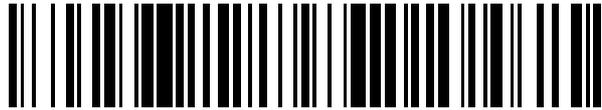


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 399**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/5377** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2015 PCT/US2015/059512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015 E 15795318 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3215158**

54 Título: **Apilimod para el uso en el tratamiento de cáncer renal**

30 Prioridad:

**07.11.2014 US 201462077127 P**

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

**10.02.2020**

73 Titular/es:

**AI THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
530 Old Whitfield Street  
Guilford, CT 06437, US**

72 Inventor/es:

**BEEHARRY, NEIL;  
GAYLE, SOPHIA;  
LANDRETTE, SEAN;  
BECKETT, PAUL;  
CONRAD, CHRIS;  
XU, TIAN;  
ROTHBERG, JONATHAN, M. y  
LICHENSTEIN, HENRI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 741 399 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

Apilimod para el uso en el tratamiento de cáncer renal.

Aplicación relacionada

5 Esta aplicación reivindica prioridad a la patente de EE. UU. Ap. Ser. No. 62/077,127, presentada el 7 de noviembre de 2014.

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden apilimod para el tratamiento contra el cáncer renal.

Antecedentes de la divulgación

10 Apilimod, también conocido como STA-5326, de aquí en adelante denominado "apilimod", está identificado como un potente inhibidor de la transcripción de IL-12 y de IL-23. Véase, por ejemplo, Wada et al. Blood 109 (2007):1156-1164. IL-12 e IL-23 son citosinas inflamatorias producidas por células inmunes, tales como las células-B y los macrófagos, en respuesta a una estimulación antigénica. Los desórdenes autoinmunes y otros desordenes caracterizados por la inflamación crónica están caracterizados, en parte, por la producción inadecuada de estas citosinas. En células  
15 inmunes, la inhibición selectiva de la transcripción de IL-12/IL-23 por causa del apilimod, se demostró recientemente que dicha inhibición está mediada por la unión directa del apilimod al fosfatidilinositol-3-fosfato 5-cinasa (PIKfyve). Véase, por ejemplo, Cai et al. Chemistry and Biol. 20 (2014):912-921. PIKfyve juega un papel en la señalización de los receptores tipo Toll, lo cual es relevante para la inmunidad innata.

20 Basado en su actividad como agente inmunomodulador y como inhibidor específico de IL-12/IL-23, el apilimod se propone como un elemento útil en el tratamiento de enfermedades y desórdenes autoinmunes e inflamatorios. Véase, por ejemplo, EE.UU. 6,858,606 y 6,660,733 (describiendo una familia de compuestos de pirimidina, incluyendo el apilimod, que es supuestamente útil para tratar enfermedades y trastornos caracterizados por la sobreproducción de IL-12 o de IL-23, como artritis reumatoide, sepsis, enfermedad de Chron, esclerosis múltiple, psoriasis o diabetes mellitus dependiente de insulina). De manera similar, se sugirió que el apilimod era útil para el tratamiento de ciertos  
25 cánceres basándose en su actividad para inhibir c-Rel o IL-12/23, particularmente en los cánceres donde se creía que estas citosinas desempeñaban un papel en la promoción de la función de proliferación celular aberrante. Véase, por ejemplo, WO 2006/128129 y Baird et al., Frontiers in Oncology 3: 1 (2013, respectivamente).

30 Cada una de las tres pruebas clínicas de apilimod se ha centrado en su eficacia potencial para enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Las pruebas clínicas se realizaron en pacientes con psoriasis, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn. Un estudio clínico abierto en pacientes con psoriasis concluyó que la administración oral de apilimod mostró una actividad inmunomoduladora que respalda la inhibición de la síntesis de IL-12/IL-23 para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias mediadas por TH1 y TH17. Wada et al., PLoSOne 7: e35069 (abril, 2012). Pero los resultados de las pruebas controladas en la artritis reumatoide y en la enfermedad de Crohn no apoyaron la idea de que la inhibición de IL-12/IL-23 por apilimod se traduzca en una mejoría clínica en cualquiera de  
35 estas indicaciones. En un ensayo clínico de Fase II aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo y apilimod en pacientes con artritis reumatoide, el apilimod no alteró la expresión sinovial de IL-12 y de IL-23. Krauz et al., Arthritis & Rheumatism 64:1750-1755 (2012). Los autores concluyeron que los "resultados no apoyan la idea de que la inhibición de IL-12/IL-23 por el apilimod sea capaz de inducir una mejora clínica robusta en AR". De manera similar, un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con un placebo y con el apilimod para el tratamiento de la enfermedad  
40 de Crohn activa concluyó que, aunque es bien tolerado, el apilimod no demuestra eficacia alguna sobre el placebo. Sands et al. Inflamm Bowel Dis. 2010 Jul;16(7):1209-18.

45 La vía de la rapamicina (mTOR) de los mamíferos es una vía de señalización celular importante que participa en múltiples funciones fisiológicas, incluyendo el crecimiento celular, la proliferación celular, el metabolismo, la síntesis de proteínas y la autofagia (La Plante et al Cell 2012, (149(2), pp.274-293). mTOR es una cinasa que integra señales intracelulares y extracelulares que señalan a los niveles de aminoácidos, estrés, oxígeno, energía y factores de crecimiento y regula la respuesta celular a estas señales ambientales. La desregulación de mTOR ha estado implicada en una amplia variedad de enfermedades y desórdenes, incluyendo a el cáncer, la obesidad, la diabetes y la neurodegeneración. Se han explorado ciertos componentes de la vía de mTOR como objetivos farmacológicos para tratar algunas de estas enfermedades. Sin embargo, la eficacia terapéutica ha estado limitada, por ejemplo, en el  
50 tratamiento de algunos cánceres y algunos inhibidores de mTOR han demostrado tener un efecto adverso sobre el metabolismo. Los genes supresores de tumores del complejo de la esclerosis tuberosa, TSC1 y TSC2, son reguladores negativos de mTOR.

Resumen de la divulgación

55 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos del tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para el uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

La presente divulgación está basada, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que el apilimod es un agente altamente citotóxico en células nulas TSC. En estas células, la vía mTOR está constitutivamente activa. La vía mTOR está activada en varios tipos de cáncer, y en un examen posterior de más de 100 líneas celulares de cáncer, el apilimod mostró actividad antiproliferativa en las líneas celulares de múltiples tipos de cáncer, incluyendo a los carcinomas renales. Adicionalmente, la actividad citotóxica del apilimod en líneas celulares de cáncer se debe a una inhibición del tráfico intracelular y a un aumento correspondiente en la apoptosis y/o en autofagia, en lugar de a través de la inhibición de la producción de IL-12/23 por parte del apilimod, como se había predicho basados en la actividad inmunomoduladora del apilimod. Adicionalmente, una proyección sobre 450 cinasas identificó a PIKfyve como la única diana de unión de alta afinidad ( $K_d=75$  pM) para el apilimod. La presente divulgación proporciona nuevos métodos para el uso terapéutico del apilimod en el tratamiento contra el cáncer de células renales.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición para el tratamiento de cáncer renal en un sujeto que tiene cáncer renal, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones, el apilimod es dimesilato de apilimod. En realizaciones, la composición está en una forma adecuada para administración oral o intravenosa. En realizaciones, la composición comprende además al menos un agente activo adicional, que puede ser seleccionado de un agente terapéutico o de un agente no terapéutico, o una combinación de un agente terapéutico y de un agente no terapéutico. En realizaciones, el al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la proteína cinasa, un agente antineoplásico a base de platino, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor metabólico de nucleósidos, un agente alquilante, un agente intercalante, un agente de unión a tubulina, y combinaciones de los mismos. En realizaciones, el agente terapéutico es un inhibidor de la proteína cinasa. En realizaciones, el inhibidor de la proteína cinasa es pazopanib o sorafenib, o una combinación de los mismos. La composición puede comprender además a un agente no terapéutico seleccionado para mejorar uno o más de los efectos secundarios del apilimod. En realizaciones, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ondansetrón, granisetron, dolasetron y palonosetrón. En realizaciones, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en pindolol y risperidona.

En realizaciones, la composición comprende una cantidad de dimesilato de apilimod que es eficaz para inhibir la actividad de la cinasa PIKfyve en las células cancerígenas del sujeto. El cáncer renal puede ser, en algunas realizaciones, refractario al tratamiento estándar o metastásico. En realizaciones, el cáncer renal se selecciona del carcinoma renal de células claras, un carcinoma de células transicionales, tumor de Wilms (nefroblastoma), sarcoma renal y tumores renales benignos (no cancerígenos), adenoma renal, oncocitoma y angiomiolipoma.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para el tratamiento del cáncer renal en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar a el sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del apilimod, o una composición que comprende apilimod, en la cual el apilimod es apilimod en sí (es decir, la base libre de apilimod), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, clatrato, hidrato, polimorfo de los mismos. En una realización, el apilimod es una base libre de apilimod o dimesilato de apilimod.

En realizaciones, el método comprende, además, administrar al menos un agente activo adicional al sujeto. Al menos un agente activo adicional puede ser un agente terapéutico o un agente no terapéutico. Al menos un agente activo adicional puede administrarse en una dosificación única con el apilimod, o en una forma de dosificación separada del apilimod. En realizaciones, al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la proteína cinasa, un agente antineoplásico a base de platino, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor metabólico de nucleósidos, un agente alquilante, un agente intercalante, un agente aglutinante de tubulina, un inhibidor de la vía PD-1/PDL-1 y combinaciones de los mismos. En realizaciones, el agente terapéutico es un inhibidor de la proteína cinasa. En realizaciones, el inhibidor de la proteína quinasa es pazopanib o sorafenib, o una combinación de los mismos. En realizaciones, el al menos un agente activo adicional, es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®) temsirolimus (Torisel®), everolimus (Afinitor®), bevacizumab (Avastin®), pazopanib (Votrient®), axitinib (Inlyta®) y combinaciones de los mismos. En realizaciones, el agente terapéutico es un inhibidor de la vía PD-1/PDL-1. En realizaciones, el inhibidor de la vía PD-1/PDL-1 se selecciona de pembrolizumab (Keytruda), avelumab, atezolizumab (MPDL3280A), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (MK-3475), MSB0010718C, y MEDI4736.

En realizaciones, al menos un agente activo es un agente no terapéutico seleccionado para mejorar uno o más efectos secundarios del apilimod. En realizaciones, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ondanestron, granisetron, dolsetron y palonosetron. En una realización, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en pindolol y risperidona. En una realización, la forma de dosificación de la composición del apilimod es una forma de dosificación oral. En otra realización, la forma de dosificación de la composición de apilimod es apropiada para la administración intravenosa, la administración es por una única inyección o por una bolsa de goteo.

En una realización, el sujeto es un paciente humano con cáncer. En una realización, el paciente humano con cáncer que necesita tratamiento con apilimod está en cuyo cáncer es resistente a un régimen de quimioterapia estándar. En una realización, el paciente humano con cáncer que necesita del tratamiento con apilimod es uno cuyo cáncer se reincide después del tratamiento con un régimen de quimioterapia estándar. En una realización, el cáncer es un cáncer renal. En una realización, el cáncer renal es un carcinoma de células de transición, tumor de Wilms (nefroblastoma),

sarcoma renal y tumores renales benignos (no cancerígeno), adenoma renal, oncocitoma y angiomiolipoma. En una realización, el cáncer renal es un carcinoma de células renales de células claras.

5 En una realización, el régimen estándar de quimioterapia comprende uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en ibrutinib, rituximab, doxorubicina, prednisolona, vincristina, velcade, ciclofosfoamida, dexametasona y everolimus.

10 En una realización, el método es un método para tratar el cáncer renal utilizando una terapia de combinación que comprende apilimod y un régimen de quimioterapia para el tratamiento del cáncer renal. En realizaciones, el régimen de quimioterapia comprende a un inhibidor de la vía PD-1/PDL-1. En realizaciones, el inhibidor de la ruta PD-1/PDL-1 se selecciona de pembrolizumab (Keytruda), avelumab, atezolizumab (MPDL3280A), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (MK-3475), MSB0010718C, y MEDI4736.

15 En otra realización, el método es un método para tratar el cáncer renal usando una terapia de combinación que comprende apilimod y un régimen de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer renal. En una realización, el régimen de inmunoterapia es el régimen de interleucina-2 (IL-2) o el régimen de interferón alfa. En una realización, el régimen de inmunoterapia comprende un inhibidor de la ruta PD-1/PDL-1. En realizaciones, el inhibidor de la ruta PD-1/PDL-1 se selecciona de pembrolizumab (Keytruda), avelumab, atezolizumab (MPDL3280A), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (MK-3475), MSB0010718C, y MEDI4736.

20 En algunas realizaciones, el método es un método para tratar el cáncer renal utilizando una terapia de combinación que comprende apilimod y un régimen inhibidor de la proteína cinasa para el tratamiento del cáncer renal. En una realización, el régimen de inhibidores de la proteína quinasa es sorafenib, sunitinib, bevacizumab, lenvatinib, everolimus.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: las células deficientes en TSC2 son altamente sensibles al apilimod ( $IC_{50} = 20$  nM).

Figura 2A: porcentaje de líneas celulares con un  $IC_{50}$  menor a 500 nM.

25 Figura 2B: los fibroblastos de pulmón normales no son sensibles a la citotoxicidad inducida por el apilimod a concentraciones tan altas como 10 micromolar.

Figura 3: el apilimod induce la autofagia de una manera dependiente de la dosis.

Figura 4: gráfico del volcán de impactos capturados significativos que aplican CT-689 a una concentración de 0.1  $\mu$ M bajo condiciones de captura óptimas.

Figura 5: el apilimod se une con alta afinidad a PIKfyve ( $K_d = 75$  pM).

30 Figura 6: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales 769-P, Avg.  $IC_{50} = 44$  nM ( $n=2$ ).

Figura 7: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales RCC-MF, Avg.  $IC_{50} = 8$  nM ( $n=2$ ).

35 Figura 8: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales RCC-ER, Avg.  $IC_{50} = 9$  nM ( $n=2$ ).

Figura 9: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales RCC-FG2, Avg.  $IC_{50} = 32$  nM ( $n=2$ ).

Figura 10: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales RCC-JF, Avg.  $IC_{50} = 60$  nM ( $n=2$ ).

40 Figura 11: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renal 786-O, Avg.  $IC_{50} = 71$  nM ( $n=2$ ).

Figura 12: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales A704, Avg.  $IC_{50} = 11$  nM ( $n=2$ ).

45 Figura 13: actividad antiproliferativa de LAM-002 en la línea celular de carcinoma de células claras renales RCC-JW, Avg.  $IC_{50} = 27$  nM ( $n=2$ ).

Figura 14: LAM-002 + combinación de sorafenib en células RCC-ER (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor índice de combinación (IC) en  $ED_{50}$ ,  $ED_{75}$  y  $ED_{90}$ .

Figura 15: LAM-002 + combinación de sorafenib en células RCC-FG2 (ensayo de 5 días). A, gráfico de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en  $ED_{50}$ ,  $ED_{75}$  y  $ED_{90}$ .

Figura 16: LAM-002 + combinación de sorafenib en células RCC-MF (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>.

Figura 17: LAM-002 + combinación de sorafenib en células 769-P (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>.

5 Figura 18: LAM-002 + combinación de pazopanib en células RCC-ER (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>.

Figura 19: LAM-002 + combinación de pazopanib en células RCC-FG2 (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>.

10 Figura 20: LAM-002 + combinación de pazopanib en células RCC-MF (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>.

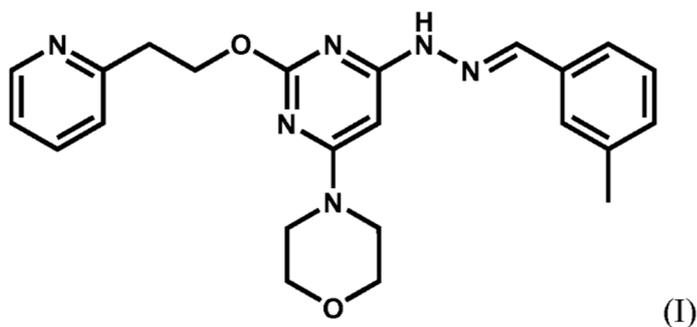
Figura 21: LAM-002 + combinación de pazopanib en células 769-P (ensayo de 5 días). A, gráfica de barras que muestra la viabilidad celular (%); B, determinación del valor del índice de combinación (IC) en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>.

#### Descripción detallada de la divulgación

15 La presente divulgación proporciona composiciones y métodos relacionados con la utilización del apilimod para tratar el cáncer renal en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, que necesita tal tratamiento. La presente divulgación se refiere en general a nuevos usos del apilimod basados en el sorprendente descubrimiento de la actividad citotóxica del apilimod contra un intervalo de células cancerígenas de origen tanto linfoide como no linfoide, una actividad que no está claramente relacionada ni es predecible a partir de la actividad inmunomoduladora conocida del apilimod y de la actividad inhibidora de IL-12/23.

20 Adicionalmente, la presente divulgación proporciona nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento del cáncer basados en una terapia de combinación que utiliza el apilimod y al menos a un agente terapéutico adicional. Las terapias de combinación descritas en la presente explotan la actividad citotóxica única del apilimod que se demuestra que proporciona un efecto sinérgico cuando se combina con otros agentes anticancerígenos.

25 Como se utiliza en la presente, el término "apilimod" puede referirse al propio apilimod (es decir, la base libre de apilimod), o puede abarcar sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, clatratos, hidratos, polimorfos de apilimod, como se describe a continuación. La estructura de apilimod se muestra en la Fórmula I:



30 El nombre químico del apilimod es 2-[2-Piridin-2-il)-etoxi]-4-N'-(3-metil-benciliden)-hidrazino]-6-(morfo-lin-4-il) pirimidina (nombre IUPAC: (E)-4-(6-(2-(3-metilbenciliden)hidrazinil)-2-(2-(piridin-2-il)etoxi)pirimidin-4-il)morfolina), y el número CAS es 541550-19-0.

El apilimod puede prepararse, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en las patentes de EE.UU. No. 7,923,557 y 7,863,270 y WO 2006/128129.

35 Como se utiliza en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal formada a partir de, por ejemplo, un ácido y un grupo básico de apilimod. Las sales ilustrativas incluyen, pero no están limitadas a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, ácido fosfato, isonicotinato, lactato, salicilato, ácido citrato, tartrato, oleato, tanato, pantenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, besilato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (por ejemplo, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato).

40 El término "sal farmacéuticamente aceptable" también se refiere a una sal preparada a partir de una composición de apilimod que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico, y una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptables.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" también se refiere a una sal preparada a partir del apilimod que tiene un grupo funcional básico, tal como un grupo funcional amino, y un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptables.

5 Las sales de los compuestos descritos en la presente se pueden sintetizar a partir del compuesto parental mediante métodos químicos convencionales, tales como los métodos descritos en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Hemrich Stalil (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, agosto 2002. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar a el compuesto original (por ejemplo, 2-[2-piridin-2-il)-etoxi]-4-N'-(3-metil-bencilideno)-hidrazino]-6-(morfolin-4-il) pirimidina) con el ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos.

10 Una forma de sal de un compuesto descrito en la presente puede convertirse en la base libre y opcionalmente en otra forma de sal por métodos bien conocidos por los expertos en el tema. Por ejemplo, la base libre puede formarse pasando la solución salina a través de una columna que contiene una fase estacionaria de amina (por ejemplo, una columna Strata-NH<sub>2</sub>). Alternativamente, una solución de la sal en agua se puede tratar con bicarbonato de sodio para descomponer a la sal y precipitar a la base libre. La base libre puede combinarse con otro ácido utilizando métodos rutinarios.

15 Como se utiliza en la presente, el término "polimorfo" se refiere a formas cristalinas sólidas de un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, 2-[2-piridin-2-il)-etoxi]-4-N'-(3-metil-bencilideno)-hidrazino]-6-(morfolin-4-il)-pirimidina) o complejos de los mismos. Los diferentes polimorfos del mismo compuesto pueden exhibir propiedades físicas, químicas y/o espectroscópicas diferentes. Las diferentes propiedades físicas incluyen, pero no están limitadas a la estabilidad (por ejemplo, al calor o a la luz), compresibilidad y densidad (importante en la formulación y fabricación del producto), y tasas de disolución (que pueden afectar la biodisponibilidad). Las diferencias en la estabilidad pueden deberse a cambios en la reactividad química (por ejemplo, oxidación diferencial, de manera que una forma de dosificación se decolora más rápidamente cuando se compone de un polimorfo que cuando se compone de otro polimorfo) o características mecánicas (por ejemplo, las tabletas se desmoronan en el almacenamiento, ya que un polimorfo favorecido cinéticamente se convierte en un polimorfo más estable termodinámicamente) o ambos (Por ejemplo, tabletas de un polimorfo son más susceptibles a romperse en alta humedad). Las diferentes propiedades físicas de los polimorfos pueden afectar su procesamiento. Por ejemplo, un polimorfo podría tener más probabilidades de formar solvatos o podría ser más difícil de filtrar o lavar hasta dejarlo libre de impurezas que otro, esto es debido, por ejemplo, a la forma o distribución de tamaño de las partículas de estos.

20 Como se utiliza en la presente, el término "hidrato" se refiere a un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, 2-[2-piridin-2-il)-etoxi]-4-N'-(3-metil-bencilideno)-hidrazino]-6-(morfolin-4-il)-pirimidina) o una de las sales de los mismos, que incluye además una cantidad de agua estequiométrica o no estequiométrica unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

25 Como se utiliza en la presente, el término "clatrato" se refiere a un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, 2-[2-piridin-2-il)-etoxi]-4-N'-(3-metil-bencilideno)-hidrazino]-6-(morfolin-4-il)-pirimidina) o una sal de los mismos, en forma de una red cristalina que contiene espacios (por ejemplo, canales) que tienen una molécula huésped (por ejemplo, un solvente o agua) atrapados en su interior.

30 Como se utiliza en la presente, el término "solvato" o "solvato farmacéuticamente aceptable" es un solvato formado a partir de la asociación de una o más moléculas solventes a uno de los compuestos descritos en la presente (por ejemplo, 2-[2-piridin-2-il)-etoxi]-4-N'-(3-metil-bencilideno)-hidrazino]-6-(morfolin-4-il)-pirimidina). El término solvato incluye a hidratos (por ejemplo, hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares).

#### Métodos de tratamiento

35 La presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento contra el cáncer renal en un sujeto que necesita del mismo, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, clatrato, hidrato, polimorfo, del mismo.

40 En una realización, el cáncer renal es un carcinoma de células renales (CCR). En una realización, el carcinoma de células renales se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células renales papilar, carcinoma de células renales cromóforo, otros tipos raros de carcinomas de células renales (por ejemplo, conducto colector CCR, CCR quística multilocular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso tubular y de células fusiformes, CCR asociado a neuroblastoma, carcinoma de células renales no clasificado) y CCR metastásico. En una realización, el cáncer renal se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células de transición, tumor de Wilms (nefroblastoma), sarcoma renal y tumores renales benignos (no cancerosos), apenoma renal, oncocitoma y angiomiolipoma.

45 La presente divulgación también proporciona métodos que comprenden terapia de combinación para el tratamiento contra el cáncer. Tal como se utiliza en la presente, la "terapia de combinación" o "co-terapia" incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de apilimod como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto benéfico de la acción conjunta del apilimod y el agente activo adicional. Al menos un agente adicional puede ser un agente terapéutico o un agente no terapéutico. El efecto benéfico de la combinación incluye,

5 pero no está limitada a, la coacción de farmacocinética o de farmacodinamia resultante de la combinación de los compuestos terapéuticos. El efecto benéfico de la combinación también puede relacionarse con la mitigación de una toxicidad, efecto secundario o un evento adverso asociado con otro agente en la combinación. La "terapia de combinación" no pretende abarcar la administración de dos o más de estos compuestos terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que, de manera incidental y arbitraria, den como resultado un efecto benéfico que no se pretendía ni estaba previsto.

10 Al menos un agente activo adicional puede ser un agente terapéutico, por ejemplo, un agente anticancerígeno o un agente quimioterapéutico contra el cáncer, o un agente no terapéutico, y combinaciones de los mismos. Con respecto a los agentes terapéuticos, el efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no está limitado a, la coacción farmacocinética o farmacodinamia resultante de la combinación de compuestos terapéuticamente activos. Con respecto a los agentes no terapéuticos, el efecto beneficioso de la combinación puede relacionarse con la mitigación de la toxicidad, efecto secundario o evento adverso asociado con un agente terapéuticamente activo en la combinación.

15 En una realización, al menos un agente adicional es un agente no terapéutico que mitiga uno o más efectos secundarios de una composición de apilimod, el uno o más efectos secundarios seleccionados de cualquiera de náuseas, vómitos, dolor de cabeza, mareos, aturdimiento, somnolencia y estrés. En un aspecto de esta realización, el agente no terapéutico es un antagonista de un receptor de serotonina, también conocido como receptores de 5-hidroxitriptamina o receptores de 5-HT. En un aspecto, el agente no terapéutico es un antagonista de un receptor 5-HT3 o 5-HT1a. En un aspecto, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ondansetrón, granisetron, dolasetron y palonosetrón. En otro aspecto, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en pindolol y risperidona.

20 En una realización, al menos un agente adicional es un agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico es un agente contra el cáncer como se describe con más detalle a continuación bajo "terapia de combinación".

25 En el contexto de la terapia de combinación, la administración del apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, clatrato, hidrato, polimorfo, metabolito, profármaco, análogo o derivado de los mismos, puede ser simultáneo o secuencial a la administración de uno o más agentes activos adicionales. En otra realización, la administración de los diferentes componentes de una terapia de combinación puede ser a diferentes frecuencias. El uno o más agentes adicionales se pueden administrar previo a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 3 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o subsecuente a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de un compuesto de la presente divulgación.

30 El uno o más agentes activos adicionales se pueden formular para la administración conjunta con el apilimod en una única forma de dosificación, como se describe con mayor detalle en la presente. El uno o más agentes activos adicionales se pueden administrar por separado de la forma de dosificación que comprende el apilimod. Cuando el agente activo adicional se administra por separado del apilimod, puede ser por la misma o una vía diferente de administración que el apilimod.

35 Preferiblemente, la administración de una composición que comprende a el apilimod en combinación con uno o más agentes activos adicionales proporciona una respuesta sinérgica en el sujeto que está siendo tratado. En este contexto, el término "sinérgico" se refiere a que la eficacia de la combinación es más efectiva que los efectos aditivos de cualquiera de las terapias individuales. El efecto sinérgico de una terapia de combinación según la divulgación puede permitir el uso de dosis más bajas y/o la administración menos frecuente de al menos un agente en la combinación comparado con las dosis y/o frecuencia fuera de la combinación. Los efectos benéficos adicionales de la combinación pueden manifestarse en la evitación o reducción de los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquiera de las terapias en la combinación sola (también denominada monoterapia).

40 La "terapia de combinación" también abarca la administración de los compuestos de la presente divulgación en combinación adicional con las terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o tratamiento de radiación). Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede llevarse a cabo en cualquier momento apropiado siempre que se produzca un efecto benéfico de la acción conjunta de la combinación de los compuestos terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se logra cuando el tratamiento sin medicamentos se elimina temporalmente de la administración de los compuestos terapéuticos, quizás por días o incluso por semanas.

45 El tratamiento no farmacológico se puede seleccionar entre quimioterapia, terapia de radiación, terapia hormonal, terapia antiestrogénica, terapia génica, cirugía (por ejemplo, nefrectomía radical, nefrectomía parcial, cirugía laparoscópica y robótica), ablación por radiofrecuencia y crioblación. Por ejemplo, una terapia sin medicamentos es la extirpación de un ovario (por ejemplo, para reducir el nivel de estrógeno en el cuerpo), toracentesis (por ejemplo, para extraer líquido del tórax), paracentesis (por ejemplo, para extraer líquido del abdomen), cirugía para extirpar o reducir los angiomiolipomas, trasplante de pulmón (y opcionalmente con un antibiótico para prevenir la infección debido

al trasplante), o la terapia de oxígeno (por ejemplo, a través de una cánula nasal que contiene dos tubos pequeños de plástico o púas que se colocan en ambas fosas nasales, a través de una máscara facial que se coloca sobre la nariz y la boca, o a través de un pequeño tubo insertado en la tráquea a través de la parte frontal del cuello, también llamada terapia de oxígeno transtorácico).

- 5 En una realización, al menos un agente adicional es un agente que mitiga a uno o más de los efectos secundarios del apilimod seleccionado de náuseas, vómitos, dolor de cabeza, mareos, aturdimiento, somnolencia y estrés. En un aspecto de esta realización, el agente adicional es un antagonista de los receptores de serotonina, también conocidos como receptores de 5-hidroxitriptamina o receptores de 5-HT. En un aspecto, el agente adicional es un antagonista de un receptor 5-HT<sub>3</sub> o 5-HT<sub>1a</sub>. En un aspecto, el agente se selecciona del grupo que consiste en ondansetrón, granisetron, dolasetron y palonosetrón. En otro aspecto, el agente se selecciona del grupo que consiste en pindolol y risperidona.

En una realización, al menos un agente adicional es un agente anticancerígeno. En una realización, el agente anticancerígeno se selecciona de entre taxol, vincristina, doxorubicina, temsirolimus, carboplatino, ofatumumab, rituximab y combinaciones de los mismos.

- 15 En una realización, al menos un agente adicional se selecciona de clorambucilo, ifosfamida, doxorubicina, mesalazina, talidomida, lenalidomida, temsirolimus, everolimus, fludarabina, fostamatinib, paclitaxel, docetaxel, ofatumumab, rituximab, dexametasona, prednisona, CAL-101, ibritumomab, tositumomab, bortezomib, pentostatina, endostatina o una combinación de los mismas.

- 20 En una realización, al menos un agente adicional se selecciona de Afinitor (Everolimus), Aldesleuquina, Avastin (Bevacizumab), Axitinib, Bevacizumab, Everolimus, IL-2(Aldesleuquina), Inlyta (Axitinib), Interleucina-2 (Aldesleuquina), Nexavar (Tosilato de Sorafenib), Pazopanib, Clorhidrato, Proleucina (Aldesleuquina), Tosilato de Sorafenib, Malato de Sunitinib, Sutt (Malato Sunitinib), Temsirolimus, Torisel (Temsirrolimus), Votrient (Hidroclorato de pazopanib), o una combinación de los mismos.

- 25 En una realización, al menos un agente adicional se dirige hacia una terapia dirigida, en la que la diana del tratamiento se dirige a los genes, las proteínas o al entorno tisular específico del cáncer que contribuye al crecimiento y a la supervivencia del cáncer. Este tipo de tratamiento bloquea el crecimiento y la proliferación de las células cancerígenas limitando el daño a las células sanas.

- 30 En una realización, al menos un agente adicional se dirige hacia la terapia anti-angiogénesis, en la que el tratamiento está centrado en detener a la angiogénesis, que es el proceso de hacer vasos sanguíneos nuevos. Debido a que un tumor necesita de los nutrientes suministrados por los vasos sanguíneos para crecer y diseminarse, el objetivo de las terapias contra la angiogénesis es "privar de alimentos" al tumor. Se ha demostrado que un fármaco antiangiogénico, el bevacizumab (Avastin), retarda el crecimiento de tumores en personas con carcinoma renal metastásico. El bevacizumab combinado con un interferón retarda el crecimiento y la diseminación del tumor.

- 35 En una realización, al menos un agente adicional está dirigido hacia la inmunoterapia, también llamada terapia biológica, está diseñado para reforzar a las defensas naturales del cuerpo para combatir el cáncer. Utiliza materiales fabricados por el cuerpo o en un laboratorio para mejorar, atacar o restaurar la función del sistema inmune. Por ejemplo, la Interleucina-2 (IL-2) es un medicamento que se ha utilizado para tratar el cáncer de riñón, así como la AM0010 y la Interleucina-15. Son hormonas celulares llamadas citocinas producidas por los glóbulos blancos y que son importantes para el funcionamiento del sistema inmune, incluyendo la destrucción de las células tumorales. El interferón-alfa es otro tipo de inmunoterapia que se utiliza para tratar el cáncer de riñón que se he diseminado. El interferón parece cambiar a las proteínas en la superficie de las células cancerígenas y retardar su crecimiento. Muchas terapias combinadas de IL-2 y de interferón-alfa para pacientes que tienen cáncer de riñón avanzado combinadas con quimioterapia son más efectivas que la IL-2 o el interferón por si solos.

- 45 En realizaciones, al menos un agente adicional es un inhibidor de la ruta PD-1/PDL-1. En realizaciones, el inhibidor de la ruta PD-1/PDL-1 se selecciona de pembrolizumab (Keytruda), avelumab, atezolizumab (MPDL3280A), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (MK-3475), MSB0010718C, y MEDI4736.

- 50 Otro ejemplo es un compuesto denominado inhibidor del punto de control. El tratamiento con estos compuestos funciona dirigiéndose a las moléculas que sirven como controles y equilibrios en las respuestas inmunes. Al bloquear estas moléculas inhibitorias o, alternativamente, activar a moléculas estimuladoras, estos tratamientos están diseñados para desencadenar o aumentar las respuestas inmunes anticancerígenas preexistentes. Varios anticuerpos incluyen PD-1, anti-CD27, B7-H3, KIR, LAG-3, 4-1BB/CD137 y GITR. Los agentes de ejemplo incluyen pembrolizumab (Keytruda, MK-3475, un anticuerpo PD-1), MPDL3280A (un anticuerpo PD-L1), varlilumab (CDX-1127, un anticuerpo anti-CD27), MGA217 (un anticuerpo que se dirige a B7- H3), lirilumab (un anticuerpo KIR), BMS-986016 (un anticuerpo LAG-3), urelumab (un anticuerpo 4-1BB/CD137), TRX518 (un anticuerpo GITR) y MK-4166 (un anticuerpo GITR).

- 55 Otro ejemplo es una vacuna contra el cáncer, diseñada para ocasionar una respuesta inmune contra antígenos específicos a tumores o asociados a tumores, alentando al sistema inmune para que ataque a las células cancerígenas que contienen a estos antígenos. Los agentes de ejemplo son AGS-003, DCVax y NY-ESO-1.

Otro ejemplo es que las células inmunes se eliminan de un paciente, se modifican genéticamente o se tratan con productos químicos para aumentar su actividad, y luego se vuelven a introducir en el paciente con el objetivo de mejorar la respuesta anticancerígena del sistema inmune.

5 En el contexto de los métodos descritos en la presente, la cantidad de apilimod administrada al sujeto es una cantidad terapéuticamente efectiva. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para tratar, mejorar un síntoma, reducir la gravedad o reducir la duración de la enfermedad o del trastorno que está siendo tratado, o aumentar o mejorar el efecto terapéutico de otra terapia, o lo suficiente para presentar un efecto terapéutico detectable en el sujeto. En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de apilimod es la cantidad efectiva para inhibir la actividad de la cinasa PIKfyve.

10 Una cantidad efectiva de apilimod puede variar de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, a aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, aproximadamente 0.1 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg; o cualquier intervalo en el que el límite inferior del intervalo sea cualquier cantidad entre 0.001 mg/kg y 900 mg/kg y el extremo superior del intervalo sea cualquier cantidad entre 0.1 mg/kg y 1000 mg/kg (por ejemplo, 0.005 mg/kg y 200 mg/kg, 0.5 mg/kg y 20 mg/kg). Las dosis efectivas también van a variar, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de las enfermedades tratadas, la vía de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto con otros tratamientos terapéuticos, tales como el uso de otros agentes. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. No. 7,863,270.

15 En aspectos más específicos, el apilimod se va a administrar en un régimen de dosificación de 30-1000 mg/día (por ejemplo, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 mg/día) durante al menos 1 semana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 36, 48 o más semanas). Preferiblemente, el apilimod se va a administrar en un régimen de dosificación de 100-1000 mg/día durante 4 o 16 semanas. De forma alternativa o posterior, el apilimod se va a administrar en un régimen de dosificación de 100-300 mg dos veces al día durante 8 semanas, o de manera opcional, durante 52 semanas. De forma alternativa o posterior, se va a administrar una composición del apilimod en un régimen de dosificación de 50 mg-1000 mg dos veces al día durante 8 semanas, u opcionalmente, durante 52 semanas.

20 Una cantidad efectiva de la composición de apilimod puede administrarse una vez al día, de dos a cinco veces al día, hasta dos veces o hasta tres veces al día, o hasta ocho veces al día. En una realización, la composición de apilimod se administra tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, durante catorce días (cuatro veces al día, tres veces al día o dos veces al día, o una vez al día) y 7 días de descanso en un ciclo de 3 semanas, hasta cinco o siete días seguidos (cuatro veces al día, tres veces al día o dos veces al día, o una vez al día) y 14-16 días de descanso en un ciclo de 3 semanas, o una vez cada dos días, o una vez a la semana, o una vez cada 2 semanas, o una vez cada 3 semanas.

25 De acuerdo con los métodos descritos en la presente, un "sujeto que necesita el mismo" es un sujeto que tiene cáncer renal, o un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer renal en relación con la población en general. El sujeto que necesite del mismo puede ser uno que es "no responsivo" o "refractario" a una terapia actualmente disponible para el cáncer. En este contexto, los términos "no responsivo" y "refractario" se refieren a la respuesta del sujeto a la terapia como clínicamente no adecuada para aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno. En un aspecto de los métodos aquí descritos, el sujeto que necesita el mismo, es un sujeto con cáncer cuyo cáncer es refractario a la terapia estándar o cuyo cáncer ha recurrido después del seguimiento del tratamiento estándar.

30 Un "sujeto" incluye un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, primate, vertebrado, ave, ratón, rata, pollo, perro, gato, vaca, caballo, cabra, camello, oveja o un cerdo. Preferiblemente, el mamífero es un humano. El término "paciente" se refiere a un sujeto humano.

35 La presente divulgación también proporciona una monoterapia para el tratamiento del cáncer renal como se describe en la presente. Como se utiliza en la presente, la "monoterapia" se refiere a la administración de un único compuesto activo o terapéutico a un sujeto que necesite del mismo.

40 Como se utiliza en la presente, "tratamiento", "tratando" o "tratar" describe el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir una enfermedad, condición o trastorno e incluye la administración de apilimod para aliviar los síntomas o complicaciones de una enfermedad, condición o trastorno, o para eliminar la enfermedad, condición o trastorno.

45 Como se utiliza en la presente, "prevención", "previniendo" o "prevenir" describe la reducción o eliminación del inicio de los síntomas o complicaciones de la enfermedad, condición o trastorno e incluye la administración de apilimod para reducir el inicio, desarrollo o recurrencia de los síntomas de la enfermedad, condición o trastorno

50 En una realización, la administración de apilimod conduce a la eliminación de un síntoma o complicación del cáncer que está siendo tratado, sin embargo, no se requiere la eliminación del cáncer. En una realización, la gravedad del síntoma disminuye. En el contexto del cáncer, tales síntomas pueden incluir marcadores clínicos de severidad o progresión, incluyendo el grado en que un tumor secreta factores de crecimiento, degrada la matriz extracelular, se vasculariza, pierde adherencia a los tejidos yuxtapuestos o hace metástasis, así como el número de metástasis.

5 El tratamiento del cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una reducción en el tamaño de un tumor. Una reducción en el tamaño de un tumor también puede denominarse como "regresión tumoral". Preferiblemente, después del tratamiento, el tamaño del tumor se reduce en un 5% o más en relación con su tamaño antes del tratamiento; más preferiblemente, el tamaño del tumor se reduce en un 10% o más; más preferiblemente, se reduce en un 20% o más; más preferiblemente, reducido en un 30% o más; más preferiblemente, reducido en un 40% o más; aún más preferiblemente, reducido en un 50% o más; y lo más preferible, reducido en más del 75% o aún más. El tamaño de un tumor se puede medir por cualquier método de medición que sea reproducible. El tamaño de un tumor se puede medir como el diámetro del tumor.

10 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una reducción en el volumen del tumor. Preferiblemente, después del tratamiento, el volumen del tumor se reduce en un 5% o más en relación con el tamaño previo al tratamiento; más preferiblemente, el volumen del tumor se reduce en un 10% o más; más preferiblemente, se reduce en un 20% o más; más preferiblemente, se reduce en un 30% o más; más preferiblemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferiblemente, se reduce en un 50% o más; y lo más preferible, se reduce en más del 75% o más. El volumen del tumor puede medirse por cualquier método de medición que sea reproducible.

15 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una disminución en el número de tumores. Preferiblemente, después del tratamiento, el número de tumores se reduce en un 5% o más en relación con el número previo al tratamiento; más preferiblemente, el número de tumores se reduce en un 10% o más; más preferiblemente, se reduce en un 20% o más; más preferiblemente, se reduce en un 30% o más; más preferiblemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferiblemente, se reduce en un 50% o más; y lo más preferible, se reduce en más del 75%. El número de tumores puede ser medido por cualquier método de medición que sea reproducible. El número de tumores se puede medir contando los tumores visibles a simple vista o con un aumento específico. Preferiblemente, la ampliación especificada es de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o 50x.

20 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede resultar en una disminución en el número de lesiones metastásicas en otros tejidos u órganos distantes del sitio del tumor primario. Preferiblemente, después del tratamiento, el número de lesiones metastásicas se reduce en un 5% o más en relación con el número previo a el tratamiento; más preferiblemente, el número de lesiones metastásicas se reduce en un 10% o más; más preferiblemente, se reduce en un 20% o más; más preferiblemente, se reduce en un 30% o más; más preferiblemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferiblemente, se reduce en un 50% o más; y lo más preferible, se reduce en más del 75%. El número de lesiones metastásicas puede ser medido por cualquier método de medición que sea reproducible. El número de lesiones metastásicas se puede medir contando las lesiones metastásicas visibles a simple vista o con un aumento específico. Preferiblemente, la ampliación especificada es de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o 50x.

25 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado un aumento en el tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados, en comparación con una población que recibe un acarreador por sí solo. Preferiblemente, el tiempo de supervivencia promedio se incrementa en más de 30 días; más preferiblemente, por más de 60 días; más preferiblemente, por más de 90 días; y lo más preferible, por más de 120 días. Un aumento en el tiempo de supervivencia promedio de una población puede medirse por cualquier método que sea reproducible. Un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población puede medirse, por ejemplo, calculando, para una población, la duración promedio de la supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento en el tiempo de supervivencia promedio de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el tiempo de supervivencia promedio después de completar una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

30 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede resultar en un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población de sujetos tratados en comparación con una población de sujetos no tratados. Preferiblemente, el tiempo promedio de supervivencia se incrementa en más de 30 días; más preferiblemente, por más de 60 días; más preferiblemente, por más de 90 días; y lo más preferible, por más de 120 días. Un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población puede medirse por cualquier método reproducible. Un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población puede medirse, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el tiempo de supervivencia promedio después de completar una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

35 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede resultar en un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un medicamento que no es el apilimod. Preferiblemente, el tiempo de supervivencia promedio se incrementa en más de 30 días; más preferiblemente, por más de 60 días; más preferiblemente, por más de 90 días; y lo más preferible, por más de 120 días. Un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población puede medirse por cualquier método que sea reproducible. Un aumento en el tiempo promedio de supervivencia de una población puede medirse, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento en el tiempo de supervivencia promedio de

una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el tiempo de supervivencia promedio después de completar una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

5 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe un acarreador solo. El tratamiento de un trastorno, enfermedad o condición de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede resultar en una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población no tratada. El tratamiento de un trastorno, enfermedad o condición de acuerdo con los métodos descritos la presente puede resultar en una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un medicamento que no es el apilimod. Preferiblemente, la tasa de mortalidad se reduce en más del 2%; más preferiblemente, en más del 5%; más preferiblemente, en más del 10%; y lo más preferible, en más del 25%. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados puede medirse por cualquier método que sea reproducible. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población puede medirse, por ejemplo, calculando para una población el número promedio de muertes relacionadas con la enfermedad por unidad de tiempo después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número promedio de muertes relacionadas con la enfermedad por unidad de tiempo después de completar una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

20 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una disminución en la tasa de crecimiento del tumor. Preferiblemente, después del tratamiento, la tasa de crecimiento del tumor se reduce en al menos un 5% en relación con el tamaño previo al tratamiento; más preferiblemente, la tasa de crecimiento del tumor se reduce en al menos un 10%; más preferiblemente, se reduce en al menos 20%; más preferiblemente, se reduce en al menos 30%; más preferiblemente, se reduce en al menos un 40%; más preferiblemente, se reduce en al menos 50%; incluso más preferiblemente, se reduce en al menos un 50%; y lo más preferible, se reduce en al menos un 75%. La tasa de crecimiento del tumor se puede medir por cualquier método de medición que sea reproducible. La tasa de crecimiento del tumor se puede medir de acuerdo con un cambio en el diámetro del tumor por unidad de tiempo. En una realización, después del tratamiento, la tasa de crecimiento del tumor puede ser de aproximadamente cero y se determina que mantiene el mismo tamaño, por ejemplo, si el tumor ha dejado de crecer.

30 El tratamiento contra el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una disminución en el recrecimiento tumoral. Preferiblemente, después del tratamiento, el recrecimiento del tumor es inferior al 5%; más preferiblemente, el recrecimiento tumoral es inferior al 10%; más preferiblemente, menos del 20%; más preferiblemente, menos del 30%; más preferiblemente, menos del 40%; más preferiblemente, menos del 50%; aún más preferiblemente, menos del 50%; y lo más preferible, menos del 75%. El recrecimiento tumoral puede medirse por cualquier método de medición que sea reproducible. El recrecimiento tumoral se mide, por ejemplo, midiendo un aumento en el diámetro de un tumor después de una contracción tumoral previa que siguió al tratamiento. Una disminución en el recrecimiento tumoral está indicada por la falla de los tumores para volver a aparecer después de que el tratamiento haya sido detenido.

40 El tratamiento o la prevención de un trastorno de proliferación celular de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una reducción en la velocidad de la proliferación celular. Preferiblemente, después del tratamiento, la tasa de proliferación celular se reduce en al menos un 5%; más preferiblemente, al menos en un 10%; más preferiblemente, al menos en un 20%; más preferiblemente, al menos en un 30%; más preferiblemente, al menos en un 40%; más preferiblemente, al menos en un 50%; incluso más preferiblemente, al menos en un 50%; y lo más preferible, al menos en un 75%. La tasa de proliferación celular se puede medir por cualquier método de medición que sea reproducible. La tasa de proliferación celular se mide, por ejemplo, midiendo el número de células en división en una muestra de tejido por unidad de tiempo.

50 El tratamiento o la prevención de un trastorno de proliferación celular de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una reducción en la proporción de células en proliferación. Preferiblemente, después del tratamiento, la proporción de células en proliferación se reduce en al menos un 5%; más preferiblemente, al menos en un 10%; más preferiblemente, al menos en un 20%; más preferiblemente, al menos en un 30%; más preferiblemente, al menos en un 40%; más preferiblemente, al menos en un 50%; incluso más preferiblemente, al menos en un 50%; y lo más preferible, al menos en un 75%. La proporción de células en proliferación puede medirse por cualquier método de medición que sea reproducible. Preferiblemente, la proporción de células en proliferación se mide, por ejemplo, cuantificando el número de células en división con respecto al número de células que no están en división en una muestra de tejido. La proporción de células en proliferación puede ser equivalente al índice mitótico.

55 El tratamiento o la prevención de un trastorno de proliferación celular de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede dar como resultado una disminución en el tamaño de un área o una zona de proliferación celular. Preferiblemente, después del tratamiento, el tamaño de un área o una zona de proliferación celular se reduce en al menos un 5% con respecto a su tamaño antes del tratamiento; más preferiblemente, se reduce en al menos un 10%; más preferiblemente, se reduce en al menos 20%; más preferiblemente, se reduce en al menos 30%; más preferiblemente se reduce en al menos un 40%; más preferiblemente, se reduce en al menos 50%; incluso más preferiblemente, se reduce en al menos un 50%; y lo más preferible, se reduce en al menos un 75%. El tamaño de un

área o una zona de proliferación celular puede medirse por cualquier método de medición que sea reproducible. El tamaño de un área o una zona de proliferación celular puede medirse como el diámetro o el ancho de un área o una zona de proliferación celular.

5 El tratamiento o la prevención de un trastorno de proliferación celular de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede resultar en una disminución en el número o en la proporción de células con apariencia o morfología anormal. Preferiblemente, después del tratamiento, el número de células que tienen una morfología anormal se reduce en al menos un 5% con respecto a su tamaño antes del tratamiento; más preferiblemente, se reduce en al menos un 10%; más preferiblemente, se reduce en al menos 20%; más preferiblemente, se reduce en al menos 30%; más preferiblemente, se reduce en al menos un 40%; más preferiblemente, se reduce en al menos 50%; incluso más preferiblemente, se reduce en al menos un 50%; y lo más preferible, se reduce en al menos un 75%. Una apariencia o morfología celular anormal se pueden medir por cualquier método de medición que sea reproducible. Una morfología celular anormal se puede medir por microscopía, por ejemplo, utilizando un microscopio de cultivo de tejido invertido. Una morfología celular anormal puede tomar la forma de pleiomorfismo nuclear.

15 Como se utiliza en la presente, el término "selectivamente" refiere a que tiende a ocurrir con una frecuencia más alta en una población que en otra población. Las poblaciones comparadas pueden ser poblaciones de células. Preferiblemente, el apilimod actúa selectivamente en células hiperproliferativas o células con una proliferación anormal, en comparación con células normales. Como se utiliza en la presente, una "célula normal" es una célula que no puede ser clasificada como parte de un "trastorno de proliferación celular". Una célula normal carece de crecimiento no regulado o anormal, o ambos, que pueden conducir al desarrollo de una condición o una enfermedad no deseadas. Preferiblemente, una célula normal posee mecanismos de punto de control del ciclo celular que funcionan de manera normal. Preferiblemente, el apilimod, actúa selectivamente para modular a una diana molecular (por ejemplo, una cinasa diana) pero no modula significativamente otro objetivo molecular (por ejemplo, una cinasa que no es el objetivo). La divulgación también proporciona un método para inhibir selectivamente la actividad de una enzima, como podría ser una cinasa. Preferiblemente, un evento ocurre selectivamente en la población A, relativo a la población B si ocurre 20 dos veces o más frecuentemente en la población A, que en comparación con la población B. Un evento ocurre de manera selectiva si ocurre más de cinco veces más frecuentemente en la población A. Un evento ocurre selectivamente si ocurre más de diez veces más frecuentemente en la población A; más preferiblemente, más de cincuenta veces; aún más preferiblemente, más de 100 veces; y lo más preferible, mayor a 1000 veces más frecuentemente en la población A en comparación con la población B. Por ejemplo, se diría que la muerte celular ocurre de manera selectiva en células enfermas e hiperproliferativas si esta ocurriera con una frecuencia mayor a dos veces en células enfermas e hiperproliferativas en comparación con células normales.

#### Composiciones farmacéuticas y formulaciones

35 La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, clatrato, hidrato, polimorfo, de los mismos, en combinación con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la cantidad es eficaz para el tratamiento del cáncer renal y/o eficaz para inhibir a la PIKfyve en las células cancerígenas de un sujeto que tiene cáncer renal.

En una realización, el apilimod es una base libre de apilimod. En una realización, el apilimod es dimesilato de apilimod.

En una realización, el apilimod se combina con al menos un agente activo adicional en una única forma de dosificación.

En una realización, la composición comprende además a un antioxidante.

40 En realizaciones, al menos un agente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante, un agente intercalante, un agente de unión a tubulina, un corticosteroide y combinaciones de los mismos. En una realización, al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en ibrutinib, rituximab, doxorubicina, prednisolona, vincristina, velcade y everolimus, y combinaciones de los mismos. En una realización, al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico seleccionado de ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina (también denominada doxorubicina o Adriamycin<sup>TM</sup>), vincristina (también denominada Oncovin<sup>TM</sup>), prednisona, prednisolona y combinaciones de las mismas.

50 En realizaciones, al menos un agente activo adicional es un agente no terapéutico seleccionado para mejorar uno o más efectos secundarios de la composición del apilimod. En una realización, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ondansetrón, granisetron, dolasetron y palonosetrón. En una realización, el agente no terapéutico se selecciona del grupo que consiste en pindolol y risperidona.

En realizaciones, al menos un agente adicional es un inhibidor de la vía PD-1/PDL-1. En realizaciones, el inhibidor de la ruta PD-1/PDL-1 se selecciona de pembrolizumab (Keytruda), avelumab, atezolizumab (MPDL3280A), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (MK-3475), MSB0010718C, y MEDI4736.

55 En realizaciones, al menos un agente activo adicional se selecciona de un inhibidor de la vía de mTOR, un inhibidor de TKI, un inhibidor de PI3K, un inhibidor de PI3K/mTOR dual, un inhibidor de SRC, un inhibidor de VEGF, una cinasa de Janus (JAK), un inhibidor de Raf, un inhibidor de Erk, un inhibidor de la farnesiltransferasa, un inhibidor de la histona desacetilasa, un agente antimetabólico, un inhibidor de eflujo de resistencia a múltiples fármacos, un antibiótico y una

citosina. En una realización, el segundo agente terapéutico es una citocina terapéutica. En una realización, el segundo agente terapéutico es Interleucina-2. En otra realización, el segundo agente terapéutico se selecciona de un inhibidor de tirosina cinasa (por ejemplo, everolimus, bevacizumab).

5 En las realizaciones, el inhibidor de mTOR se selecciona del grupo que consiste en rapamicina (también denominada sirolimus), everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, umirolimus, zotarolimus, AZD8055, INK128, WYE-132, Torin-1, análogos de pirazolopitimina PP242, PP30, PP487, PP121, KU0063794, KU-BMCL-200908069-1, Wyeth-BMCL-200910075-9b, INK-128, XL388, AZD8055, P2281 y P529. Véase, por ejemplo, Liu et al. Drug Disc. Today Ther. Strateg., 6(2):47-55 (2009).

10 En realizaciones, el inhibidor de mTOR es trans-4-[4-amino-5-(7-metoxi-1H-indol-2-il)imidazo[5,1-f][1,2,4]tri-ácido azin-7-il]ciclohexano ácido carboxílico (también conocido como OSI-027), y cualquiera de las sales, solvatos, hidratos y otras formas físicas, cristalinas o amorfas, de los mismos. Véase US 2007/0112005. OSI-027 puede prepararse de acuerdo con el documento US 2007/0112005. En una realización, el inhibidor de mTOR es OXA-01. Véase, por ejemplo, el documento WO 2013152342 A1.

15 En realizaciones, el inhibidor de PI3K es seleccionado del grupo que consiste en GS-1101 (Idelalisib), GDC0941 (Pictilisib), LY294002, BKM120 (Buparlisib), PI-103, TGX-221, IC-87114, XL 147, ZSTK474, BYL719, AS-605240, PIK-75, 3-metiladenina, A66, PIK-93, PIK-90, AZD6482, IPI-145 (Duvelisib), TG100-115, AS-252424, PIK294, AS-604850, GSK2636771, BAY 80-6946 (Copanlisib), CH5132799, CAY10505, PIK-293, TG100713, CZC24832 y HS-173.

20 En realizaciones, el inhibidor dual de PI3K/mTOR se selecciona del grupo que consiste en, GDC-094, WAY-001, WYE-354, WAY-600, WYE-687, Wyeth-BMCL-200910075-16b, Wyeth BMCL-200910096-27, KU0063794 y KUBM-CL-200908069-5, NVP-BEZ235, XL-765, PF-04691502, GDC-0980 (Apatolisib), GSK1059615, PF-05212384, BGT226, PKI-402, VS-558 y GSK2126458. Véase, por ejemplo, Liu et al. Drug Disc. Today Ther. Strateg., 6(2):47-55 (2009).

25 En realizaciones, el inhibidor de la vía mTOR es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un ARN de horquilla corta, un micro-ARN, un oligonucleótido antisentido, un ácido nucleico bloqueado o un aptámero) que se une e inhibe el nivel de expresión o actividad o una proteína (o ácido nucleico que codifica a la proteína) en la vía de mTOR. Por ejemplo, el polipéptido o ácido nucleico inhibe el Complejo 1 de mTOR (mTORC1), la proteína asociada a los reguladores de mTOR (Raptor), la proteína SEC13 8 (MLST8) letal para mamíferos, el sustrato de Akt rico en prolinas de 40 kDa (PRAS40), el dominio DEP que contiene proteína interactuante con mTOR (DEPTOR), Complejo 2 mTOR (mTORC2), compañera de mTOR insensible a la rapamicina (RICTOR), proteína tipo subunidad beta de la proteína G (GβL),  
30 proteína quinasa 1 activada por estrés en mamíferos (mSIN1), paxillina, RhoA, sustrato de toxina botulínica C3 relacionada a Ras C3 (Rac1), homólogo 42 de la proteína de control de la división celular (Cdc42), proteína Cinasa C α (PKCα), la proteína cinasa serina/treonina Akt, fosfoinositido 3-cinasa (PI3K), p70S6K, Ras y/o factor de iniciación de la traducción en eucariontes 4E (eIF4E) - proteínas de unión (4EBPs), o el ácido nucleico que codifica a una de estas proteínas.

35 En realizaciones, el inhibidor de SRC se selecciona del grupo que consiste en bosutinib, saracatinib, dasatinib, ponatinib, KX2-391, XL-228, TG100435/TG100855 y DCC2036. Véase, por ejemplo, Puls et al. Oncologist. 2011 May; 16(5): 566-578. En una realización, el inhibidor de la SRC es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un ARN de horquilla corta, un micro-ARN, un oligonucleótido antisentido, un ácido nucleico bloqueado o un aptámero) que se une e inhibe el nivel de expresión o actividad de la proteína SRC o de un ácido nucleico que codifica para la proteína SRC.  
40

45 En realizaciones, el inhibidor de VEGF es seleccionado de bevacizumab, sunitinib, pazopanib, axitinib, sorafenib, regorafenib, lenvatinib y motesanib. En una realización, el inhibidor de VEGF es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un RNA de horquilla corta, un micro-RNA, un oligonucleótido antisentido, un morfolino, un ácido nucleico bloqueado, o un aptámero) que se unen e inhiben el nivel de expresión o la actividad de una proteína VEGF, una proteína receptora de VEGF o un ácido nucleico que codifica para cada una de estas proteínas. Por ejemplo, el inhibidor de VEGF es un receptor de VEGF soluble (por ejemplo, un receptor de VEGF-C/D soluble (sVEGFR-3)).

En realizaciones, el inhibidor de JAK se selecciona de facitinib, ruxolitinib, baricitinib, CYT387 (número de CAS 1056634-68-4), lestauritinib, pacritinib y TG101348.

50 (Número CAS 936091-26-8]8). En una realización, el inhibidor de JAK es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un RNA de horquilla corta, un micro-RNA, un oligonucleótido antisentido, un morfolino, un ácido nucleico bloqueado, o un aptámero) que se une e inhibe el nivel de expresión o actividad de un JAK (por ejemplo, JAK1, JAK2, JAK3 o TYK2) o un ácido nucleico que codifica para la proteína JAK.

55 En realizaciones, el inhibidor de Raf se selecciona de PLX4032 (vemurafenib), sorafenib, PLX-4720, GSK2118436 (dabrafenib), GDC-0879, RAF265, AZ 628, NVP-BHG712, SB90885, ZM 336372, GW5074, TCC 632, CEP-32496 y LGX818 (Encorafenib). En una realización, el inhibidor de Raf es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un ARN

de horquilla corta, un micro-ARN, un oligonucleótido antisentido, un morfolino, un ácido nucleico bloqueado o un aptámero) que se une a e inhibe el nivel de expresión o la actividad de un Raf (por ejemplo, A-Raf, B-Raf, C-Raf) o un ácido nucleico que codifica para la proteína Raf. En una realización, el inhibidor de MEK se selecciona de AZD6244 (Selumetinib), PD0325901, GSK1120212 (Trametinib), U0126-EtOH, PD184352, RDEA119 (Rafametinib), PD98059, BIX 02189, MEK162 (Binimetinib), AS-703026 (Pimasertib), SL-327, BIX02188, AZD8330, TAK-733 y PD318088. En una realización, el inhibidor de MEK es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un ARN de horquilla corta, un micro-ARN, un oligonucleótido antisentido, morfolino, un ácido nucleico bloqueado o un aptámero) que se une e inhibe el nivel de expresión o la actividad de MEK (por ejemplo, MEK-1, MEK-2) o un ácido nucleico que codifica para la proteína MEK.

En realizaciones, el inhibidor de Akt se selecciona entre MK-2206, KRX-0401 (perifosina), GSK690693, GDC-0068 (Ipatasertib), AZD5363, CCT128930, A-674563, PHT-427. En una realización, el inhibidor de Akt es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un ARN de horquilla corta, un micro-ARN, un oligonucleótido antisentido, morfolino, un ácido nucleico bloqueado o un aptámero) que se une e inhibe el nivel de expresión o la actividad de Akt (por ejemplo, Akt-1, Akt-2, Akt-3) o un ácido nucleico que codifica para la proteína Akt.

En realizaciones, el inhibidor de la farnesiltransferasa es seleccionado de LB42708 o de tipifarnib. En una realización, el inhibidor de la farnesiltransferasa es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia de doble cadena, un ARN de horquilla corta, un micro-ARN, un oligonucleótido antisentido, morfolino, un ácido nucleico bloqueado, o un aptámero) que se une e inhibe el nivel de expresión o la actividad de la farnesiltransferasa o un ácido nucleico que codifica para la proteína farnesiltransferasa. En una realización, el inhibidor de la modulación de histonas se selecciona de entre ácido anacárico, C646, MG149 (histona acetiltransferasa), GSK J4 Hcl (histona desmetilasa), GSK343 (activo contra EZH2), BIX 01294 (histona metiltransferasa), MK0683 (Vorinostat), MS275 (Entinostat), LBH589 (Panobinostat), Tricostatina A, MGCD0103 (Mocetinostat), Tasquinimod, TMP269, Nexturastat A, RG2833, PDX101 (Belinostat).

En las realizaciones, el agente antimetabólico es seleccionado de Griseofulvina, tartrato de vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, Epotilona A, Epotilona B, ABT-751, CYT997 (Lexibulin), tartrato de vinflunina, Fosbretabulin, GSK461364, ON-01910 (Rigosertib), Ro3280, BI2536, NMS-P937, BI 6727 (Volasertib), HMN-214 y MLN0905.

En realizaciones, el inhibidor de la tirosina cinasa es seleccionado de Votrient, Axitinib, Bortezomib, Bosutinib, Carfilzomib, Crizotinib, Dabrafenib, Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Ibrutinib, Imatinib, Lapatinib, Nilotinib, Pegaptanib, Ponatinib, Regorafenib, Ruxolitinib, Sorafenib, Sunitinib, Trametinib, Vandetanib, Vemurafenib, y Vismodegib.

En una realización, el antibiótico de poliéter es seleccionado de monensina, nigericina, valinomicina, salinomicina.

Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene a los compuestos descritos en la presente en una forma farmacéuticamente aceptable apropiada para la administración a un sujeto. Como se utiliza en la presente, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, acarreadores y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son apropiados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable de riesgo/beneficio.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no es biológica ni es indeseable e incluye un excipiente que es aceptable para uso veterinario, así como para uso de productos farmacéuticos en humanos. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, líquidos estériles, agua, solución salina tamponada, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), aceites, detergentes, agentes de suspensión, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, lactosa, sacarosa o dextrano), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico o glutatión), agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular o mezclas apropiadas de los mismos.

Una composición farmacéutica se puede proporcionar a granel o en forma de una dosis unitaria. Es especialmente ventajoso formular composiciones farmacéuticas en forma de dosis unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. El término "forma de unidad de dosificación" como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la divulgación está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr. Una forma de dosis unitaria puede ser una ampolla, un vial, un supositorio, una gragea, una tableta, una cápsula, una bolsa intravenosa o una bomba sencilla o en un inhalador en aerosol.

En aplicaciones terapéuticas, las dosis varían dependiendo del agente, la edad, el peso y el estado clínico del paciente que es el receptor, y la experiencia y el juicio del médico o profesional que administra la terapia, entre otros factores que afectan a la dosis seleccionada. Generalmente, la dosis debe de ser una cantidad terapéuticamente eficaz. Las

dosis se pueden proporcionar en mg/kg/día en unidades de medida (las dosis se pueden ajustar según el peso del paciente en kg, el área de la superficie corporal en m<sup>2</sup> y la edad en años). La cantidad efectiva de una composición farmacéutica es aquella que proporciona una mejora objetivamente identificable según lo observado por el clínico u otro observador calificado. Por ejemplo, aliviar un síntoma de un trastorno, enfermedad o condición. Tal como se utiliza en la presente, el término "manera eficaz de dosificación" se refiere a la cantidad de una composición farmacéutica para producir el efecto biológico deseado en un sujeto o en célula.

Por ejemplo, la forma de unidad de dosificación puede comprender de 1 nanogramo a 2 miligramos, o de 0.1 miligramos a 2 gramos; o de 10 miligramos a 1 gramo, o de 50 miligramos a 500 miligramos o de 1 microgramo a 20 miligramos; o de 1 microgramo a 10 miligramos; o de 0.1 miligramos a 2 miligramos.

Las composiciones farmacéuticas pueden tomar cualquier forma apropiada (por ejemplo, líquidos, aerosoles, soluciones, inhalantes, vahos, aerosoles; o sólidos, polvos, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, parches y similares) para administración por cualquier medio deseado (por ejemplo, pulmonar, inhalación, intranasal, oral, bucal, sublingual, parenteral, subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intratecal, transdérmica, transmucosa, rectal y formas similares). Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación puede estar en forma de una solución acuosa o un polvo para la administración del aerosol por inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o de la nariz), en forma de una tableta o una cápsula para la administración oral; en forma de una solución o dispersión acuosa estéril apropiada para la administración mediante inyección directa o mediante adición a fluidos de infusión estériles para la infusión intravenosa; o en forma de loción, crema, espuma, parche, suspensión, solución, o supositorio para la administración transdérmica o transmucosa.

Una composición farmacéutica puede estar en forma de una forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye, pero no se limita a, cápsulas, tabletas, formas bucales, trociscos, pastillas y líquidos orales en forma de emulsiones, suspensiones acuosas, dispersiones o soluciones. Las cápsulas pueden contener mezclas de un compuesto de la presente divulgación con rellenos inertes y/o diluyentes tales como almidones farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, almidón de maíz, patata o tapioca), azúcares, agentes edulcorantes artificiales, celulosas en polvo, tales como cristalinas y celulosas microcristalinas, harinas, gelatinas, gomas, etcétera. En el caso de tabletas para uso oral, los vehículos que se utilizan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se pueden añadir agentes lubricantes, como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el compuesto de la presente divulgación puede suspenderse o puede disolverse en una fase oleosa que se combina con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Si se desea, se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes y/o colorantes.

La composición farmacéutica puede estar en forma de una tableta. La tableta puede comprender la dosis unitaria de un compuesto de la presente divulgación junto con un diluyente o un vehículo inertes tal como un azúcar o alcohol de azúcar, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol o manitol. La tableta puede comprender además un diluyente no derivado de azúcar, tal como el carbonato de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, o una celulosa o un derivado de los mismos, tal como metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil metil celulosa y almidones tales como almidón de maíz. La tableta puede comprender además agentes de unión y de granulación tales como polivinilpirrolidona, desintegrantes (por ejemplo, polímeros reticulados hinchables, como carboximetil celulosa entrecruzada), agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos), preservativos (por ejemplo, parabenos), antioxidantes (por ejemplo, BHT), agentes tampón (por ejemplo, tampones de fosfato o de citrato), y agentes efervescentes tales como mezclas de citrato/bicarbonato.

La tableta puede ser una tableta recubierta. El recubrimiento puede ser un recubrimiento de película protectora (por ejemplo, una cera o un barniz) o un recubrimiento diseñado para controlar la liberación del agente activo, por ejemplo, de liberación retardada (liberación del activo después de un tiempo de retraso predeterminado luego de la ingestión) o liberación en una localización particular en el tracto gastrointestinal. Esto último se puede lograr, por ejemplo, utilizando recubrimientos de película entérica como los que se venden bajo la marca de nombre Eudragit®.

Las formulación de las tabletas puede prepararse mediante métodos de compresión convencionales, granulación húmeda o granulación en seco y utilizar diluyentes, agentes aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, agentes modificadores de la superficie (incluidos los tensioactivos) farmacéuticamente aceptables, agentes estabilizantes o de suspensión, incluidos, pero no limitados a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, laurilsulfato de sodio, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa cálcica, polivinilpirrolidona, gelatina, ácido alginico, goma de acacia, goma de xantano, citrato de sodio, silicatos complejos, carbonato de calcio, glicina, dextrina, sucrosa, sorbitol, fosfato de calcio, lactosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, talco, almidones secos y azúcar en polvo. Los agentes modificadores de superficie preferidos incluyen agentes modificadores de superficie aniónicos y no iónicos. Los ejemplos representativos de agentes modificadores de la superficie incluyen, pero no se limitan a, poloxámero 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetosteárico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, silicato de aluminio y magnesio, y trietanolamina.

La composición farmacéutica puede estar en forma de una cápsula de gelatina dura o blanda. De acuerdo con esta formulación, el compuesto de la presente divulgación puede estar en forma sólida, semisólida o líquida.

Una composición farmacéutica puede estar en forma de una solución o dispersión acuosa estéril apropiada para administración parenteral. El término parenteral como se utiliza en la presente incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

- 5 Una composición farmacéutica puede estar en forma de una solución o dispersión acuosa estéril apropiada para la administración mediante inyección directa o mediante la adición a fluidos de infusión estériles para infusión intravenosa, y comprende un solvente o medio de dispersión que contiene agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas apropiadas de los mismos, o uno o más aceites vegetales. Las soluciones o suspensiones del compuesto de la presente descripción como una base libre o una sal farmacológicamente aceptable se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo. Los ejemplos de tensioactivos adecuados se mencionan a continuación. Las dispersiones también se pueden preparar, por ejemplo, en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites.

15 Las composiciones farmacéuticas para uso en los métodos de la presente divulgación pueden comprender además uno o más aditivos además de cualquier vehículo o diluyente (tal como la lactosa o el manitol) que está presente en la formulación. El uno o más de los aditivos pueden comprender o consistir en uno o más tensioactivos. Los tensioactivos típicamente tienen una o más cadenas alifáticas largas, como los ácidos grasos, lo cual les permite insertarse directamente en las estructuras lipídicas de las células para mejorar la penetración y la absorción del fármaco. Un parámetro empírico comúnmente utilizado para caracterizar la hidrofiliicidad e hidrofobicidad relativa de los tensioactivos es el balance hidrofílico-lipofílico (el valor "HLB"). Los tensioactivos con valores más bajos de HLB son más hidrófobos y tienen mayor solubilidad en aceites, mientras que los tensioactivos con valores más altos de HLB son más hidrófilos y tienen mayor solubilidad en soluciones acuosas. Por lo tanto, generalmente se considera que los tensioactivos hidrofílicos son aquellos compuestos que tienen un valor HLB mayor que aproximadamente 10, y los surfactantes hidrofóbicos son generalmente aquellos que tienen un valor HLB menor que aproximadamente 10. Sin embargo, estos valores HLB son simplemente una guía debido a que, para muchos tensioactivos, los valores HLB pueden diferir tanto como aproximadamente 8 unidades de HLB, dependiendo del método empírico elegido para determinar el valor HLB.

30 Entre los agentes tensioactivos para el uso en las composiciones de la divulgación está el polietilenglicol, los ácidos grasos de polietilenglicol (PEG) y los ácidos grasos de PEG mono y diésteres, los ésteres de glicerol de PEG, los productos de transesterificación de alcohol y aceite, los ácidos grasos de poliglicerilo, el ácido graso de propilenglicol ésteres, esteroides y derivados de esteroides, ácidos grasos ésteres de polietilenglicol sorbitán, alquil éteres de polietilenglicol, azúcar y sus derivados, alquilfenoles de polietilenglicol, polioxi-etilenopolioxi-propileno (POE-POP), copolímeros de bloque, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, tensioactivos iónicos, vitaminas solubles en grasa y sus sales, vitaminas hidrosolubles y sus derivados anfífilicos, aminoácidos y sus sales, y ácidos orgánicos y sus ésteres y anhídridos.

35 La presente divulgación también proporciona empaques y kits que comprenden composiciones farmacéuticas para uso en los métodos de la presente divulgación. El kit puede comprender uno o más recipientes seleccionados de un grupo que consiste en una botella, un vial, una ampolla, un blíster y una jeringa. El kit puede además incluir una o más instrucciones para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, condición o trastorno de la presente divulgación, una o más jeringas, uno o más aplicadores, o una solución estéril apropiada para reconstituir la composición farmacéutica de la presente divulgación.

40 Todos los porcentajes y relaciones utilizados en la presente, a menos que se indique lo contrario, son en peso. Otras características y ventajas de la presente divulgación son evidentes a partir de los diferentes ejemplos. Los ejemplos proporcionados ilustran diferentes componentes y metodología útiles en la práctica la presente divulgación. Basándose en la presente divulgación, el experto en la materia puede identificar y emplear otros componentes y otras metodologías útiles para poner en práctica la presente divulgación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: El apilimod es un inhibidor altamente selectivo de la proliferación de células nulas TSC2

50 El apilimod identificó en una pantalla de viabilidad celular de alto rendimiento utilizando células de fibroblastos embrionarios de ratón TSC2<sup>-/-</sup> (MEF-EV). Las células nulas TSC2 tienen mTOR constitutivamente activo. Brevemente, las células MEF derivadas de embriones de ratón mutantes para TSC2 (Onda et al., J. Clin. Invest. 104 (6): 687-95, 1999) se infectaron con un vector de retrovirus que codifica para el gen de resistencia a antibióticos de higromicina (MEF-EV) o el mismo vector de retrovirus que también codifica para TSC2 (MEF-TSC2). Las líneas MEF-EV y MEF-TSC2 se establecieron por selección por la higromicina.

55 Las células se expandieron en DMEM que contenía FBS al 10% (Omega Scientific) y 2 mM L-Glutamina. Se prepararon stocks de células congeladas para uso directo en el ensayo HTS. Las células se cosecharon, se sedimentaron y luego se resuspendieron en FBS al 95% y DMSO al 5% a una concentración de 1X10<sup>7</sup> células/ml. Se congelaron alícuotas de 1 ml a -80 a una velocidad de 1 grado por minuto. Estos stocks se transfirieron posteriormente a nitrógeno líquido en fase de vapor para el almacenamiento a largo plazo.

Para realizar la proyección, los viales se descongelaron a 37°C con agitación continua hasta que se descongelaron y luego se volvieron a suspender en medio de ensayo a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en un volumen apropiado y se cuantificó utilizando un contador de células automatizado y se diluyó de acuerdo con un recuento final de 40,000 células/ml.

5 Los compuestos de prueba (5 µl de solución stock, 6 x concentración final deseada en pocillos) se dispensaron a placas de ensayo de 384 placas (Corning 3712) utilizando un manipulador de líquidos Biomek FX. Se agregaron células MEF-EV (1000 células por pocillo en 25 µl de medio) a estas placas preformateadas utilizando un sistema de dispensación Thermo Wellmate, sin contacto con una cabeza de casete de diámetro estándar. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en una incubadora humidificada.

10 La viabilidad celular se determinó con el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega) según las instrucciones del fabricante. La viabilidad se expresó como un porcentaje de células control sin tratar. Como ejemplo, para el apilimod, la viabilidad de las células MEF-EV (Media +/- StDev, n=3) fue de 2.16 +/- 0.36% @ 0.5 µM y 1.94 +/- 0.07% @ 5 µM.

15 La actividad del apilimod en células deficientes en TSC2 se demostró además realizando una respuesta de dosis de 10 puntos en las líneas MEF-EV y en MEF-TSC2 descritas anteriormente, así como para tres pares adicionales de líneas isogénicas: **(1)** (TSC2 <sup>-/-</sup>, p53 <sup>-/-</sup>) y (TSC2 <sup>+/-</sup>, p53 <sup>-/-</sup>) las líneas MEF se establecieron a partir de (TSC2 <sup>-/-</sup>, p53 <sup>-/-</sup>) o (TSC2 <sup>+/-</sup>, p53 <sup>-/-</sup>) embriones de acuerdo con los métodos estándar. Véase, por ejemplo, Zhang et al. J. Clin. Invest. 112, 1223-33, 2003. **(2)** Se establecieron líneas ELT3-EV y ELT3-TSC2 a partir de la línea celular de tumor de rata ELT3. La línea ELT3 es un modelo establecido de tumor de rata para LAM/TSC. Véase, por ejemplo, Howe et al., Am. J.Path. 146, 1568-79, 1995. Estas células albergan una mutación que inactiva a TSC2, que conduce a la activación constitutiva de la vía mTOR. Para desarrollar un par de células isogénicas, se infectaron células ELT3 con un vector de retrovirus que codifica para el gen de resistencia a antibióticos de higromicina (ELT3-EV) o el mismo vector de retrovirus que también codifica para TSC2 (ELT3-TSC2). Las líneas ELT3-EV y ELT3-TSC2 se establecieron por selección con higromicina. **(3)** Las líneas TRI-AML102 y AML103 se establecieron a partir de una muestra de AML humana primaria nula para TSC2 proporcionada por la Dra. Elizabeth Henske (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). Las células se infectaron con un retrovirus anfotrópico LXSN16E6E7 que codifica los marcos de lectura abiertos HPV16 E6 y E7 y el casete de resistencia a neomicina. Las células se expandieron y se seleccionaron con neomicina. Los clones individuales se aislaron y se congelaron. La secuencia codificante del gen de la telomerasa humana (hTERT) con el casete de resistencia a higromicina (pLXSN plásmido hTERT-hyg) se expresó de forma estable en un clon E6E7 AML TSC2<sup>-/-</sup> confirmado utilizando el reactivo de transfección Eugene6 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). El TRI-AML102 se generó mediante la incorporación estable de un plásmido de selección de zeomicina de control (pcDNA3.1-zeo), mientras que TRI-AML103 expresa el ADNC de TSC2 humano pcDNA3.1-zeo plásmido. Como resultado de estos procesos de ingeniería, tanto TRI102 como TRI103 son líneas resistentes a neomicina, higromicina y zeomicina.

20  
25  
30  
35 Para respuesta a dosis de 10 puntos, 750 MEF, 2000 ELT3 o 2000 células AML en 100 µl de medio de crecimiento (DMEM (CellGro 10-017-CV) FBS 10% (Sigma Aldrich F2442-500ML, lote 12D370) Penicilina/Estreptomocina (100X) (CellGro Ref. 30-002) se sembraron en placas por pocillo de una placa de 96 pocillos. 24 horas después de colocar las células en placas, se eliminaron los medios y diluciones de apilimod (1-500 nM, diluciones dobles) en 100 µl se agregaron medios de crecimiento (concentración final de DMSO al 0.1%). 72 horas después de la adición del compuesto, se determinó la viabilidad celular relativa mediante el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega) y se expresó como un porcentaje en relación con las células de control tratadas con vehículo (DMSO). Los valores de IC<sub>50</sub> fueron calculados a partir de las curvas de respuesta a la dosis utilizando XLFIT (IDBS).

40  
45 Las células deficientes en TSC2 eran altamente sensibles a el apilimod (IC<sub>50</sub> = 20 nM, Figura 1). Los MEF TSC2 <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup> demostraron un aumento en la sensibilidad a el apilimod en comparación con los MEF TSC2 <sup>+/-</sup> p53 <sup>-/-</sup> como se indica por una proporción de selectividad por encima de 1 (2.45).

Tabla 1: IC<sub>50</sub> (viabilidad) del apilimod en diferentes tipos celulares

Tipo celular	MEF TSC2 <sup>-/-</sup>	MEF TSC2 <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup>	AML TSC2 <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup>	ELT3
IC50 TSC2 <sup>-/-</sup>	19.70	28.80	117.00	13.70
IC50 TSC2 rescate	20.10	70.70	132.00	16.05
Proporción selectiva	1.02	2.45	1.13	1.17
<b>IC50s (nM) calculado para respuesta a dosis de 10 puntos en líneas TSC2<sup>-/-</sup> deficientes y de rescate. IC50s fue calculado del promedio de dos experimentos. La proporción selectiva se calcula dividiendo el IC50 de la línea de rescate TSC2 por la línea TSC2<sup>-/-</sup>.</b>				

Además, las concentraciones más altas del apilimod tenían una mayor potencia en las células TSC2 -/- MEF-EV en comparación con las células TSC2 de rescate MEF-TSC2. Estos datos, junto con el hecho de que el apilimod no es citotóxico en células mononucleares de sangre periférica (Wada et al., Blood 109, 1156-64, 2007), ni en una variedad de otras líneas de cáncer, incluidas U937, HELA, Jurkat y THP -1 (Publication PCT No. WO 2006/128129) sugiere que

### Ejemplo 2: El apilimod es un agente citotóxico altamente selectivo en células cancerígenas

La actividad citotóxica del apilimod se evaluó utilizando un ensayo de viabilidad celular estándar como CellTiterGlo™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se evaluaron 122 líneas celulares de cáncer humano para determinar la sensibilidad a el apilimod. Se llamó a una línea celular como sensible a apilimod si la IC<sub>50</sub> era inferior a 500 nM. Se identificaron 35 líneas celulares como sensibles a la citotoxicidad inducida por el apilimod. El apilimod también fue altamente selectivo para las células cancerígenas en comparación con las células normales, que tenían un IC<sub>50</sub> que variaba entre 20 y 200 veces más que las células cancerígenas (Figuras 2A-2B).

El mecanismo de la actividad citotóxica del apilimod se investigó adicionalmente analizando las vacuolas autofágicas después de 72 horas de tratamiento en una línea celular de neuroglioma H4 (IC<sub>50</sub> 250-300 nM). La autofagia se cuantificó utilizando el kit de detección de autofagia Cyto-ID (Enzo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La figura 3 muestra que el apilimod indujo la autofagia de una manera dependiente de la dosis.

### Ejemplo 3: El apilimod es un aglutinante altamente selectivo para la cinasa PIKfyve

Para poder identificar la diana celular del apilimod en células cancerígenas, se utilizó un lisado de células completas preparado a partir de células de neuroglioma humano para identificar a sus compañeros de unión utilizando espectrometría de masas de captura química (CCMS). Este trabajo se realizó en Caprotec Bioanalytics GmbH, Berlín, Alemania. Véase Michaelis et al, J. Med. Chem., 55 3934-44 (2012) y las referencias citadas en el mismo.

En resumen, se sintetizaron dos variantes de compuestos de captura que emplean a el apilimod como función selectiva unida en una sola orientación y se analizaron por LC-MS y 1H-NMR para asegurar la identidad y la pureza. Las condiciones de captura se optimizaron en células cancerígenas H4 (neuroglioma humano) del lisado de células completas, por ejemplo, minimización de interacciones no específicas de las proteínas con compuestos de captura, concentración de reactivos y proteínas para obtener la máxima unión de las proteínas y los compuestos de captura, etcétera. Se seleccionó a un compuesto de captura para identificar aglomerantes de proteínas específicos en los experimentos de CCMS que utilizan a el apilimod como un ligando competidor. Las proteínas que son detectadas por LC-S en el ensayo de captura y que están significativamente disminuidas en competencia con los experimentos de control, se consideran aglutinantes específicos. Estos aglutinantes específicos fueron además sometidos a criterios de análisis de datos estrictos para determinar la especificidad después de la evaluación sin sesgo de los datos. Los aglutinantes de proteínas específicos se clasificaron según sus valores de cambio (VC) en los experimentos de captura. Solo dos proteínas fueron identificadas como proteínas diana de alta probabilidad candidatas para el apilimod: PIKfyve y Vac14. La gráfica de volcanes se muestra en la Figura 4. Los valores de VC y valor-p para estas proteínas en los cuatro experimentos de concentración de compuestos de captura diferentes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

		Concentraciones de los compuestos de captura			
		0.1 μM	0.5 μM	1.0 μM	2.0 μM
PIKfyve	log <sub>2</sub> (VC)	6.3	6.2	4.1	4.3
	-log <sub>10</sub> (valor-p)	3.7	2.8	5.1	3.9
Vac14	log <sub>2</sub> (VC)	6.2	5.6	Inf.	3.9
	-log <sub>10</sub> (valor-p)	3.9	3.8	1.9	3.6

En un estudio separado, se realizó un perfil de proteína cinasa del apilimod para identificar dianas de la cinasa (DiscoveRx, Fremont, CA). Se realizó un estudio de constante de disociación (K<sub>d</sub>) utilizando a el apilimod en concentraciones crecientes (0.05 - 3000 nM) contra PIKfyve, una diana conocida del apilimod. El experimento se realizó por duplicado y se determinó que la K<sub>d</sub> era de 0.075 nM (intervalo de 0.069 - 0.081 nM) (Figura 5).

A continuación, se examinó a el apilimod contra un panel completo de cinasas (PIKfyve no incluido). En total, 456 cinasas, incluidas las cinasas relevantes para la enfermedad, se evaluaron para determinar su capacidad para unirse a el apilimod. La concentración de detección de apilimod fue 1 μM, una concentración que es >10,000 veces mayor que la K<sub>d</sub> para el apilimod contra PIKfyve. Los resultados de la pantalla demostraron que el apilimod no se unía a ninguna de las 456 cinasas probadas.

En conjunto, estos resultados demuestran que el apilimod se une con una muy alta selectividad en células cancerígenas a una cinasa celular única, PIKfyve. PIKfyve es una enzima que se une a PI(3)P y cataliza la formación de los segundos mensajeros lipídicos PI(3,5)P<sub>2</sub> y PI(5)P y otros han demostrado que el apilimod también es un inhibidor potente y específico de esta quinasa: PIKfyve en células normales. Cai X et al., Chem Biol. 2013 Jul 25;20(7):912-21. Como se discute con más detalle a continuación, para poder entender el mecanismo de la citotoxicidad selectiva del apilimod contra las células cancerígenas, se realizaron una serie de experimentos destinados a dilucidar su actividad biológica en las células cancerígenas.

#### Ejemplo 4: Mecanismo de actividad anticancerígena del Apilimod

Se había establecido que el apilimod era un potente inhibidor de las citocinas inflamatorias IL-12 e IL-23. De esta manera entonces, se indicó a el apilimod para tratar una enfermedad o un trastorno y se basó en esta actividad. Aunque las pruebas clínicas del apilimod se centraron en su potencial eficacia en enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias como la psoriasis, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, hubo algunas sugerencias publicadas sobre que el apilimod podría ser útil contra los cánceres, y específicamente contra los cánceres en los cuales c-rel o IL-12/23 actuaban como factores pro-proliferativos. Véase, por ejemplo, WO 2006/128129 y Baird et al., Frontiers in Oncology 3:1 (2013), respectivamente. Sorpresivamente, y contrariamente a estas expectativas basadas en la actividad inhibidora de IL-12/23 del apilimod, no se encontró correlación entre ninguna de las expresiones de c-Rel (c-Rel es un factor de transcripción para los genes IL-12/23), IL-12, o la expresión de IL-23 y la sensibilidad a el apilimod en las líneas celulares probadas.

La expresión de IL-12A, IL-12RB1, IL-12RB2, IL-12B, IL-23A e IL-23R se analizó en un grupo diverso de 75 líneas celulares de cáncer (véase la Tabla 3).

Tabla 3. Varias líneas celulares cancerígenas

Número	Modelo de cáncer	Línea celular	IC50 (nM)
1	Linfoma humano de Burkitt	ST486	25
2	Linfoma de células del manto humano	JeKo-1	70
3	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	SUDHL-4	25
4	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	SUDHL-6	80
5	Linfoma humano de Burkitt	Daudi	200
6	Linfoma humano histiocítico	U937	106
7	Carcinoma humano de pulmón	A549	110
8	Cáncer humano colorectal	HCT116	125
9	Linfoma de células B humanas	DB	150
10	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	WSU-DLCL2	160
11	Colorectal humano	HCT-15	200
12	Colorectal humano	SW480	90
13	Colorectal humano	COLO-2Q5	380
14	Colorectal humano	SW620	90
15	Leucemia humana de células T	Jukart	200
16	Neuroglioma humano	H4	250
17	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	Toledo	270

ES 2 741 399 T3

Número	Modelo de cáncer	Línea celular	IC50 (nM)
18	Linfoma humano de células B No Hodgkins	Rec-1	300
19	Linfoma humano de Hodgkins	KMH-2	181
20	Linfoma humano de Burkitt	EB1	174
21	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	SUDHL-10	20
22	Linfoma humano de Burkitt	GA-10	382
23	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	OCI-Ly19	380
24	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	HT	642
25	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	Pfeiffer	2,620
26	Linfoma humano de Burkitt	Namalwa	600
27	Linfoma humano folicular de células B -GCB	DOHH-2	700
28	Carcinoma de vejiga humana (GATOR -/-)	SW780	1000
29	Cáncer colorectal humano	MDST8	1000
30	Linfoma humano de Burkitt	Raji	10,000
31	Linfoma humano de Hodgkins	HD-MyZ	>1000
32	Linfoma humano de Hodgkins	L540	>1000
33	Linfoma humano de Hodgkins	HDLM-2	>1000
34	Linfoma humano de Hodgkins	CA46	>10,000
35	Linfoma anaplásico de células grandes de humano	SUDHL-1	590
36	Carcinoma humano de pulmón	H1734	1500
37	Cáncer colorectal humano	SW1116	1500
38	Colorectal humano	COLO-320DM	2,060
39	Neuroblastoma	A172	2000
40	Carcinoma humano de pulmón	H1693	2000
41	Carcinoma humano de pulmón	H460	>2000
42	Carcinoma humano de pulmón	H358	>2000
43	Cáncer humano de páncreas	CAPAN2	>2000
44	Cáncer humano de páncreas	PANC1	>2000
45	Cáncer humano de páncreas	MiaPaCa-2	>2000

ES 2 741 399 T3

Número	Modelo de cáncer	Línea celular	IC50 (nM)
46	Cáncer humano de páncreas	AsPC1	>2000
47	Cáncer humano de próstata	DU145	>2000
48	Leucemia mielógena aguda humana	KG-1	>2500
49	Cáncer humano de próstata	LnCap	3000
50	Linfoma humano de células T	HH	3,300
51	Leucemia humana de células T	MOLT-4	3,300
52	Cáncer humano de próstata	22RV1	>5000
53	Cáncer humano colorectal	DLD-1	>5000
54	Leucemia humana mielógena	K562	>5000
55	Cáncer humano colorectal	RKO	>5000
56	Ovario humano	TOV-21G	7000
57	Cáncer humano de próstata	PC-3	10,000
58	Linfoma humano de Hodgkins	L428	10,000
59	Plasmocitoma humano	RPMI-8226	>10,000
60	Carcinoma humano de pulmón	NCI-1975	>10,000
61	Cáncer humano de mama	CAMA1	>10,000
62	Neuroblastoma humano	SW1088	>10,000
63	Neuroblastoma humano	M0591K	>10,000
64	Neuroblastoma humano	U-118 MG	>10,000
65	Neuroblastoma humano	U-87 MG	>10,000
66	Leucemia humana monocítica aguda	THP1	>10,000
67	Linfoma difuso de células B grandes humanas -GCB	KARPAS-422	>10,000
68	Linfoma humano folicular de células B	RL	>10,000
69	Linfoma humano de células del manto	GRANTA-519	>10,000
70	Bronquioalveolar humano	NCI-H1650	>20,000
71	Bronquioalveolar humano	SW1573	>20,000
72	Bronquioalveolar humano	NCI-H1781	>20,000
73	Bronquioalveolar humano	NCI-H1666	20,000

Número	Modelo de cáncer	Línea celular	IC50 (nM)
74	Colorectal humano	LOVO	>10,000
75	Colorectal humano	HT-29	>10,000

Brevemente, los datos de expresión génica de CCLE se analizaron para las 75 líneas celulares de cáncer para las que se obtuvieron curvas de respuesta a dosis contra apilimod. La expresión de cada gen de interleucina se comparó en líneas sensibles (IC<sub>50</sub> menos de 500 nM) e insensibles (IC<sub>50</sub> mayores de 500 nM) mediante una prueba de t no pareada. No se encontró una relación estadísticamente significativa con la única excepción de IL-23A (p = 0.022). Se había observado previamente que IL-23A estaba elevado en líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas sensibles a el apilimod, y se observó que IL-23A recombinante aumenta la proliferación de líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (véase Baird et al. 2013, supra). Es importante destacar que la importancia estadística de la expresión de IL-23A en las líneas sensibles de cáncer parece estar impulsada completamente por solo dos líneas de cáncer de colon. Adicionalmente, la expresión de IL-23A no es un predictor estadísticamente significativo para la sensibilidad en el linfoma no Hodgkin de células B.

**Ejemplo 5: El apilimod inhibe la proliferación de células renales cancerígenas**

Las líneas celulares de cáncer renal RCC-MF, RCC-ER, RCC-JF y RCC-JW se cultivaron en medio 5A de McCoy (Corning), mientras que 786-0, 769-P y RCC-FG2 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Corning) y A-704 se cultivó en MEM (Corning) suplementado con FBS al 10% (Sigma Aldrich F2442-500ML, lote 12D370) y penicilina/estreptomicina (100X) (CellGro Ref 30-002) y se sembraron a una densidad de 1000, 1200, 1000, 4000, 200, 2000, 1200 y 5000 células por pocillo, respectivamente, en placas de 96 pocillos en un volumen final de 50 µl.

Para estudios de tratamiento único, 24 horas después de la siembra, las células se trataron con mesilato de apilimod (denominado en este ejemplo simplemente como 'apilimod' o LAM-002), sorafenib, pazopanib o sunitinib a una concentración final de 0.5-10000 nM (3 veces diluido y un total de 10 diluciones). Todas las diluciones de los fármacos se prepararon como un stock 2x y se agregaron 50 µl a los pocillos apropiados. Las células se trataron durante 120 horas antes de evaluar la viabilidad utilizando CellTiterGlo® (Promega) donde la luminiscencia relativa de las células no tratadas se estableció en 100% de viabilidad y cada concentración de fármaco se expresó como un porcentaje de células no tratadas. Los valores de EC<sub>50</sub> se determinaron utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). En resumen, los datos sin procesar se transformaron logarítmicamente y luego se analizaron mediante regresión no lineal (ajuste de curva) donde los datos estaban restringidos (inferior = 0, superior = 100).

Los resultados de estos estudios del tratamiento único se muestran en las Figuras 6-13 y se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Resultados del tratamiento único en líneas celulares con cáncer renal

Línea celular	IC50 (nM)
769-P	44
RCC-MF	8
RCC-EF	9
RCC-FG2	32
RCC-JF	60
786-0	71
A-704	11
RCC-JW	27

Para el cálculo de la sinergia entre el apilimod y el pazopanib, o el sorafenib, se sembraron células RCC-ER, RCC-FG2, RCC-MF y 769-P como se describe anteriormente. 24 horas después, las células se trataron con el apilimod solo (concentración final 2-250 nM; diluido 2 veces y un total de 8 diluciones), con pazopanib solo (concentración final 78.1 - 10000 nM; diluciones 2 veces y un total de 8 diluciones) o con sorafenib solamente (concentración final 78.1-10000 nM; diluido 2 veces y un total de 8 diluciones) o la combinación de cada concentración del apilimod con cada

concentración de pazopanib o de sorafenib (matriz 8 x 8). Las células se trataron durante 120 horas antes de evaluar la viabilidad utilizando CellTiterGlo® (Promega) donde la luminiscencia relativa de las células no tratadas se estableció en 100% de viabilidad y cada concentración de fármaco se expresó como un porcentaje de células no tratadas.

- 5 Las figuras 14-21 muestran los resultados de los estudios de sinergia. Los gráficos de barras en cada figura (A) muestran el efecto de una concentración única del apilimod, una concentración única de pazopanib y el efecto de la combinación del apilimod y el pazopanib (en concentraciones de agente único) sobre la viabilidad celular. El "valor esperado", si el efecto de la combinación de los dos fármacos fuera aditivo, se calcula utilizando la fracción de viabilidad del apilimod multiplicada por la fracción de viabilidad del pazopanib, y se muestra como la barra color negro.
- 10 Los gráficos de efecto fraccional de contra IC (B) en cada figura muestran el índice de combinación (IC) según lo definido por Chou et al. (Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul. 1984; 22:27-55) que se utilizó como una medida de la sinergia y se calculó utilizando CalcuSyn (versión 2.11, Biosoft). El análisis se limitó a evaluar los valores de IC que se encontraban dentro de una concentración clínicamente alcanzable y también donde el efecto de fracción (Fa) fue mayor que 0.75 (es decir, una reducción mayor del 75% en la viabilidad celular con la combinación de los fármacos).
- 15 En los gráficos de IC contra efecto fraccional, los puntos de datos se indican con 'x' y las líneas muestran un intervalo de confianza del 95%, y las combinaciones de los fármacos que producen valores de IC > 1 son antagónicas, IC = 1 es aditivo e IC < 1 son sinérgicos. Adicionalmente, se muestra el valor de IC en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub> para la combinación de apilimod y pazopanib o sorafenib. Se aplicó la misma metodología para la combinación del apilimod con sorafenib. Las tablas 6, a continuación, muestran un resumen de los resultados de los estudios de sinergia.
- 20 Los datos presentados aquí demuestran que el apilimod fue capaz de actuar de forma sinérgica con pazopanib y con sorafenib en el panel de las líneas celulares renales analizadas.

Tabla 5. Valor de IC en ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub> para la combinación de apilimod y pazopanib en varias líneas celulares

Línea celular	Apilimod+	IC en ED <sub>50</sub>	IC en ED <sub>75</sub>	IC en ED <sub>90</sub>
RCC-ER	sorafenib	0.77	0.45	0.31
RCC-FG2	sorafenib	0.79	0.64	0.51
RCC-MF	sorafenib	0.73	0.59	0.48
769-P	sorafenib	1.22	0.87	0.62
RCC-ER	pazopanib	0.56	0.35	0.22
RCC-FG2	pazopanib	0.32	0.38	0.46
RCC-MF	pazopanib	0.58	0.50	0.43
769-P	pazopanib	0.57	0.87	1.31

Tabla 6. Sumario de los estudios de sinergia

	RCC-ER	RCC-FG2	RCC-MF	769-P
Pazopanib + LAM-002	Sinérgica	Sinérgica	Sinérgica	Sinérgica
Sorafenib + LAM-002	Sinérgica	Sinérgica	Sinérgica	Sinérgica

25

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método para tratar el cáncer renal en un sujeto que tiene cáncer renal.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el apilimod es dimesilato de apilimod.
- 5 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el método comprende además administrar al menos un agente activo adicional, opcionalmente en el que al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico o un agente no terapéutico, o una combinación de un agente terapéutico y un agente no terapéutico.
- 10 4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en la que al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la proteína cinasa, un inhibidor de la vía PD-1/PDL-1, un inhibidor del punto de control, un agente antineoplásico a base de platino, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor metabólico de nucleósidos, un agente alquilante, un agente intercalante, un agente de unión a tubulina, y combinaciones de los mismos.
- 15 5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en la que el agente terapéutico es un inhibidor de la proteína cinasa, opcionalmente en el que el inhibidor de la proteína quinasa es pazopanib o sorafenib, o una combinación de los mismos.
- 20 6. La composición para el uso de la reivindicación 4, en la que el agente terapéutico es un inhibidor de la vía PD-1/PDL-1, opcionalmente en el que agente terapéutico es seleccionado de pembrolizumab (Keytruda), avelumab, atezolizumab (MPDL3280A), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (MK-3475), MSB0010718C y MEDI4736.
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que el método comprende, además, administrar un agente no terapéutico seleccionado para mejorar uno o más efectos secundarios ocasionados por el apilimod.
- 25 8. La composición para el uso de la reivindicación 3, en la que al menos un agente activo adicional es un agente no terapéutico.
9. La composición para el uso de la reivindicación 7 u 8, en la que el agente no terapéutico es a) seleccionado del grupo que consiste en ondaneestron, granisetron, dolsetron y palonosetron, o b) seleccionado del grupo que consiste en pindolol y risperidona.
- 30 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la cantidad terapéuticamente efectiva del apilimod o del dimesilato de apilimod es la cantidad efectiva para inhibir la actividad cinasa de PIKfyve en las células cancerígenas del sujeto.
11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el cáncer renal es refractario al tratamiento estándar o metastásico.
- 35 12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el cáncer renal se selecciona de carcinoma renal de células claras, un carcinoma de células de transición, tumor de Wilms (nefroblastoma), sarcoma renal y tumores benignos (no cancerígenos), adenoma renal, oncocitoma y angiomiolipoma.
- 40 13. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la composición está en una forma adecuada para administración oral o intravenosa.
14. Apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en un método para inhibir la proliferación de una célula cancerígena renal en un sujeto, el método que comprende poner en contacto a la célula cancerígena con una cantidad del apilimod, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, eficaz para inhibir la proliferación de la célula.
- 45 15. Apilimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en un método para inhibir la supervivencia de una célula cancerígena renal en un sujeto, el método comprende poner en contacto a la célula cancerígena con una cantidad del apilimod, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, eficaz para inhibir la actividad cinasa de PIKfyve en la célula cancerígena.

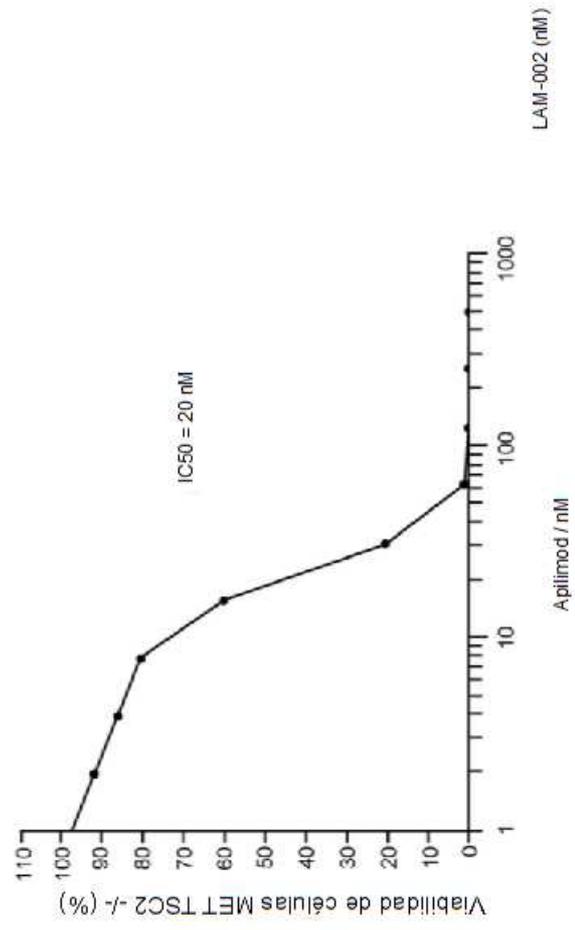


FIG. 1

Porcentaje de líneas celulares con un IC50 menor a 500 nM (N=122)

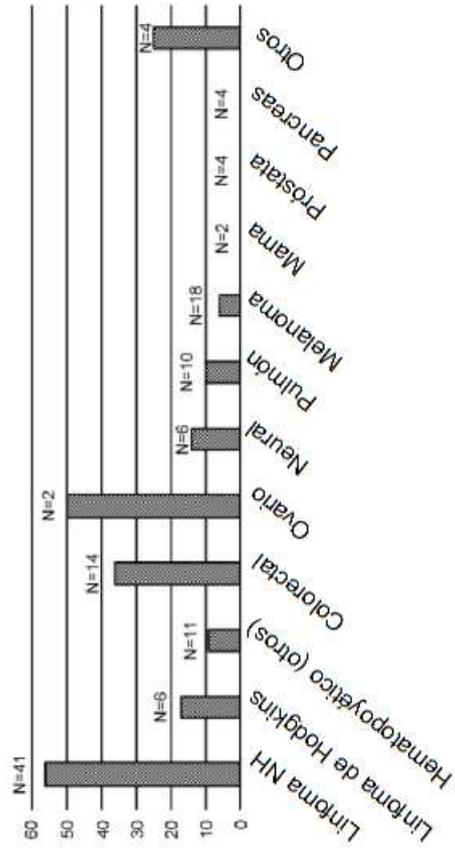
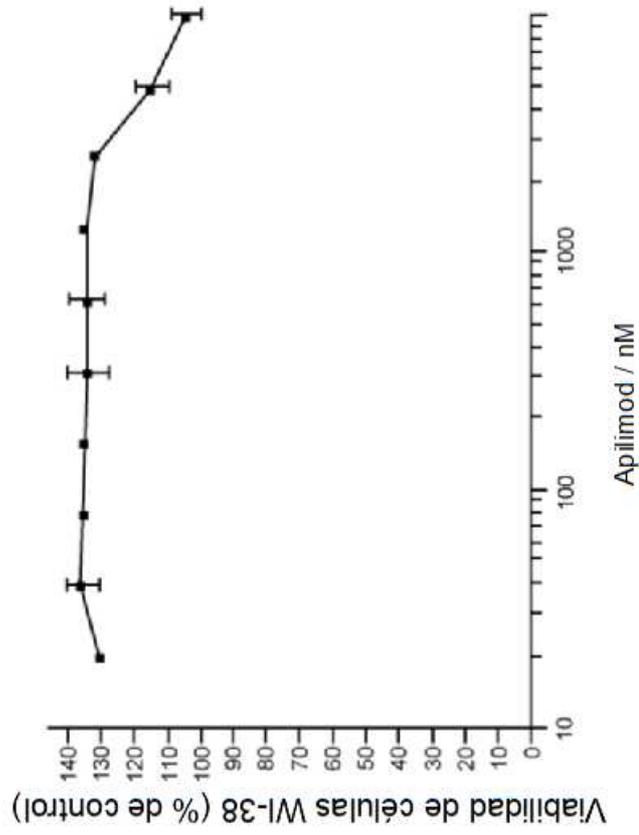


FIG. 2A



**FIG. 2B**

Vacuolas autofágicas en neuroglioma H4 tratado con apilimod

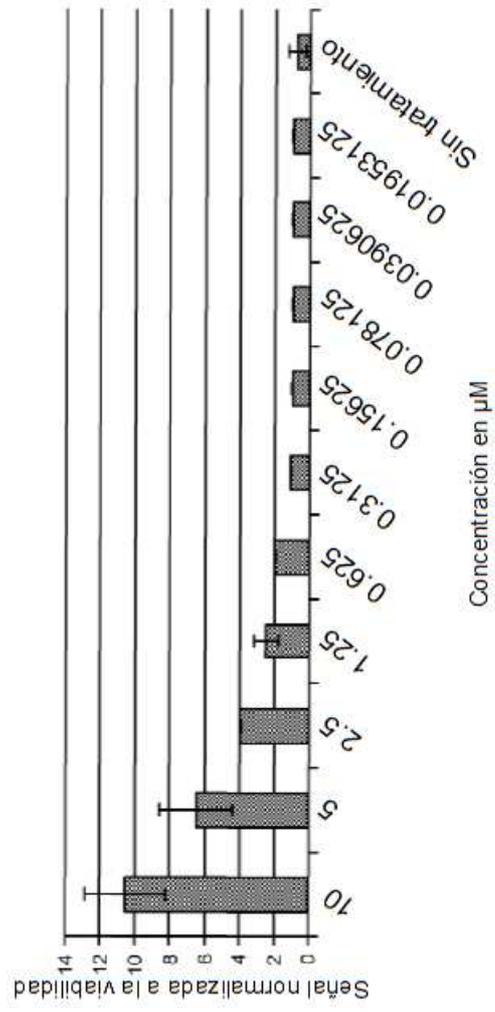


FIG. 3

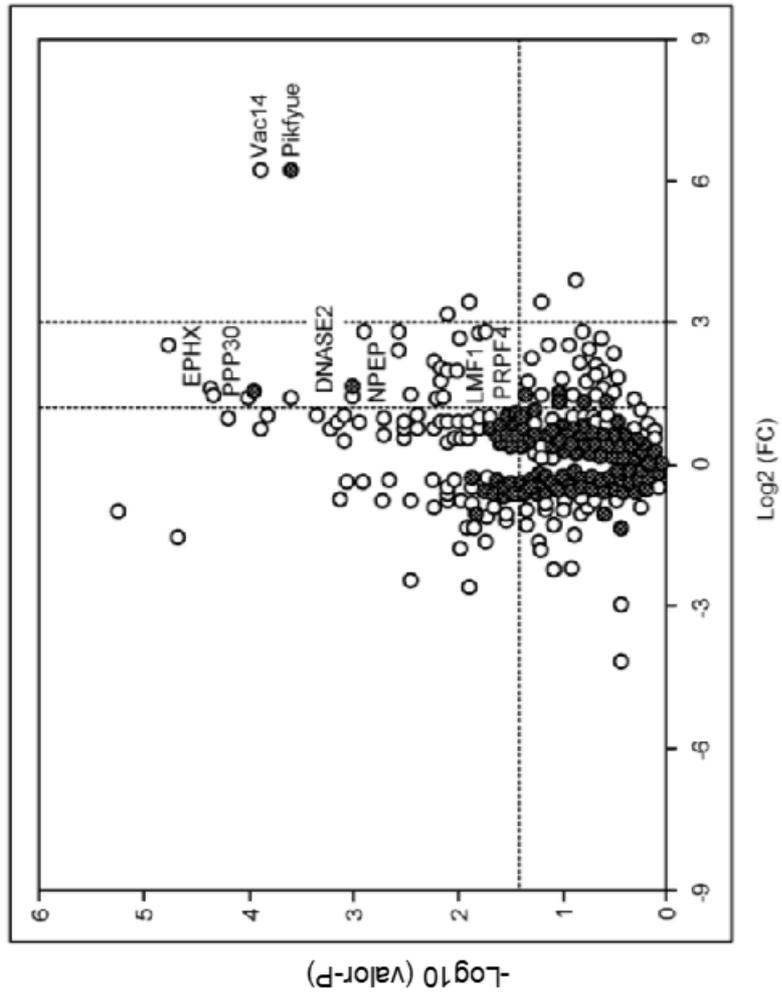


FIG. 4

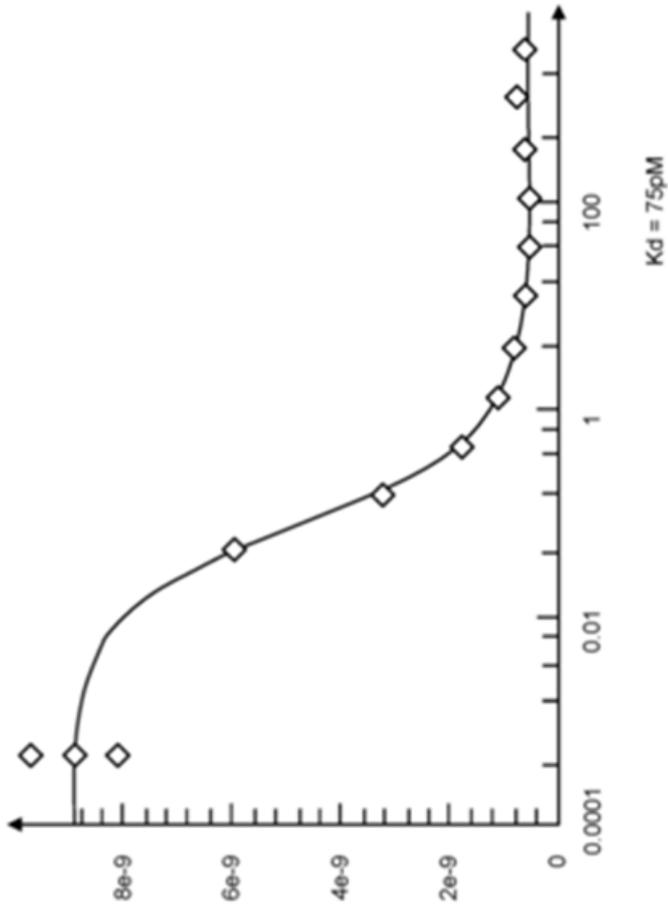


FIG. 5

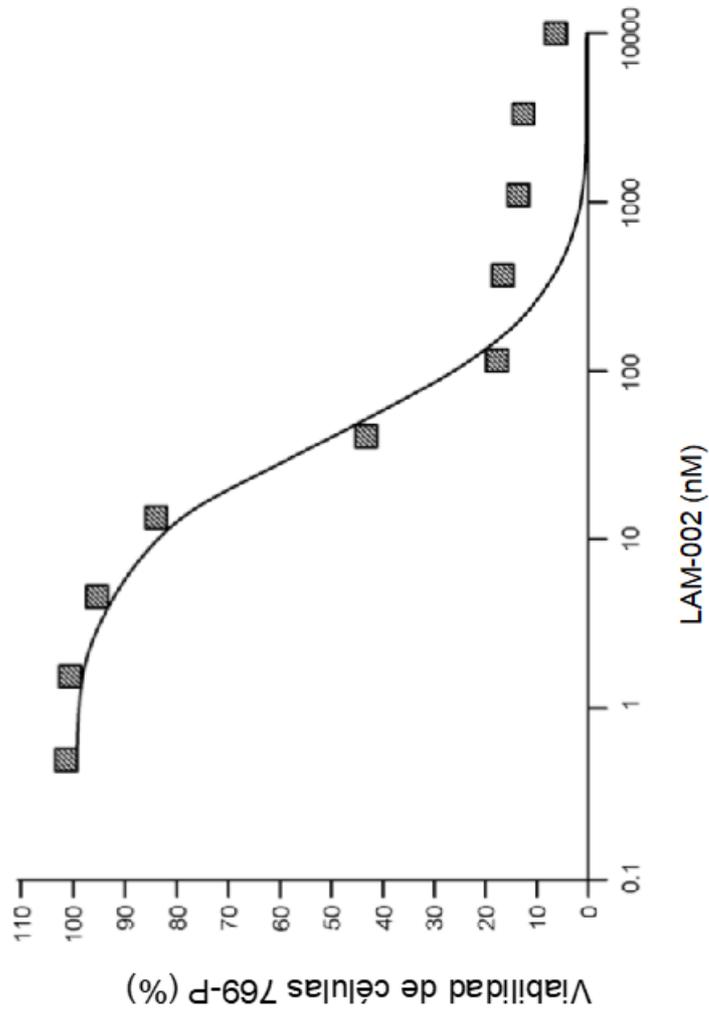


FIG. 6

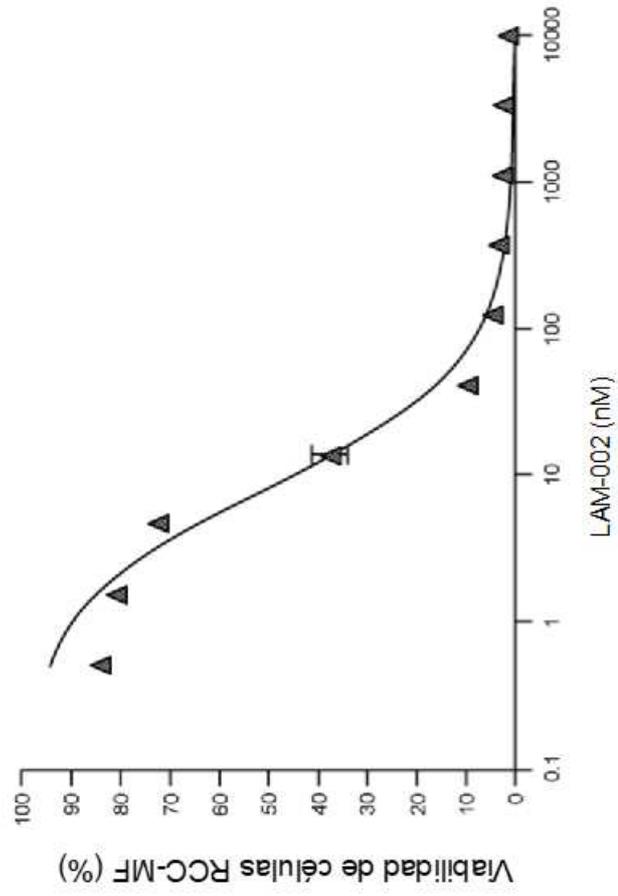


FIG. 7

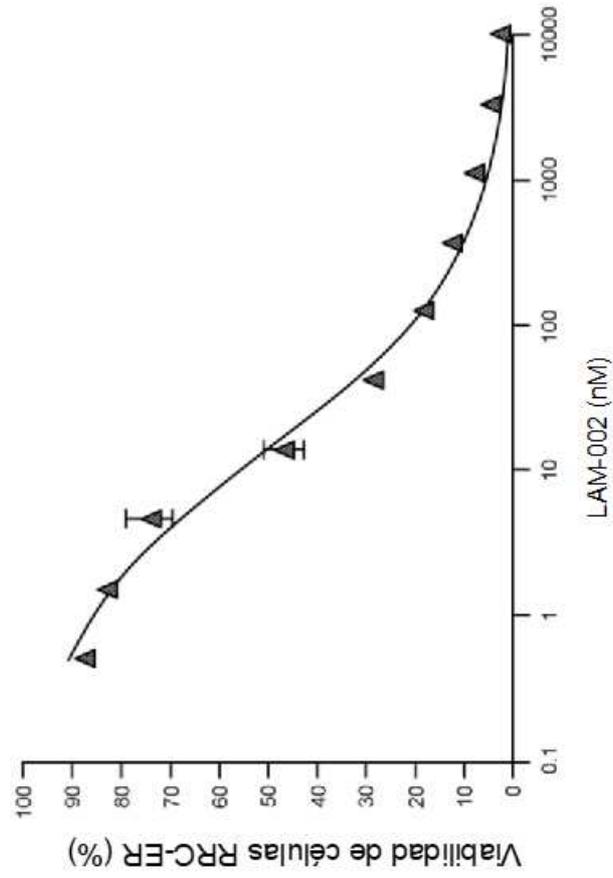


FIG. 8

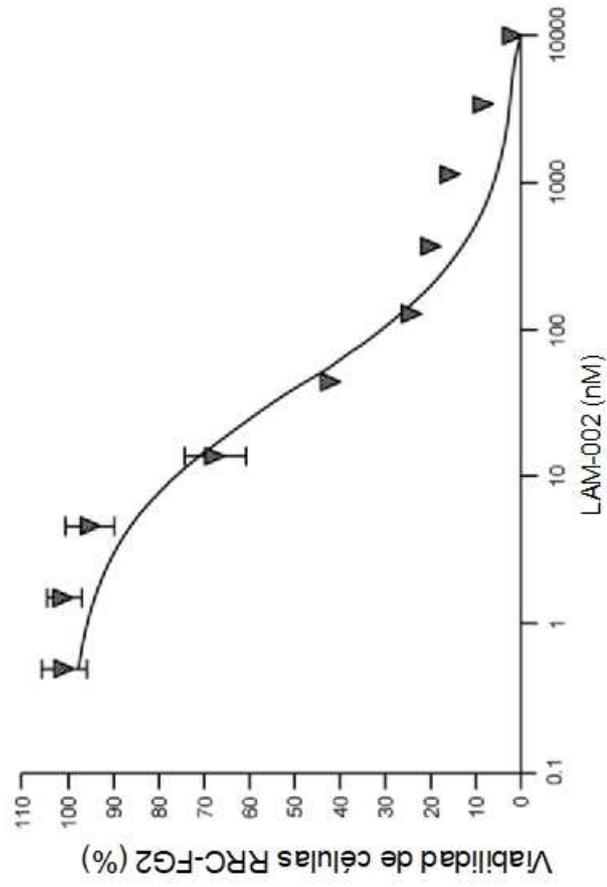


FIG. 9

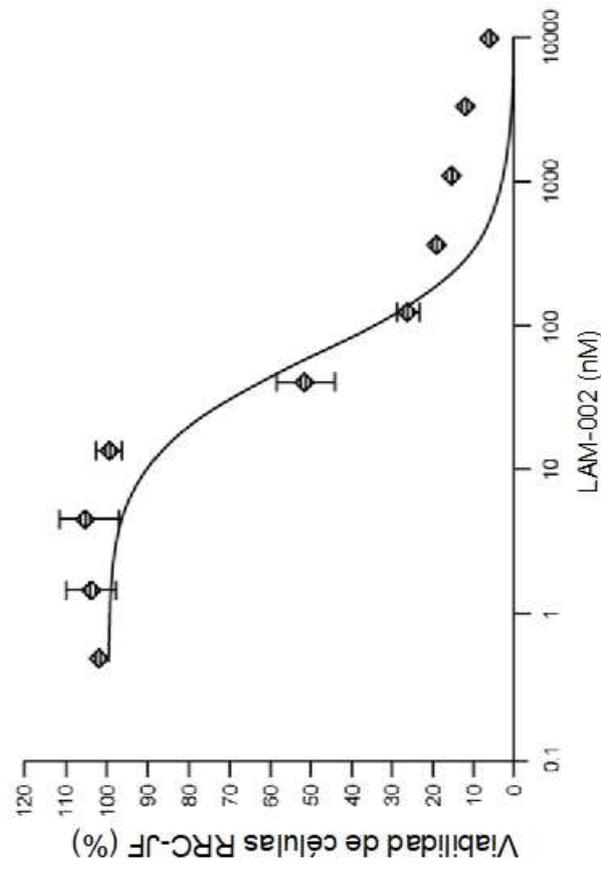


FIG. 10

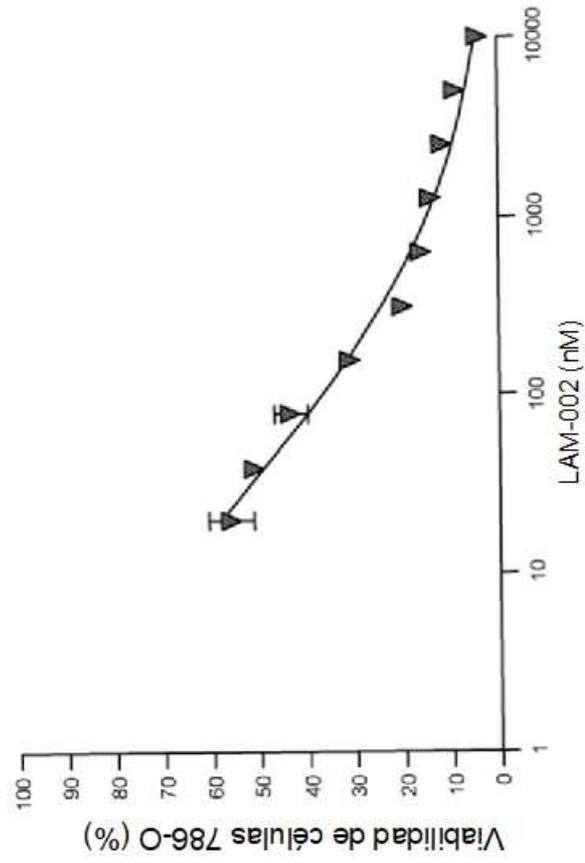


FIG. 11

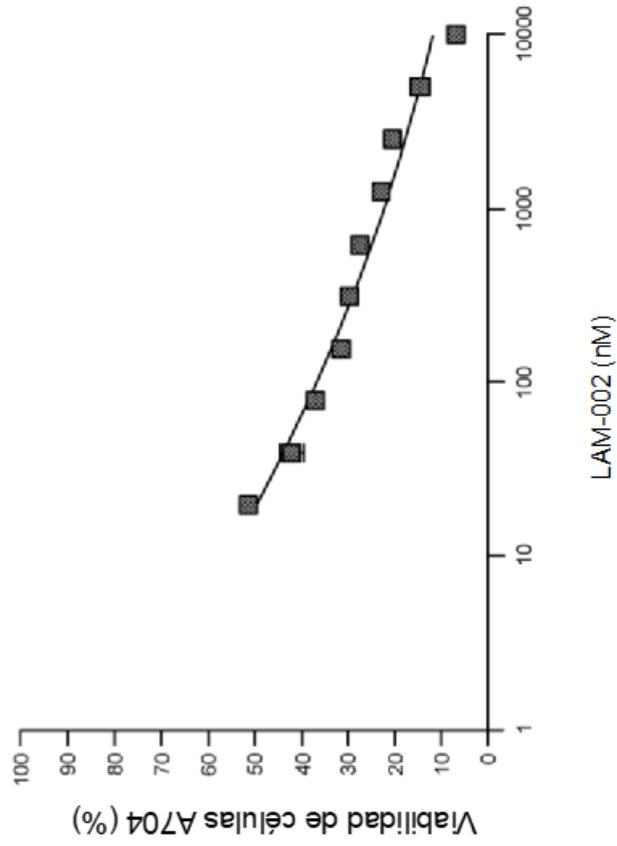


FIG. 12

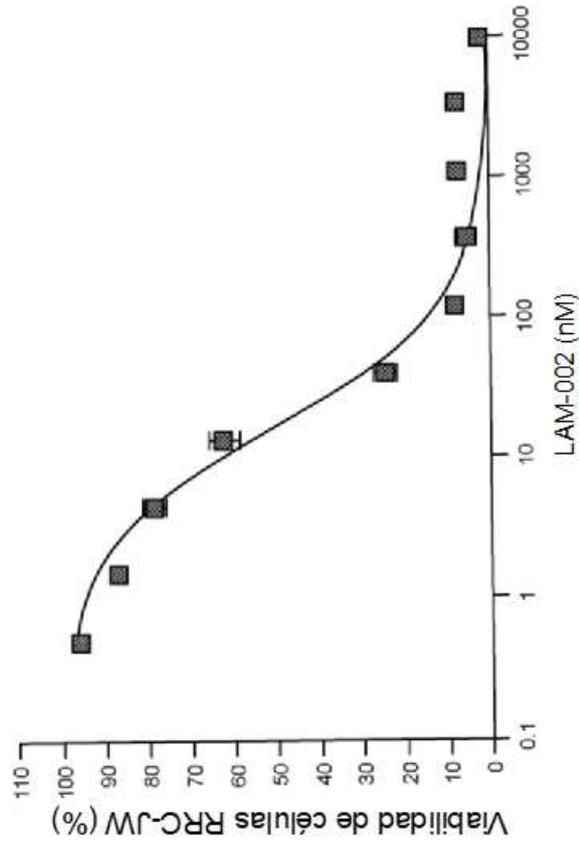


FIG. 13

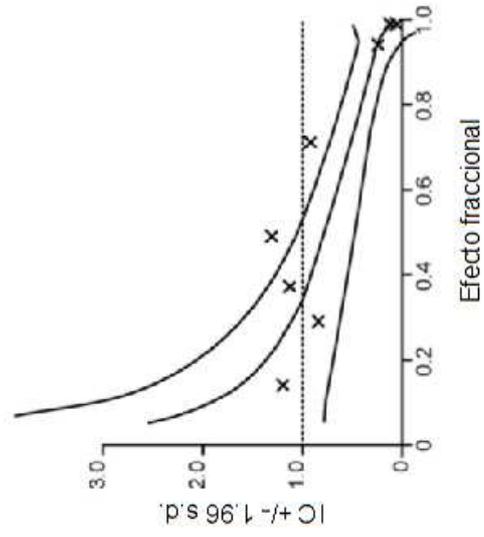


FIG. 14B

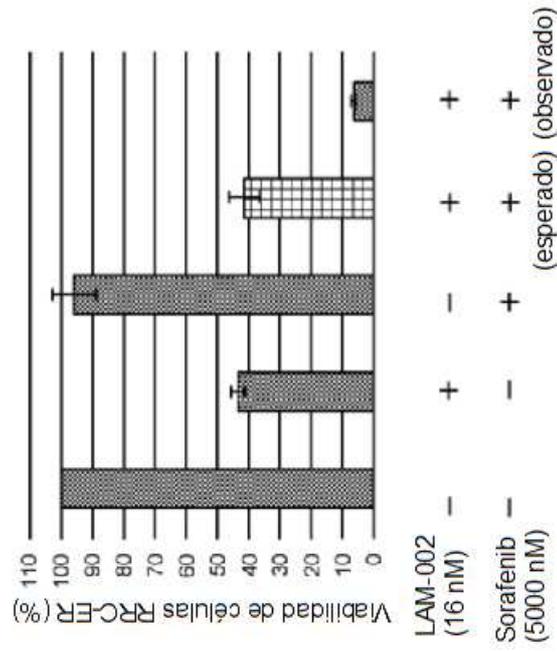


FIG. 14A

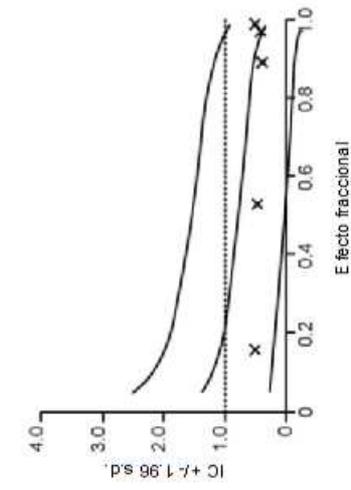


FIG. 15B

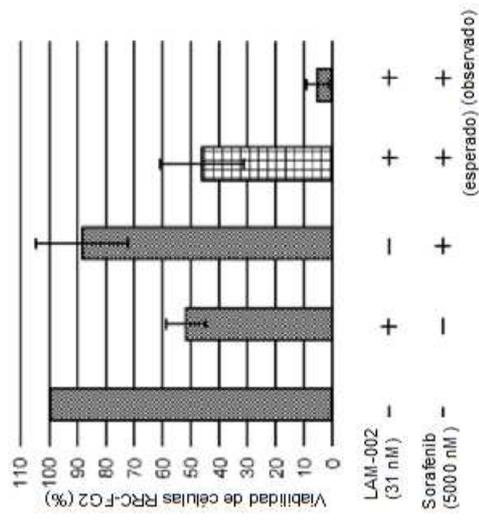


FIG. 15A

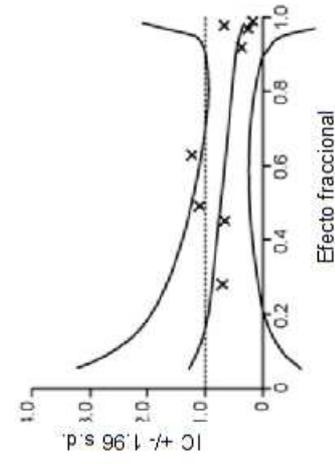


FIG. 16B

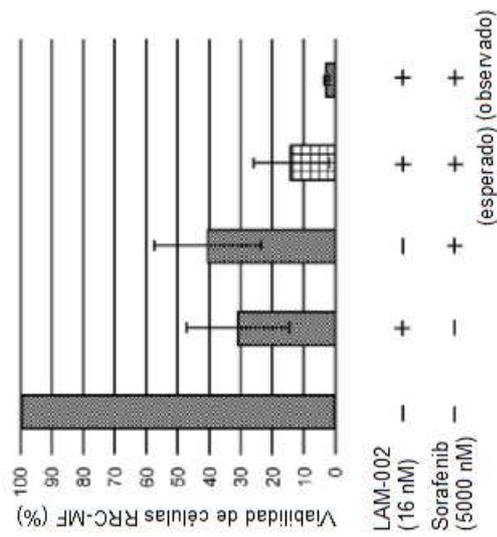


FIG. 16A

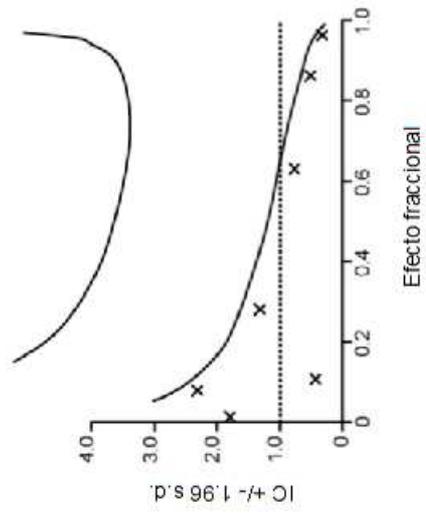


FIG. 17B

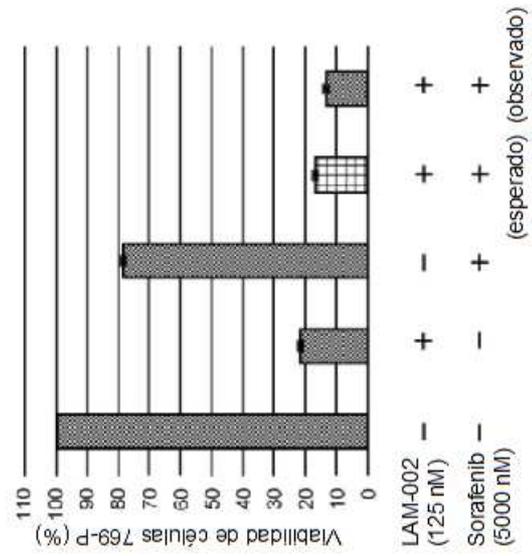


FIG. 17A

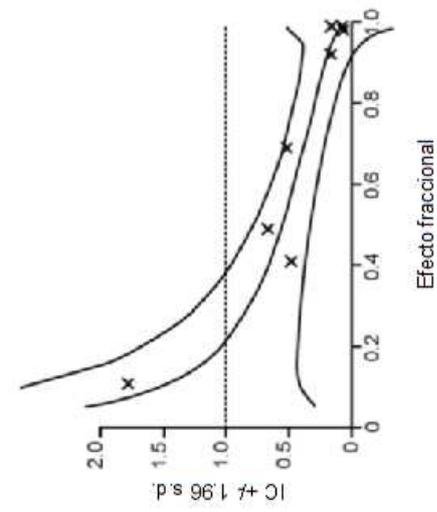


FIG. 18B

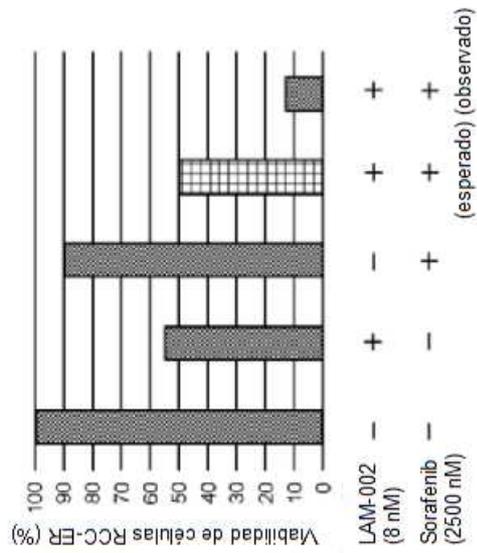


FIG. 18A

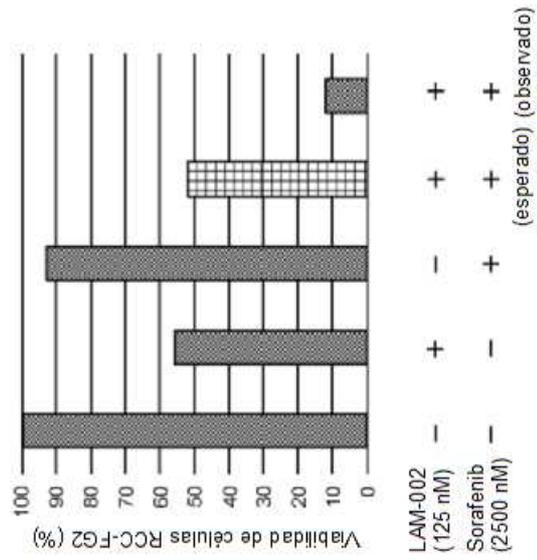


FIG. 19A

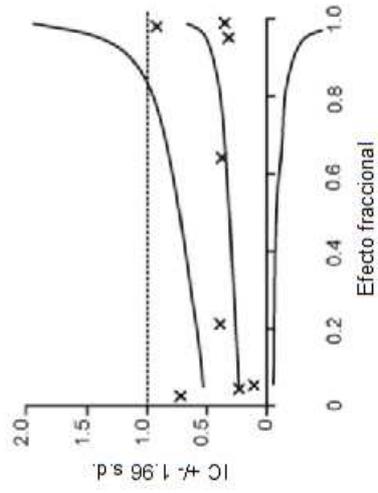


FIG. 19B

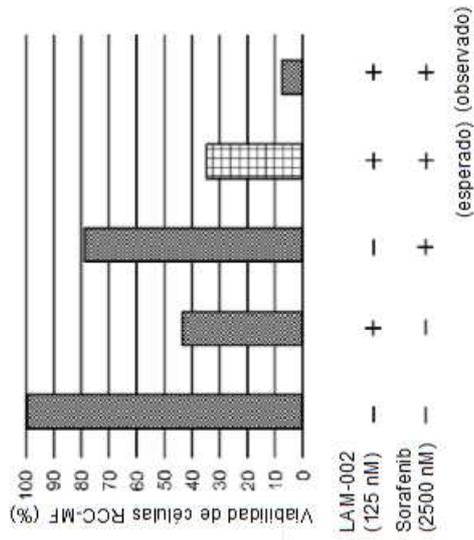


FIG. 20A

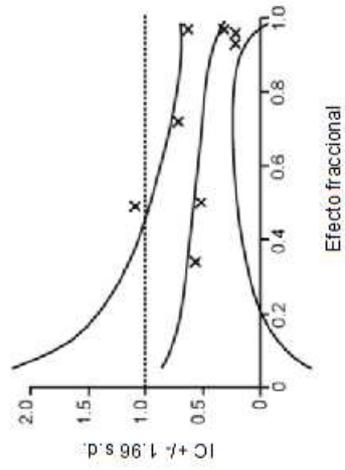


FIG. 20B

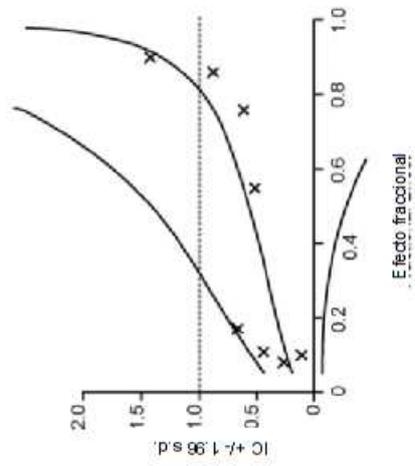


FIG. 21B

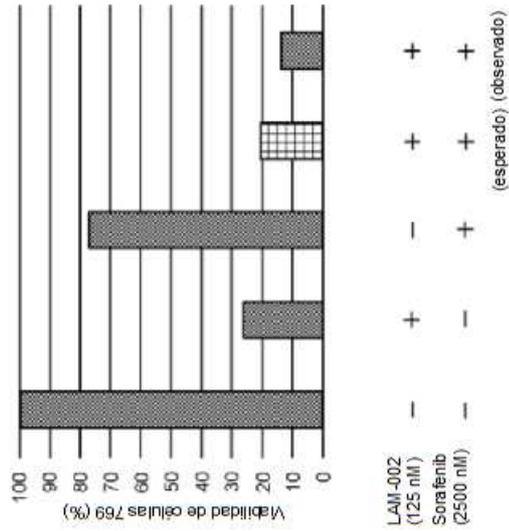


FIG. 21A