(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 797 091**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2017 PCT/IB2017/050743**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017 WO17118965**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2017 E 17704548 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3413894**

(54) Título: **Uso de inhibidores de la actividad o de la función de la PI3K para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario**

(30) Prioridad:

10.02.2016 EP 16155123
29.08.2016 EP 16186188

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BIETH, BRUNO;
BURKHART, CHRISTOPH;
CHRIST, ANDREAS;
DE BUCK, STEFAN;
KALIS, CHRISTOPH y
LINDGREN, SAM

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 797 091 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

Uso de inhibidores de la actividad o de la función de la PI3K para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención se refiere a usos de inhibidores de la actividad o la función de la familia de la fosfatidilinositol 3-cinasa (en adelante inhibidores de la PI3K), en donde dichos inhibidores tienen una acción inhibitoria sobre la isoforma delta de la PI3K y/o sus sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario. La invención se refiere más específicamente a la 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El síndrome de Sjögren se clasifica como “primario” o “secundario”. El síndrome de Sjögren primario (SSp) ocurre en ausencia de otro trastorno reumático subyacente, mientras que el síndrome de Sjögren secundario se asocia con otra enfermedad reumática subyacente, como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR) o la esclerodermia. El síndrome de Sjögren primario es una enfermedad autoinmune crónica en la cual el sistema inmunitario del cuerpo ataca las glándulas que secretan líquidos, por ejemplo, las glándulas salivales y lagrimales. El ataque inmunomediado a las glándulas salivales y lagrimales lleva al desarrollo de sequedad bucal y ocular. Otros síntomas o afecciones del SSp incluyen sequedad de la piel, cansancio y fatiga a veces hasta agotamiento total, mialgia, artralgia, rigidez e hinchazón de las articulaciones, vasculitis, dificultad para la concentración. Actualmente, no existe una cura conocida para el síndrome de Sjögren primario, pero los tratamientos pueden ayudar a controlar los síntomas. Se pueden usar medicamentos antiinflamatorios no esteroideos para tratar los síntomas musculoesqueléticos, pero también se recetan corticosteroides, fármacos inmunosupresores y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), la mayoría de los cuales tienen efectos secundarios adversos. Por lo tanto, existe la necesidad de avances terapéuticos adicionales en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario (Holdgate N. F1000Research 2016, 5 (F1000 Faculty Rev): 1412).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0003] Se ha descubierto que el inhibidor de la PI3K delta 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables son adecuadas para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

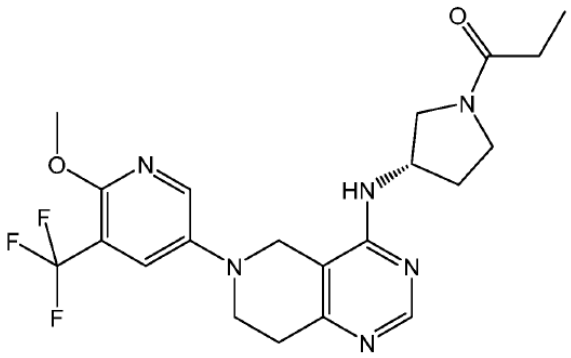
DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0004] La figura 1 muestra la relación FC/FD del compuesto A después de la administración oral única a sujetos humanos sanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0005] Se ha descubierto que la 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables son adecuadas para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

[0006] La 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona



(compuesto **A**)

y ejemplos de sus sales farmacéuticamente aceptables se describen en el Ejemplo 67 de la patente WO2012/004299.

[0007] La Akt fosforilada (pAkt) es un efector posterior de la activación de PI3K delta. La 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona, o sus sales farmacéuticamente aceptables, es un inhibidor de la PI3K con una selectividad para la isoforma delta de PI3K (WO2012/004299). Presumimos que la ruta de Akt se activa en pacientes con SSp, y se ha descubierto que la 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7, 8-tetrahidro-pirido [4,3-d] pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables son útiles en el tratamiento del SSp.

1) La hiperactividad crónica de los linfocitos B es una anormalidad inmunorreguladora constante y prominente en el SSp (Hansen A y col, Arthritis Research & Therapy 2007; 9; 218). La 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidina-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables inhibe directamente múltiples funciones de los linfocitos B *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo la función de pAkt, CD69, CD86, APC, la producción de citocinas y la producción de anticuerpos.
2) Se ha descubierto que los pacientes con SSp expresan un perfil único de moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, incluida una sobreexpresión llamativa de la quimiocina atrayente de linfocitos B CXCL13 (BCA-1, BLC), pero también de CXCL10 (IP-10) y CCL4 (MIP-1beta) que desempeñan una función en la patogénesis del SSp (Hansen A y col, Arthritis Research & Therapy 2007; 9; 218, Lee, Y. J. y col, Rheumatology 2010; 49 (9); 1747-1752, Kramer JM y col., J Leukoc Biol. 2013; 94 (5); 1079-1089, Nishikawa A y col Arthritis Research & Therapy 2016; 18;106). La 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables inhiben CXCL13 (BCA-1, BLC), pero también CXCL10 (IP-10) y CCL4 (MIP-1beta) en el sobrenadante de BPMC derivado de voluntarios humanos sanos estimulados con CpG o anti-IgM.
3) Las características del SSp incluyen la formación de tejido linfoide ectópico con estructuras similares a centros germinales (CG). En individuos sanos, los CG se generan a partir de folículos primarios de linfocitos B de órganos linfoides secundarios durante las respuestas inmunes dependientes de los linfocitos T (Hansen A y col, Arthritis Research & Therapy 2007; 9; 218).

[0008] Histológicamente, la inhibición de la formación de CG va acompañada de una reducción general de los linfocitos B de la zona marginal (linfocitos B MZ) y los linfocitos T cooperadores foliculares (TFH) según lo medido por el análisis FACS. Se considera que esas células contribuyen a la fisiopatología en el SSp. La 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidina-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables reducen estructuras similares a los CG, los linfocitos B MZ y los TFH.

[0009] En una forma de realización, la invención proporciona 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

[0010] En otra forma de realización, la invención proporciona un compuesto para usar en un método para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables a un sujeto, por ejemplo un sujeto humano que necesita dicho tratamiento.

[0011] En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d] pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

[0012] En otra forma de realización, la invención proporciona 1-{(S)-3-6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

[0013] Se prefieren cualesquiera de las formas de realización anteriores, en donde la 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido [4,3-d] pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona está en forma de sal de fosfato.

[0014] En una forma de realización preferida, la invención se refiere a la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona.

[0015] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal. Típicamente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a los primates (por ejemplo, humanos, hombres o mujeres), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas formas de realización, el sujeto es un primate. En una forma de realización preferida, el sujeto es un humano.

[0016] Como se usa en el presente documento, el término "inhibe", "inhibición" o "inhibir" se refiere a la reducción o supresión de una afección, síntoma o trastorno o enfermedad dados, o a una disminución significativa en la actividad basal de una actividad o proceso biológico.

[0017] Como se usa en el presente documento, el término "trata", "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una forma de realización a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En otra forma de realización, "trata", "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico que incluye aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra forma de realización más, "trata", "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En otra forma de realización más, "trata", "tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retrasar el inicio o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

[0018] Tal como se usa en el presente documento, un sujeto "necesita" un tratamiento si dicho sujeto se beneficiaría de dicho tratamiento biológica, médicamente o en términos de la calidad de vida.

[0019] Como se usa en el presente documento, el término "administración" o "administrar" del compuesto objeto significa proporcionar un compuesto de la invención y profármacos del mismo a un sujeto que necesite tratamiento. La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concomitante) y consecutiva en cualquier orden y mediante cualquier vía de administración.

[0020] Otros agentes terapéuticos como posibles elementos de combinación incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen a CD40, como se describe en WO2012/065950; coestimuladores de linfocitos T inducibles, tales como AMG557; anticuerpos dirigidos al receptor del factor de activación de linfocitos B (BAFF-R) tal como se describe en WO2010/007082; dosis bajas de IL-2, anticuerpos anti CD20, tales como rituximab; anticuerpos que inhiben el factor de activación de linfocitos B (BAFF) como belimumab; anticuerpos contra el receptor de interleucina-6 (IL-6R), como tocilizumab; abatacept; o belatacept; pero también gotas de ciclosporina para los ojos; fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), tales como metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, hidroxicloroquina y sales de oro; inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF)-a, como infliximab y etanercept; medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno; corticosteroides sistémicos, como la prednisona; u otros agentes inmunosupresores, como la azatioprina, el micofenolato mofetilo y la ciclofosfamida.

[0021] Otros agentes como posibles elementos de combinación incluyen, por ejemplo, secretagogos; agonistas de los receptores muscarínicos, como cevimelina y pilocarpina; gabapentina o pregabalina; lágrimas artificiales; saliva artificial o crema vaginal de estrógenos.

[0022] Composición farmacéutica que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables se describen en WO2012/004299. La vía de administración preferida es la oral.

[0023] En una forma de realización, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables y uno o más agentes terapéuticamente activos.

[0024] En una forma de realización, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona y uno o más agentes terapéuticamente activos.

[0025] En otra forma de realización, la invención proporciona un producto que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sales farmacéuticamente aceptables y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del SSp.

[0026] En otra forma de realización, la invención proporciona un producto que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del SSp.

[0027] Los productos proporcionados como una preparación combinada para el tratamiento del SSp incluyen una composición que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables y el/los otro(s)

agente(s) terapéutico(s) juntos en la misma composición farmacéutica, o el compuesto de la Fórmula (I) y el/los) otro(s) agente(s) terapéutico(s) en forma separada, por ejemplo en forma de kit.

[0028] Los productos proporcionados como una preparación combinada para el tratamiento del SSp incluyen una composición que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona y el/los otro(s) agente(s) terapéutico(s) juntos en la misma composición farmacéutica, o el compuesto de la Fórmula (I) y el/los otro(s) agente(s) terapéutico(s) en forma separada, por ejemplo en forma de kit.

[0029] En consecuencia, la invención proporciona 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en el tratamiento del SSp, en donde el medicamento se prepara para la administración con otro agente terapéutico.

[0030] La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento del SSp, en el que el medicamento se administra con 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0031] La invención también proporciona 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en un método de tratamiento del SSp, en donde la 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables se preparan para la administración con otro agente terapéutico.

[0032] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método de tratamiento del SSp en el que el otro agente terapéutico se prepara para la administración con 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0033] La invención también proporciona 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en un método de tratamiento del SSp, en donde la 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables se administran con otro agente terapéutico.

[0034] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método de tratamiento del SSp, en el que el otro agente terapéutico se administra con 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0035] La invención también proporciona 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento del SSp, en donde el paciente ha recibido tratamiento con otro agente terapéutico previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas anteriores).

[0036] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en el tratamiento del SSp, en el que el paciente ha recibido tratamiento con otro agente terapéutico previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas anteriores) con 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0037] La invención proporciona la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para usar en el tratamiento del SSp, en donde el medicamento se prepara para la administración con otro agente terapéutico.

[0038] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en el tratamiento del SSp, en el que el medicamento se administra con la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona.

[0039] La invención también proporciona la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para usar en un método de tratamiento del SSp, en el que la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona se prepara para la administración con otro agente terapéutico.

[0040] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método de tratamiento del SSp en el que el otro agente terapéutico se prepara para la administración con la sal de fosfato de 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona.

[0041] La invención también proporciona la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para usar en un método de tratamiento del SSp, en el que la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona se administra con otro agente terapéutico.

[0042] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método de tratamiento del SSp, en el que el otro agente terapéutico se administra con la sal de fosfato de 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona.

[0043] La invención también proporciona la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para usar en el tratamiento del SSp, en el que el paciente ha recibido tratamiento con otro agente terapéutico previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas anteriores).

[0044] La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en el tratamiento del SSp, en el que el paciente ha recibido tratamiento previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas anteriores) con la sal de fosfato de 1-{(*S*)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona.

[0045] En una forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del SSp pueden estar en dosis unitarias de aproximadamente 10-100 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de unos 50-70 kg.

[0046] En otra forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del SSp pueden estar en dosis unitarias de aproximadamente 10-100 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de unos 40-200 kg.

[0047] En una forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para el tratamiento del SSp puede estar en dosis unitarias de aproximadamente 10-100 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de unos 50-70 kg.

[0048] En otra forma de realización, la composición o combinación farmacéutica que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para el tratamiento del SSp puede estar en dosis unitarias de aproximadamente 10-100 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de unos 40-200 kg.

[0049] La dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto, la composición farmacéutica, o las combinaciones de estos, depende del peso corporal, la edad y el estado individual o la gravedad del trastorno o enfermedad que se está tratando. Un médico versado en la materia puede determinar fácilmente la cantidad eficaz de cada uno de los ingredientes activos necesarios para prevenir, tratar o inhibir el progreso del trastorno o enfermedad.

[0050] En otra forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del SSp pueden estar en dosis unitarias de aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de alrededor de 50-70 kg.

[0051] En otra forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del SSp pueden estar en dosis unitarias de aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de alrededor de 40-200 kg.

[0052] En otra forma de realización, la composición o combinación farmacéutica que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para el tratamiento del SSp puede estar en dosis unitarias de aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 50-70 kg.

[0053] En otra forma de realización, la composición o combinación farmacéutica que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para el tratamiento del SSp puede estar en dosis unitarias de aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 40-200 kg.

[0054] En otra forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del SSp se administra a aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 50-70 kg, dos veces al día.

[0055] En otra forma de realización, la composición farmacéutica o combinación que comprende 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento del SSp se administra a aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 40-200 kg, dos veces al día.

[0056] En otra forma de realización, la composición o combinación farmacéutica que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para el tratamiento del SSp se administra a aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 50-70 kg, dos veces al día.

[0057] En otra forma de realización, la composición o combinación farmacéutica que comprende la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona para el tratamiento del SSp se administra a aproximadamente 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 40-200 kg, dos veces al día.

DETALLES EXPERIMENTALES

[0058] En la medida en que la producción de los materiales de partida no se describe particularmente, los compuestos son conocidos o pueden prepararse de manera análoga a los métodos conocidos en la técnica o como se describe a continuación.

[0059] Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención sin ninguna limitación.

Abreviaturas

Abreviatura	**Descripción**
Akt	véase PKB
CPA	Célula presentadora de antígeno
BCR	Receptor de linfocitos B
BD	Becton Dickinson
b.i.d	dos veces al día (*"bis in die"*)
BMMC	Mastocitos derivados de la médula ósea
ASB	Albumina de suero bovino
CsA	Ciclosporina A
DMSO	Dimetilsulfóxido
CE_{50}	Concentración que conduce un efecto del 50%
FACS	Seleccionador celular activado por fluorescencia
fMLP	N-formilmetionil-lencil-fenilalanina
HEL	Lisozima de huevo de gallina
CI_{50}	Concentración que conduce a una inhibición del 50%.
IFNα	Interferón alfa
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
InsR	Receptor de insulina
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LPS	Lipopolisacárido
m-IL-3	murino IL-3
RLM	Reacción linfocitaria mixta
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
n.d.	no determinado
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CDp	Célula dendrítica plasmocitoide
PDK1	Proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinositida 1
PH	Dominio de homología Pleckstrin
PI	Fosfatidil-inositol
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-cinasa
PKB	Proteína cinasa B (también conocida como Akt)
rIL-4	interleucina-4 de rata
TA	Temperatura ambiente
SCF	Factor de células madre
DE	Desviación Estándar

EEM	Error estandar de la media
Ser473	Posición de la serina 473
Th	Linfocitos T cooperadores
TLR	Receptor tipo Toll

Activación de linfocitos B humanos en sangre total diluida.

[0060] **Método**. Para evaluar los efectos sobre la activación de los linfocitos B con la estimulación del receptor de linfocitos B de superficie, se estimularon linfocitos B en sangre total humana al 90% por incubación con anticuerpos anti-IgM solos (algM) o en combinación con IL-4 (algM/IL-4) en la presencia de cantidades tituladas de compuestos. Las estimulaciones en sangre total reflejan de manera fidedigna el estado fisiológico y tienen en cuenta la posible unión a las proteínas plasmáticas. La activación temprana a través de la vía proximal la diana PI3K se visualizó como la inhibición de la fosforilación de Akt.

[0061] Para la evaluación de los efectos *in vitro* del compuesto **A** en los marcadores de activación de superficie de los linfocitos B tras la estimulación, se añadieron 180,5 µl de sangre total heparinizada con 9,5 µl de compuesto **A** prediluido en placas de microtitulación con fondo en forma de U de 96 pocillos (Nunc), lo que dio como resultado una dilución en serie a 1/2 con un rango de concentración de 50 a 0,008 µM. Los pocillos de control se pretrataron con DMSO para obtener una concentración final de DMSO del 0,5%. Los cultivos se establecieron por duplicado, se mezclaron bien mediante agitación en un agitador de placas (30 segundos, velocidad 900), se mezclaron mediante absorción y expulsión con pipeta y se agitaron nuevamente en el agitador de placas. Los cultivos se incubaron a 37 °C con CO_2 al 5 % durante 1 hora. Luego se incubaron 10 µl de solución de estímulo como se ha descrito y se mezclaron como se ha especificado y los cultivos se incubaron a 37 °C con CO_2 al 50% durante otras 24 h.

Análisis por citometría de flujo

[0062] Después de la incubación, los agregados celulares se separaron mediante la adición de 15 µl/pocillo de una solución de EDTA 25 mM, pH 7,4, a los cultivos. Las muestras se mezclaron completamente mediante agitación en un agitador de placas (velocidad 900) durante 15 minutos. Las células se tiñeron mediante la adición de 25 µl de una mezcla de anticuerpos marcados con fluorescencia, mezcla en un agitador de placa (30 segundos, velocidad 900) e incubación durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se tiñeron con anti-huCD3-CPA-Cy7 (Becton Dickinson [BD]# 557832) para permitir la activación de los linfocitos T y con anti-huCD19-CPA (BD # 555415) para permitir la activación de los linfocitos B en el análisis FACS. Además, las muestras se tiñeron con combinaciones de los siguientes anticuerpos como se describe en la sección Resultados: anti-huCD69-PE-Cy7 (BD # 557745) y anti-huCD86-PE-Cy5 (BD # 555659).

[0063] Después de la tinción, las muestras se transfirieron a placas de microtitulación con fondo en forma de V de 96 pocillos profundos (Corning nº 396096) que contenían 2 ml/pocillo de solución 1x de lisis BD (BD nº 349202). Las placas se mezclaron mediante absorción y expulsión con pipeta y se incubaron durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las placas se centrifugaron a 450 x g durante 5 minutos y, después de la eliminación del sobrenadante, se añadieron 2 ml de CellWASH (BD # 349524) a cada pocillo. Las placas se centrifugaron a 450 x g durante 5 minutos nuevamente, el sobrenadante se retiró y el sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de CellWASH.

[0064] Los datos se obtuvieron en un citómetro de flujo BD LSR II utilizando el software BD FACSDiva (versión 4.1.2). Los linfocitos se seleccionaron en el diagrama de dispersión FSC/SSC de acuerdo con el tamaño y la granularidad y se analizaron adicionalmente para detectar la expresión de CD19, CD3 y marcadores de activación. Los datos se calcularon a partir de diagramas de dispersión como porcentaje de células teñidas positivamente para marcadores de activación dentro de la población CD19 + o CD3 +.

Evaluación estadística

[0065] La relación señal/ruido (S/N) se calculó dividiendo los porcentajes de linfocitos B o T con marcadores positivos de muestras de sangre activadas por el porcentaje de linfocitos B o T con marcadores positivos de muestras no activadas.

[0066] El porcentaje de inhibición de la activación de linfocitos B o T después de la exposición al fármaco se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%\text{ de inhibición} = 100\text{ x } \frac{\text{estimulación sin fármaco} - \text{estimulación con fármaco}}{\text{estimulación sin fármaco} - \text{sin estimular}}$$

[0067] Se usó el software ORIGIN 7 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts) para el ajuste de la curva de regresión no lineal. La concentración del fármaco que resultó en una inhibición del 50% (CI50) se obtuvo ajustando la ecuación de Hill a los datos de inhibición.

[0068] Para la evaluación de los efectos *in vitro* del compuesto **A** en el marcador de activación de la vía intracelular pAkt tras la estimulación, se añadieron 180 µl de sangre heparinizada con 10 µl de compuesto **A** prediluido en tubos de 5 ml con fondo en forma de U (BD, cat # 352063) lo que dio como resultado una dilución con un rango de concentración de 16666 nM a 0,8 nM. Las muestras de control se pretrataron con DMSO para obtener una concentración final de DMSO al 0,17%. Las muestras se colocaron por duplicado, se mezclaron bien mediante agitación en un agitador de vórtice (3 veces durante 5 segundos, velocidad 1800). Las muestras se incubaron a 37 °C en el baño de agua durante 1,5 horas (con las tapas cerradas). Luego, se añadió el estímulo en un volumen de 10 µl, se mezcló (3 veces durante 5 segundos, velocidad 1800) y se incubó durante 20 minutos a 37 °C en el baño de agua.

Lisis, fijación y permeabilización

[0069] Después de la incubación, se agregaron 2 ml de tampón BD Phosflow Lyse/Fix precalentado (37 °C en baño de agua) (BD, cat # 558049) por tubo y se agitó durante 3 segundos en un agitador de vórtice y se incubó durante 20 minutos a 37 °C en el baño de agua. Las muestras se centrifugaron a 400 g durante 5 min. Después de la centrifugación, se añadieron 2 ml de tampón BD Phosflow Perm/Wash I (BD, cat # 557885) por tubo y se incubaron a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad durante 10 minutos. Después de la centrifugación a 400 g durante 5 minutos, los gránulos se lavaron con 2 ml de tampón BD Phosflow Perm/Wash I y se centrifugaron nuevamente a 400 g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y las muestras se tiñeron como se describe a continuación.

Análisis de citometría de flujo

[0070] Para el análisis de la pAkt, las muestras de sangre humana procesadas se tiñeron con anti-hu CD20 (anti-huCD20 marcado con Alexa488, BD cat # 558056) para permitir la activación de los linfocitos B en el análisis citométrico. Además, las muestras se tiñeron con fosfo-Akt antihumana conjugada con Alexa647 (Ser473; BD, cat # 560343).

[0071] Los procedimientos de tinción se realizaron en BD Phosflow Perm/tampón de lavado I a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, las muestras se lavaron con 2 ml de tampón BD Phosflow Perm/Wash I y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos y los sedimentos se resuspendieron en 300 µl de tampón de tinción BD Stain Buffer (BD, cat # 554656). Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se obtuvieron los datos en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) utilizando el software DIVA (versión 6.1.2). Los linfocitos se seleccionaron en el diagrama de dispersión FSC/SSC según el tamaño y la granularidad y se analizó adicionalmente la expresión de CD20 y la fosforilación de Akt. Los datos se calcularon a partir de diagramas de dispersión o histogramas como porcentaje de células teñidas positivamente para la fosforilación de Akt dentro de la población de CD20+. La ecuación estadística se realizó como se ha descrito anteriormente para los marcadores de activación de superficie.

[0072] Resultados (Tabla 1).

Tabla 1 Inhibición de las funciones de los linfocitos B humanos en sangre total

Matriz	Sangre humana al 90 %		
Estímulo	algM/IL-4		algM
Lectura	CD69	CD86	pAkt[e]
(A) CI_{50} [µM]	0,193[d]	0,202[d]	0,144

[d]Los datos mostrados son valores medios ± DE de al menos cuatro experimentos independientes;
[e]Los datos mostrados son valores medios ± DE de al menos dos experimentos independientes

Proliferación de linfocitos B de ratón después de la estimulación a través de BCR

[0073] **Método**. Los linfocitos B de murino se estimularon a través de BCR mediante un anticuerpo anti-IgM en presencia de cantidades tituladas de compuestos como se describe en (Julius y col 1984) y se evaluó la proliferación mediante la incorporación de ^{3}H-timidina radiactiva.

[0074] **Resultados** (Tabla 2).

Producción de anticuerpos inducida por LPS a partir de linfocitos B de ratón *in vitro*

[0075] **Método**. Las funciones de los linfocitos B inducidas por LPS se investigaron de acuerdo con un protocolo adaptado de Moon (Moon y col 1989) con modificaciones menores: se cultivaron linfocitos B esplénicos de ratones Balb/c nu/nu con mIL-4, mIL-5 y LPS en la presencia de cantidades tituladas de compuesto. Las concentraciones finales fueron $0{,}5x10^5$ esplenocitos/pocillo, 500 U/ml de mIL-4, 500 U/ml de mIL-5 y 50 µg/ml de LPS. Los

sobrenadantes se analizaron por ELISA para detectar la producción de anticuerpos después de 6 días de incubación.

[0076] **Resultados** (Tabla 2).

Presentación de antígenos y producción de citocinas de linfocitos B con BCR transgénicos de ratón. Método. Purificación de linfocitos B $CD19^+$esplénicos de ratón MD4 HEL BcR Tg

[0077] Los ratones MD4 HEL BcR Tg B10.BR (MD4 B10.BR) fueron un obsequio del Profesor Jose Moreno (Unidad de Investigación sobre Enfermedades Autoinmunes, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México).

[0078] Se aislaron los bazos de ratones MD4 B10.BR y B10.BR de control de camada no transgénica después de sacrificarlos por exposición a una cantidad excesiva de isoflurano. Los bazos aislados se suspendieron en RPMI1640 (Invitrogen, # 31870), y se disociaron mediante un disociado GentleMACS (Miltenyi Biotec), y se filtraron con Cell Strainer (BD Falcon, malla de 70 µm, # 352350). La suspensión de células de bazo individual se trató adicionalmente con tampón de lisis (Sigma, # R7757) para eliminar los eritrocitos, se lavó con PBS^- dos veces, y se resuspendió en medio de cultivo completo consistente en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 50 µM de 2-mercaptoetanol (2-ME). Se realizó una purificación adicional de linfocitos B esplénicos mediante la eliminación de células no B con clasificación celular activada magnéticamente, AutoMACS (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se incubaron 1×10^7 células de bazo suspendidas en 40 µl de tampón MACS, PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 0,5% (ASB) y EDTA 2 mM con 0 µl de cóctel de biotina-anticuerpos consistente en anticuerpos monoclonales contra CD43 (Ly48, IgG_{2a} de rata), CD4 (L3T4, IgG_{2b} de rata) y Ter-119 (IgG_{2b} de rata) durante 15 minutos en hielo. Después del tratamiento con un cóctel de biotina-anticuerpos, los esplenocitos se incubaron adicionalmente con 30 µl de anticuerpos anti-biotina durante 15 minutos en hielo, se resuspendieron en 1 ml de tampón MACS y se aplicaron para purificar linfocitos B mediante AutoMACS. En la purificación mediante AutoMACS, se eligió el programa “Deplete”, y la fracción negativa del puerto de salida neg1 se recogió como la fracción rica en linfocitos B. La pureza se determinó mediante la proporción de células $CD19^+$ en la fracción separada en el análisis FACS, y fue superior al 95 %.

Tinción celular y análisis FACS

[0079] Los linfocitos B purificados se resuspendieron en 50 µl de tampón FACS helado (PBS suplementado con azida al 0,1% y ASB al 0,1%). Las suspensiones celulares en tampón FACS se trataron con 1 µl de bloque Fc (anticuerpo anti-ratón CD16/CD32 de rata, BD Pharmingen, # 553142) durante 10 minutos en hielo. Después del tratamiento con el bloque Fc, las células se tiñeron durante 30 minutos en hielo con PerCp anti-CD19 para identificar la población de linfocitos B y luego con péptido anti-HEL_{48-61}/anticuerpos MHC Class II I-Ak (Aw3.18.14) seguido del anticuerpo PE IgG_1 anti-ratón para medir la activación celular y la actividad presentadora de antígeno. Las muestras de células teñidas se lavaron con 5 ml de tampón FACS helado dos veces y se analizaron mediante FACS Calibur (BD Bioscience).

[0080] El anticuerpo Aw3.18.14 (Dadaglio G y col. 1997) se purificó a partir del cultivo de hibridoma (ATCC, # CRL2826) con un filtro de 30 kd de centrífuga Amicon (Milliore, # LSK2ABA20). Todos los demás anticuerpos se adquirieron de BD Bioscience.

[0081] Se analizaron los datos de FACS y se calculó su intensidad de fluorescencia media (IFM) con el software FlowJo (Tree Star Inc). Los valores de CI_{50} se calcularon con el software GraphPad PRISM versión 6.0 (GraphPad Software Inc).

Medición de la carga de antígeno a través de MHC II

[0082] Un millón de esplenocitos o linfocitos B purificados de ratones MD4 B10.BR se suspendieron en 500 µl de medio de cultivo completo y se sembraron en una placa de 24 pocillos. Las células se pretrataron con compuesto **A** durante 30 minutos, y luego se cultivaron con ciertas concentraciones de proteína HEL a 37 °C, con CO_2 al 5% durante la noche. Después del cultivo durante la noche, las células se recogieron y se aplicaron al análisis FACS para medir el nivel de expresión del complejo péptido HEL/MHC II en células $CD19^+$ como se ha descrito anteriormente. El DMSO se mantuvo a una concentración inferior al 0,1%.

Medición de la liberación de citocinas proinflamatorias

[0083] Un millón de linfocitos B purificados de MD4 B10.BR como se escribe en la sección 2.1 se suspendieron en 200 µl de medio de cultivo completo y se estimularon con 100 µM de proteínas HEL con ligando CD40 soluble a 37 °C, con CO_2 al 5 % durante 48 horas. El compuesto **A** se añadió en el cultivo 30 minutos antes de la estimulación. Después de la estimulación con la proteína HEL, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se aplicaron para medir la IL-6 y el TNFα por ELISA de acuerdo con las instrucciones de fabricación proporcionadas (sistemas de I+D). Los datos se representan como la media de concentración (pg/ml) de muestras por triplicado y

los valores de CI_{50} se calculan como se ha descrito anteriormente. La concentración de DMSO se mantuvo a una concentración inferior al 0,1%.

[0084] Resultados (Tabla 2).

Tabla 2 Inhibición de las funciones de los linfocitos B de murino

Matriz	Bazo de ratón		Linfocito B de ratón BCR tg		
Estímulo	Anti-IgM	LPS/IL-4	Lisozima de huevo de gallina (HEL)		
Lectura	Proliferación	IgM	función	IL-6	TNFα
(**A**) IC_{50} [μM]	0,008[a]	0,234[a]	0,395[b]	0,022[a]	0,028[a]

[a]Los datos mostrados son la media de al menos dos experimentos independientes; [b]Los datos mostrados son la media de al menos cuatro experimentos independientes

Producción de quimiocinas de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)

Método.

Aislamiento de CMSP

[0085] Para evaluar el efecto del compuesto **A** sobre la producción de quimiocinas relevantes para la formación de centros germinales, se aislaron CMSP de la capa leucocitaria (recogida a través de Inter-Regionale Blutspende de la Cruz Roja Suiza) mediante centrifugación en gradiente Ficoll estándar utilizando Ficoll-Paque plus (GE healthcare # 17-1440-03) en tubos de Leucosep (Greiner Bio-one # 227289). Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se resuspendieron a 2,2 x 10^6/ mL en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%, Gentamicina (50 ug/ml), Insulina-Transferrina-Selenio y β-Mercaptoetanol (50 μM).

Estimulación de CMSP

[0086] Se distribuyeron las CMSP en placas de 48 pocillos (Costar # 3548) y se incubaron con compuesto **A** prediluido, lo que resultó en una dilución con una concentración final de 0,3, 1 o 3 uM. Las muestras de control se pretrataron con DMSO para obtener una concentración final de DMSO al 0,03%. Las muestras se mezclaron a fondo y se incubaron en una incubadora humificada a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, las células se estimularon mediante la adición del agonista TLR9 ODN M362 (Invivogen, # tlrl-m362) a una concentración final de 30 ug/ml o anti-IgM-Dextrano (Finabiosolution # 0004) a una concentración final de 2 ug/ml. Las muestras de control se dejaron sin estimular. Las muestras se mezclaron a fondo y se incubaron en una incubadora humificada a 37 °C durante 24 h.

Determinación de citocinas/quimiocinas

[0087] Después de la estimulación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificaron las quimiocinas mediante inmunoensayo Bio-Plex Multiplex (CXCL13; Bio Rad # 171 BK12MR2) o ensayo MSD V-Plex (IP-10; Meso Scale Diagnostics) o de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0088] **Resultados** (Tablas 3 y 4).

Tabla 3 Inhibición de la producción de CXCL 13 inducida por el ligando TLR9

estímulo	no	ODN	ODN	ODN	ODN
Compuesto **A** (nM)	no	no	3000	1000	300
Donante 1	1[a]	61	41	42	51
Donante 2	1	19	4	6	8
Donante 3	0	14	5	7	8
Donante 4	1	9	3	3	3
Donante 5	1	63	29	42	39
Donante 6	4	202	86	84	113
media	1	61	28	31	37
DE	1	73	33	32	42
% de inhibición			55	51	40

[a] La cantidad de CXCL13 medida en el sobrenadante de cultivo se muestra como pg/ml

Tabla 4 Inhibición de la producción de IP-10 inducida por ligando anti-IgM-Dextrano

estímulo	no	anti-IgM-dextrano	anti-IgM-dextrano	anti-IgM-dextrano	anti-IgM-dextrano
Compuesto **A** (nM)	no	no	3000	1000	300
Donante 1	117	3026	715	1624	2764

Donante 2	48	106	93	71	79
Donante 3	15	77	27	29	32
Donante 4	17	35	34	42	37
Donante 5	88	1460	899	1010	1233
Donante 6	442	58	59	52	52
media	121	794	305	471	699
DE	162	1227	394	683	1117
% de inhibición			62	41	12

[a]La cantidad de IP-10 medida en el sobrenadante de cultivo se muestra como pg/ml

Migración de linfocitos B inducida por CXCL13

Método.

Aislamiento de linfocitos B de la capa leucocitaria

[0089] Las CMSP se aislaron de capa leucocitaria como se ha descrito anteriormente. Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se resuspendieron a 5 x 10^7/ mL en PBS que contenía FBS al 2% y EDTA 1 mM. La purificación adicional de los linfocitos B se realizó mediante la eliminación de las células no B con un kit de enriquecimiento de linfocitos B humanos EasySep™ (STEMCELL Technologies # 19054) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 4 x 10^8 CMSP en 8 ml de tampón de aislamiento con 400 ul de cóctel de enriquecimiento en un tubo de fondo redondo de 14 ml durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las CMSP se incubaron adicionalmente con 600 ul de partículas magnéticas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para el aislamiento de los linfocitos B, el tubo se colocó en el imán durante 5 minutos y los linfocitos B enriquecidos se recogieron en un tubo nuevo de 14 ml. Las células fueron lavadas y resuspendidas a 5 x 10^6/ mL en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%, Gentamicina (50 ug/ml), Insulina-Transferrina-Selenio y β-Mercaptoetanol (50 μM).

Ensayo de migración en placa transwell de 96 pocillos

[0090] Los linfocitos B aislados se pasaron a un tubo de fondo redondo de 5 ml (Costar # 352054) y se incubaron con compuesto **A** prediluido, lo que resultó en una dilución con una concentración final de 10, 1, 0,1 o 0,01 uM. Las muestras de control se pretrataron con DMSO para obtener una concentración final de DMSO al 0,1%. Las muestras se mezclaron a fondo y se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 30 minutos. Unos 235 ul de CXCL13 (R&D Systems # 801-CX) en una dilución con una concentración final de 100 nM se añadieron a los pocillos de la placa receptora de transwell de 96 pocillos (Costar # 3387). Los pocillos de control se llenaron con 235 ul de medio. El inserto de soporte permeable de 5 um se añadió a la placa receptora y se llenó con 80 ul de linfocitos B preincubados. La placa Transwell se incubó en una incubadora humificada a 37 °C durante 3 h. El inserto de soporte permeable se retiró y el número de células en la placa receptora se evaluó mediante citometría de flujo. **Resultados** (Tabla 5).

Tabla 5 Inhibición de la migración de linfocitos B inducida por CXCL 13

estímulo	No	CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13
compuesto **A** (nM)	No	No	10000	1000	100	10
Recuento celular[a]	737	6981	2043	3743	4556	6165
DE	42	478	353	594	317	953
% de inhibición	100	0	79	52	39	13
DE	1	8	6	10	5	15

[a] Valor medio de 4 pocillos

Inhibición dependiente del tiempo de la fosforilación de Akt *ex vivo* por una sola dosis oral de compuesto de prueba en ratas

Método.

Animales

[0091] Todos los experimentos se realizaron con ratas Lewis macho adultas (LEW/Han/Hsd, Charles River, Alemania y LEW/Orl @ Rj, Janvier, Francia), con un peso de 220-280 g.

Condiciones de mantenimiento

[0092] Los animales fueron alojados en condiciones higiénicas convencionales y alimentados con una dieta estándar y agua potable a voluntad. Se les permitió el acceso sin restricciones a alimentos y agua antes y durante el experimento.

Reactivos

[0093] Se usó heparina de sodio de alto peso molecular (B. Braun, Melsungen, Alemania; 5000 UI/ml) como anticoagulante. El anticuerpo IgM de cabra anti-rata se obtuvo de Serotec, Düsseldorf, Alemania (cat # 302001). El tampón BD Phosflow Lyse/Fix I se obtuvo de BD biosciences (cat # 558049). La IL- 4 recombinante de rata (BD, cat # 555107) se almacenó en partes alícuotas a -80 °C.

Fármacos y aplicación de fármacos in vivo

[0094] La suspensión para la administración se preparó de cero y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente. 14,8 mg de compuesto **A** se suspendieron en 5,92 ml de CMC al 0,5% con Tween80 al 0,5%. Las suspensiones lechosas y homogéneas se aplicaron luego al animal. Las sustancias de prueba se administraron oralmente en un volumen de 4 ml/kg de peso corporal resultante en una dosis oral de 10 mg/kg.

Recogida de sangre

[0095] Los animales fueron anestesiados con isoflurano usando un sistema de flujo de aire Fluvac. Se recogió la sangre total por vía sublingual antes de la administración de la dosis y a las 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas después de la administración de la dosis. Para el análisis farmacodinámico, se recogieron 100 µl de sangre de rata por punto temporal en tubos Eppendorf con 30 UI de heparina de sodio (B. Braun, Melsungen, Alemania; 5000 UI/ml). Para el análisis farmacocinético, se recogieron 150 µl de sangre de rata por punto temporal en tubos Eppendorf (Milian cat # TOM-14) recubiertos con EDTA.

Análisis farmacocinético.

[0096] Para el análisis farmacocinético, se almacenaron 150 µl de cada muestra de sangre total a-80 °C antes del análisis. Después de la adición de 20 µl de patrón interno (conc = 400 ng/ml) a una alícuota de 80 µl de cada muestra de sangre total, las células y las proteínas se eliminaron por centrifugación después de precipitación con 400 µl de acetonitrilo. La capa superior orgánica se evaporó luego hasta secarse. Los residuos se disolvieron en acetonitrilo al 50% que contenía ácido fórmico al 0,2%, se diluyeron con ácido fórmico al 0,2%, se centrifugaron y luego se almacenaron a 10 ºC antes del análisis. Para la calibración, se añadieron 8 muestras de sangre total sin tratar con cantidades de compuesto de 1 a 5000 ng/ml. Las muestras de control de calidad y recuperación se ajustaron a 100 ng/ml.

[0097] Para el análisis, se inyectó una alícuota de 10 µL de cada extracto de muestra en un sistema LC-MS-MS. Los compuestos se resolvieron en una columna de fase inversa Reprosil-pur C18 aplicando un gradiente lineal de formiato de amonio 5 mM que contenía ácido fórmico al 0,2% a acetonitrilo, que contenía metanol al 5%, en 5 minutos. Para la detección, se utilizó espectrometría de masas en MRM con la transición de masa 451,2 m/z → 247,0 m/z. Después de la ionización del efluente de la columna en una fuente de electrospray AP, el compuesto **A** y el estándar interno se detectaron como sus iones de producto [MH]+.

[0098] Las concentraciones del compuesto **A** se calcularon mediante XKalibur® y Excel®, en base a la relación del área de pico extraída, obtenida de la intensidad relativa de la señal MS/MS. Se determinó que el LOQ era de 1 ng/ml y la precisión de la calibración entre 1 ng/ml y 1000 ng/ml fue mejor que el 5%. La precisión de las muestras de QC (n = 5 a 100 ng/ml) fue mejor que el 4,7% de RSD y la recuperación fue del 102,6%.

Estimulación de sangre total in vitro

[0099] Para el análisis *ex vivo* de la sangre de animales tratados con fármacos, se mezclaron 90 ml de sangre heparinizada en tubos de 5 ml con fondo en forma de U (BD, cat # 352063) con 100 ml de medio RPMI (Gibco, cat # 31870) inmediatamente después de la recolección de sangre, y se activaron con 10 µl de IgM anti-rata/rIL-4 a una concentración final de IgM anti-rata de 50 mg/ml y rIL-4 de 10 ng/ml. Las muestras de control se dejaron sin estimular. Las muestras se mezclaron a fondo y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en el baño de agua.

Lisis, fijación y permeabilización

[0100] Después de la incubación, se añadieron 2 ml de tampón BD Phosflow Lyse/Fix precalentado (37 °C en baño de agua) por tubo. Las muestras se mezclaron completamente y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en el baño de agua. Luego, las muestras se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos. Después de la centrifugación, se añadieron 2 ml de tampón BD Phosflow Perm/Wash por tubo. Las muestras se mezclaron a fondo y se incubaron a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se congelaron rápidamente en hielo seco y luego se almacenaron a -80 °C hasta la tinción con FACS.

Análisis de citometría de flujo

[0101] Para su descongelación, todas las muestras se incubaron durante 10 minutos en el baño de agua a 25 °C. Después de centrifugado a 400 g durante 5 minutos, los gránulos se lavaron con 2 ml de tampón BD Phosflow Perm/wash y se centrifugaron nuevamente a 400 g durante 5 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes. Para el análisis de pAkt, las muestras se tiñeron con IgM anti-rata marcada con PE (BD, cat # 553888) para permitir la activación de los linfocitos B en el análisis FACS. Además, las muestras se tiñeron con anti-fosfo-Akt conjugada con Alexa647 (Ser473; BD, cat # 560343). Los procedimientos de tinción se realizaron en un volumen total de 100 µl de tampón BD Phosflow Perm/wash a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, las muestras se lavaron con 2 ml de tampón BD Phosflow Perm/wash y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos y los sedimentos se resuspendieron en 300 µl de BD Stain Buffer (BD, cat # 554656). Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se obtuvieron los datos en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) utilizando el software DIVA (versión 6.1.2). Los linfocitos se seleccionaron en el diagrama de dispersión FSC/SSC según el tamaño y la granularidad y se analizaron adicionalmente para determinar la expresión de IgM y la fosforilación de Akt. Los datos se calcularon a partir de diagramas de dispersión o histogramas como porcentaje de células teñidas positivamente para la fosforilación de Akt dentro de la población de IgM +.

Evaluación estadística

[0102] Los efectos de los fármacos *ex vivo* se expresaron como inhibición de la fosforilación de Akt medida por citometría de flujo. El porcentaje de inhibición de la fosforilación de Akt se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%\text{ de inhibición} = 100 \text{ x } \frac{\text{estimulación sin fármaco} - \text{estimulación con fármaco}}{\text{estimulación sin fármaco} - \text{sin estimular}}$$

[0103] **Resultados** (Tabla 6).

Tabla 6 Inhibición dependiente del tiempo de la fosforilación de Akt en ratas

	% de inhibición de pAkt en IgM + linfocitos B					
tiempo [h]	**rata 1**	**rata 2**	**rata 3**	**rata 4**	**Media**	**DE.**
0	-2,0	15,7	6,9	-20,6	**0,0**	**15,5**
1	100,0	98,2	95,6	99,1	**98,2**	**1,9**
2	100,9	97,3	101,8	98,2	**99,6**	**2,1**
4	93,8	100,0	105,3	81,4	**95,1**	**10,3**
6	76,1	99,1	94,7	83,1	**88,2**	**10,6**
8	83,1	83,1	85,8	65,4	**79,4**	**9,4**
10	69,0	74,3	76,9	62,7	**70,7**	**6,3**
12	74,3	71,6	73,4	69,0	**72,1**	**2,3**
24	30,8	40,6	37,0	12,2	**30,2**	**12,6**

[0104] Se trató a un grupo de cuatro ratas Lewis con una dosis oral única de 10 mg/kg de compuesto **A**. En los puntos temporales indicados, se estimuló la sangre total de rata al 50% con IgM anti-rata/rIL-4 y se determinó la fosforilación de Akt como se ha descrito en la sección Método. Los datos muestran valores individuales y medios de cuatro animales con DE.

Análisis farmacocinético del compuesto A en plasma humano.

[0105] **Método**. Se obtuvo una muestra de sangre total por punción venosa directa o una cánula permanente insertada en una vena del antebrazo. Se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían ácido etilendiaminotetraacético tripotásico (K3 EDTA) y se centrifugaron dentro de 60 minutos a 3-5 °C para separar el plasma. El plasma obtenido se congeló y se almacenó a-20 °C hasta la medición de la concentración del fármaco.

[0106] Las concentraciones plasmáticas del compuesto **A** se cuantificaron usando un método de espectrometría de masas en tándem - cromatografía líquida de ionización por electropulverización (HPLC-MS/MS) validado en modo de iones positivos. Brevemente, se transfirieron 40 µl de muestras de plasma a una placa de precipitación de proteína Impact colocada en una placa de 96 pocillos. Ciento cincuenta microlitros de compuesto **A** estándar interno [13CD3] diluido a 4 ng/ml preparado en acetonitrilo al 75% en agua se añadieron a la placa de 96 pocillos antes de mezclar con vórtice. Para las muestras de control sin tratar, se añadió un volumen de ciento cincuenta microlitros de acetonitrilo al 75% en agua que no contenía patrón interno en reemplazo. La placa sellada con una película se agitó durante 10 minutos, se centrifugó (10 minutos, 2250 g, a 4 °C). Se inyectó un volumen de 4 µL del extracto de muestra en el sistema LC/MS/MS (API4000, Applied Biosystems).

[0107] La separación cromatográfica del compuesto **A** se realizó utilizando un Ascentis 2,7 µm C18, 50 × 2,1 mm (Sigma-Aldrich) a 40 °C y un caudal de 1,00 ml/min. La fase móvil consistió en A: ácido fórmico al 0,1% en agua y B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. La condición inicial con el 10% de la fase móvil B se mantuvo durante los primeros 0,3 minutos, la composición de la fase móvil B se incrementó linealmente al 50% en los siguientes 0,3 minutos, saltó al 95% en 1,0 minutos y luego nuevamente al 10%. El tiempo de retención para el compuesto **A** y su estándar interno fue de alrededor de 1.4 min. Las transiciones de masa seleccionadas fueron respectivamente de 451,2 → 247,1, 174,1 y 455,3 → 251,2, 174,2, 124,2 para el compuesto **A** y el compuesto **A** [13CD3].

[0108] Las curvas de calibración se construyeron utilizando relaciones de área de pico (compuesto **A** versus compuesto **A** [13CD3]) de los estándares de calibración mediante la aplicación de un algoritmo de regresión cuadrática por mínimos cuadrados ponderado (1/concentración al cuadrado).

[0109] Las concentraciones del compuesto **A** en las muestras clínicas se volvieron a calcular a partir de sus relaciones de área de pico frente a la curva de calibración (software de análisis). El método fue validado con éxito en el rango de 3 ng/ml a 1000 ng/ml con un LLOQ de 3 ng/ml. El rango dinámico estaba cubierto por 7 estándares de calibración. El método cumplió con los criterios dados para la aceptación con respecto a la linealidad (desviación estándar de calibración ≤15% (≤ 20% en el LLOQ) de la curva de calibración), exactitud y precisión dentro del día y entre días (sesgo medio ≤ 15% (≤ 20 % en el LLOQ) del valor nominal; precisión ≤ 15% (≤ 20% en el LLOQ)), así como la respuesta de transferencia.

[0110] **Resultados** (Figura 1).

Medición de pAkt en linfocitos B en muestras clínicas de sangre total estimuladas/no estimuladas

Método.

Recolección de sangre y estimulación celular

[0111] Para la evaluación de los efectos *in vivo* del compuesto **A** en la activación de linfocitos B humanos medida como fosforilación de Akt, se prepararon muestras clínicas a partir de sangre total usando un sistema monovette de Na-Heparina.

[0112] Luego se incubó sangre total con anti-IgM/IL-4 (7,5 µg/ml de anti-IgM [Southern Biotech] y 7,5 ng/ml de IL-4 [I + D]) o con PBS (muestra no estimulada). La incubación se realizó utilizando 95 µl de sangre (por duplicado) en formato de placa dentro de 1 h después de la extracción de sangre. Los cultivos se mezclaron bien mediante absorción y expulsión con pipeta y se incubaron a 37 °C (en incubadora, 5% de CO_2). Después de 30 minutos, se lisó la sangre total y se fijó con tampón BD PhosFlow-Lyse/Fix precalentado (37 °C) (1600 µl) durante 20 minutos a 37 °C (baño de agua) en la oscuridad. Las muestras de sangre lisadas y fijadas se congelaron inmediatamente y se almacenaron a-80 °C hasta su posterior procesamiento.

Tinción para marcador de activación de linfocitos B

[0113] Las muestras clínicas se procesaron dentro de una semana después de la extracción de sangre. Después de completar la descongelación (a 37 °C en baño de agua), las muestras se centrifugaron a 502 g (1580 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células sedimentadas se lavaron con 500 µL de tampón BD Phosflow Perm II helado, se mezclaron bien y se mantuvieron en hielo durante 30-35 minutos. Después de la incubación, se añadieron 1200 µl de tampón FACS y las células se centrifugaron durante 10 minutos a 650 g (1800 rpm) a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se descartaron y las muestras se lavaron una vez más como se ha descrito anteriormente. El procedimiento de tinción consistió en tinción directa (con CD20 anti-humano marcado con anticuerpo anti-humano CD20 Per-CP-Cy5.5-labeled [BD cat # 558021] y conjugado anti-humano total Akt Alexa Fluor ® 488 [Cell Signaling cat # 2917S]), y tinción indirecta para pAkt (Ser473) (Cell Signaling cat # 4058L). En primer lugar, las células se incubaron con anticuerpos primarios (50 µL de volumen total) durante 30-35 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, seguido de lavado con tampón FACS (1200 µL) y centrifugación a 650 g (1800 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células granuladas se incubaron adicionalmente con anticuerpos secundarios (50 µL de volumen total) durante 15-17 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad seguido de lavado con tampón FACS (1200 µL) y centrifugación a 650 g (1800 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de repetir la etapa de lavado (tampón FACS 1200 µL, centrifugación a 650 g durante 10 minutos a temperatura ambiente), las células se resuspendieron en 300 µL de PFA al 1% (en PBS) y se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 ml.

Adquisición y análisis de datos

[0114] Las muestras se analizaron el mismo día. La adquisición de datos se realizó en un FACS Canto II utilizando el software DIVA a un alto caudal. La activación se realizó de la siguiente manera: en primer lugar, se excluyeron los dobletes utilizando un diagrama de dispersión FSC-A vs. FSC-H. Las células individuales se mostraron en un diagrama de dispersión FSC-A vs. SSC-A para crear una puerta en los leucocitos. Se creó un diagrama de

dispersión CD20 frente a SSC-A y se mostraron los leucocitos. Se creó un histograma gráfico basado en los linfocitos B positivos para CD20 para pAkt. Se utilizaron muestras no estimuladas para establecer la puerta de intervalo para poblaciones de pAkt positivas y negativas. Los datos se calcularon como porcentaje de inhibición de pAkt en relación con el valor de referencia.

[0115] Resultados (Figura 1).

[0116] El compuesto **A** muestra una inhibición dependiente de la dosis, la concentración y el tiempo de la vía PI3K/Akt. Se logra una inhibición de la vía de más del 80% durante 12 horas después de una sola administración de 80 mg del compuesto **A**. El modelado de la relación dosis-respuesta para el compuesto **A** sugeriría que un régimen de dosificación de dos veces al día garantizaría una inhibición sostenida de la vía durante 24 horas.

REIVINDICACIONES

1. 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario.

2. Compuesto para usar según la reivindicación 1, que es la sal de fosfato de 1-{(S)-3-[6-(6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-3-il)-5,6,7,8-tetrahidro-pirido[4,3-d]pirimidin-4-ilamino]-pirrolidin-1-il}-propan-1-ona.

3. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para usar según la reivindicación 1 o 2 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

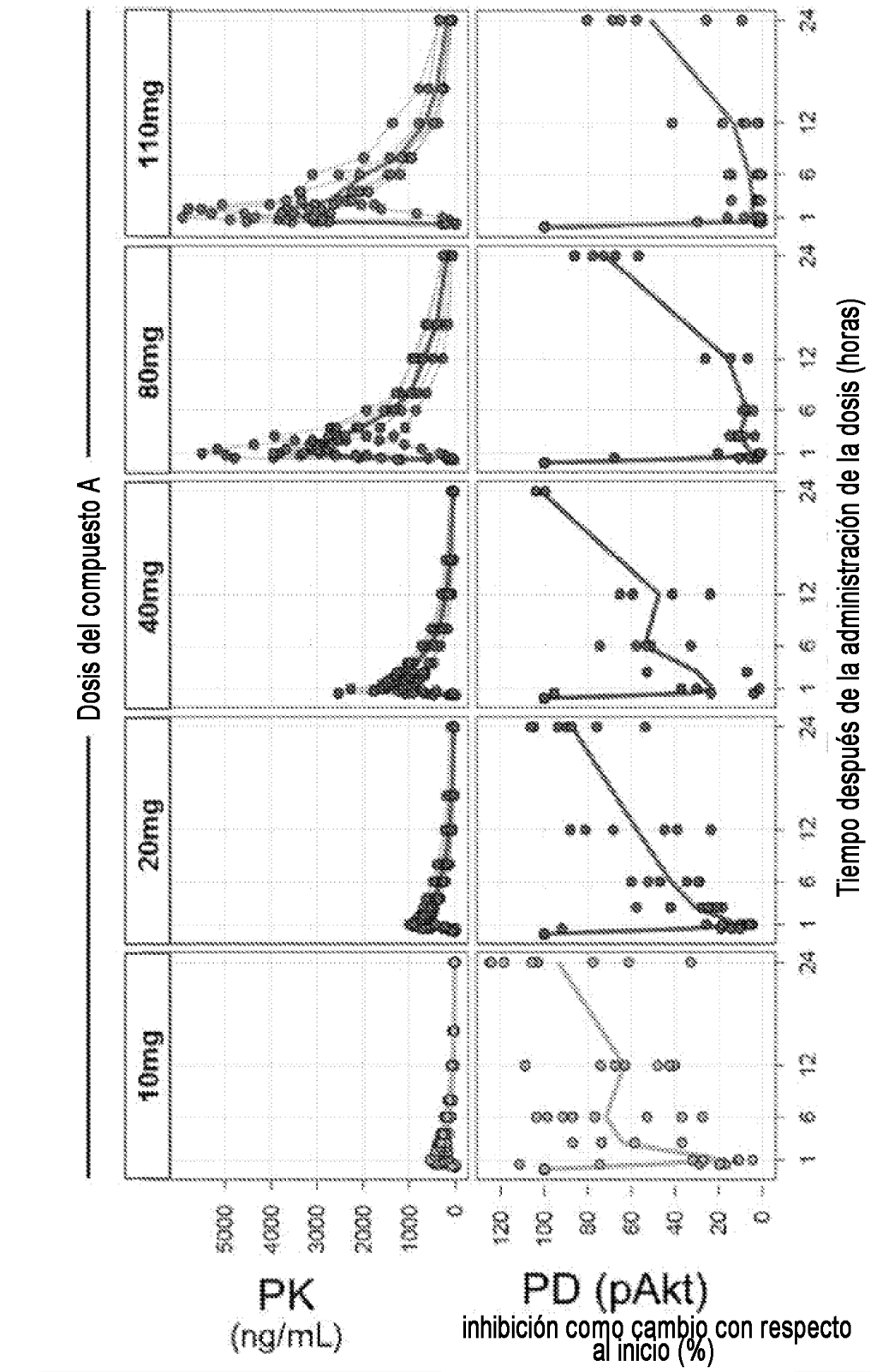
4. Combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para usar según la reivindicación 1 o 2 y uno o más agentes terapéuticamente activos.

5. Compuesto para usar según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la dosis unitaria es de 10-100 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 40-200 kg.

6. Compuesto para usar según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la dosis unitaria es de 70 mg de ingrediente activo para un sujeto humano de aproximadamente 50-70 kg.

7. Compuesto para su uso según la reivindicación 5 o la reivindicación 6 en el que la administración es dos veces al día.

Figura 1


Dosis del compuesto A
10mg
20mg
40mg
80mg
110mg
PK
(ng/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
PD (pAkt)
inhibición como cambio con respecto al inicio (%)
120
100
80
60
40
20
0
1
6
12
24
Tiempo después de la administración de la dosis (horas)