está asociada con la expresión de P110δ, y sugieren una ventana terapéutica favorable.

Para determinar si la citotoxicidad inducida por el compuesto I es por apoptosis, se examinó la escisión de las caspasas y PARP mediante análisis de transferencia Western. Las células INA-6 se cultivaron con el compuesto I (0-5 µM) durante 120 horas. Los lisados celulares totales se sometieron a inmunotransferencia utilizando Ab anti-caspasa-3, 8, 9, PARP y α-tubulina. FL indica proteína de longitud completa, y CL indica proteína escindida. Se observó una escisión significativamente aumentada de caspasa-8, caspasa-9, caspasa-3 y PARP en células de MM INA-6 tratadas con el compuesto I durante 120 horas (Figura 31F). Estos resultados indican que la citotoxicidad desencadenada por el compuesto I está mediada, al menos en parte, a través de la apoptosis dependiente de caspasa (tanto intrínseca como extrínseca).

Ejemplo 30 (Referencia)

Inhibición de la fosforilación de AKT y ERK por el compuesto I

Este ejemplo demuestra la inhibición de la fosforilación de AKT y ERK por el compuesto I.

Un importante efector secuencia abajo de PI3K es la serina/treonina proteína quinasa AKT, que se activa por fosforilación de Thr308 en el bucle de activación del dominio quinasa y Ser473 en la cola C terminal. La fosforilación de ambos sitios requiere una interacción entre el dominio de homología de pleckstrina N-terminal de AKT y el fosfoinosítido de membrana generado por PI3K. Se demostró que el compuesto I inhibe ambos dominios, lo que sugiere que P110δ es la isoforma predominante responsable de la señalización de PI3K en las líneas celulares de MM.

Se examinó la inhibición de las rutas AKT y ERK en células INA-6 por el compuesto I. Las células INA-6 se cultivaron con el compuesto I o LY294002 durante 12 horas, Figura 32A. Se usó Ab actina como control de carga. Las células INA-6 y MM.1S se cultivaron con el compuesto I (0, 0,25, 1,0, 5,0 µM) durante 6 horas, Figura 32B. Las células LB e INA-6 se cultivaron con el compuesto I durante 0-6 horas, Figura 32C. Los lisados celulares completos se sometieron a inmunotransferencia utilizando anticuerpos AKT, P-AKT (Ser473 y Thr308), ERK1/2, P-ERK1/2, P-PDK1 y P-FKRHL. Se usó α-tubulina como control de carga.

El compuesto I bloqueó significativamente la fosforilación de AKT y ERK1/2 en células INA-6 positivas para p110δ (Figura 32A), pero no afectó la fosforilación de AKT o ERK en células MM.1S con baja expresión de P110δ (Figura 32B). El compuesto I también inhibió significativamente la fosforilación de PDK-1 secuencia arriba y FKHRL secuencia abajo en células de MM INA-6 y LB de una manera dependiente del tiempo y de la dosis (Figura 32C), confirmando además la inhibición de ambas rutas PI3K/AKT y ERK en estas células

Ejemplo 31 (Referencia)

El compuesto I induce el desarrollo de AVO y la autofagia

Este ejemplo demuestra la capacidad del compuesto I para desencadenar tanto apoptosis como autofagia.

AKT regula la autofagia, por lo que se llevó a cabo la investigación del compuesto I para inducir la autofagia en células de MM LB e INA-6.

Las células de MM INA-6 y LB se trataron con 5 µM del compuesto I durante 6 horas. El tratamiento con el compuesto I indujo la acumulación de LC3 en las células LB e INA-6, evidenciado por microscopía de fluorescencia o microscopía electrónica de transmisión. La formación del autofagosoma se definió por la acumulación de LC3; las flechas indican autofagosomas, Figura 33A.

Se trataron células INA-6 con 5 µM del compuesto I o privación de suero durante 6 horas, se tiñeron con 1 µg/mL de naranja de acridina durante 15 minutos, y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia, Figura 33B. Se determinaron los niveles de proteína LC3 y beclina-1 mediante transferencia Western utilizando anticuerpos LC3 y beclina-1 de lisados de células INA-6 tratadas con el compuesto I, con o sin 3-MA, Figura 33C. GAPDH sirvió como control de carga.

El análisis de inmunofluorescencia mostró un marcado aumento de tinción de LC3 en células INA-6 y LB desencadenadas por el tratamiento con el compuesto I (5 µM, 6 horas) (Figura 33A). El análisis por microscopio electrónico también mostró un aumento de las vacuolas autofágicas (flechas) en las células de MM tratadas con el compuesto I. Dado que la autofagia se caracteriza por el desarrollo del orgánulo vesicular ácido (AVO), se llevó a cabo una tinción con naranja de acridina. Como se muestra en la Figura 33B, la tinción vital con naranja de acridina reveló el desarrollo de AVO en células LB e INA-6 tratadas con el compuesto I. Además, se detectaron proteínas LC3-II y beclina-1 marcadamente aumentadas en células de MM INA-6 después de 6 horas de tratamiento con el compuesto I, que se bloqueó con inhibidor 3-MA autofágico (Figura 33C).

No se indujo citotoxicidad en las células INA-6 y LB por 3-MA a concentraciones de hasta 100 µM, Figura 33D. Las células LB (♦) positivas para P110δ se trataron con 3-MA (0-100 µM) durante 24 horas. Los datos representan la media (± SD) de cultivos por triplicado.

Estos resultados indican que el compuesto I induce el desarrollo de AVO y autofagia en puntos de tiempo más tempranos que la inducción de la escisión de caspasa/PARP.

La autofagia degrada los componentes celulares, recicla los constituyentes celulares y responde a varios tipos de estrés celular. En este ejemplo, LC3-II, una característica distintiva de la autofagia, se induce mediante el tratamiento con el compuesto I en líneas celulares MM positivas para p110δ. Es importante destacar que el tratamiento con el compuesto I resultó en un aumento marcado de la autofagia, evidenciado por la presencia de vacuolas autofágicas en el citoplasma, formación de AVO, asociación de membrana de la proteína I asociada a microtúbulos de LC3 con autofagosomas, y una marcada inducción de proteína LC3-II. El análisis por microscopía electrónica confirmó que el compuesto I indujo autofagosomas. LC3-II se expresó a través de la conversión de LC3-I. Por el contrario, la autofagia inducida por el compuesto I fue suprimida por 3-MA, un inhibidor específico de autofagia. Estos estudios sugieren que los efectos citotóxicos tempranos del compuesto I están asociados con la autofagia.

Ejemplo 32 (Referencia)

El Compuesto I inhibe el crecimiento celular en presencia de BMSC

Este ejemplo demuestra la capacidad del compuesto I para inhibir el crecimiento de células de MM paracrinas con BMSC.

5 Dado que IL-6 e IGF-1 inducen el crecimiento y anti-apoptosis en células de MM, se examinó el compuesto I para superar los efectos de estas citoquinas en células de MM INA-6 y LB. Las células LB e INA-6 se cultivaron durante 48 horas con medio de control (■); o con el compuesto I a 5,0 μM (▨) o 10 μM (□), en presencia o ausencia de IL-6 (1 y 10 ng/mL), Figura 34A, o IGF-1 (10 y 100 ng/mL), Figura 34B. La síntesis de ADN se determinó midiendo la incorporación de [^3H]-timidina durante las últimas 8 horas de los cultivos de 72 horas. Los datos representan la media ($\pm$ SD) de cultivos por triplicado. Ni IL-6 ni IGF-1 protegieron contra la inhibición del crecimiento inducido por el compuesto I (Figuras 34A y 34B).

El microambiente de BM confiere proliferación y resistencia a los fármacos en MM, por lo tanto, se examinó el efecto inhibitor del crecimiento de células de MM del compuesto I en presencia de las BMSC.

15 Se cultivaron células de MM LB e INA-6 durante 48 horas con medio de control (□) y con 2,5 μM (▨), 5 μM (▨), y 10 μM (■) del compuesto I, en presencia o ausencia de BMSC, Figura 34C. La síntesis de ADN se determinó mediante la incorporación de [^3H]-timidina. Los datos representan la media ($\pm$ SD) de cultivos por triplicado.

Se midió la IL-6 en sobrenadantes de cultivo de BMSC tratadas con el compuesto I (0-2, 5 μM) por ELISA, Figura 34D. Las barras de error indican SD ($\pm$).

Se cultivaron BMSC con 1,0 μM del compuesto I o medio de control durante 48 horas; las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo se detectaron usando matrices de citoquinas, Figura 34E.

20 Se trataron células INA-6 cultivadas con o sin BMSC con compuesto durante 48 horas. Los lisados celulares totales se sometieron a inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados, Figura 34F. La Actina se utilizó como control de carga.

25 Se cultivaron las BMSC de 2 pacientes diferentes (□, ◇) con el compuesto I (0-20 μM) durante 48 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayo de MTT, Figura 34G. Los valores representan la media $\pm$ SD de cultivos por triplicado.

De manera importante, el compuesto I inhibió el crecimiento y la secreción de citoquina (Figuras 34C-E), así como la fosforilación de AKT y ERK (Figura 34F), inducida por las BMSC. Por el contrario, no se observó inhibición significativa del crecimiento en las BMSC (Figura 34G). Estos resultados indican que el compuesto I bloquea el crecimiento de células de MM paracrinas en el contexto del microambiente de BM.

30 Ejemplo 33 (Referencia)

El compuesto I inhibe la formación de túbulos de HuVEC angiogénicos

35 Este ejemplo demuestra la capacidad del compuesto I para inhibir la formación de túbulos de HuVEC. Se investigó el papel de PI3K, específicamente la isoforma p110, en angiogénesis. Las células endoteliales son un regulador esencial de la angiogénesis para el crecimiento tumoral. Ambas rutas de Akt y ERK están asociadas con el crecimiento de células endoteliales y la regulación de la angiogénesis; y de manera importante, las células endoteliales expresan p110 δ . Este ejemplo también demuestra que el compuesto I bloquea la formación de tubos tipo capilar *in vitro*, asociada con la subregulación de la fosforilación de Akt.

40 Se investigó el efecto de la inhibición de P110 δ en la angiogénesis. Las HuVEC se trataron con 0, 1,0 o 10 μM de compuesto I durante 8 horas, y se evaluó la formación de tubos mediante células endoteliales (Figura 35A). Las células HuVEC se sembraron en placa sobre superficies revestidas con Matrigel y se dejaron formar túbulos durante 8 horas, en presencia o ausencia del compuesto I. Se midió la formación del tubo de células endoteliales mediante análisis microscópico, Figura 35B. *P <0,005.

45 Las HuVEC se cultivaron con el compuesto I (0-20 μM) durante 48 horas, y se evaluó la viabilidad mediante ensayo de MTT, Figura 35C. Los datos que se muestran son la media $\pm$ SE de pozos por triplicado de un experimento representativo. De este modo, el compuesto I inhibió la formación de tubos de tipo capilar de una manera dependiente de la dosis (p <0,05) (Figura 35B), sin citotoxicidad asociada (Figura 35C).

50 La fosforilación y expresión de AKT y ERK1/2 se redujo notablemente en células HuVEC mediante el tratamiento con el compuesto I. Las HuVEC se cultivaron con el compuesto I (0-200 μM) durante 8 horas, y los lisados celulares se analizaron mediante inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados, Figura 35D. Se utilizó como control de carga Actina.

Estos hallazgos sugieren que el compuesto I puede inhibir la angiogénesis, asociado con la subregulación de la actividad de AKT y ERK.

Ejemplo 34 (Referencia)

El Compuesto II inhibe el crecimiento de células de MM *in vivo*

Este ejemplo demuestra la capacidad del compuesto II para inhibir el crecimiento de células de MM humanas *in vivo*.

Se evaluó la eficacia *in vivo* del inhibidor de P110δ en un modelo de xenoinjerto en el que se inyectan ratones SCID por vía subcutánea con células de MM humanas.

Los ratones inyectados con 5×10^6 células LB se trataron por vía oral dos veces al día con vehículo de control (●), y el compuesto II 10 mg/kg (□) o 30 mg/kg (○). El volumen tumoral medio se calculó como en Materiales y métodos, Figura 36A. Las barras de error representan SD (±).

Imágenes representativas de todo el cuerpo de un ratón tratado durante 12 días con vehículo de control (panel superior) o compuesto II (30 mg/kg) (panel inferior), Figura 36B.

Los tumores recogidos del ratón tratado con el compuesto II (30 mg/kg) (panel derecho) y el ratón de control (panel izquierdo) se sometieron a análisis inmunohistoquímico usando Ab CD31 y P-AKT. Las células positivas para CD31 y P-AKT son de color marrón oscuro, Figura 36D.

Los ratones se trataron con el compuesto II 10 mg/kg (–), 30 mg/kg (...) o vehículo de control (-). La supervivencia se evaluó desde el primer día de tratamiento hasta el sacrificio con curvas de Kaplan-Meier, Figura 36C.

Se recogieron tejidos tumorales de ratones tratados con vehículo de control o compuesto II (30 mg/kg). Los niveles de proteína de fosforilados de PDK-1 y AKT (Ser473) se determinaron por transferencia Western de lisados celulares, Figura 36E. La Actina se utilizó como control de carga.

Se controló el crecimiento de células INA-6 injertadas en fragmentos de hueso humano en ratones SCID mediante mediciones en serie de suero de shuIL-6R. Los ratones se trataron con el compuesto II 10 mg/kg (□), 30 mg/kg (Δ) o vehículo de control (●), y los niveles de shuIL-6R se determinaron semanalmente mediante ELISA, Figura 36F. Las barras de error indican SD (±).

El Compuesto II (inhibidor de p110 δ) redujo significativamente el crecimiento tumoral de MM en el grupo de tratamiento ($n = 7$) en comparación con los ratones de control ($n = 7$). La comparación de los volúmenes tumorales mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de control frente a los de tratamiento (vs 10 mg/kg, $P < 0,05$, vs a 30 mg/kg, $P < 0,01$) (Figura 36A). Se observó una marcada disminución en el crecimiento tumoral en ratones tratados frente a los de control en el día 12 (Figura 36B). Las curvas de Kaplan-Meier y el análisis de intervalo logarítmico mostraron una supervivencia total (OS) media de 15 días (intervalo de confianza del 95%, 12 - 17 días) en ratones de control frente a 23 días (95% de intervalo de confianza, 15-34 días) y 32 días (95% de intervalo de confianza, 27-49 días) en los grupos tratados con 10 mg/kg y 30 mg/kg del compuesto II, respectivamente. También se observó una prolongación estadísticamente significativa en la OS media en comparación con los ratones de control en los grupos de tratamiento (vs 10 mg/kg, $P = 0,086$, vs 30 mg/kg, $P = 0,056$) (Figura 36C). De manera importante, el tratamiento con el vehículo solo o con el compuesto II no afectó el peso corporal. Además, el análisis inmunohistoquímico (Figura 36D) y la inmunotransferencia (Figura 36E) confirmaron que el tratamiento con compuesto II (30 mg/kg) inhibió significativamente p-Akt y p-PDK-1, así como disminuyó significativamente las células positivas para CD31 y la densidad de microvasos ($p < 0,01$) (Figura 36D). Esto sugiere que el compuesto II puede inhibir la angiogénesis *in vivo* mediante la supresión de la ruta de Akt.

Para examinar la actividad del compuesto II sobre el crecimiento de células de MM en el contexto del microambiente de BM humana *in vivo*, se usó un modelo SCID-hu en el que las células INA-6 dependientes de IL-6 se inyectan directamente en un fragmento de hueso humano implantado por vía subcutánea en ratones SCID. Este modelo recapitula el microambiente de BM humana con crecimiento dependiente de IL-6/BMSC humana de células de MM humanas INA-6. Estos ratones SCID-hu se trataron con el compuesto II o vehículo solo diariamente durante 4 semanas, y se controló shuIL-6R en suero como carga tumoral marcadora. Como se muestra en la Figura 36F, el tratamiento con el compuesto II inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control del vehículo. Se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral en este modelo, evidenciada por la disminución de los niveles de shuIL-6R en suero liberados por las células INA-6, confirmando que la inhibición de p110δ bloquea la actividad promotora del crecimiento de MM del microambiente de BM *in vivo*. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la inhibición de p110δ por el compuesto II inhibe significativamente el crecimiento de MM *in vivo* y prolonga la supervivencia.

Ejemplo 35

El compuesto I en combinación con bortezomib exhibe citotoxicidad sinérgica

Este ejemplo demuestra el efecto del Compuesto I en combinación con bortezomib para mediar la citotoxicidad sinérgica de MM.

Se investigaron los efectos de combinar el compuesto I con bortezomib en la inducción de la citotoxicidad sinérgica de MM. Las células de MM LB e INA-6 se cultivaron con medio (■) y con el compuesto I, 1,25 μM (▨), 2,5 μM (▩), o 5,0 μM (□), en presencia o ausencia de bortezomib (0-5 nM). La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de MTT; los datos representan la media $\pm$ SD de cultivos por cuadruplicado, Figura 37A.

- 5 Las células INA-6 se trataron con el compuesto I (5 μM) y/o bortezomib (5 nM) durante 6 horas. La fosforilación de AKT se determinó mediante transferencia Western de lisados celulares usando anticuerpos fosfo-AKT (ser473), Figura 37B. La Actina sirvió como control de carga.

- 10 El compuesto I potencia la citotoxicidad de bortezomib. Las concentraciones crecientes del compuesto I (1,5-5,0 μM) añadidas a bortezomib (2,5, 5,0 nM) desencadenaron citotoxicidad sinérgica en células de MM LB e INA-6 (Figura 37A y Tabla 7). De manera importante, la inducción de fosfo-Akt por el tratamiento con bortezomib se inhibió en presencia del compuesto I (Figura 37B).

Tabla 7

Índice de combinación (CI)				
	Bortezomib (nM)	Compuesto I (μM)	Fa	CI
LB	2,5	1,25	0,39	0,57
	2,5	2,5	0,52	0,58
	2,5	5	0,57	0,67
	5	1,25	0,42	0,88
	5	2,5	0,60	0,25
	5	5	0,67	0,22
INA-6	2,5	1,25	0,49	0,31
	2,5	2,5	0,58	0,48
	2,5	5	0,69	0,54
	5	1,25	0,56	0,73
	5	2,5	0,66	0,42
	5	5	0,75	0,31

- 15 Ejemplo 36 (Referencia)

Compuesto I eficaz en líneas celulares de linfoma folicular

- 20 Este ejemplo proporciona evidencia de que el compuesto I bloquea la señalización de PI3K e induce apoptosis en células de linfoma folicular. P110 δ se expresa en líneas celulares FL como se muestra en la Figura 38A. Ciertas líneas celulares muestran una reducción en la producción de pAkt, Akt, pS6 y S6 cuando la célula se expone al compuesto I, Figura 38B. La escisión de PARP y caspasa-3 se observa después de la exposición al compuesto I de una manera dependiente de la dosis después de 24 horas a 0,1 μM y 0,5 μM , Figura 38C.

Ejemplo 37 (Referencia)

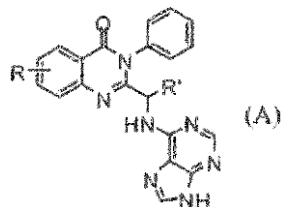
Compuesto I eficaz en células primarias de MCL

- 25 Este ejemplo demuestra que el compuesto I es efectivo contra MCL. Se encontró que el compuesto I bloqueaba la señalización constitutiva de PI3K en células primarias de MCL de dos pacientes de una manera dependiente de la dosis cuando se exponía a 0,1 μM o 1 μM de compuesto I, Figura 39A. También se observa que el Compuesto I inhibe el factor de supervivencia y la señalización de quimioquinas en las líneas celulares de MCL. La Figura 39B muestra una reducción significativa de pAkt en líneas de MCL expuestas a diferentes factores de supervivencia en presencia del compuesto I.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula A para uso en un método de tratamiento de una neoplasia hematológica en un ser humano, en el que el método comprende la administración simultánea o secuencial de bortezomib,

en el que la fórmula A es



5

en la que R es H, halo o alquilo C1-C6; y

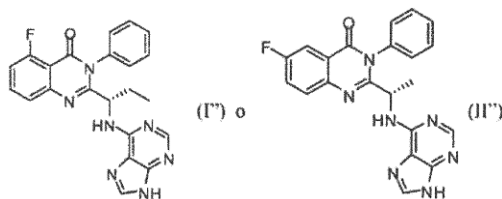
R' es alquilo C1-C6; o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en el que el compuesto opcionalmente se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es predominantemente el enantiómero S.

3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15

4. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la neoplasia hematológica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular, macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma de células B y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

20

5. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ser humano es refractario al tratamiento de quimioterapia, o en recaída después del tratamiento con quimioterapia.

6. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ser humano tiene una neoplasia hematológica que expresa constitutivamente la actividad de fosforilación de Akt.

25

7. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ser humano tiene una neoplasia hematológica con alta actividad de p110δ y baja actividad de p110α.

8. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto mantiene una concentración media en sangre por encima del nivel de EC₅₀ para la activación de PI3Kδ y por debajo del nivel para EC₅₀ de activación de PI3Kγ en basófilos durante un período de al menos 12 horas desde la administración del compuesto.

30

9. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto mantiene una concentración media en plasma sanguíneo entre 100 nM y 110δ nM durante un período de al menos 12 horas desde la administración del compuesto.

10. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ser humano tiene al menos un ganglio linfático agrandado.

35

11. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el linfoma no Hodgkin es un linfoma no Hodgkin indolente.

12. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho ser humano es refractario a al menos una quimioterapia estándar o experimental.

13. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho ser humano es refractario a al menos dos quimioterapias estándar o experimentales.
14. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho ser humano es refractario a al menos un tratamiento de quimioterapia estándar o experimental.
- 5 15. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho ser humano es refractario a al menos dos tratamientos de quimioterapia estándar o experimentales.

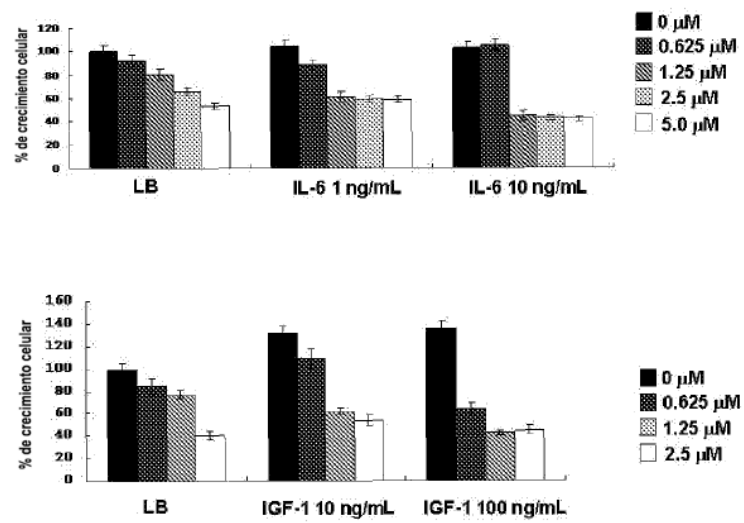


Figura 1

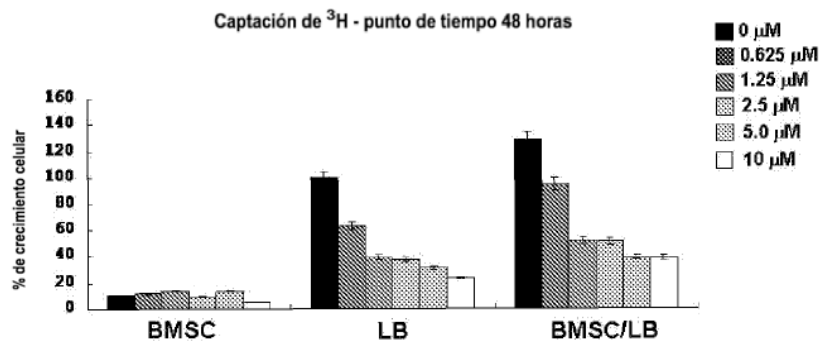
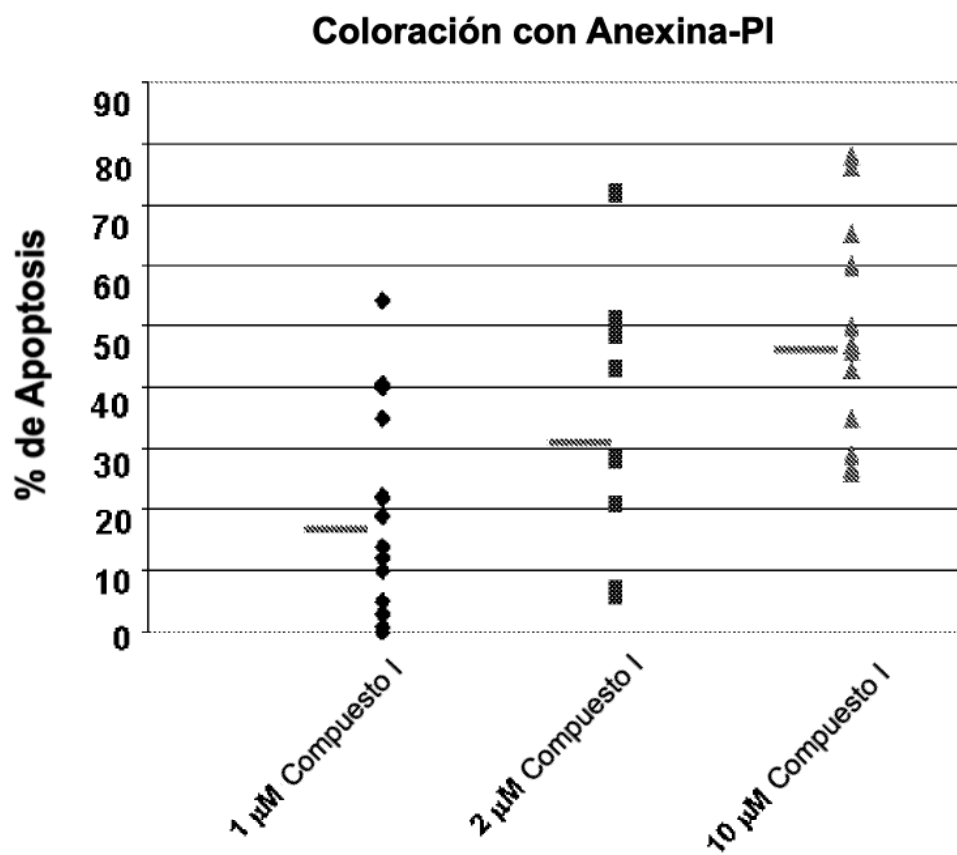


Figura 2

**Figura 3**

Línea celular	% de reducción en viabilidad celular	% de reducción en fosforilación de Akt (Ser473)	Activación de caspasa 3
MOLT-4	52%	84%	Sí
CCRF-SB	61%	90%	Sí
CEM/C2	50%	71%	Sí
CEM/C1	57%	47%	Sí
SupB13*	42%	85%	No
SupB15*	38%	20%	No

Figura 4

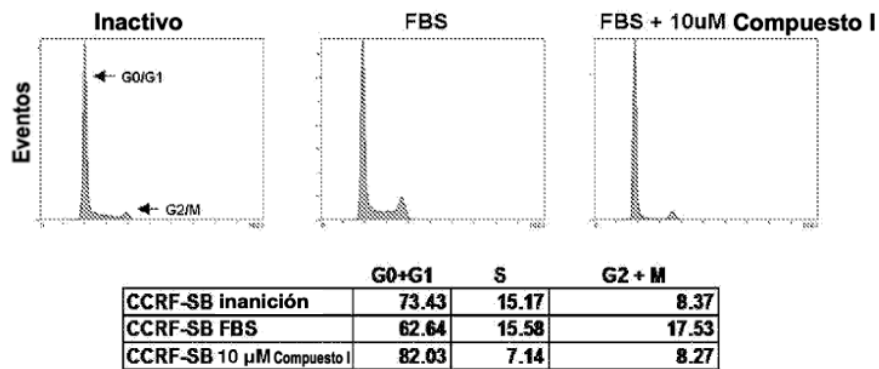


Figura 5

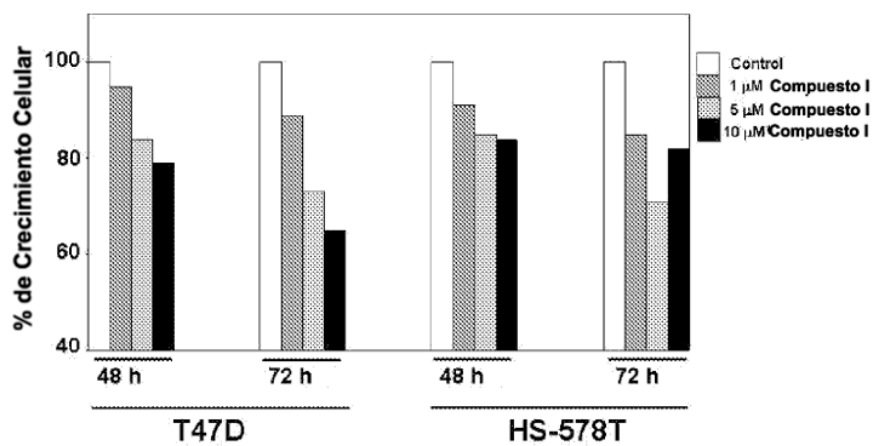


Figura 6

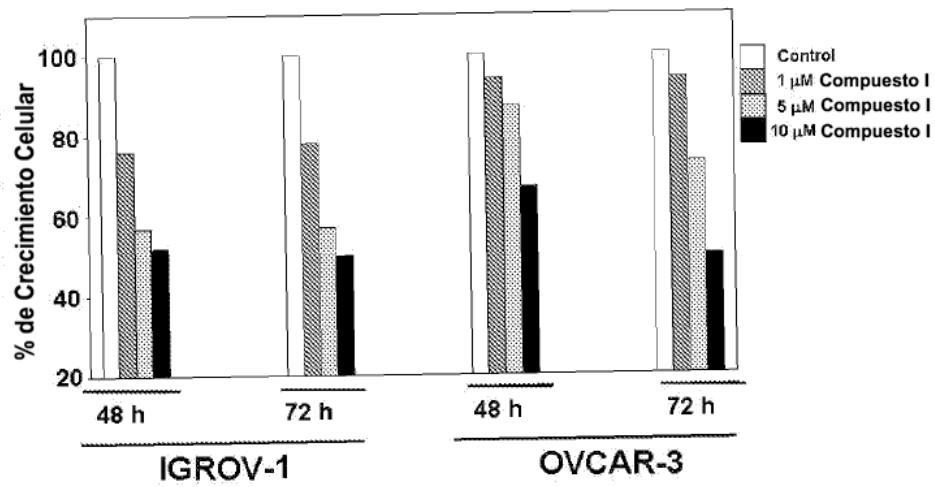


Figura 7

Línea Celular	Tipo	Fosforilación constitutiva de Akt (Ser473)	Reducción en Akt(Ser473) con Compuesto I
HT	Linfoma B	Sí	Sí
CCRF-CEM	Linfoma T	Sí	Sí
MOLT-4	ALL	Sí	Sí
SupB13	ALL	Sí	Sí
CEM/C2	ALL	Sí	Sí
CEM/C1	ALL	Sí	Sí
CCRF-SB	ALL	Sí	Sí
JURKAT	Linfoma T	Sí	Sí
DH82	Histiocitosis maligna (perro)	Sí	Sí
SU-DHL-5	DLBCL	Sí	Sí
SU-DHL-10	DLBCL	Sí	Sí
OCI-LY-19	DLBCL	Sí	Sí
MOLM-14	AML	Sí	Sí

Figura 8

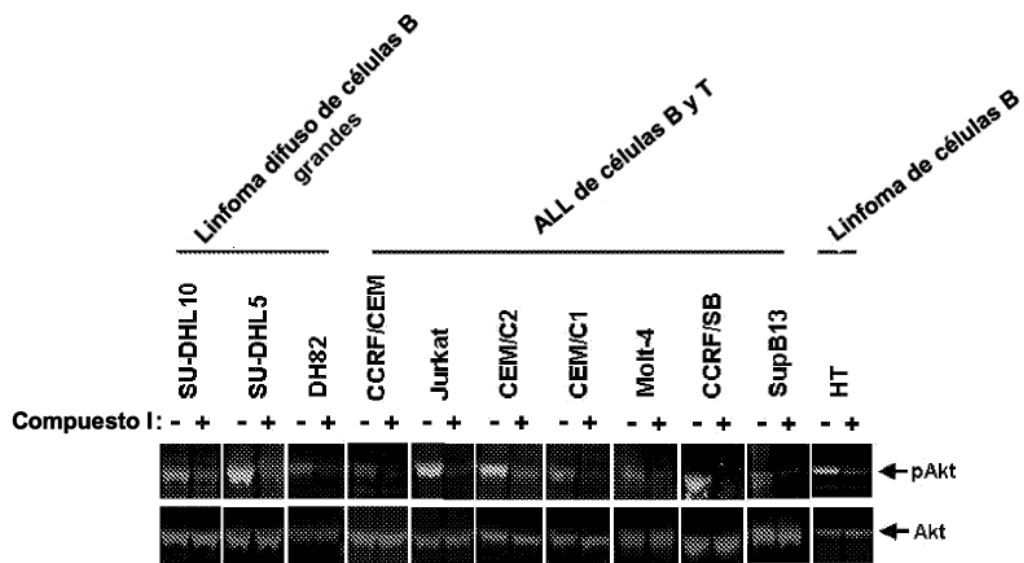


Figura 9

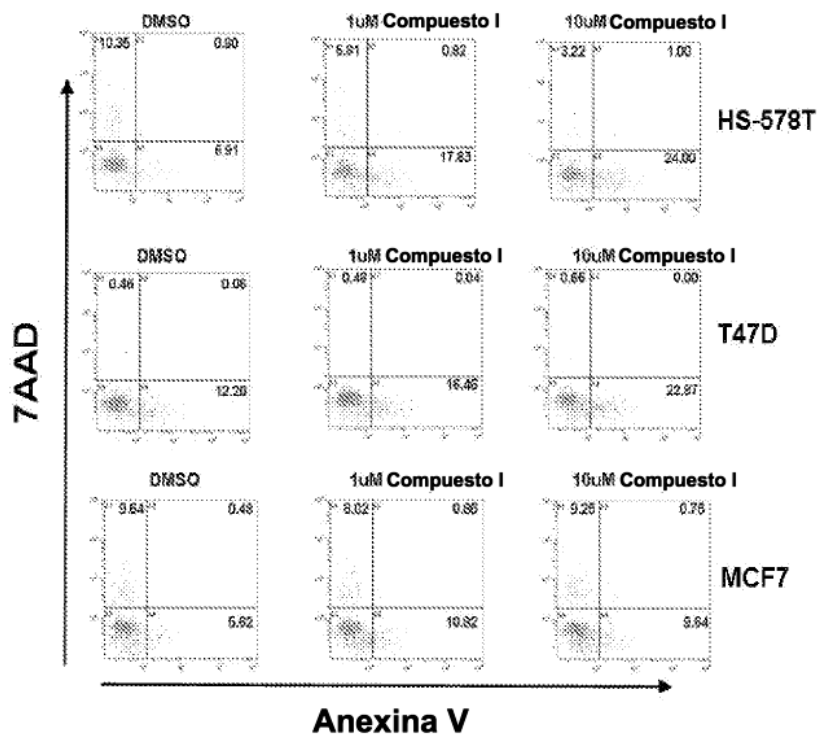


Figura 10

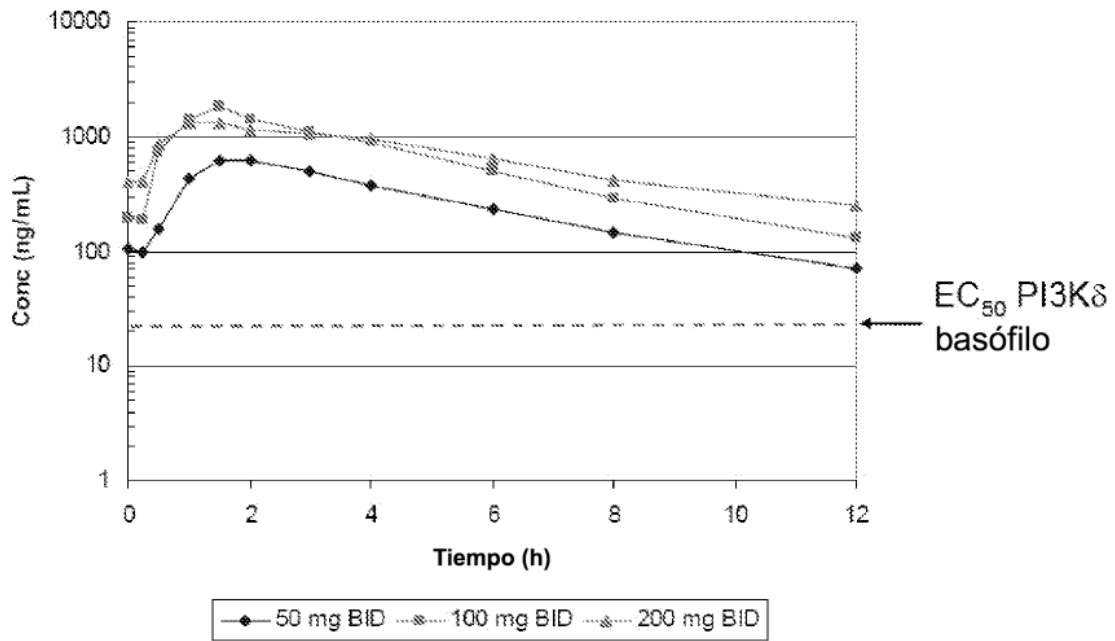


Figura 11

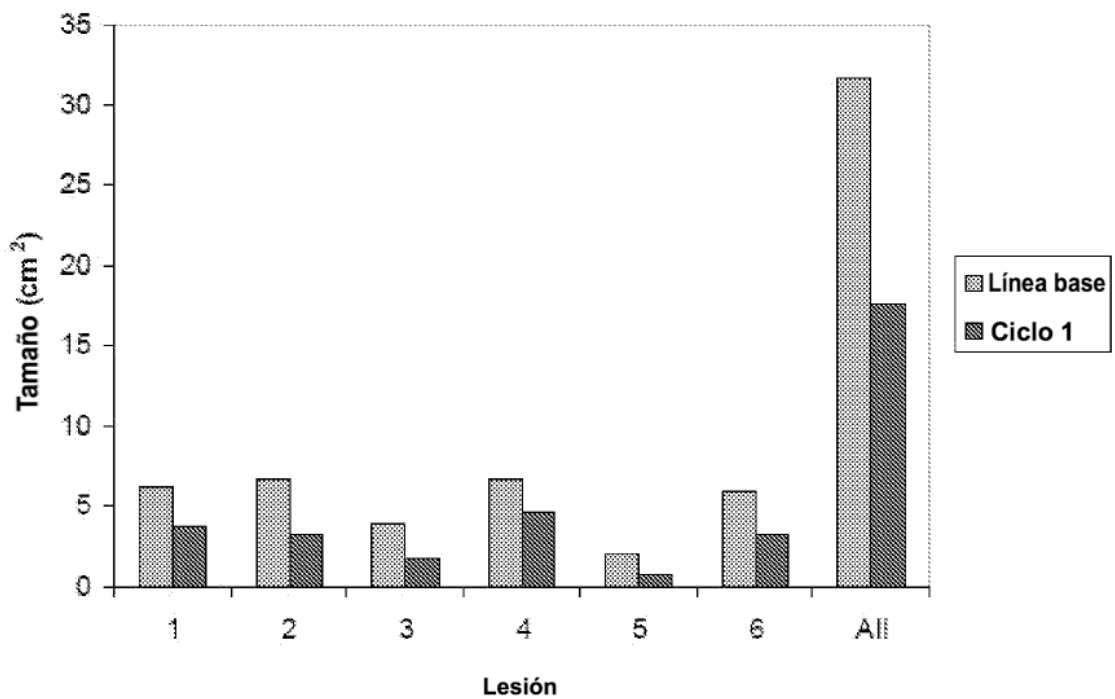


Figura 12

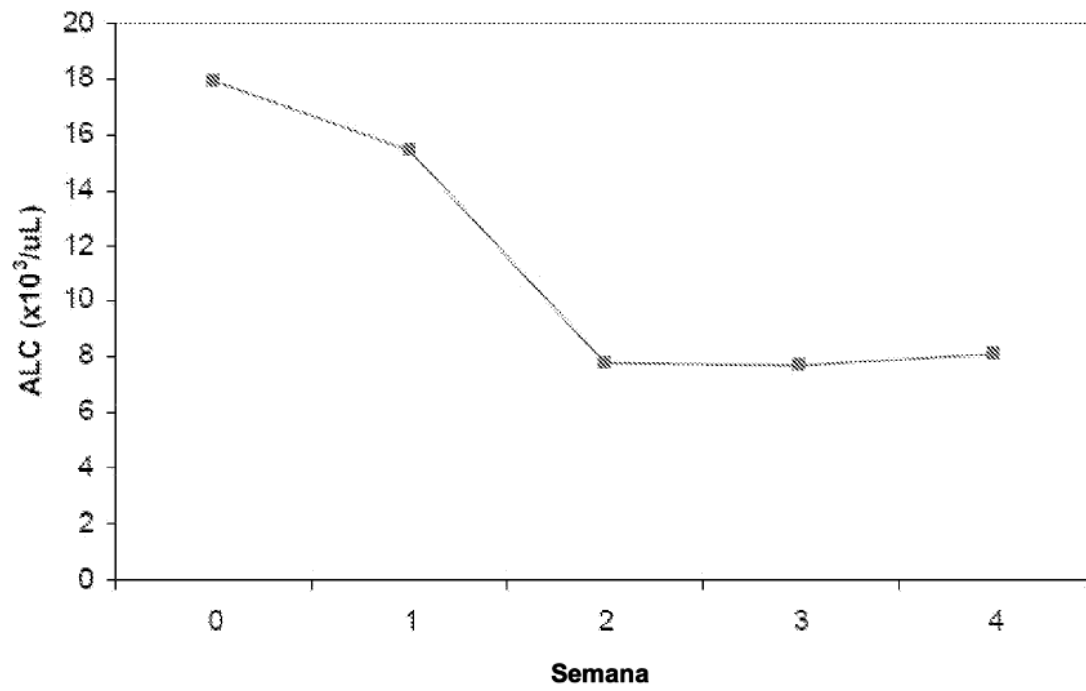


Figura 13

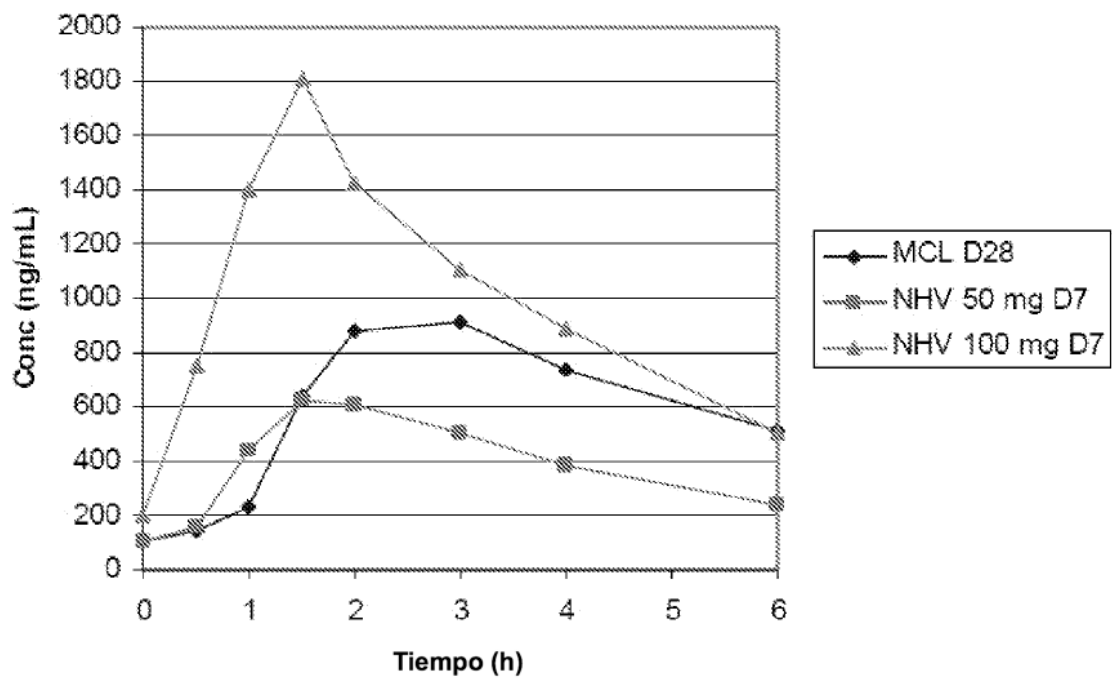


Figura 14

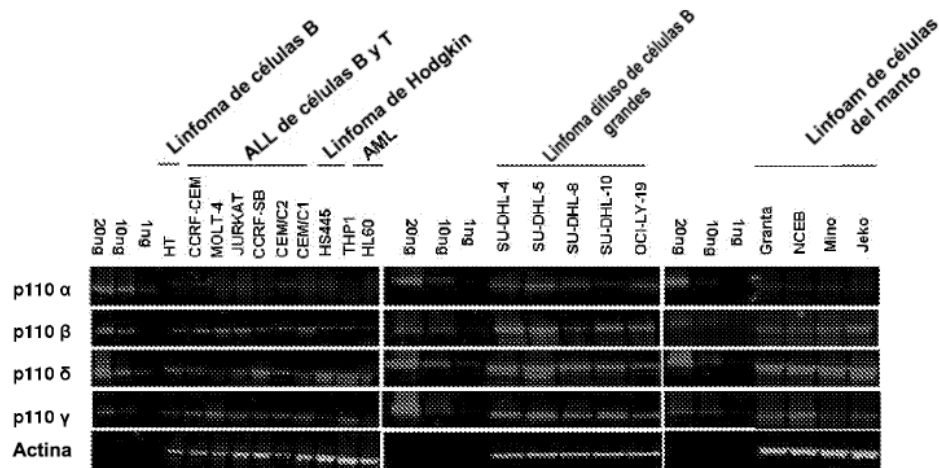


Figura 15

Alamar Blue

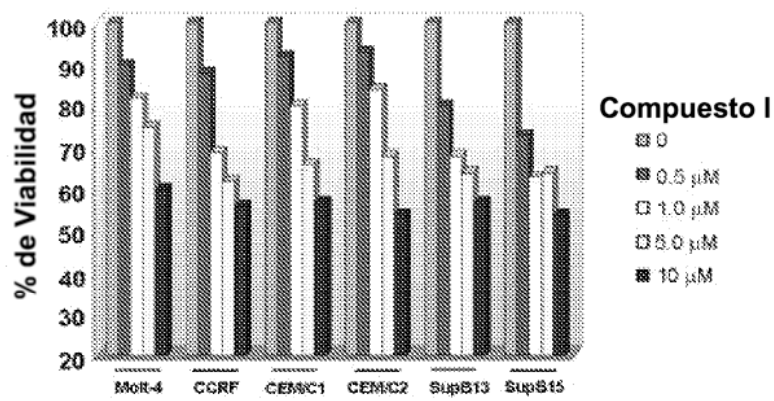


Figura 16 (A)

Anexina V-FITC/7AAD

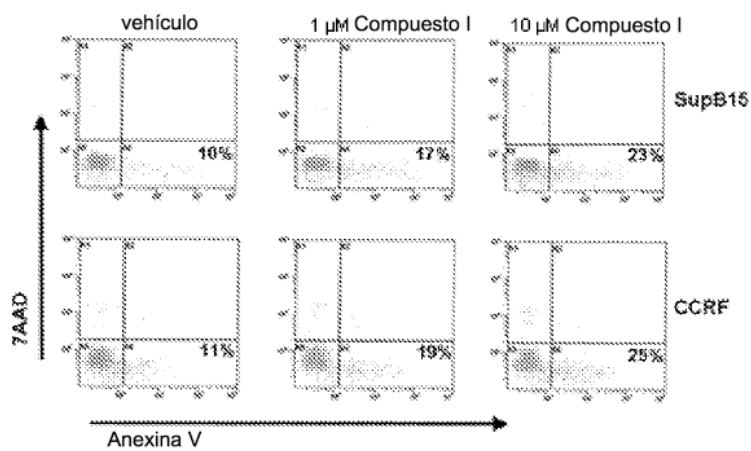


Figura 16 (B)

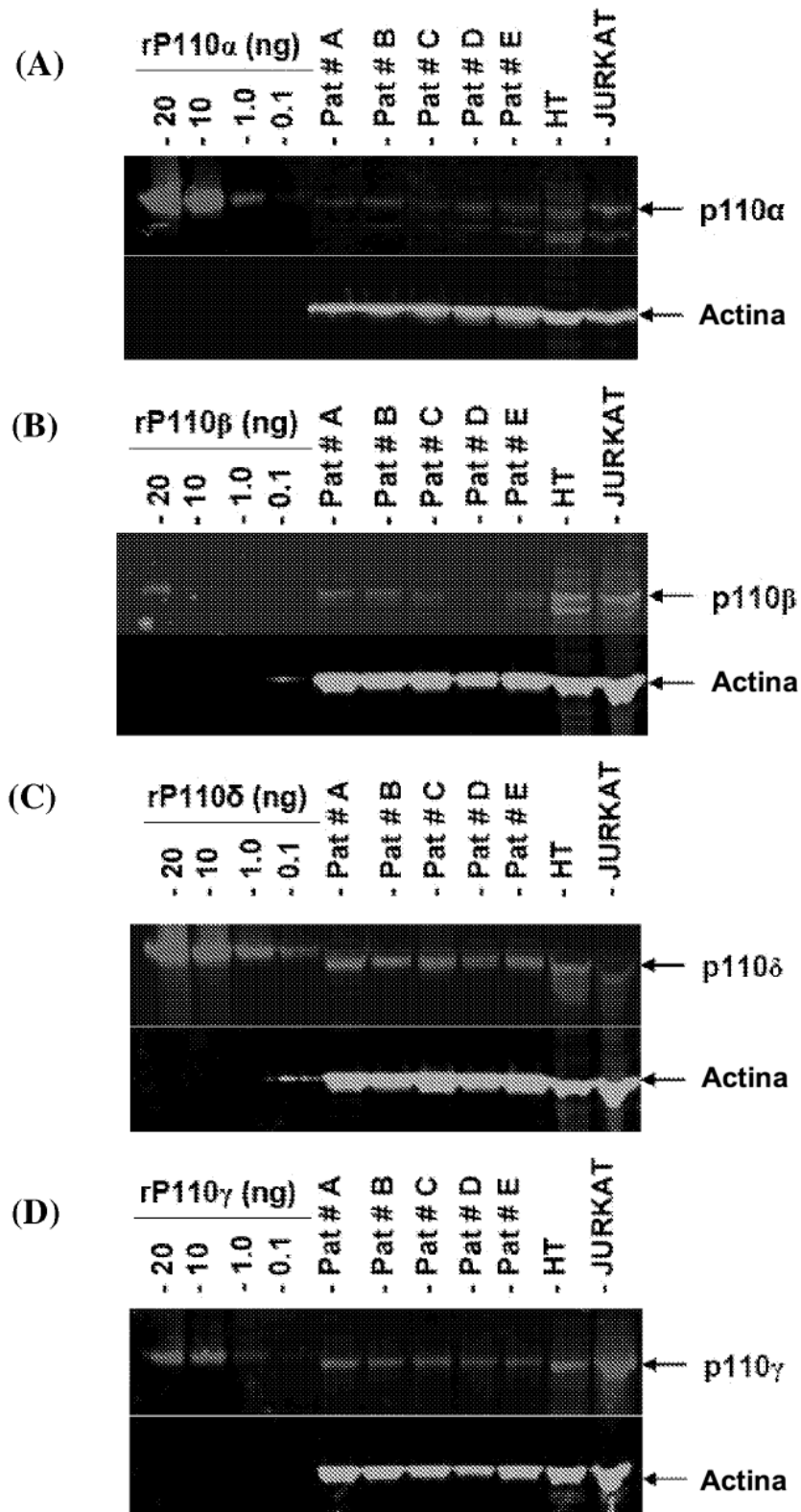


Figura 17 (A-D)

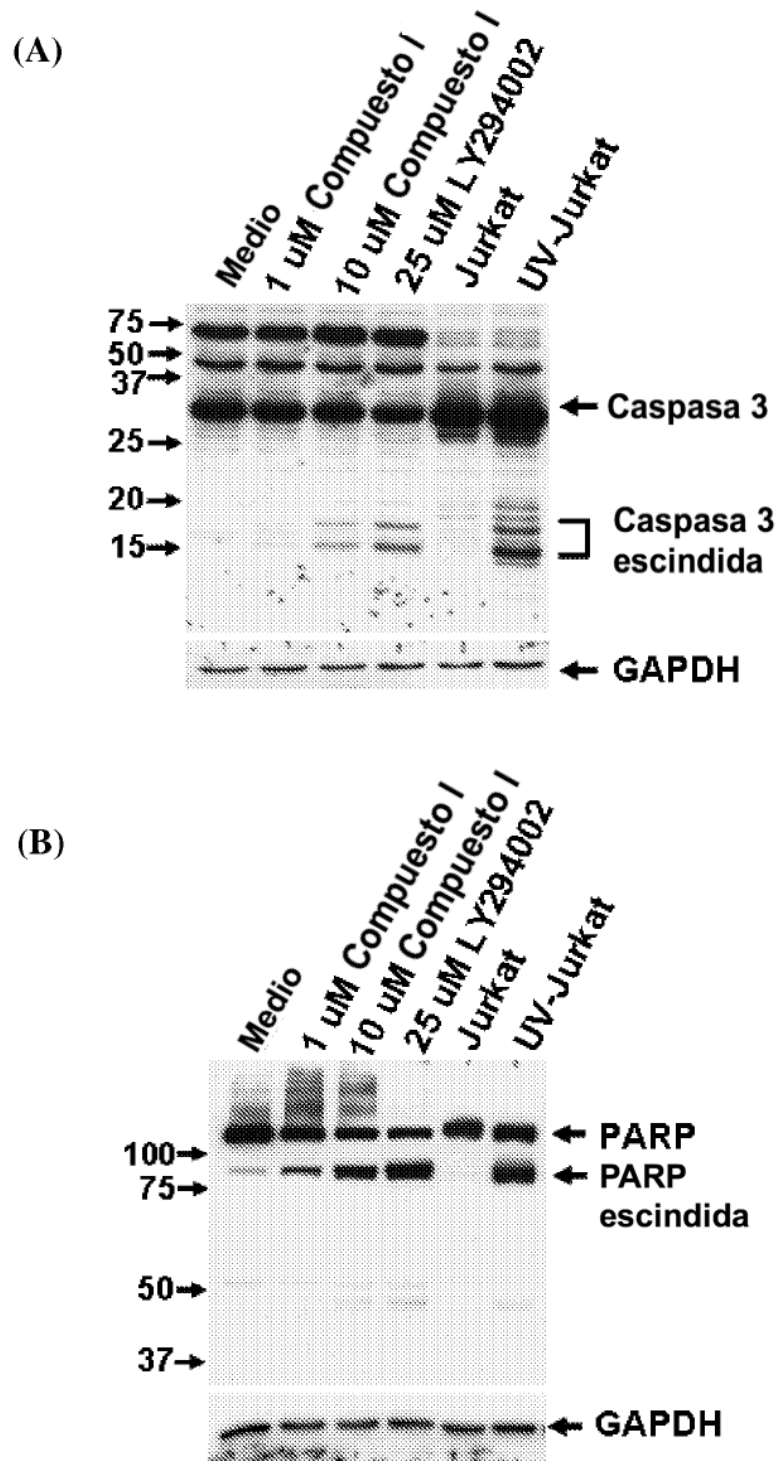


Figura 18 (A-B)

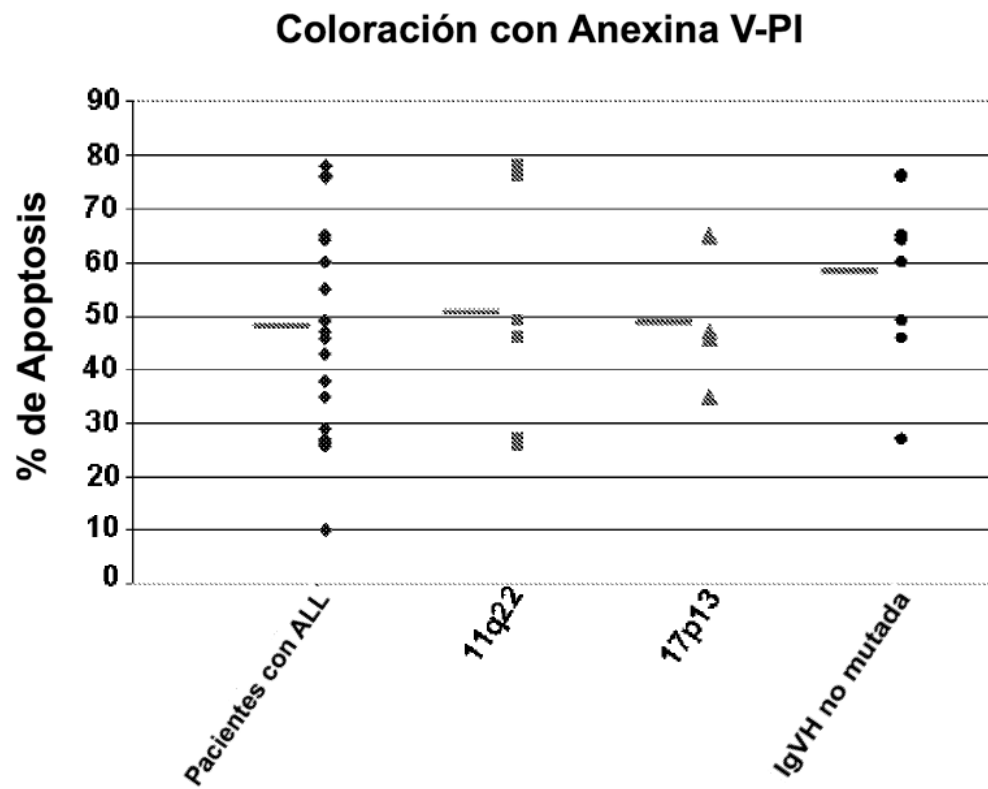


Figura 19

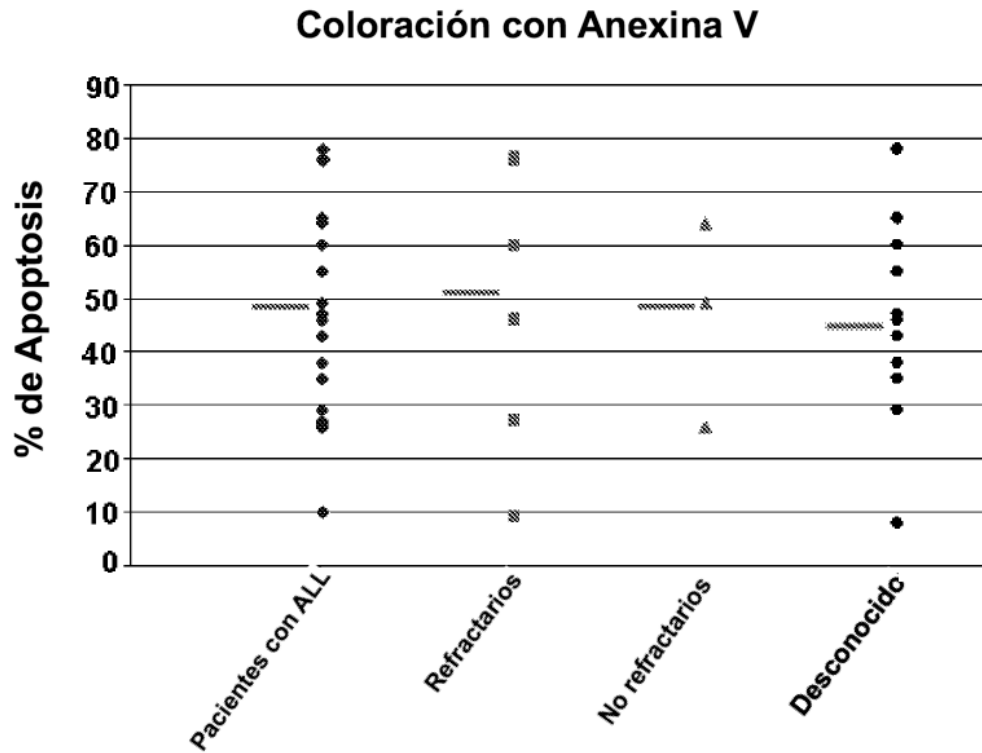


Figura 20

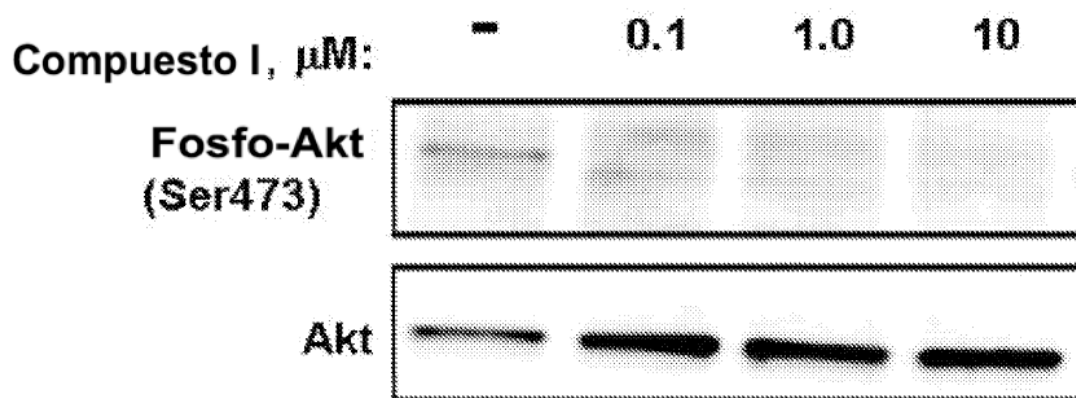


Figura 21

Sin Estimulación

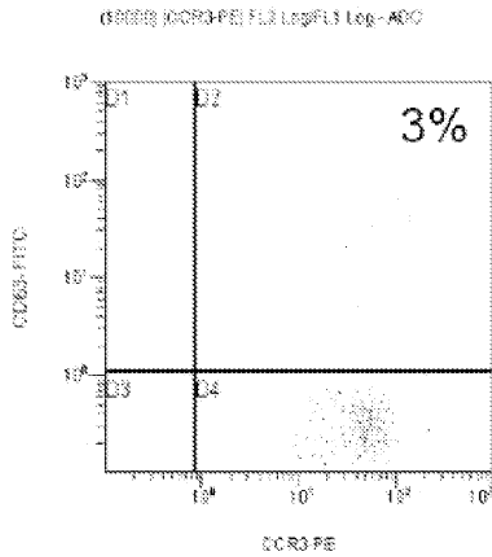


Figura 22 (A)

Anti-FC ϵ R1

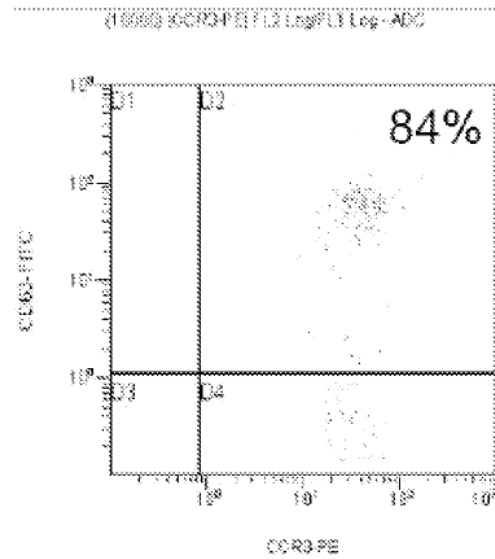


Figura 22 (B)

fMLP

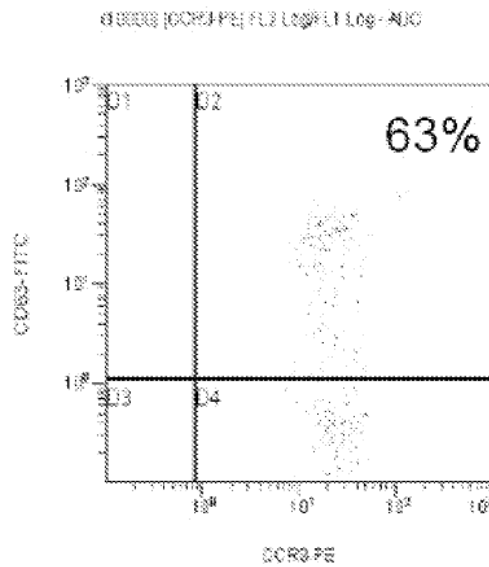


Figura 22 (C)

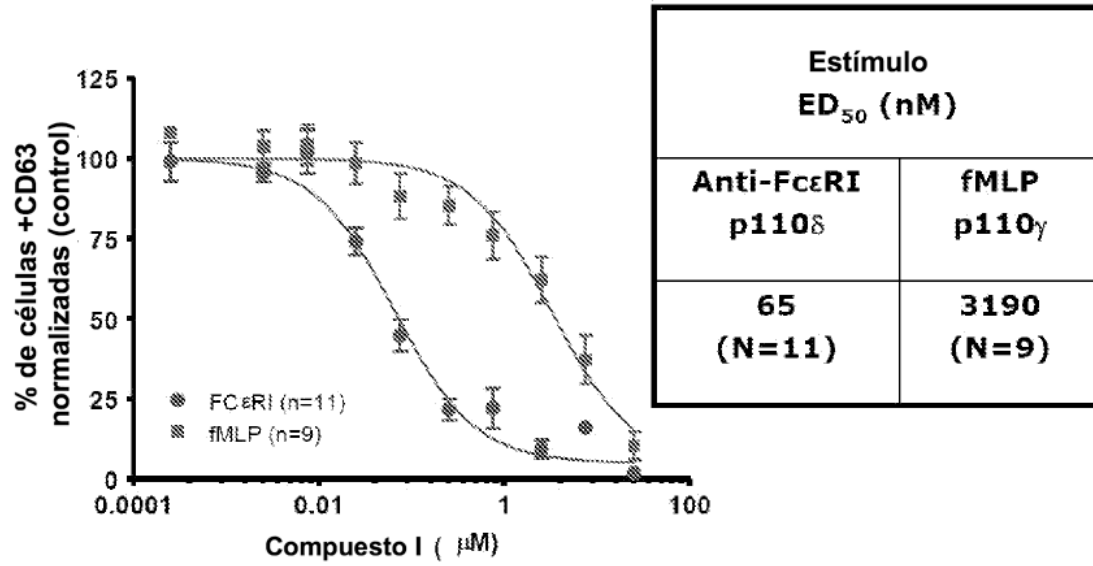


Figura 23

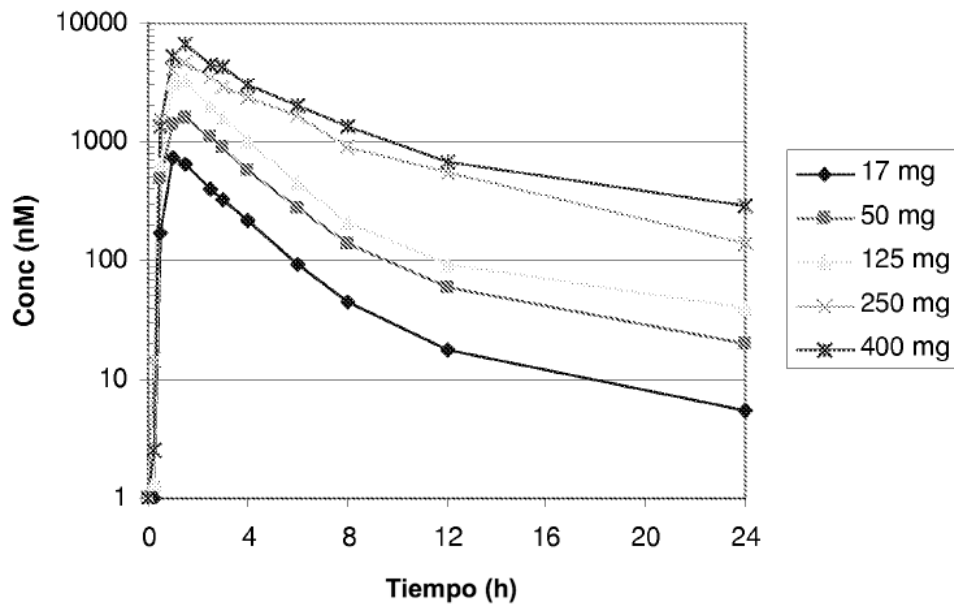


Figura 24 (A)

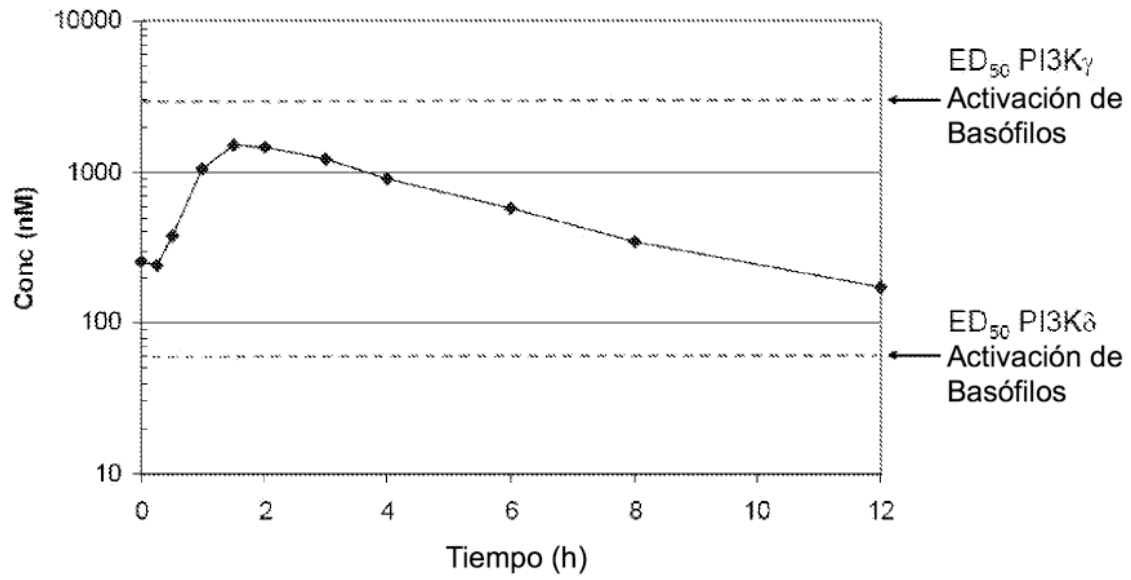


Figura 24 (B)

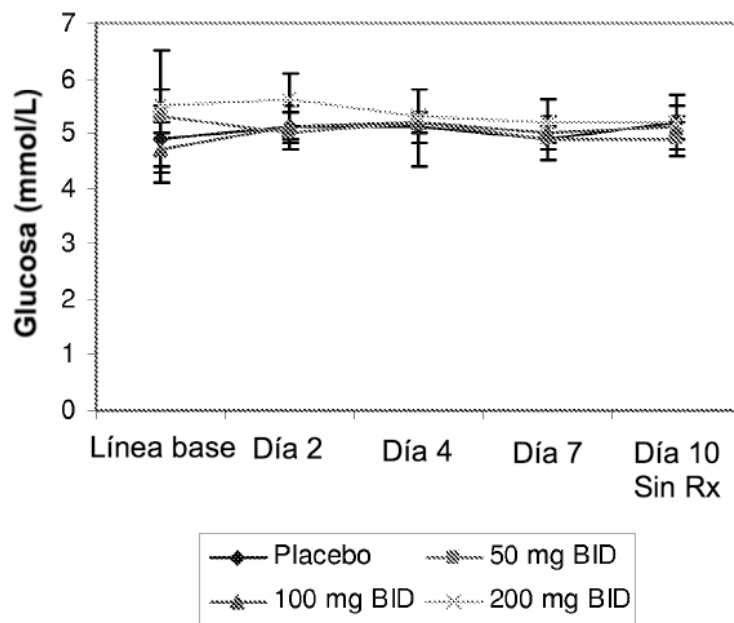


Figura 25 (A)

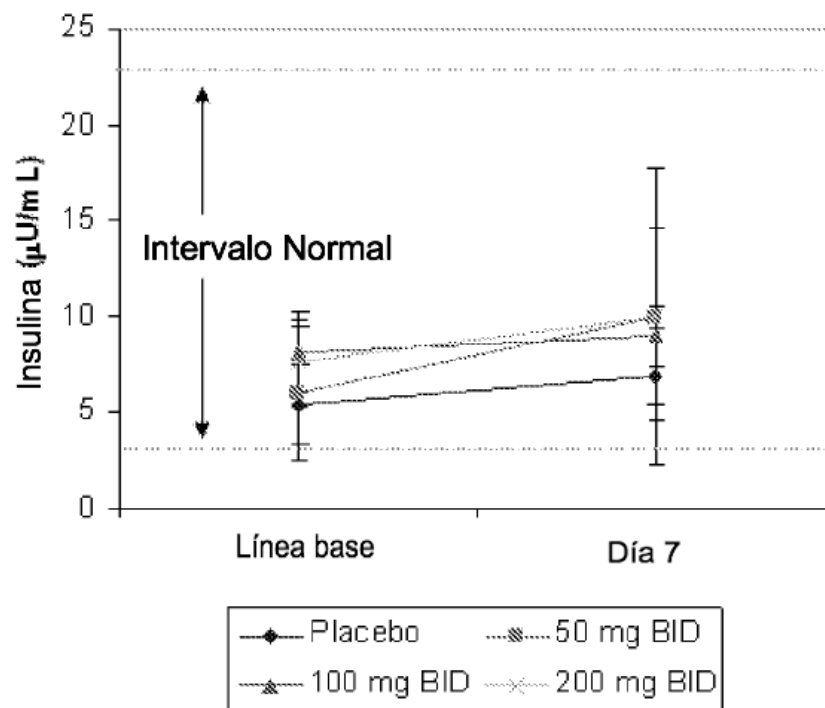


Figura 25 (B)

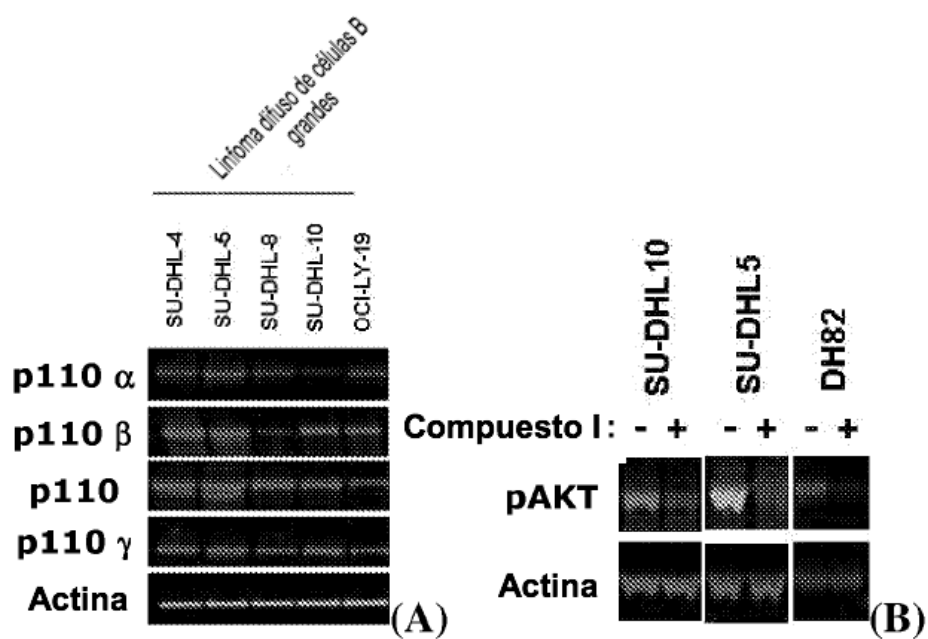


Figura 26

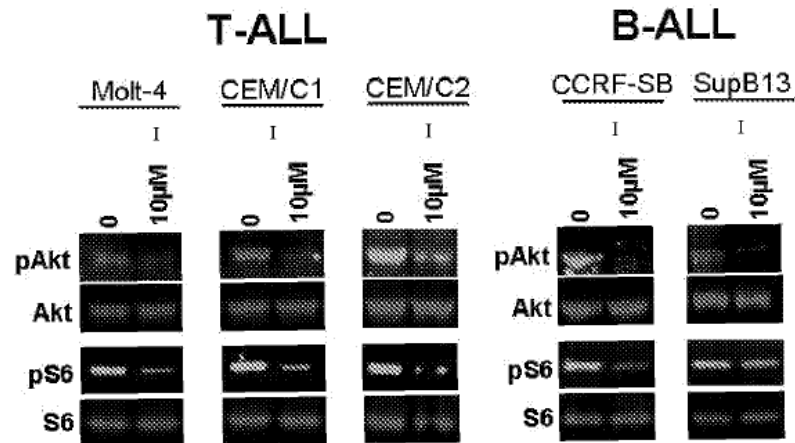


Figura 27

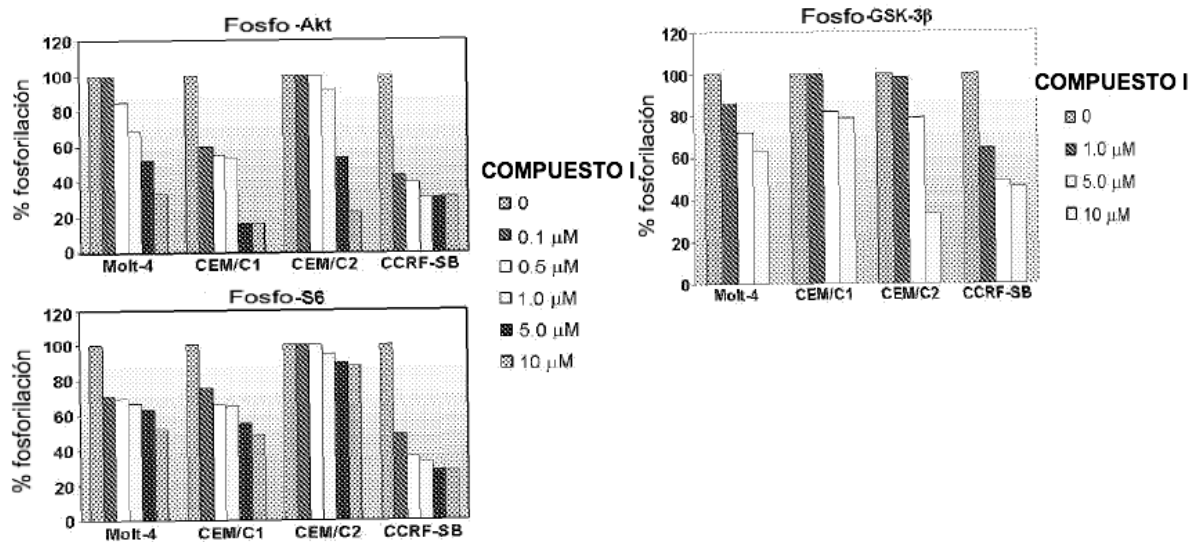


Figura 28

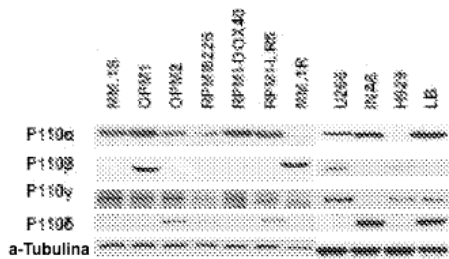
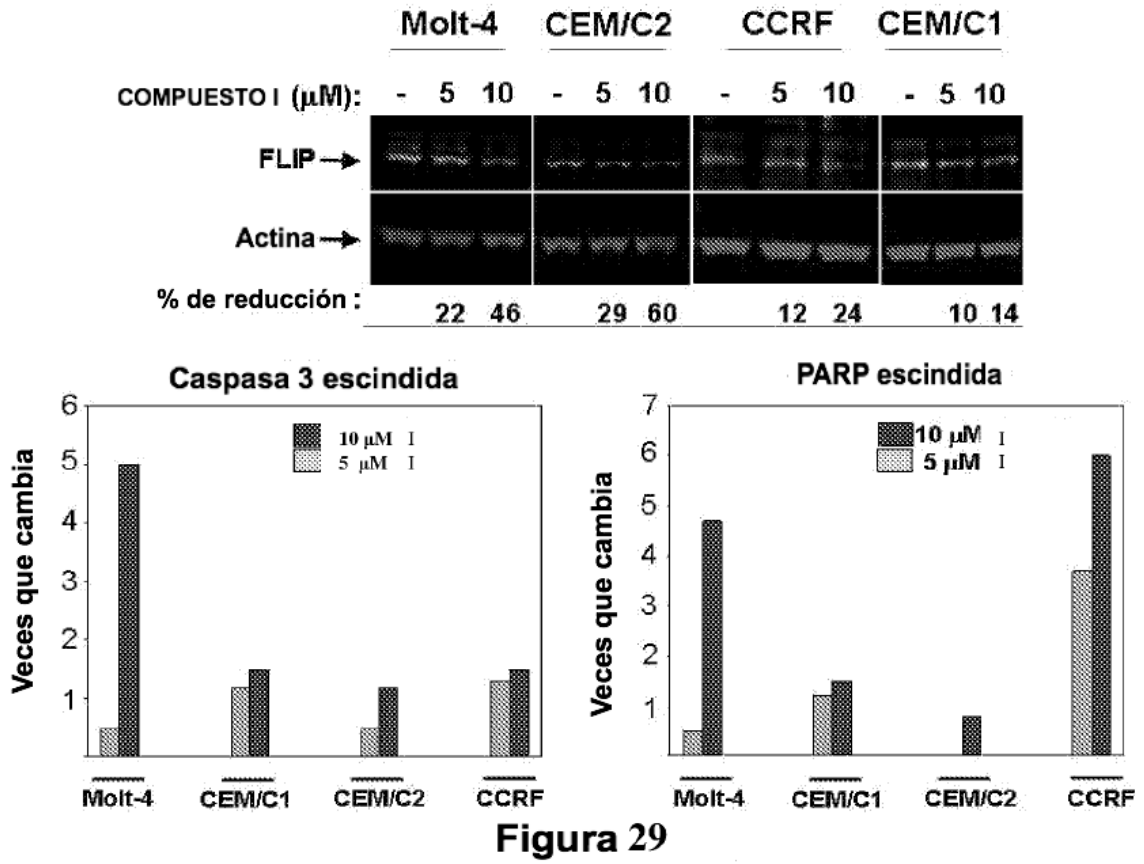


Figura 30A

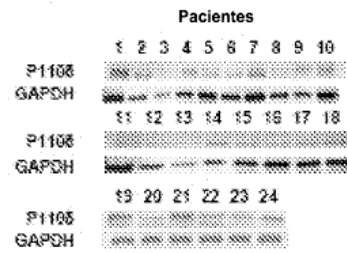


Figura 30B

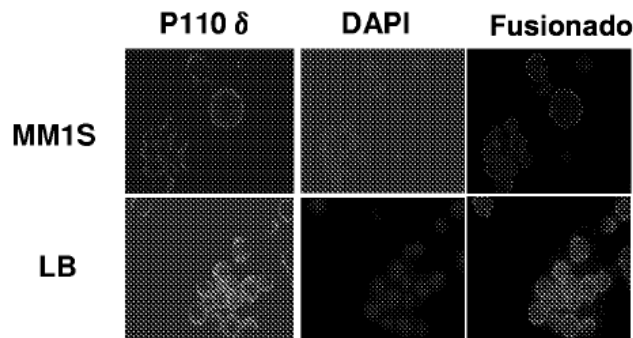


Figura 30C

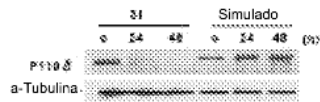


Figura 31A

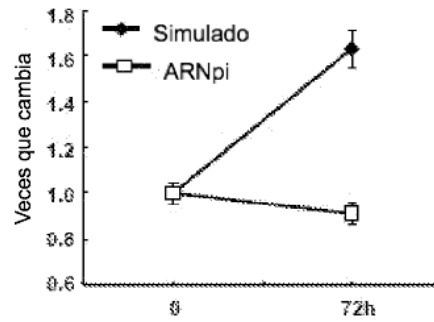


Figura 31B

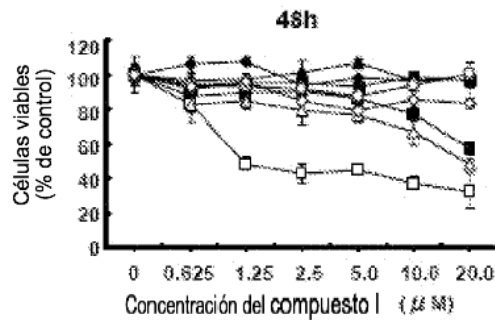


Figura 31C

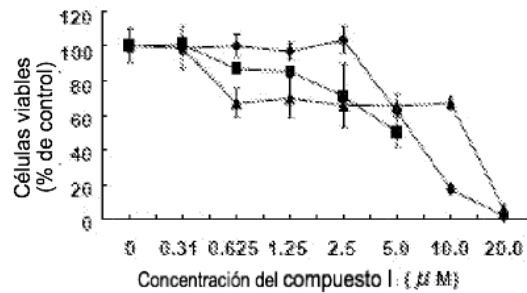


Figura 31D

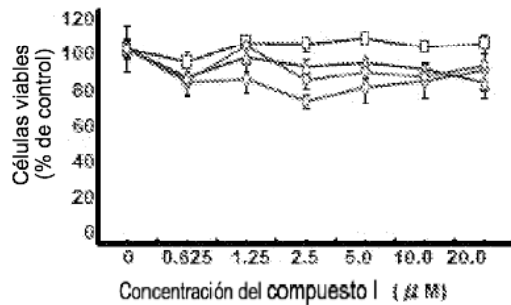


Figura 31E

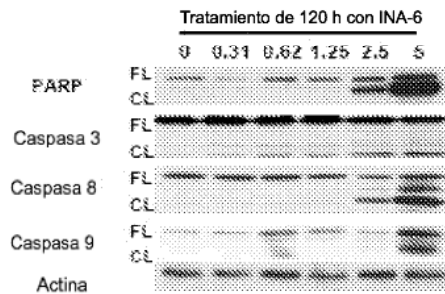


Figura 31F

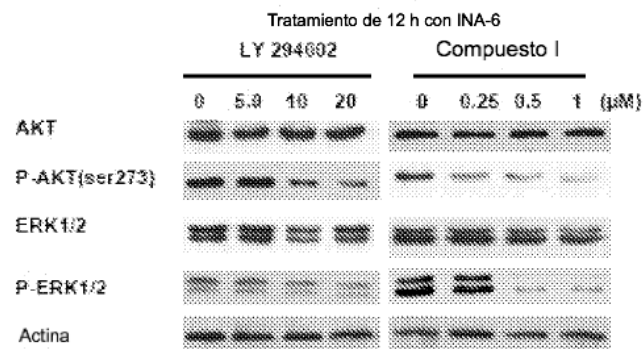


Figura 32A

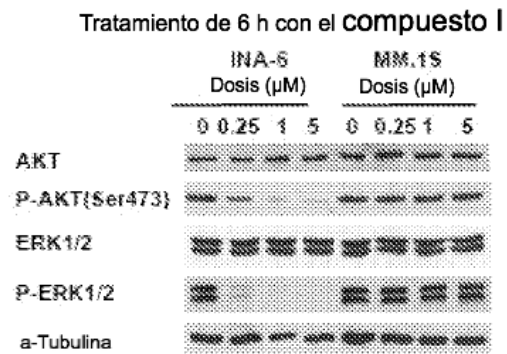


Figura 32B

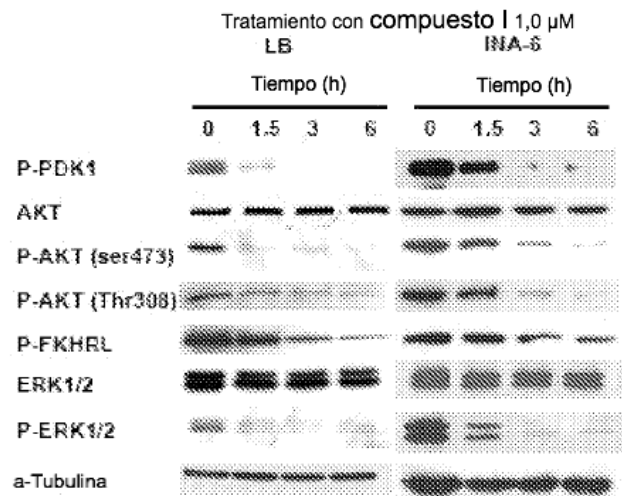


Figura 32C

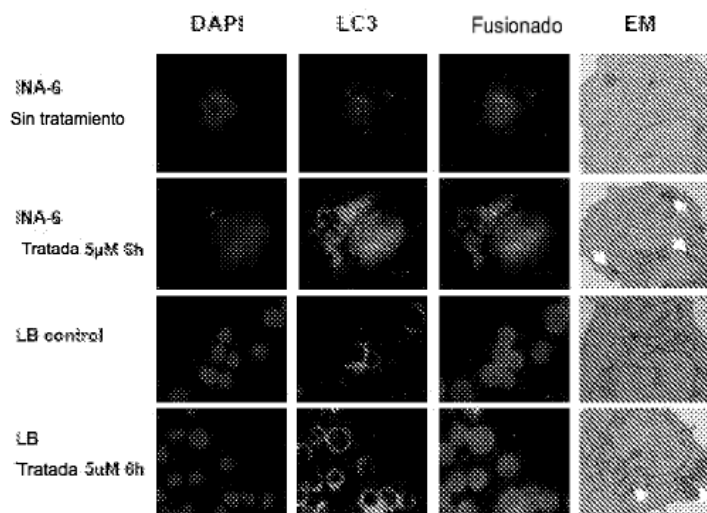


Figura 33A

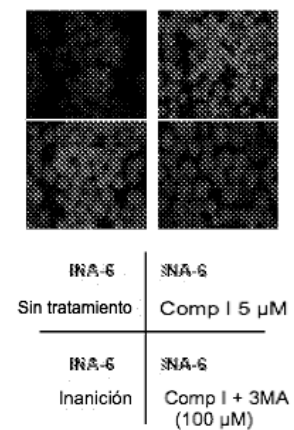


Figura 33B

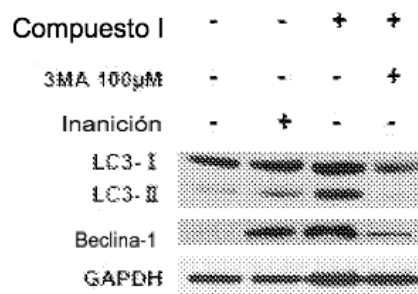


Figura 33C

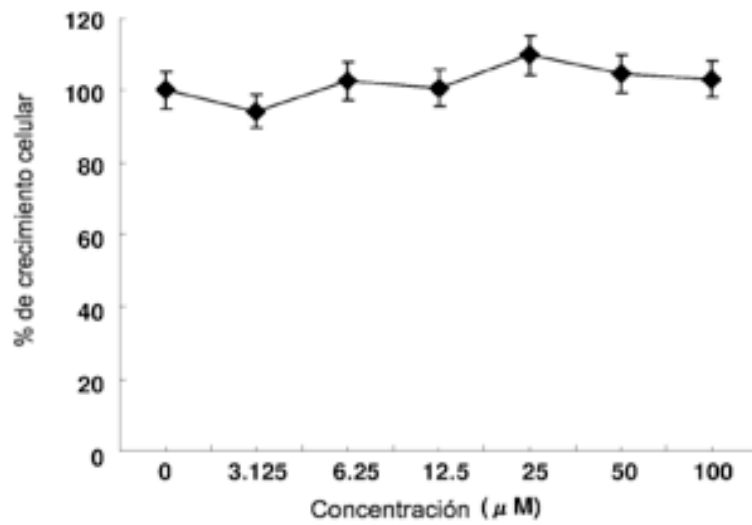


Figura 33D

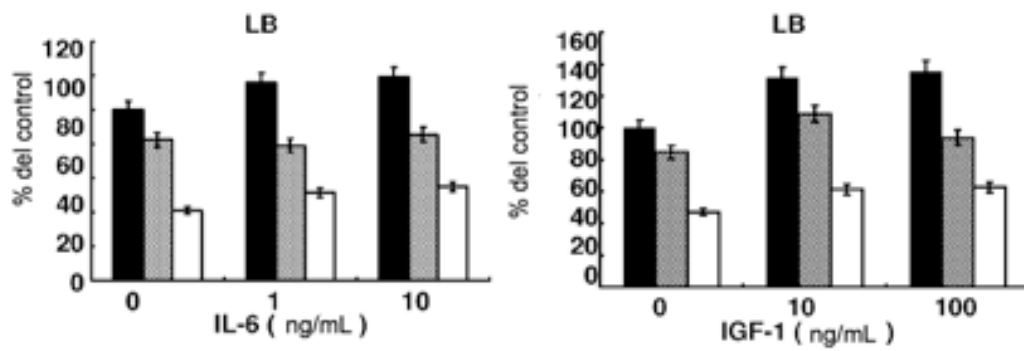


Figura 34A

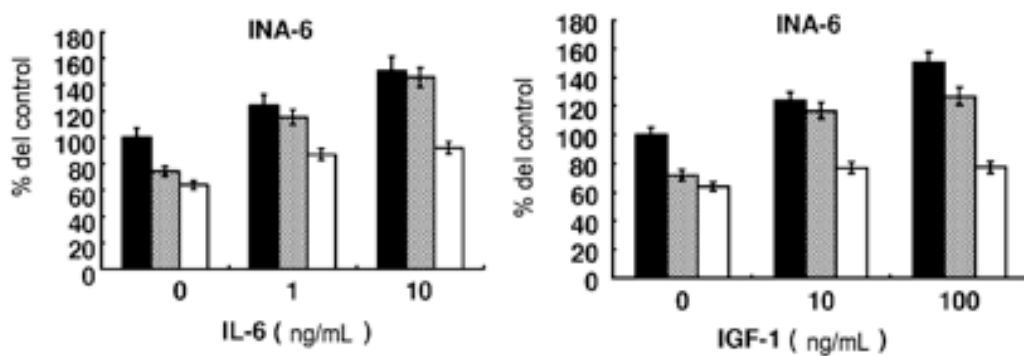


Figura 34B

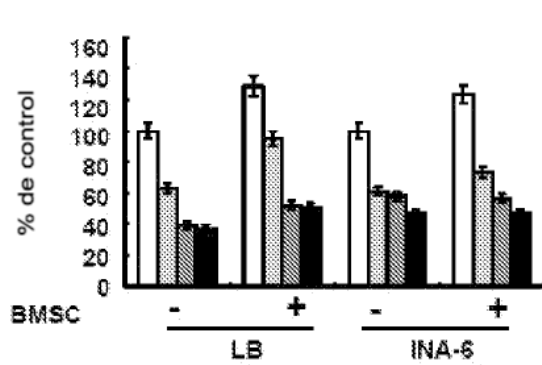


Figura 34C

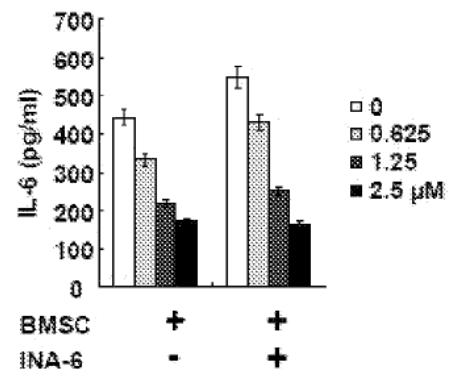


Figura 34D

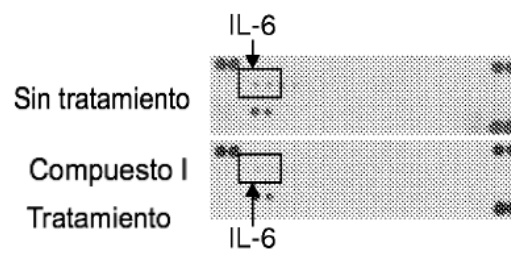


Figura 34E

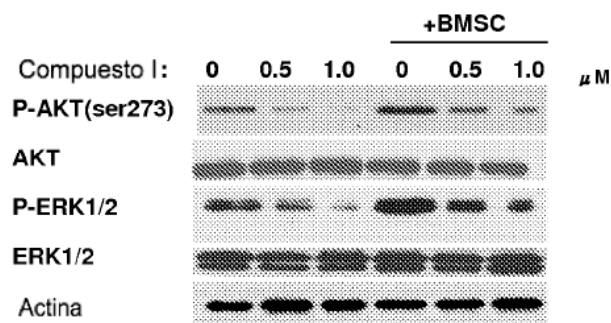


Figura 34F

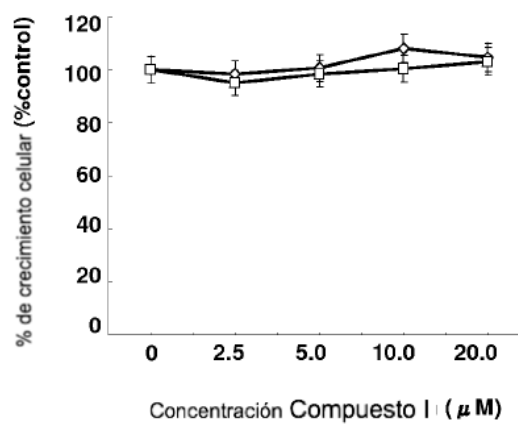


Figura 34G

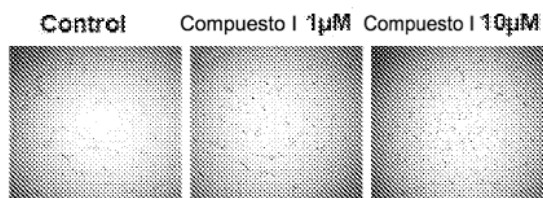


Figura 35A

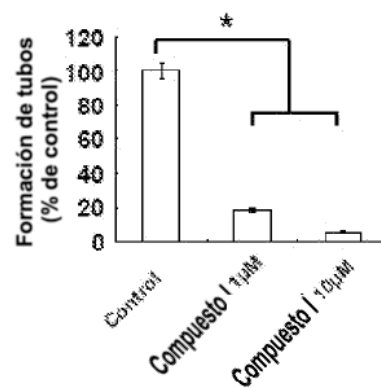


Figura 35B

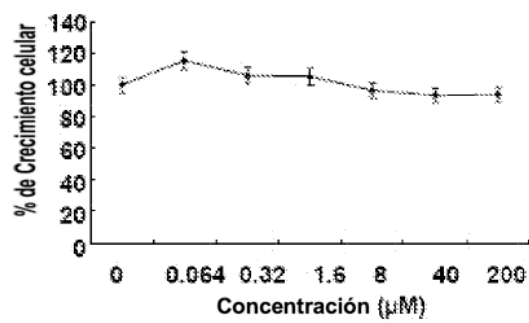


Figura 35C

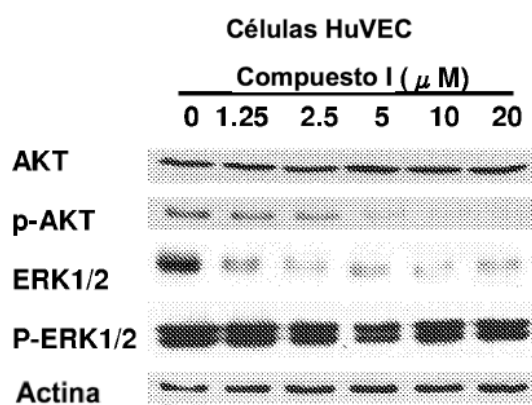


Figura 35D

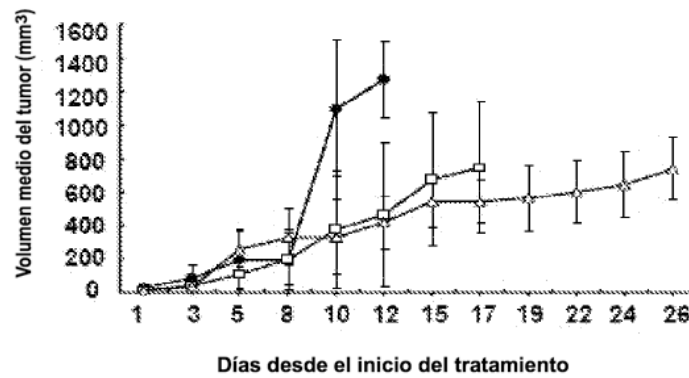


Figura 36A

Día 12

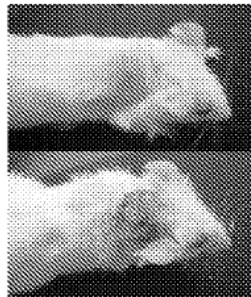


Figura 36B

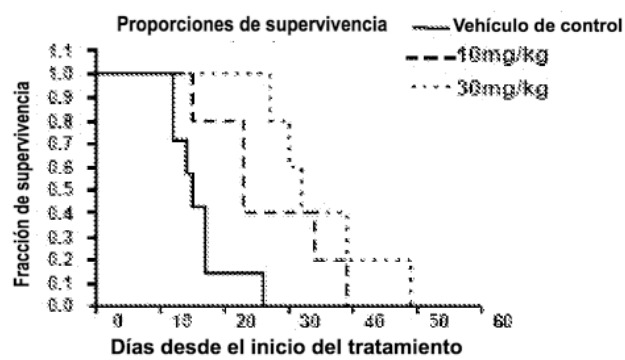


Figura 36C

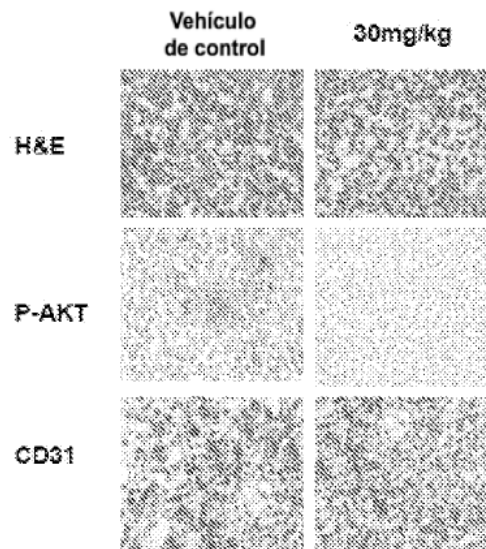


Figura 36D

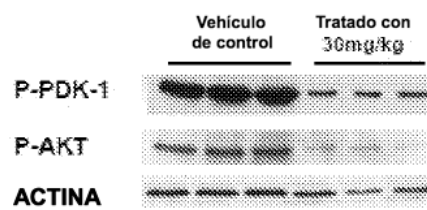


Figura 36E

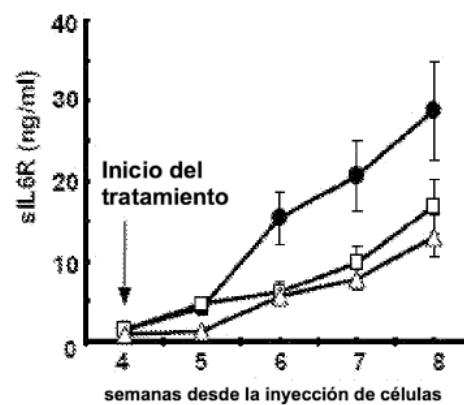


Figura 36F

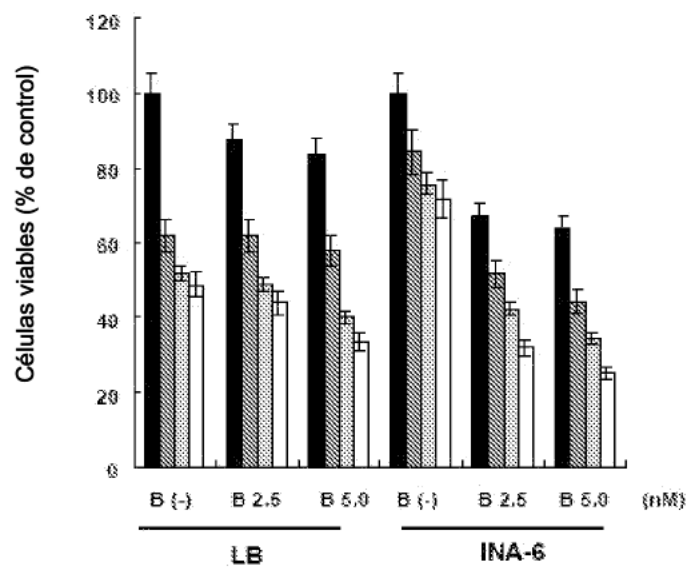


Figura 37A

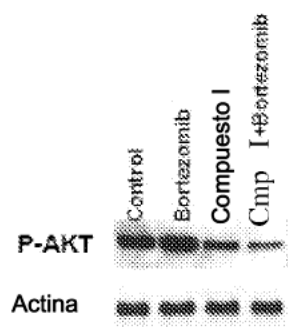


Figura 37B

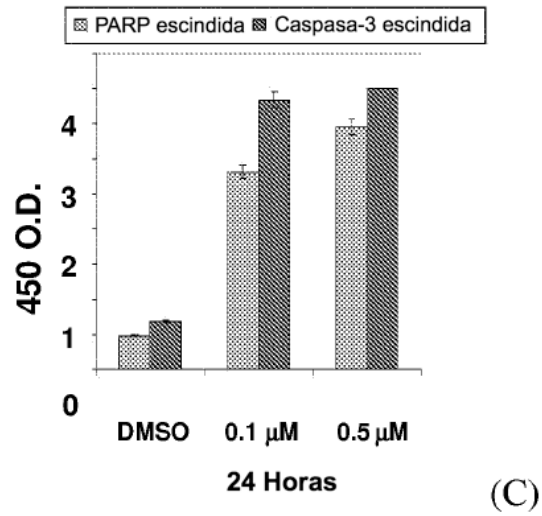
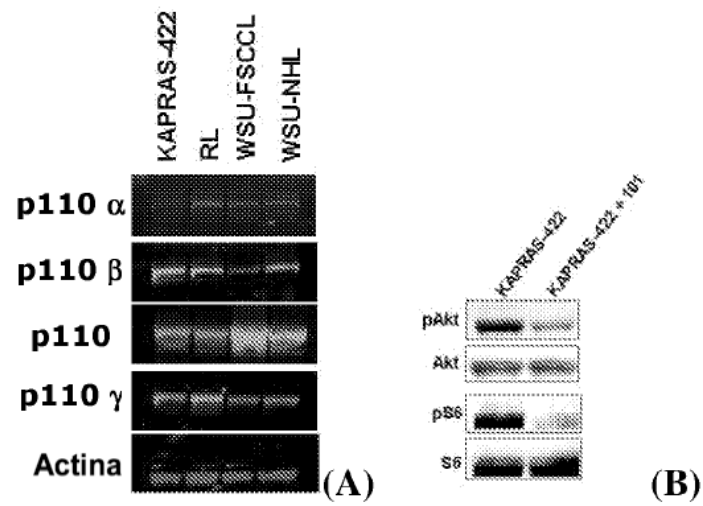
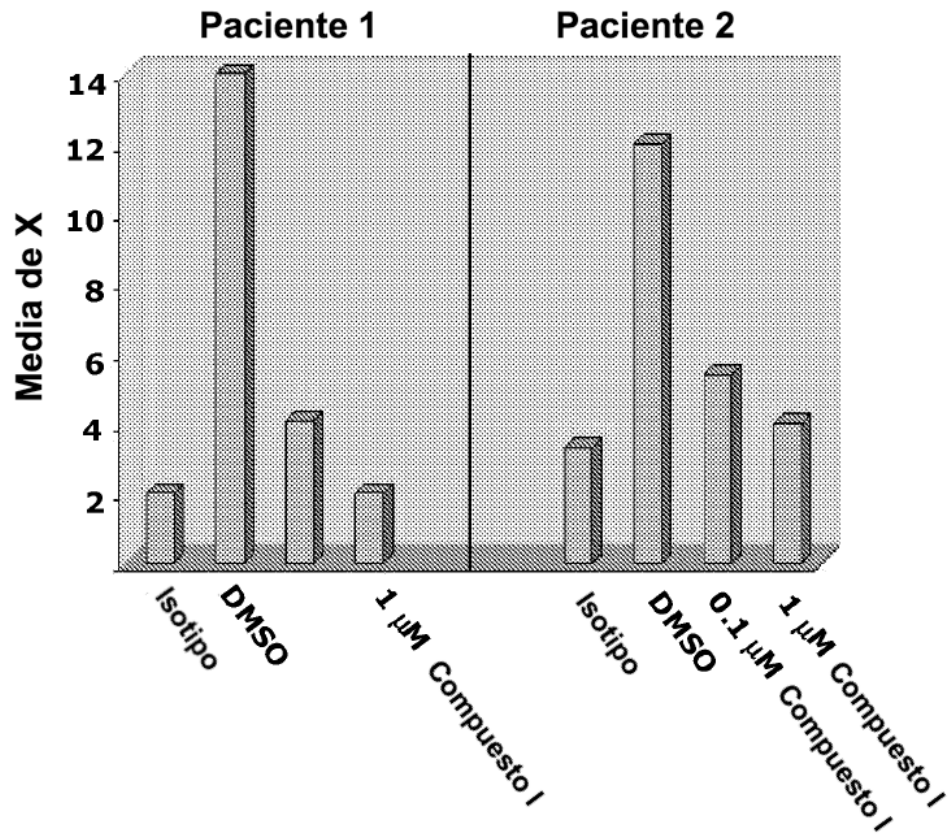
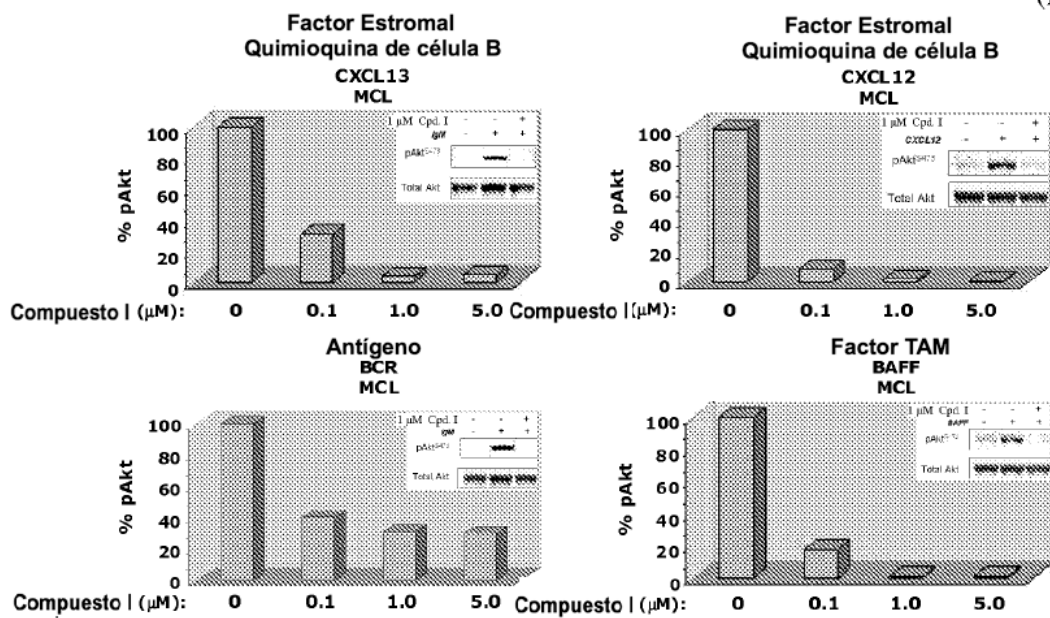


Figura 38



(A)



(B)

Figura 39

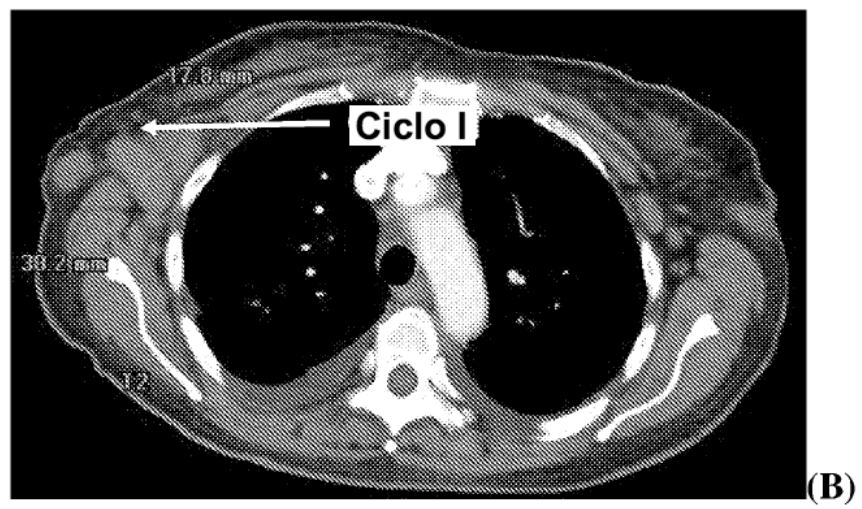
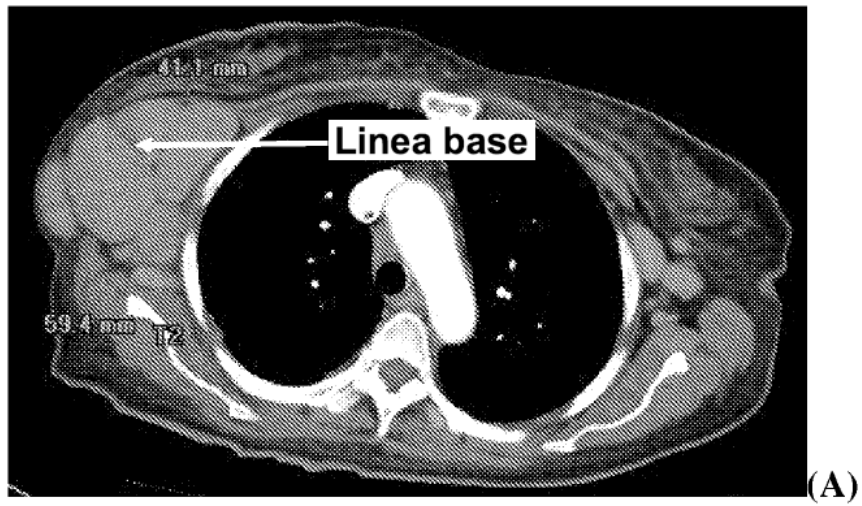


Figura 40