

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 875**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2017** **PCT/US2017/036847**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017** **WO17214565**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2017** **E 17811118 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023** **EP 3468559**

54 Título: **Métodos de uso y combinaciones farmacéuticas de inhibidores de HDAC con inhibidores de BET**

30 Prioridad:

09.06.2016 US 201662348054 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2024

73 Titular/es:

DANA FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (50.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, Massachusetts 02215, US y
ACETYLON PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

WONG, KWOK-KIN;
LIU, YAN;
ADEEGBE, DENNIS, O. y
QUAYLE, STEVEN, NORMAN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 973 875 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

Métodos de uso y combinaciones farmacéuticas de inhibidores de HDAC con inhibidores de BET

Antecedentes

La inhibición de la histona desacetilasa (HDAC) puede provocar la detención del crecimiento de las células cancerosas. Sin embargo, la inhibición de pan-HDAC conduce a efectos adversos significativos y es deseable un perfil de inhibición de HDAC alternativo, particularmente en combinación con otros agentes terapéuticos.

HDAC6 es una HDAC de Clase IIb y se sabe que elimina grupos acetilo de muchas proteínas celulares, incluidas la α -tubulina y la HSP90. Se ha informado que la hiperacetilación de HSP90 desestabiliza sus proteínas diana, incluidas ER y EGFR. Los inhibidores de HDAC6 han demostrado actividad proliferativa anticancerígena en diversos tipos de cáncer. Se ha demostrado que el bloqueo de la actividad de HDAC6 provoca la inhibición del crecimiento de las células cancerosas a través de diversos mecanismos.

Las proteínas de bromodominio y motivo extraterminal (BET), incluidas BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT, contienen un bromodominio que reconoce residuos de lisina acetilada, por ejemplo, en las colas N-terminales de las histonas. Los inhibidores de BET se unen a los bromodominios de las proteínas BET y alteran los programas epigenéticos y transcripcionales celulares. Los inhibidores de las proteínas BET han demostrado efectos terapéuticos en diversos tipos de cáncer.

Jennifer S. Carew Et Al, Blood. (2015) 126 (23): 3022., doi:<https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3022.3022>, (20151203), páginas 1 - 5, URL: <https://ashpublications.org/blood/article/126/23/3022/135311/Antagonizing-HDAC6-Activity-A-New-Strategy-to-Maximize-the-Anti-Myeloma-Effects-of-BET-Inhibition>". El documento WO 2015/084905 A1 se refiere a combinaciones farmacéuticas para el tratamiento del linfoma en un sujeto que lo necesita. El documento WO 2015/054099 A1 se refiere a combinaciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer de mama en un sujeto que lo necesita.

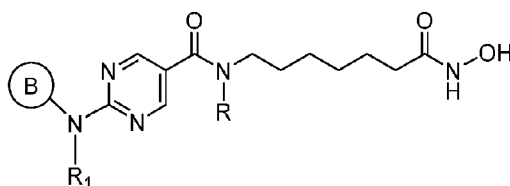
Debido a las toxicidades limitantes de la dosis de los inhibidores panselectivos de HDAC actuales, existe una necesidad continua de métodos mejorados para el tratamiento del cáncer.

Sumario

Con el fin de proporcionar tratamientos contra el cáncer alternativos, eficaces y menos tóxicos, en este documento se divulgan métodos para el tratamiento del cáncer y combinaciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de HDAC y un inhibidor de BET. Las combinaciones farmacéuticas y los métodos divulgados en este documento son bien tolerados y no exhiben las toxicidades limitantes de la dosis de terapias anteriores.

En un primer aspecto, la invención proporciona una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que el cáncer es cáncer de pulmón, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de la histona desacetilasa (HDAC6), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de bromodominio y motivo extraterminal (BET), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en la que el inhibidor selectivo de HDAC6 es un compuesto de fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que,

el anillo B es arilo o heteroarilo;

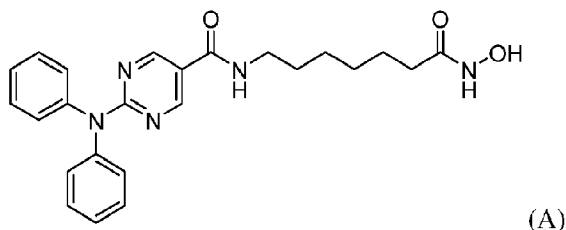
R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁₋₆;

y

R es H o alquilo C₁₋₆; y

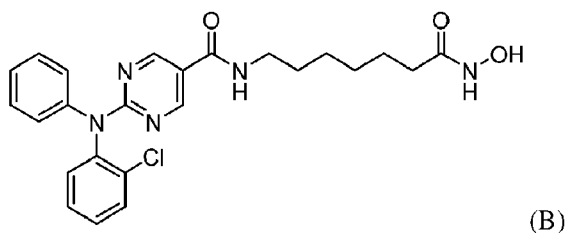
en el que el inhibidor de BET se selecciona del grupo que consiste en N-[6-(3-metanosulfonamido-4-metilfenil)-3-metil-
 [1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-8-il]carbamato (bromosporina), 2-[2-(3-cloro-4-metoxifenil)etil]-5-(dimetil-1,2-oxazol-4-il)-
 1-[(2S)-2-(morfolin-4-il)propil]-1H-1,3-benzodiazol (CBP30), (6S)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][
 1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-acetamida (CPI-203), 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-4H-[1,2]oxazolo[5,4-
 5 5 d][2]benzazepin-4-il]acetamida (CPI-0610), [(2S)-5-(ciclobutiloxi)-3,4-dihidro-2-metil-6-[1-(4-piperidinil)-1H-pirazol-4-
 il]-1(2H)-quinolinil]ciclopropilmetanona (FT-1101), 7-(3,5-dimetil-1,2-oxazol-4-il)-8-metoxi-1-[(1R)-1-piridin-2-iletil]-3H-
 imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (GSK2820151), 7,3,5- dimetil-4-isoxazolil-1,3-dihidro-8-metoxi-1-[1R-1-(2-piridinil)etil]-
 2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (I-BET151), ácido 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidro-2-
 metil-6-quinolinil]-benzoico (I- BET726), (S)-2-(6-(4-clorofenil)-8-metoxi-4H-benzo[f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-
 10 4-il)-N-etilacetamida (I-BET-762), 7-(3,5-Dimetilisoxazol-4-il)-4-piridin-2-il-4,5-dihidroimidazo[1,5,4-
 de][1,4]benzoxazin-2(1H)-ona (INCB054329), 8-(6,7-dihidro-6-metil-7-oxo-1H-pirrol-2,3-c]piridin-4-il)-2,2,4-trimetil-6-
 (metilsulfonil)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (INCB057643), 3-(4-(2-(5-(3,5)-dimetilisoxazol-4-il)-1-(2-morfolinoetil)-
 1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)fenoxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (ISOX DUAL), ácido (6S)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-
 trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina-6 acético, éster 1,1-dimetiletílico (JQ1), 2-(4-morfolinil)-8-
 15 fenil-4H-1-benzopiran-4-ona (LY294002), 8-fenil-2-(1-piperazinil)-4H-1-benzopiran-4-ona, diclorhidrato (LY303511),
 (E)-4-[2-(2-amino-4-hidroxi-5-metilfenil)diazenil]-N-2-piridinilbencenosulfonamida (MS436), 4-(4-clorofenil)-N-(4-
 hidroxifenil)-2,3,9-trimetil-, (6S)-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina-6-acetamida (MK8628), 4-bromo-N-
 (2,3-dihidro-6-metoxi-1,3-dimetil-2-oxo-1H-bencimidazol-5-il)-2-metil-bencenosulfonamida (OF-1), 3-(3,5-dimetil-4-
 isoxazolil)-5-hidroxi- α -fenilbencenometanol (OXF BD 02), 2-metoxi-N-(3-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolin-6-
 20 il)bencenosulfonamida (PFI-1), (2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-[(1R,4R)-5-(2-piridinil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-2-
 propen-1-ona (PFI-3), 2-metoxi-N-(3-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolin-6-il)bencenosulfonamida (PF-6405761),
 2-[4-(2-hidroxi-3,5-dimetilfenil)-5,7-dimetoxi-4(3H)-quinazolinona (RVX-208), (S)-2-(4-(4-clorofenil)-2,3,9-
 trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-il)acetamida (TEN-010), 4-acetil-N-[5-[(dietilamino)sulfonil]-
 2-hidroxifenil]-3-etil-5-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (XD 14), y ZEN003694, o una sal farmacéuticamente aceptable
 25 de los mismos.

En otras realizaciones, R¹ es un arilo o heteroarilo. En otra realización, el compuesto de fórmula I es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización adicional, R¹ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está sustituido por un halo. En aún
 30 otra realización, más, el compuesto de fórmula I es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, el inhibidor de BET es JQ1.

En aún otra realización, el inhibidor selectivo de HDAC6 o el inhibidor de BET se administran en una dosis
 35 subterapéutica. En otra realización más, el inhibidor selectivo de HDAC6 induce la apoptosis de células cancerosas.

En determinadas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente
 aceptable.

En otra realización, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se formulan juntos como una única
 40 formulación. En otra realización más, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se formulan cada uno como
 formulaciones separadas.

Otros objetos, características y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Además,
 los ejemplos demuestran el principio de la divulgación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A muestra el porcentaje de células vivas determinado por la fracción del total de células que fueron negativas para el tinte de viabilidad viva/muerta después de cultivar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos durante 24 horas con inhibidores de HDAC.

- 5 La figura 1B muestra el porcentaje de células T CD4+FOXP3- (izquierda), células T CD8+ (centro) o monocitos CD3-CD14+ (derecha) en PBMC viables totales después del cultivo con los inhibidores de HDAC indicados.

La figura 1C muestra un resumen de las proporciones de células Treg CD4+Foxp3- después de un cultivo de 24 horas de PBMC de pacientes donantes sanos con los fármacos indicados. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 4-8 sujetos. * indica valor de $p < 0.05$, ** indica valor de $p < 0.001$, *** indica valor de $p < 0.0001$.

La figura 2A muestra el porcentaje de células Treg CD4+FOXP3- en PBMC de pacientes con NSCLC que se cultivaron con el compuesto A o entinostat durante 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 4 pacientes. * indica valor de $p < 0.05$.

15 La figura 2B muestra el porcentaje de células Treg CD4+FOXP3- en tumores de pacientes con NSCLC que se cultivaron con el compuesto A durante 72 horas. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 4 pacientes. * indica valor de $p < 0.05$.

La figura 3A muestra un resumen (izquierda) e histogramas representativos (derecha) de los niveles de expresión de CD69 en células T CD8+ seleccionadas dentro de las PBMC de pacientes con NSCLC que se cultivaron con el compuesto A o entinostat. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 4 pacientes con NSCLC. *** indica valor de $p < 0.0001$.

La figura 3B muestra un resumen (izquierda) e histogramas representativos (derecha) de los niveles de expresión de CD69 en células T CD4+ seleccionadas dentro de las PBMC de pacientes con NSCLC que se cultivaron con el compuesto A o entinostat. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 4 pacientes con NSCLC. * indica valor de $p < 0.05$.

25 La figura 3C muestra un resumen (izquierda) e histogramas representativos (derecha) de los niveles de expresión de CD69 en células T CD8+ seleccionadas dentro de PBMC de donantes sanos que se cultivaron con el compuesto A o entinostat durante 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 8 donantes sanos. ** indica valor de $p < 0.001$.

30 La figura 3D muestra un resumen (izquierda) e histogramas representativos (derecha) de los niveles de expresión de CD69 en células T CD4+ seleccionadas dentro de PBMC de donantes sanos que se cultivaron con el compuesto A o entinostat durante 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ SEM de muestras analizadas de 8 donantes sanos. * indica valor de $p < 0.05$.

La figura 3E muestra el fenotipo de PBMC que se cultivaron con el compuesto A o entinostat y se evaluaron adicionalmente mediante análisis de citofluorimetría. Se muestra un perfil representativo de la expresión de fosfo-STAT3 (arriba) o CD69 (abajo) en células T CD3+ totales de tres experimentos independientes analizados a partir de 3 donantes sanos.

La figura 4A muestra histogramas representativos de los niveles de expresión de MHC clase II (izquierda) y la molécula coestimuladora CD86 (derecha) en monocitos CD3-CD14+ activados de PBMC de pacientes con NSCLC después del cultivo con inhibidores de HDAC indicados durante 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 4 pacientes.

40 La figura 4B muestra histogramas representativos de los niveles de expresión de MHC clase II (izquierda) y la molécula coestimuladora CD86 (derecha) en macrófagos asociados a tumores CD45+CD68+CD11b+ en tumores citorreducidos después de cultivo con inhibidores de HDAC indicados durante 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 4 pacientes.

45 La figura 4C muestra histogramas representativos de los niveles de expresión de MHC clase II (izquierda) y la molécula coestimuladora CD86 (derecha) en monocitos CD3-CD14+ activados en PBMC de donantes sanos después del cultivo con inhibidores de HDAC indicados durante 24 horas.

La figura 4D muestra el porcentaje de proliferación de las células T respondedoras determinado por dilución de CTV en respuesta a la estimulación de las células CD14+. Los datos representan dos experimentos independientes. * indica valor de $p < 0.05$.

50 La figura 5A muestra la proporción de subconjuntos de células linfoides indicados en tumores de ratones KP.

La figura 5B muestra la proporción de subconjuntos de células linfoides indicados en tumores de ratones TL.

La figura 5C muestra la proporción de células T CD8+ a células Treg CD4+Foxp3+ en tumores de ratones KP y TL.

- La figura 5D muestra los niveles de expresión de PD-1 (izquierda), CTLA-4 (centro) y TIM3 (derecha) en células T CD3+ CD8+ infiltrantes de tumores en ratones tratados con vehículo o compuesto A como se indica. Los datos son la media $\pm$ SEM de 5-9 ratones por grupo.
- 5 La figura 5E muestra los niveles de expresión de PD-1 (izquierda), CTLA-4 (centro) y TIM3 (derecha) en células T CD3+ CD4+ Foxp3- infiltrantes de tumores en ratones tratados con vehículo o compuesto A como se indica. Los datos son la media $\pm$ SEM de 5-9 ratones por grupo.
- La figura 5F muestra los niveles de expresión de PD-1 (izquierda), CTLA-4 (centro) y TIM3 (derecha) en células T CD3+ CD4+Foxp3+infiltrantes de tumores en ratones tratados con vehículo o compuesto A como se indica. Los datos son la media $\pm$ SEM de 5-9 ratones por grupo.
- 10 La figura 5G muestra el porcentaje de subconjuntos de células T indicados que expresan Ki67 en tumores de ratones KP (izquierda) o TL (derecha) que fueron tratados con el compuesto A o vehículo como control. Los datos son la media $\pm$ SEM de 5-9 ratones por grupo.
- La figura 5H muestra la proporción de células T CD8+ infiltradas en tumores que expresan el marcador de activación CD69 después de la estimulación ex vivo. * indica valor de $p < 0.05$.
- 15 La figura 5I muestra la proporción de células Treg CD8 a CD4+Foxp3+(izquierda), el porcentaje de células T CD8+ que expresan el marcador de activación CD69 (centro) y los niveles de expresión de MHC clase II en macrófagos (derecha) en tumores de ratones KP tratados con el compuesto B o vehículo.
- La figura 5J muestra la estrategia de activación para macrófagos asociados a tumores (TAM) CD11b^{lo}CD11c+ en ratones GEM con el histograma correspondiente para la expresión de MHC clase II.
- 20 La figura 5K muestra gráficos de histograma representativos para los niveles de expresión de MHC clase II, CD80 y CD86 en TAM de ratones KP tratados como se indica.
- La figura 5L muestra los niveles de expresión de las moléculas MHC II en macrófagos asociados a tumores CD11c+ CD11b^{lo} en ratones KP y TL tratados con vehículo y compuesto A.
- 25 La figura 5M muestra los niveles de expresión de la molécula coestimuladora CD86 en macrófagos asociados a tumores CD11c+ CD11b^{lo} en ratones KP y TL tratados con vehículo y compuesto A.
- La figura 5N muestra el perfil de expresión génica de células T CD3+ clasificadas a partir de tumores de ratones tratados con vehículo frente a ratones tratados con el compuesto A.
- La figura 6 muestra la cinética de crecimiento tumoral después de 2 semanas de tratamiento con los fármacos y anticuerpos indicados. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo. * indica valor de $p < 0.05$.
- 30 La figura 7A muestra histogramas representativos de la expresión de PD-1 (izquierda) y CD69 (derecha) en células T. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.
- La figura 7B muestra histogramas representativos de la expresión PD-1 (izquierda), CD69 (centro) y Foxp3 (derecha) en Tregs.
- 35 La figura 7C muestra gráficos de histograma representativos que representan el porcentaje de células en proliferación según la dilución de CSFE.
- La figura 8A Muestra el cambio en el tamaño del tumor después de 2 semanas de tratamiento con los fármacos y anticuerpos indicados.
- La figura 8B muestra un promedio de células positivas para Ki67 de las áreas tumorales seleccionadas y se representó el total de caspasa 3 escindida en el área tumoral de cada portaobjetos. Se analizaron dos ratones.
- 40 La figura 8C muestra la supervivencia libre de progresión de los ratones en cada condición de tratamiento, donde la progresión de la enfermedad se clasificó como un aumento superior al 30 % en el volumen del tumor. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo. * indica valor de $p < 0.05$, ** indica valor de $p < 0.001$, *** indica valor de $p < 0.0001$.
- 45 La figura 8D muestra la cinética de crecimiento tumoral en ratones TL. Los datos son la media $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo.
- La figura 8E muestra la cinética de crecimiento tumoral en ratones B6. Los datos son la media $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo.
- La figura 9A muestra un resumen de la proporción CD8:Treg en ratones KP tratados como en la figura 8A. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

La figura 9B muestra un resumen de las poblaciones de células CD4+, CD8+ y CD4+Foxp3+ (Tregs) en los tumores de ratones KP que fueron tratados con JQ1 y/o el compuesto A. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

5 La figura 9C muestra el porcentaje de células T CD8+ que expresaron CD69 dentro de los leucocitos infiltrantes de tumores. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

La figura 9D muestra el porcentaje de células T CD8+ dentro de los leucocitos infiltrantes de tumores que secretaron IFN- γ según la intensidad fluorescente media después de la estimulación ex vivo. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

10 La figura 9E muestra el porcentaje de CD107 α expresado según la intensidad fluorescente media después de la estimulación ex vivo. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

La figura 9F muestra el porcentaje de células tumorales EpCam+ muertas determinado por poblaciones que se tiñeron positivamente para el tinte de discriminación vivo/muerto.

La figura 9G muestra un resumen de los niveles de expresión de MHC clase II en TAM en los tumores de ratones tratados. Los ratones de control recibieron vehículo solo. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

15 La figura 9H muestra un resumen de los niveles de expresión de CD86 en TAM en los tumores de ratones tratados. Los ratones de control recibieron vehículo solo. Los datos son la media $\pm$ SEM de 4-8 ratones por grupo.

La figura 10 muestra la estrategia de activación para los análisis FACS.

Descripción detallada

20 El microambiente tumoral contiene una variedad de células estromales/de soporte, incluidas aquellas de origen hematopoyético. En muchos modelos de investigación se ha demostrado que tipos de células específicas, tales como los linfocitos T, las células asesinas naturales (NK) y diversas células mieloides, desempeñan varias funciones en la configuración del curso de la respuesta inmune contra las células cancerosas. (Adam, J.K. et al., Immune responses in cancer. Pharmacol Ther, 2003. 99(1): p. 113- 32; Domagala-Kulawik, J., The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention. Transl Lung Cancer Res, 2015. 4(2): p. 177-90; Quail, D.F. and J.A. Joyce, Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med, 2013. 19(11): p. 1423-37). De particular importancia son las células presentadoras de antígenos (APC), que procesan antígenos asociados a tumores (TAA) y los presentan a células T potenciales reactivas a tumores en un procedimiento que conduce al cebado de células T. A pesar de su potencial para generar una respuesta antitumoral, las respuestas específicas de antígenos de las células T a menudo son inhibidas por células inmunosupresoras tales como las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y las células T reguladoras CD4+Foxp3+ (Facciabene, A. et al., T-regulatory cells: ke y players in tumor immune escape and angiogenesis. Cancer Res, 2012. 72(9): p. 2162-71). Además de los mecanismos celulares inhibidores que operan en el microambiente del tumor, las células cancerosas pueden evadir el reconocimiento inmunológico mediante la regulación negativa del ion de clase MHC en su superficie celular o amortiguar la función efectora de las células T mediante la regulación positiva de moléculas tales como PD-L1 que transducen señales inhibitorias a las células T. Esto pone de relieve la noción de que los agentes que promueven cambios inmunofenotípicos y funcionales positivos en las células inmunitarias pueden generar un microambiente tumoral más permisivo que favorezca una respuesta antitumoral potenciada.

40 Las HDAC son una familia de enzimas que modulan la expresión de genes o sus productos eliminando grupos acetilo de proteínas histonas y no histonas. Al hacerlo, regulan numerosos procedimientos celulares, algunos de los cuales han sido implicados en aspectos del desarrollo y comportamiento de tumores, como la diferenciación y la progresión del ciclo celular de células malignas, así como la apoptosis (Haberland, M. et al., *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nat Rev Genet, 2009. 10(1): p. 32-42; Licciardi, P.V. and T.C. Karagiannis, *Regulation of immune responses by histone deacetylase inhibitors*. ISRN Hematol, 2012. 2012: p. 690901; Roper, S. and M. Esteller, *The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer*. Mol Oncol, 2007. 1(1): p. 19-2). Se han realizado varios estudios para evaluar la utilidad relativa de los inhibidores de HDAC pan- e isoenzimas selectivos para la terapia del cáncer (Kroesen, M. et al., *HDAC inhibitors and immunotherapy: a double edged sword?* Oncotarget, 2014. 5(16): p. 6558-72; West, A.C. et al., *The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system*. Oncoimmunology, 2014. 3(1): p. e27414). Aunque se han demostrado resultados terapéuticos prometedores con el uso de inhibidores pan-HDAC, especialmente cuando se combinan con fármacos de quimioterapia, el uso de estos agentes se asocia con efectos adversos y toxicidad limitante de la dosis en los pacientes. Si bien muchos estudios traslacionales que exploran la eficacia terapéutica de los inhibidores de HDAC se han centrado en sus efectos sobre las células malignas, múltiples estudios han destacado la actividad inmunomoduladora de los inhibidores de HDAC cuando se usan solos o en combinación con otros agentes de inmunoterapia (Chinnaiyan, P. et al., *Modulation of radiation response by histone deacetylase inhibition*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. 62(1): p. 223- 9; Di Fazio, P. et al., *The pan-deacetylase inhibitor panobinostat inhibits growth of hepatocellular carcinoma models by alternative pathways of apoptosis*. Cell Oncol, 2010. 32(4): p. 285-300; Kroesen, 2014; Licciardi, 2012; Roper, 2007; Oeste, 2014). Los inhibidores pan-HDAC tienen limitaciones que incluyen una mala tolerabilidad, particularmente en combinación con fármacos estándar. Por ejemplo, el inhibidor panobinostat de

pan-HDAC provoca efectos citotóxicos directos mediante la inducción de apoptosis en líneas celulares tumorales (Di Fazio, 2010). Más allá de la destrucción autónoma directa de las células cancerosas, los modelos murinos de tumores epiteliales han demostrado que los inhibidores pan-HDAC específicos de clase pueden alterar la expresión de los ligandos NKG2D, afectando así la función lítica de las células NK contra las células cancerosas. Los efectos de los inhibidores de HDAC sobre los constituyentes celulares del microambiente inmunitario del tumor siguen siendo poco conocidos.

Los inhibidores del bromodominio son una segunda clase de moléculas que alteran los programas epigenéticos y transcripcionales celulares mediante la regulación del reconocimiento de residuos de lisina acetilada por la maquinaria transcripcional. JQ1 es un inhibidor bien caracterizado de la familia BET de proteínas que contienen bromodominios y puede regular indirectamente las huellas epigenéticas mediante la modulación de las interacciones de las histonas acetil transferasas (HAT) y las HDAC con factores de transcripción y proteínas involucradas en la expresión génica. Los efectos de los inhibidores de BET (por ejemplo, JQ1) sobre las células inmunitarias asociadas a tumores siguen siendo en gran medida desconocidos.

Los datos preclínicos y clínicos recientes generados con anticuerpos que se dirigen a puntos de control inmunológico, a saber, PD-(L)1 y CTLA4, demuestran que la inmunidad antitumoral puede impulsarse en múltiples tipos de tumores dirigiéndose a las interacciones inhibitoras entre las células T, las APC y las poblaciones de células tumorales. Sin embargo, si bien el uso de estos agentes representa un avance importante en el tratamiento del cáncer, sólo una minoría de pacientes responde en la mayoría de los tipos de tumores. Además, las barreras a la respuesta parecen diversas y están mal caracterizadas. Cada vez se reconoce más que la durabilidad de la inmunidad antitumoral depende de las contribuciones de las células inmunitarias. Como se describe en este documento, se identificaron ciertos efectos inmunomoduladores de moduladores epigenéticos de moléculas pequeñas, incluidos inhibidores de HDAC selectivos y no selectivos e inhibidores de BET. En este documento se describen cambios dinámicos notables con respecto al fenotipo y la función de las células T y monocitos/macrófagos en tejidos periféricos, así como en el microambiente tumoral causado por un inhibidor selectivo de HDAC6 (por ejemplo, el compuesto A). También se describen los efectos específicos de Treg de un inhibidor de BET. Una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor selectivo de HDAC6 (por ejemplo, Compuesto A) y un inhibidor de BET (por ejemplo, JQ1) facilitó una respuesta antitumoral sostenida en modelos de ratón inmunocompetentes modificados genéticamente de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Dado que el compuesto A demuestra un perfil de seguridad favorable en los ensayos clínicos actuales de cánceres hematológicos, su utilidad en combinación con la inhibición del bromodominio representa una combinación racional para el desarrollo traslacional para aumentar las respuestas inmunitarias antitumorales dirigiéndose a mecanismos distintos de los puntos de control inmunitarios.

En este documento se divulga una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BET para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita. También se proporcionan en este documento productos combinados y combinaciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor selectivo de HDAC6 (por ejemplo, un compuesto de fórmula I o fórmula II) y un inhibidor de BET.

Definiciones

A continuación se enumeran las definiciones de diversos términos usados en esta divulgación. Estas definiciones se aplican a los términos como se usan en esta especificación y reivindicaciones, a menos que se limiten de otro modo en casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más grande.

Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, el término "que comprende" puede incluir las realizaciones "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". Los términos "comprende(n)", "incluye(n)", "que tiene", "tiene", "puede", "contiene(n)" y sus variantes, como se usan en este documento, están destinados a ser abiertos. frases, términos o palabras de transición que requieren la presencia de los ingredientes/etapas nombrados y permiten la presencia de otros ingredientes/etapas. Sin embargo, se debe interpretar que dicha descripción también describe composiciones o procedimientos como "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" los compuestos enumerados, lo que permite la presencia únicamente de los compuestos nombrados, junto con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, y excluye otros compuestos.

El término "aproximadamente" generalmente indica una posible variación de no más del 10 %, 5 % o 1 % de un valor. Por ejemplo, "aproximadamente 25 mg/kg" indicará generalmente, en su sentido más amplio, un valor de 22.5-27.5 mg/kg, es decir, 25 ± 2.5 mg/kg.

El término "alquilo" se refiere a unidades estructurales de hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada que contienen, en determinadas realizaciones, entre uno y seis, o uno y ocho átomos de carbono. Ejemplos de las unidades estructurales de alquilo C_{1-6} incluyen, las unidades estructurales metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, neopentilo, *n*-hexilo; y ejemplos de las unidades estructurales alquilo C_{1-8} incluyen unidades estructurales de metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, neopentilo, *n*-hexilo, heptilo y octilo.

El número de átomos de carbono en un sustituyente alquilo se puede indicar mediante el prefijo " C_{x-y} ," donde *x* es el número mínimo e *y* es el número máximo de átomos de carbono en el sustituyente. Asimismo, una C_x cadena significa una cadena alquílica que contiene *x* átomos de carbono.

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillos carbocíclicos mono o policíclicos que tienen uno o más anillos aromáticos, condensados o no condensados, que incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo e idenilo.

El término "heteroarilo" se refiere a unidades estructurales o sistema de anillos mono o policíclico (por ejemplo, bi o tricíclico o más) condensados o no condensados que tienen al menos un anillo aromático, que tiene de cinco a diez átomos de los cuales un átomo del anillo se selecciona entre S, O y N; cero, uno o dos átomos del anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente de S, O y N; y los átomos restantes del anillo son carbono. Heteroarilo incluye piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo y quinoxalinilo.

El término "halo" se refiere a un halógeno, tal como flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "HDAC" se refiere a las histonas desacetilasas, que son enzimas que eliminan los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas centrales, lo que conduce a la formación de una cromatina condensada y transcripcionalmente silenciada. Actualmente se conocen 18 histonas desacetilasas, que se clasifican en cuatro grupos. Las HDAC de clase I, que incluyen HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, están relacionadas con el gen RPD3 de la levadura. Las HDAC de clase II, que incluyen HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10, están relacionadas con el gen Hda1 de la levadura. Las HDAC de clase III, que también se conocen como sirtuinas, están relacionadas con el gen Sir2 e incluyen SIRT1-7. Los HDAC de Clase IV, que contienen solo HDAC11, tienen características de los HDAC de Clase I y II. El término "HDAC" se refiere a una cualquiera o más de las 18 histonas desacetilasas conocidas, a menos que se especifique lo contrario.

El término "HDAC6 selectivo" significa que el compuesto se une a HDAC6 en un grado sustancialmente mayor, tal como 5X, 10X, 15X, 20X mayor o más, que a cualquier otro tipo de enzima HDAC, tal como HDAC1 o HDAC2. Es decir, el compuesto es selectivo para HDAC6 sobre cualquier otro tipo de enzima HDAC. Por ejemplo, un compuesto que se une a HDAC6 con un IC₅₀ de 10 nM y a HDAC1 con un IC₅₀ de 50 nM es selectivo para HDAC6. Por otro lado, un compuesto que se une a HDAC6 con un IC₅₀ de 50 nM y a HDAC 1 con un IC₅₀ de 60 nM no es selectivo para HDAC6.

El término "inhibidor" es sinónimo del término antagonista.

Un "inhibidor de BET" se dirige a proteínas de bromodominio y motivo extraterminal (BET), incluidas BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT. Las proteínas BET contienen un bromodominio que reconoce residuos de lisina acetilada. Los inhibidores de BET se unen a los bromodominios de las proteínas BET y alteran los programas epigenéticos y transcripcionales celulares. Por ejemplo, un inhibidor de BET incluye ABBV-075, BAY1238097, BMS986158, bromosporina, CBP30, CPI-203, CPI-0610, FT-1101, GSK2820151, I-BET151, I-BET726, I-BET-762 (GSK525762), INCB054329, INCB057643, ISOX DUAL, JQ1, LY294002, LY303511, MS436, MK8628 (OTX-015), OF-1, OXF BD 02, PFI-1, PFI-3, PF-6405761, RVX-208, TEN-010, XD 14 y ZEN003694.

Como se usa en este documento, el término "tratamiento" o "tratamiento" indica que el método, al menos, ha mitigado el cáncer. Un método para tratar comprende aplicar o administrar al sujeto una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET. Un método para tratar comprende aplicar o administrar a un tejido o línea celular aislado de un sujeto (por ejemplo, para diagnóstico o aplicaciones ex vivo), que tiene cáncer, una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET. El propósito de la aplicación o administración de la combinación farmacéutica es curar, sanar, aliviar, modificar, alterar, remediar, recuperar, mejorar, o afectar el cáncer. Tales tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, basándose en el conocimiento obtenido en el campo de la farmacogenómica. Los métodos de la divulgación pueden, al menos, mitigar la proliferación celular anormal. Por ejemplo, el método puede reducir la tasa de crecimiento del cáncer en un paciente, o prevenir el crecimiento continuo o la propagación del cáncer, o incluso reducir el alcance general del cáncer.

Como se usa en este documento, el término "paciente", "individuo" o "sujeto" se refiere a un ser humano o un mamífero no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tales como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y murinos. Preferiblemente, el paciente, sujeto o individuo es humano.

Como se usa en este documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, tal como un portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

Como se usa en este documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a derivados de los compuestos divulgados en los que el compuesto original se modifica convirtiendo un unidad estructural ácida o básico existente en su forma de sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables usadas en la presente divulgación incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables usadas en la presente divulgación se pueden sintetizar a partir del compuesto

original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales apropiadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa, 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical, 66, 2 (1977).

Como se usa en este documento, el término "composición" o "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil dentro de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un paciente o sujeto. Existen múltiples técnicas de administración de un compuesto en la técnica que incluyen administración intravenosa, oral, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar y tópica.

Como se usa en este documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o portador farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, estabilizador, agente dispersante, agente de suspensión, diluyente, excipiente, agente espesante, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, involucrado en llevar o transportar un compuesto útil dentro de la invención dentro o hacia el paciente de manera que pueda realizar su función prevista. Por lo general, tales construcciones se llevan o transportan desde un órgano o parte del cuerpo a otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación, incluido el compuesto útil dentro de la invención, y no perjudicial para el paciente. El término "combinación", "combinación terapéutica", "combinación farmacéutica" o "producto combinado" como se usa en este documento se refiere a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria, o una combinación no fija, o un kit de partes para la administración combinada donde dos o más agentes terapéuticos pueden administrarse de forma independiente, al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los socios de la combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

El término "terapia combinada" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descrito en la presente divulgación. Tal administración abarca la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única formulación que tiene una proporción fija de ingredientes activos o en formulaciones separadas (por ejemplo, cápsulas y/o formulaciones intravenosas) para cada ingrediente activo. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de manera secuencial o separada, ya sea aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes. Tal administración también abarca que cada componente se formule como una formulación separada que puede administrarse en diferentes momentos. Por ejemplo, el inhibidor selectivo de HDAC6 de fórmula I se puede dosificar diariamente. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de las afecciones o trastornos descritos en este documento.

El término "cantidad subterapéuticamente eficaz" o "dosis subterapéutica" es una cantidad o dosis del ingrediente activo (por ejemplo, un inhibidor selectivo de HDAC6 o un inhibidor de BET), que, cuando se administra a un paciente por sí solo, no inhibe completamente con el tiempo la actividad biológica del objetivo previsto.

El término "efecto sinérgico" se refiere a la acción de dos agentes, tales como, por ejemplo, un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET, que producen un efecto, por ejemplo, de ralentización de la progresión sintomática del cáncer, o de los síntomas del mismo, que es mayor que la simple suma de los efectos de cada fármaco administrado por separado.

Como se usa en este documento, el término "resistente" o "refractivo" a un agente terapéutico cuando se refiere a un paciente con cáncer significa que el cáncer tiene resistencia innata, o lograda, a los efectos del agente terapéutico como resultado del contacto con el agente terapéutico. Dicho de otra manera, el paciente con cáncer se resiste al estándar de atención habitual asociado con el agente terapéutico particular.

Como se usa en este documento, "sin tratamiento previo" se refiere al paciente que no ha recibido previamente tratamiento con un fármaco, ya sea en investigación o aprobado, para el cáncer en particular, un inhibidor de BET.

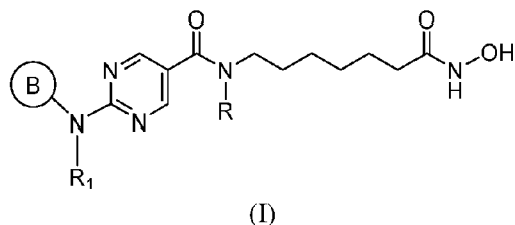
Alternativamente, los pacientes tratados según los métodos de la divulgación pueden tener "experiencia en tratamiento". Como se usa en este documento, "tratamiento experimentado" se refiere a un paciente que ha tenido al menos un ciclo previo de terapia contra el cáncer, en particular un inhibidor de BET. En algunas realizaciones, la última dosis en este curso previo ocurrió al menos tres meses antes de implementar un método según la presente divulgación.

Inhibidores de histona desacetilasa (HDAC)

En este documento se divulga un inhibidor de HDAC y un inhibidor de BET para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita. En este documento se proporcionan combinaciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento del cáncer, en las que el cáncer es cáncer de pulmón, que comprenden un inhibidor de HDAC y un inhibidor de BET.

Las combinaciones y usos farmacéuticos divulgados en este documento comprenden un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC). El inhibidor de HDAC es un inhibidor selectivo de HDAC6.

El inhibidor selectivo de HDAC6 es un compuesto de fórmula I:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
 en la que,
 el anillo B es arilo o heteroarilo;

R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁₋₆;
 y

- 10 R es H o alquilo C₁₋₆.

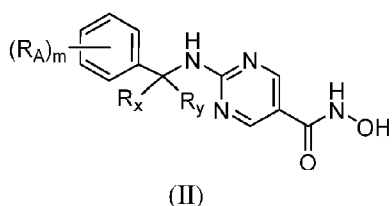
Los compuestos representativos de fórmula I incluyen:

Compuesto A 2-(difenilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidin-5-carboxamida IC₅₀(nM) HDAC6 = 10 HDAC3 = 84	Compuesto B 2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidin-5-carboxamida IC₅₀(nM) HDAC6 = 4 HDAC3 = 76
--	---

- 15 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de HDAC6 es el compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto A también se conoce como ricolinostat. En otras realizaciones, el inhibidor selectivo de HDAC6 es el compuesto B o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La preparación y las propiedades de los inhibidores selectivos de HDAC6 según la fórmula I se proporcionan en las Solicitudes de Patente Internacionales Nos. PCT/US2011/021982 y PCT/US2014/059238.

- 20 También se divulga en este documento un inhibidor selectivo de HDAC6 de un compuesto de fórmula II (que no forma parte de la presente invención):



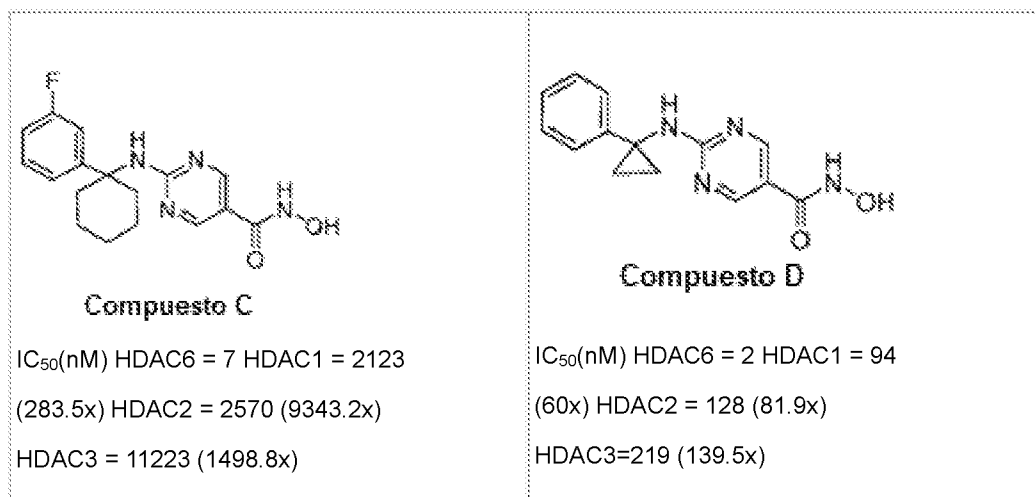
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que,

R_x y R_y junto con el carbono al que cada uno está unido, forman ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo;

cada R_A es independientemente alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, halo, OH, -NO₂, -CN o -NH₂; y m es 0, 1 o 2.

5 Los compuestos representativos de fórmula II incluyen:



o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

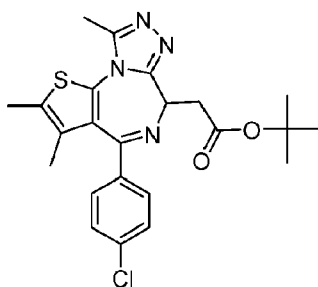
La preparación y las propiedades de los inhibidores selectivos de HDAC6 según la fórmula II se proporcionan en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2011/060791.

10 Otro inhibidor selectivo de HDAC6 de fórmula II es la tubastatina A, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Inhibidor de bromodominio y proteína con motivo extraterminal (BET)

Las combinaciones farmacéuticas para el uso divulgado en este documento comprenden un inhibidor de BET. El inhibidor de BET se selecciona del grupo que consiste en N-[6-(3-metanosulfonamido-4-metilfenil)-3-metil-
15 [1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-8-il] carbamato (bromosporina), 2-[2-(3-cloro-4-metoxifenil)etil]-5-(dimetil-1,2-oxazol-4-il)-1-[(2S)-2-(morfolin-4-il)propil]-1H-1,3-benzodiazol (CBP30), (6S)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-acetamida (CPI-203), 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-4H-[1,2]oxazolo[5,4-d][2]benzazepin-4-il]acetamida (CPI-0610), [(2S)-5-(ciclobutiloxi)-3,4-dihidro-2-metil-6-[1-(4-piperidinil)-1H-pirazol-4-il]-1(2H)-quinolinil]ciclopropilmetanona (FT-1101), 7-(3,5-dimetil-1,2-oxazol-4-il)-8-metoxi-1-[(1R)-1-piridin-2-ilet]l-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (GSK2820151), 7,3,5-dimetilo-4-isoxazolil-1,3-dihidro-8-metoxi-1-[1R-1-(2-piridinil)etil]-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (I-BET151), ácido 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-1,2,3,4-tetrahydro-2-metil-6-quinolinil]-benzoico (I-BET726), (S)-2-(6-(4-clorofenil)-8-metoxi-4H-benzo[f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-4-il)-N-etilacetamida (I-BET-762), 7-(3,5-Dimetilisoxazol-4-il)-4-piridin-2-il-4,5-dihidroimidazo[1,5,4-de][1,4]benzoxazin-2(1H)-ona (INCB054329), 8-(6,7-dihidro-6-metil-7-oxo-1H-pirrol-2,3-c)piridin-4-ilo)-2,2,4-trimetil-6-(metilsulfonil)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (INCB057643), 3-(4-(2-(5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-1-(2-morfolinoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)fenoxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (ISOX DUAL), ácido (6S)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina-6-acético, éster 1,1-dimetiletilico (JQ1), 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirran-4-ona (LY294002), 8-fenil-2-(1-piperazinil)-4H-1-benzopirran-4-ona, diclorhidrato (LY303511), (E)-4-[2-(2-amino-4-hidroxi-5-metilfenil)diazetil]-N-2-piridinilbencenosulfonamida (MS436), 4-(4-clorofenil)-N-(4-hidroxifenil)-2,3,9-trimetil-, (6S)-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina-6-acetamida (MK8628), 4-bromo-N-(2,3-dihidro-6-metoxi-1,3-dimetil-2-oxo-1H-bencimidazol-5-il)-2-metil-bencenosulfonamida (OF-1), 3-(3,5-dimetil-4-isoxazolil)-5-hidroxi-α-fenilbencenometanol (OXF BD 02), 2-metoxi-N-(3-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolin-6-il) bencenosulfonamida (PFI-1), (2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-[(1R,4R)-5-(2-piridinil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-2-propen-1-ona (PFI-3), 2-metoxi-N-(3-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolin-6-il)bencenosulfonamida (PF-6405761), 2-[4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5,7-dimetoxi-4(3H)-quinazolinona (RVX-208), (S)-2-(4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-il)acetamida (TEN-010), 4-acetil-N-[5-[(dietilamino)sulfonil]-2-hidroxifenil]-3-etil-5-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (XD 14), y ZEN003694, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, el inhibidor de BET es JQ1 o (+)-JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En otra realización, el inhibidor de BET es JQ1:



(JQ1),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En aún otra realización, el inhibidor de BET es (+)-JQ1. En otra realización más, el inhibidor de BET (+)-JQ1 se denomina JQ1. JQ1 es un inhibidor de BET bien conocido (Filippakopoulos, P. et al., *Selective Inhibition of BET Bromodomains*. Nature, 2010. 468: p. 1067-73; Belkina, A. C. et al., *BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2012. 12(7): p. 465- 77).

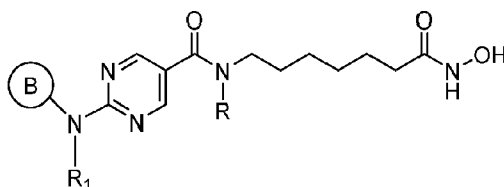
En algunas realizaciones, los compuestos descritos en este documento no están solvatados. En otras realizaciones, uno o más de los compuestos están en forma solvatada. Como se sabe en la técnica, el solvato puede ser cualquiera de los disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares.

Aunque los compuestos de fórmulas I y II se representan en sus formas neutras, en algunas realizaciones, estos compuestos se usan en una forma de sal farmacéuticamente aceptable (los compuestos según la fórmula II no son parte de la presente invención).

Combinaciones y composiciones farmacéuticas

De acuerdo con lo anterior, en este documento se proporciona una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que el cáncer es cáncer de pulmón, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de la histona desacetilasa (HDAC6) como se define en las reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de bromodominio y motivo extraterminal (BET) como se define en las reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El inhibidor selectivo de HDAC6 es un compuesto de fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que,

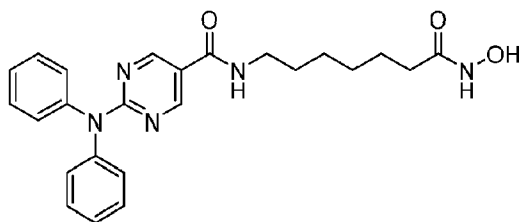
el anillo B es arilo o heteroarilo;

R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁₋₆;

y

R es H o alquilo C₁₋₆.

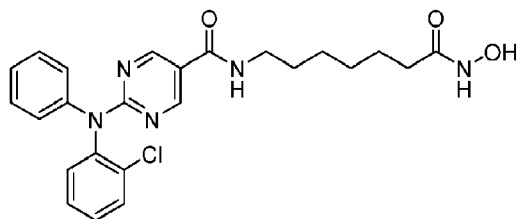
En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula I es el compuesto A



(A),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En aún otras realizaciones más, el compuesto de fórmula I es el compuesto B



(B),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 En aún otra realización, más, la combinación farmacéutica comprende el compuesto A, inhibidor selectivo de HDAC6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor de BET JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización más, la combinación farmacéutica comprende el compuesto B inhibidor selectivo de HDAC6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor de BET JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 La combinación farmacéutica es para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en la que el cáncer es cáncer de pulmón. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer resistente o refractario.

En una realización, el sujeto no ha recibido tratamiento previo.

En otras realizaciones de las combinaciones farmacéuticas anteriores, la combinación farmacéutica comprende además uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

- 15 Métodos para tratar el cáncer (no dentro del alcance de la invención actualmente reivindicada)

Se divulgan métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de HDAC y un inhibidor de BET.

- 20 El sujeto considerado en este documento es por lo general un ser humano. Sin embargo, el sujeto puede ser cualquier mamífero para el que se desee tratamiento. Por tanto, los métodos descritos en este documento se pueden aplicar tanto a aplicaciones humanas como veterinarias.

- 25 Como tal, en una realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BET. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de HDAC6 o el inhibidor de BET se administran en una dosis subterapéutica.

En otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6 de fórmula I y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BET.

- 30 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6 de fórmula II y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BET.

- 35 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización más, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 40 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 45 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto D, o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En algunas realizaciones de los métodos divulgados en este documento, la célula es una célula cancerosa. En otra realización, la célula es una célula de cáncer de pulmón. En otra realización más, la célula es una célula de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otra realización más, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En aún otra realización, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En otra realización más, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En otra realización más, en este documento se divulga un método para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de JQ1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el inhibidor selectivo de HDAC6 induce la apoptosis de células cancerosas.

40 En otras realizaciones, se divulgan métodos para disminuir la viabilidad celular de las células cancerosas en un sujeto con cáncer mediante la administración de una combinación farmacéutica divulgada en este documento.

En otra realización, se divulgan métodos para aumentar sinérgicamente la apoptosis de células cancerosas en un sujeto con cáncer mediante la administración a un sujeto de una combinación farmacéutica descrita en este documento.

45 En otra realización más, se divulgan métodos para reducir los linfocitos T reguladores circulantes (Tregs) en un sujeto con cáncer administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BET o una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica divulgada en este documento. En algunas realizaciones, las Treg son Treg CD4⁺ FOXP3⁺.

50 En aún otra realización, se divulgan métodos para alterar la expresión de complejos presentadores de antígenos en un sujeto con cáncer mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica divulgada en este documento.

En una realización adicional, se divulgan métodos para tratar el cáncer aumentando la función coestimuladora de las células presentadoras de antígenos en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad

terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica divulgada en este documento. En algunas realizaciones, la proteína presentadora es CD86 y la expresión aumenta. En otra realización, la proteína presentadora es MHC II y la expresión aumenta.

5 En una realización adicional, se divulgan métodos para tratar el cáncer mediante la activación de células T en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica divulgada en este documento. En algunas realizaciones, la expresión de CD69 aumenta. En otra realización, las células T son células T CD4⁺ positivas para CD69. En otra realización, las células T son células T CD8⁺ positivas para CD69.

10 En este documento se divulga un método para disminuir la proliferación celular de células cancerosas en un sujeto con cáncer mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica divulgada en este documento.

15 En este documento se divulgan métodos para regular positivamente la actividad funcional de los linfocitos en un sujeto que lo necesita. Específicamente, se divulgan métodos para regular positivamente la actividad funcional de los linfocitos en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de HDAC6, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación farmacéutica divulgada en este documento. En algunas realizaciones, el linfocito es una célula T. En otra realización, la actividad funcional es una activación transitoria independiente de TCR.

20 En determinadas realizaciones de los métodos anteriores, el cáncer es cáncer de pulmón. En otra realización de los métodos anteriores, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas o tumor carcinoide de pulmón. En una realización adicional de los métodos anteriores, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el cáncer es cáncer resistente o refractario.

25 En determinadas realizaciones de los métodos anteriores, el inhibidor selectivo de HDAC6 se selecciona del grupo que consiste en el compuesto A, el compuesto B, el compuesto C, el compuesto D, la tubastatina A o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor de BET es JQ1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Administración/Dosis

En algunas realizaciones del uso reivindicado, el inhibidor selectivo de HDAC6 (un compuesto de fórmula I) se administra simultáneamente con el inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones.

30 La administración simultánea por lo general significa que ambos compuestos ingresan al paciente exactamente al mismo tiempo. Sin embargo, la administración simultánea también incluye la posibilidad de que el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET entren en el paciente en momentos diferentes, pero la diferencia de tiempo es suficientemente minúscula como para que al primer compuesto administrado no se le proporcione el tiempo necesario para surtir efecto en el paciente antes de la entrada del segundo compuesto administrado. Estos tiempos de retardo corresponden por lo general a menos de 1 minuto y, más por lo general, a menos de 30 segundos. En un ejemplo, en el que los compuestos están en solución, se puede lograr la administración simultánea administrando una solución que contiene la combinación farmacéutica de compuestos. En otro ejemplo, se puede emplear la administración simultánea de soluciones separadas, una de las cuales contiene el inhibidor selectivo de HDAC6 y la otra contiene el inhibidor de BET. En un ejemplo en el que los compuestos están en forma sólida, se puede lograr la administración simultánea administrando una composición que contiene la combinación farmacéutica de compuestos. Alternativamente, se puede lograr la administración simultánea administrando dos composiciones separadas, una que comprende el inhibidor selectivo de HDAC6 y la otra que comprende el inhibidor de BET. En otra realización, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se administran sustancialmente al mismo tiempo.

45 En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica de compuestos exhibe un efecto sinérgico (es decir, mayor que el efecto aditivo) en el tratamiento del cáncer. El término "efecto sinérgico" se refiere a la acción de dos agentes, tales como, por ejemplo, un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET, produciendo un efecto, por ejemplo, retardando la progresión sintomática del cáncer o los síntomas del mismo, que es mayor que la simple suma de los efectos de cada fármaco administrado por sí mismo. Un efecto sinérgico se puede calcular, por ejemplo, usando métodos adecuados como la ecuación Sigmoide-Emax (Holford, N. H. G. and Scheiner, L. B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. and Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación del efecto mediano (Chou, T. C. and Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Cada ecuación mencionada anteriormente se puede aplicar a datos experimentales para generar un gráfico correspondiente que ayude a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Las gráficas correspondientes asociadas con las ecuaciones mencionadas anteriormente son la curva concentración-efecto, la curva de isoblograma y la curva de índice combinado, respectivamente.

55 En otras realizaciones, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET no se administran simultáneamente, pero los dos agentes exhiben un efecto sinérgico. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de HDAC6 se administra

- antes que el inhibidor de BET. En otras realizaciones, el inhibidor de BET se administra antes que el inhibidor selectivo de HDAC6. La diferencia horaria en administraciones no simultáneas puede ser superior a 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, dos horas, tres horas, seis horas, nueve horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En otras realizaciones, se proporciona tiempo al
- 5 primer compuesto administrado para que surta efecto en el paciente antes de que se administre el segundo compuesto administrado. Generalmente, la diferencia de tiempo no se extiende más allá del tiempo para que el primer compuesto administrado complete su efecto en el paciente, o más allá del tiempo para que el primer compuesto administrado se elimine o desactive total o sustancialmente en el paciente. En otra realización, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se administran en momentos diferentes.
- 10 En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se formulan juntos como una única formulación.
- En otras realizaciones, el inhibidor de HDAC y el inhibidor de BET se formulan cada uno como formulaciones separadas.
- 15 En algunas realizaciones, uno o ambos el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se administran en una cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un inhibidor selectivo de HDAC6 (un compuesto de fórmula I) o de un inhibidor de BET que, cuando se administra a un paciente por sí solo, trata eficazmente el cáncer. Una cantidad que demuestra ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" en un caso dado, para un sujeto en particular, puede no ser eficaz para el 100 % de los sujetos tratados de manera similar para la enfermedad o afección en consideración, incluso aunque dicha dosificación se considere una
- 20 "cantidad terapéuticamente eficaz" por profesionales expertos. La cantidad del compuesto que corresponde a una cantidad terapéuticamente eficaz depende en gran medida del tipo de cáncer, el estadio del cáncer, la edad del paciente que se está tratando y otros hechos. En general, las cantidades terapéuticamente eficaces de estos compuestos son bien conocidas en la técnica, tales como las proporcionadas en las referencias de respaldo citadas anteriormente.
- 25 En otras realizaciones, uno o ambos del inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se administran en una cantidad o dosificaciones subterapéuticamente eficaz. Una cantidad subterapéuticamente eficaz es una cantidad de inhibidor selectivo de HDAC6 (un compuesto de fórmula I) o un inhibidor de BET que, cuando se administra a un paciente por sí solo, no inhibe completamente con el tiempo la actividad biológica de la diana deseada.
- 30 Ya sea que se administre en cantidades terapéuticas o subterapéuticas, la combinación farmacéutica del inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET debería ser eficaz en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, una cantidad subterapéutica de un compuesto del inhibidor de BET puede ser una cantidad eficaz sí, cuando se combina con un compuesto de fórmula I (inhibidor selectivo de HDAC6), la combinación farmacéutica es eficaz en el tratamiento del cáncer.
- 35 Las combinaciones farmacéuticas para el uso reivindicado incluyen un inhibidor selectivo de HDAC6 de fórmula I y un inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones. Por tanto, en una realización, las combinaciones farmacéuticas incluyen el compuesto A y un inhibidor de BET. En otra realización, las combinaciones farmacéuticas incluyen el compuesto B y un inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones. Estas realizaciones exhiben sinergia de modo que se pueden usar cantidades subterapéuticas del inhibidor selectivo de HDAC6 o del inhibidor de BET.
- 40 En diferentes realizaciones, dependiendo de la combinación farmacéutica y las cantidades efectivas usadas, la combinación farmacéutica de compuestos puede inhibir el crecimiento del cáncer, lograr la estasis del cáncer o incluso lograr una regresión sustancial o completa del cáncer.
- Si bien las cantidades de un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET deberían dar como resultado un tratamiento eficaz del cáncer, las cantidades, cuando se combinan, preferiblemente no son excesivamente tóxicas
- 45 para el paciente (es decir, las cantidades están preferiblemente dentro de los límites de toxicidad establecidos por las directrices médicas). En algunas realizaciones, ya sea para prevenir una toxicidad excesiva y/o proporcionar un tratamiento más eficaz del cáncer, se proporciona una limitación en la dosificación total administrada. Por lo general, las cantidades consideradas en este documento son por día; sin embargo, en este documento también se consideran ciclos de medio día y de dos o tres días.
- 50 Se pueden utilizar diferentes regímenes de dosificación para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, una dosis diaria, tal como cualquiera de las dosificaciones de ejemplo descritas anteriormente, se administra una, dos, tres o cuatro veces al día durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días. Dependiendo del estadio y la gravedad del cáncer, se puede emplear un tiempo de tratamiento más corto (por ejemplo, hasta cinco días) junto con una dosis alta, o un tiempo de tratamiento más largo (por ejemplo, diez o más días, semanas o un mes, o más) se
- 55 pueden emplear junto con una dosis baja. En algunas realizaciones, se administra una dosis una o dos veces al día en días alternos. En algunas realizaciones, cada dosificación contiene tanto un inhibidor selectivo de HDAC6 como un inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones para administrarse como una dosis única, mientras que en

otras realizaciones, cada dosificación contiene un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones pa ser administrados como dosificaciones separadas.

Los inhibidores selectivos de HDAC6, los inhibidores de BET o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, se pueden administrar mediante cualquiera de los modos de administración aceptados o agentes conocidos en la técnica. Los compuestos se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, nasal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), tópica, transdérmica, intravaginal, intravesical, intracisternal o rectal. La forma de dosificación puede ser, por ejemplo, un polvo sólido, semisólido, liofilizado o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas de gelatina blandas, elásticas o duras, polvos, soluciones, suspensiones, supositorios, aerosoles. o similares, preferiblemente en formas farmacéuticas unitarias apropiadas para la administración sencilla de dosificaciones precisas. Una vía de administración particular es la oral, particularmente aquella en la que se puede ajustar un régimen de dosificación diario conveniente según el grado de gravedad de la enfermedad que se va a tratar.

Como se analizó anteriormente, el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET de la combinación farmacéutica para el uso reivindicado se pueden administrar en una dosis unitaria única o en formas de dosificación separadas. De acuerdo con lo anterior, la frase "combinación farmacéutica" incluye una combinación de dos fármacos en una forma de dosificación única o en formas de dosificación separadas, es decir, Los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables descritos a lo largo de la solicitud se pueden combinar con un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones en una dosis unitaria única, así como combinarse individualmente con un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET como se define en las reivindicaciones cuando estos compuestos se administran por separado.

Los agentes auxiliares y adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, agentes conservantes, humectantes, suspensores, edulcorantes, saborizantes, perfumantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de los microorganismos generalmente se logra mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos. También pueden incluirse agentes isotónicos. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retrasen la absorción. Los agentes auxiliares también pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes reguladores del pH y antioxidantes.

Se pueden preparar formas de dosificación sólidas con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes pacificantes y pueden tener una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una determinada parte del tracto intestinal de forma retardada. Ejemplos de composiciones embebidas que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si corresponde, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación se preparan, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., los inhibidores selectivos de HDAC6 o inhibidores de BET descritos en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador para formar de ese modo una solución o suspensión.

Generalmente, dependiendo del modo de administración previsto, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán aproximadamente del 1 % a aproximadamente 99 % en peso de los compuestos descritos en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y de 99 % a 1 % en peso de un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición estará entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 75 % en peso de un compuesto descrito en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

Los métodos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990).

Kits (que no forman parte de la presente invención)

Se divulgan los kits. Los kits incluyen paquetes que comprenden los compuestos o las composiciones de la divulgación. En algunas realizaciones, los kits comprenden un inhibidor selectivo de HDAC6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de BET, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La frase "paquete" significa cualquier recipiente que contenga compuestos o composiciones presentadas en este documento. En algunas realizaciones, el paquete puede ser una caja o un envoltorio. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Ejemplos de materiales de envasado farmacéutico incluyen botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos y cualquier material de envasado apropiado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previsto.

El kit también puede contener elementos que no están contenidos dentro del paquete, pero que están unidos al exterior del paquete, por ejemplo, pipetas.

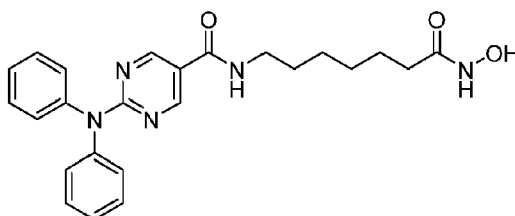
Los kits pueden contener además instrucciones para administrar compuestos o composiciones de la divulgación a un paciente. Los kits también pueden incluir instrucciones para su uso aprobados de los compuestos de este documento por agencias reguladoras, tales como the United States Food and Drug Administration. Los kits también pueden contener etiquetas o prospectos de productos para los compuestos. El(los) paquete(s) y/o cualquier prospecto del producto pueden ser aprobados por las agencias reguladoras. Los kits pueden incluir compuestos en fase sólida o en fase líquida (tales como las soluciones reguladoras proporcionadas) en un paquete. Los kits también pueden incluir soluciones reguladoras para preparar soluciones para realizar los métodos y pipetas para transferir líquidos de un recipiente a otro.

Ejemplos

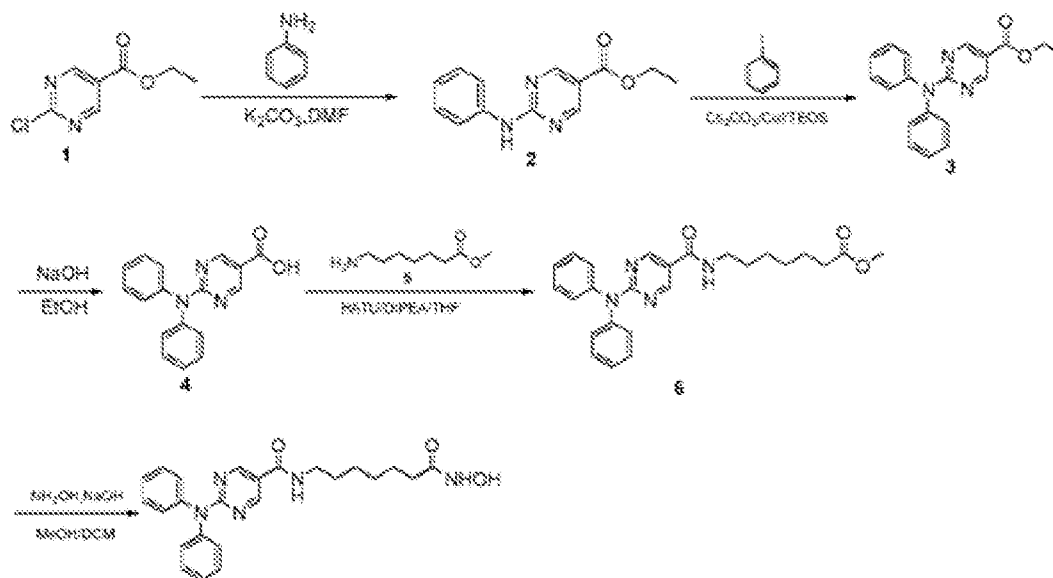
A continuación se exponen ejemplos con fines ilustrativos y para describir determinadas realizaciones específicas. Las definiciones de las variables en las estructuras de los esquemas en este documento son proporcionales a las de las posiciones correspondientes en las fórmulas presentadas en este documento.

La síntesis de los compuestos de fórmula I se proporciona en las Solicitudes de Patente Internacionales Nos. PCT/US2011/021982 (Compuesto B) y PCT/US2014/059238 (Compuestos A y B). La síntesis de los compuestos de fórmula II (Compuestos C y D) se proporciona en PCT/US2011/060791.

Ejemplo 1: Síntesis de 2-(difenilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto A)



Esquema de reacción



Síntesis del producto intermedio 2: Una mezcla de anilina (3.7 g, 40 mmol), compuesto 1 (7.5 g, 40 mmol) y K_2CO_3 (11 g, 80 mmol) en DMF (100 ml) se desgasificó y se agitó a 120 °C en atmósfera de N_2 durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió hasta t.a. y se diluyó con EtOAc (200 ml), luego se lavó con salmuera saturada (200 ml x 3). Las capas orgánicas se separaron y se secaron sobre Na_2SO_4 , se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1) para dar el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (6.2 g, 64 %).

Síntesis del producto intermedio 3: una mezcla del compuesto 2 (6.2 g, 25 mmol), yodobenceno (6.12 g, 30 mmol), CuI (955 mg, 5.0 mmol), Cs_2CO_3 (16.3 g, 50 mmol) en TEOS (200 ml) se desgasificó y se purgó con nitrógeno. La

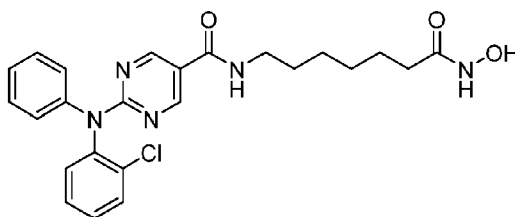
mezcla resultante se agitó a 140 °C, durante 14 horas. Después de enfriar a t.a., el residuo se diluyó con EtOAc (200 ml). Se agregaron EtOH al 95 % (200 ml) y NH_4F sobre gel de sílice [50 g, preparado previamente mediante la adición de NH_4F (100 g) en agua (1500 ml) a gel de sílice (500 g, malla 100-200)] y la mezcla resultante se mantuvo t.a., durante 2 horas. Los materiales solidificados se filtraron y se lavaron con EtOAc. El filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc = 10/1) para dar un sólido de color amarillo (3 g, 38 %).

Síntesis del producto intermedio 4: Se agregó NaOH 2 N (200 ml) a una solución del compuesto 3 (3.0 g, 9.4 mmol) en EtOH (200 ml). La mezcla se agitó a 60 °C, durante 30 min. Después de la evaporación del disolvente, la solución se neutralizó con HCl 2 N para dar un precipitado de color blanco. La suspensión se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml) y las capas orgánicas se separaron, se lavaron con agua (2 x 100 ml), salmuera (2 x 100 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 . La eliminación del disolvente dio un sólido de color marrón (2.5 g, 92 %).

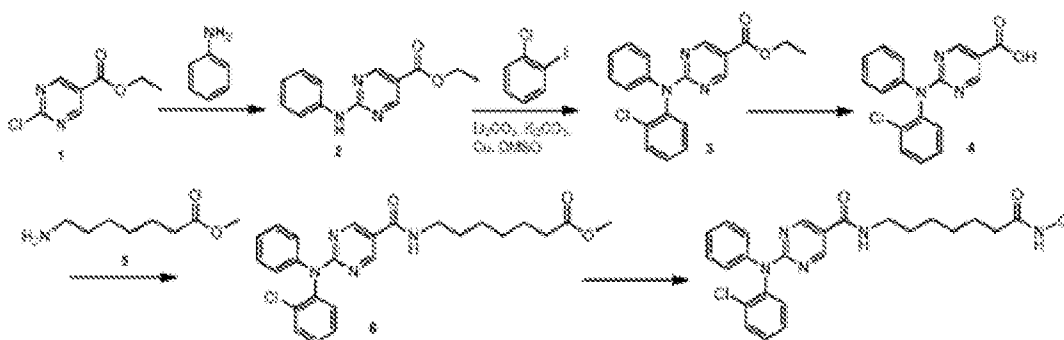
Síntesis del producto intermedio 6: una mezcla del compuesto 4 (2.5 g, 8.58 mmol), compuesto 5 (2.52 g, 12.87 mmol), HATU (3.91 g, 10.30 mmol) y DIPEA (4.43 g, 34.32 mmol) se agitaron a t.a., durante la noche. Después de filtrar la mezcla de reacción, el filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éteres de petróleo/EtOAc = 2/1) para dar un sólido de color marrón (2 g, 54 %).

Síntesis de 2-(difenilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidin-5-carboxamida (Compuesto A): Una mezcla del compuesto 6 (2.0 g, 4.6 mmol), hidróxido de sodio (2 N, 20 mL) en MeOH (50 ml) y DCM (25 ml) se agitó a 0 °C, durante 10 min. Se enfrió hidroxilamina (50 %) (10 ml) a 0 °C y se agregó a la mezcla. La mezcla resultante se agitó a t.a., durante 20 min. Después de eliminar el disolvente, la mezcla se neutralizó con HCl 1 M para dar un precipitado de color blanco. El producto en bruto se filtró y se purificó mediante HPLC previa para dar un sólido de color blanco (950 mg, 48 %).

Ejemplo 2: Síntesis de 2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidin-5-carboxamida (Compuesto B)



Esquema de reacción:



Síntesis del producto intermedio 2: Véase la síntesis del producto intermedio 2 en el ejemplo 1.

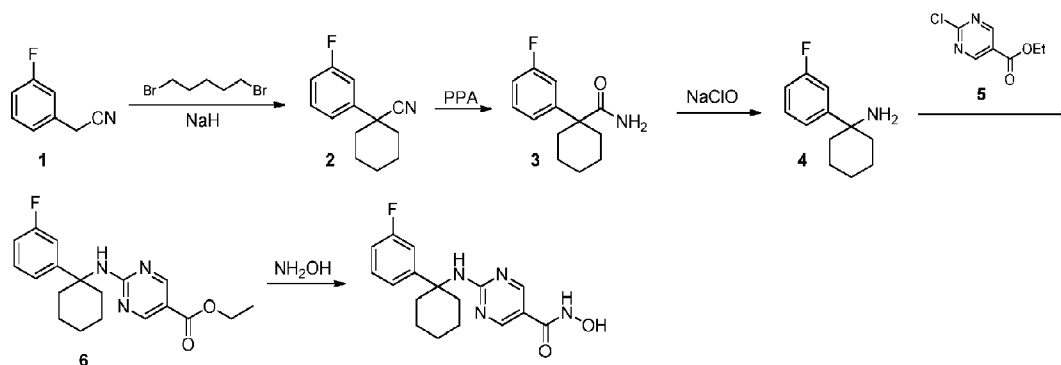
Síntesis del producto intermedio 3: Una mezcla del compuesto 2 (69.2 g, 1 equiv.), 1-cloro-2-yodobenceno (135.7 g, 2 equiv.), Li_2CO_3 (42.04 g, 2 equiv.), K_2CO_3 (39.32 g, 1 equiv.), Cu (1 equiv. 45 μm) en DMSO (690 ml) se desgasificó y se purgó con nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 140 °C. El procesamiento de la reacción dio el compuesto 3 con un rendimiento del 93 %.

Síntesis del producto intermedio 4: Véase la síntesis del producto intermedio 4 en el ejemplo 1.

Síntesis del producto intermedio 6: Véase la síntesis del producto intermedio 6 en el ejemplo 1.

Síntesis de 2-((2-clorofenil)(fenil)amino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil)pirimidin-5-carboxamida (Compuesto B): Véase la síntesis del compuesto A en el ejemplo 1.

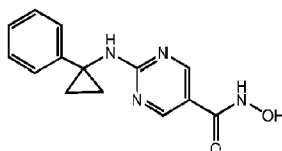
Ejemplo 3: Síntesis de 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidina-5-carboxamida (Compuesto C) (ejemplo de referencia, no forma parte de la presente invención)

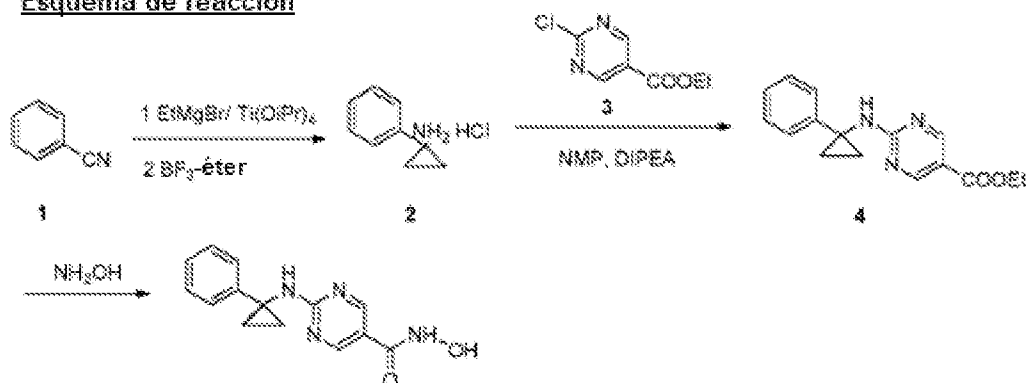


- 5 Síntesis del producto intermedio 2: A una solución del compuesto 1 (100 g, 0.74 mol) en DMF seca (1000 ml) se le agregó 1,5-dibromopentano (170 g, 0.74 mol). Se agregó gota a gota NaH (65 g, 2.2 eq.) mientras la reacción se enfriaba en un baño de hielo. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante la noche a 50 °C. La suspensión se inactivó cuidadosamente con agua helada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron para dar el producto en bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna para proporcionar el compuesto 2 como sólido pálido (100 g, 67 %).
- 10 Síntesis del producto intermedio 3: Una solución del compuesto 2 (100 g, 0.49 mol) en PPA (500 ml) se calentó a 110 °C, durante aproximadamente 5-6 horas. Una vez completada, la mezcla resultante se ajustó cuidadosamente a un pH de aproximadamente 8-9 con solución saturada de NaHCO₃. El precipitado resultante se recogió y se lavó con agua (1000 ml) para proporcionar el compuesto 3 como un sólido de color blanco (95 g, 87 %).
- 15 Síntesis del producto intermedio 4: A una solución del compuesto 3 (95 g, 0.43 mol) en n-BuOH (800 ml) se le agregó NaClO (260 ml, 1.4 eq.). Luego se agregó NaOH 3 N (400 ml, 2.8 equiv.) a 0 °C y la reacción se agitó durante la noche a t.a. La mezcla resultante se extrajo con EA (2 x 500 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera. El disolvente se eliminó al vacío para proporcionar el producto en bruto que se purificó adicionalmente mediante tratamiento con sal HCl para producir el compuesto 4 como un polvo de color blanco (72 g, 73 %).
- 20 Síntesis del producto intermedio 6: A una solución del compuesto 4 (2.29 g, 10 mmol) en dioxano (50 ml) se le agregó el compuesto 5 (1.87 g, 1.0 equiv.) y DIPEA (2.58 g, 2.0 equiv.). La mezcla se calentó durante la noche a 110-120 °C. La mezcla resultante se purificó directamente en una columna de gel de sílice para proporcionar el producto acoplado, compuesto 6, como un sólido de color blanco (1.37 g, 40 %).

Síntesis de 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidina-5-carboxamida (Compuesto C):

- 25 A una solución del compuesto 6 (100 mg, 0.29 mmol) en MeOH/DCM (10 ml, 1:1) se le agregó NH₂OH al 50 % en agua (2 ml, exceso). Después se agregó NaOH sat. en MeOH (2 ml, exceso) a 0 °C y la reacción se agitó durante 3-4 horas. Una vez completada, la mezcla resultante se concentró y se acidificó con HCl 2 N para alcanzar un pH de 4-5. El precipitado se recogió y se lavó con agua (10 ml) para eliminar el exceso de NH₂OH. El secado del precipitado proporcionó 2-((1-(3-fluorofenil)ciclohexil)amino)-N-hidroxipirimidina-5-carboxamida en forma de un polvo de color blanco (70 mg, 73 %).
- 30 Ejemplo 4: Síntesis de N-hidroxi-2-((1-fenilciclopropil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto D) (ejemplo de referencia, no forma parte de la presente invención)



Esquema de reacción

Síntesis del producto intermedio 2: Una solución del compuesto 1, benzonitrilo (250 g, 1.0 equivalente) y $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ (1330 ml, 1.5 equiv.) en MTBE (3750 ml) se enfrió hasta aproximadamente -10 a -5°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregó gota a gota EtMgBr (1610 ml, 3.0 M, 2.3 equiv.) durante un período de 60 min, durante el cual la temperatura interna de la reacción se mantuvo por debajo de 5°C . La mezcla de reacción se dejó calentar a 15 - 20°C , durante 1 hora. Se agregó gota a gota $\text{BF}_3\cdot\text{éter}$ (1300 ml, 2.0 equiv.) durante un período de 60 minutos, mientras la temperatura interna se mantenía por debajo de 15°C . La mezcla de reacción se agitó a 15 - 20°C , durante 1-2 horas y se detuvo cuando permaneció un nivel bajo de benzonitrilo. Se agregó gota a gota HCl 1 N (2500 ml) mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 30°C . Se agregó gota a gota NaOH (20 %, 3000 ml) para llevar el pH a aproximadamente 9.0, mientras se mantenía una temperatura por debajo de 30°C . La mezcla de reacción se extrajo con MTBE (3 L x 2) y EtOAc (3 L x 2) y las capas orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida (por debajo de 45°C) para producir un aceite de color rojo. Se agregó MTBE (2500 ml) al aceite para dar una solución transparente y, tras burbujear con HCl gaseoso seco, precipitó un sólido. Este sólido se filtró y se secó al vacío produciendo 143 g de compuesto 2.

Síntesis del producto intermedio 4: el compuesto 2 (620 g, 1.0 equiv.) y DIPEA (1080 g, 2.2 equiv. se disolvieron en NMP (3100 ml) y se agitaron durante 20 min. Se agregó el compuesto 3 (680 g, 1.02 equiv.) y la mezcla de reacción se calentó a aproximadamente 85 - 95°C , durante 4 horas. La solución se dejó enfriar lentamente hasta t.a. Esta solución se vertió sobre H_2O (20 L) y gran parte del sólido precipitó de la solución con agitación fuerte. La mezcla se filtró y la torta se secó a presión reducida a 50°C , durante 24 horas, produciendo 896 g del compuesto 4 (sólido, 86.8 %).

Síntesis de N-hidroxi-2-((1-fenilciclopropil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto D): Se enfrió una solución de MeOH (1000 ml) hasta aproximadamente 0 - 5°C con agitación. Se agregó $\text{NH}_2\text{OH HCl}$ (1107 g, 10 equiv.), seguido de una cuidadosa adición de NaOCH_3 (1000 g, 12.0 equivalentes). La mezcla resultante se agitó a 0 - 5°C , durante una hora y se filtró para eliminar el sólido. Se agregó el compuesto 4 (450 g, 1.0 equiv.) a la mezcla de reacción en una porción y se agitó a 10°C , durante dos horas hasta que el compuesto 4 fue consumido. La mezcla de reacción se ajustó a un pH de aproximadamente 8.5-9 mediante la adición de HCl (6 N), dando como resultado la precipitación. La mezcla se concentró a presión reducida. Se agregó agua (3000 ml) al residuo con agitación intensa y el precipitado se recogió mediante filtración. El producto se secó en una estufa a 45°C , durante la noche (340 g, rendimiento del 79 %).

Ejemplo 5: Ensayos de la enzima HDAC

Los compuestos para la prueba se diluyeron en DMSO hasta 50 veces la concentración final y se realizó una serie de diluciones de 10.3 veces. Los compuestos se diluyeron en solución reguladora de ensayo (HOPES 50 mM, pH 7.4, Kill 100 mM, Tween-20 al 0.001 %, BASE al 0.05 %, TEC 20 μM) hasta 6 veces su concentración final. Las enzimas HDAC (compradas en BPS Biosciences) se diluyeron hasta 1.5 veces su concentración final en solución reguladora de ensayo. El sustrato dipéptido y la tripsina a una concentración final de 0.05 μM se diluyeron en solución reguladora de ensayo a 6 veces su concentración final. Las concentraciones finales de enzima usadas en estos ensayos fueron 3.3 ng/ml (HDAC1), 0.2 ng/ml (HDAC2), 0.08 ng/ml (HDAC3) y 2 ng/ml (HDAC6). Las concentraciones finales de sustrato usadas fueron 16 μM (HDAC1), 10 μM (HDAC2), 17 μM (HDAC3) y 14 μM (HDAC6). Se agregaron cinco μl del compuesto y 20 μl de enzima a los pocillos de una placa negra opaca de 384 pocillos por duplicado. La enzima y el compuesto se incubaron juntos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron cinco μl de sustrato a cada pocillo, la placa se agitó durante 60 segundos y se colocó en un lector de placas Victor de 2 μl . Se siguió el desarrollo de fluorescencia durante 60 minutos y se calculó la velocidad lineal de la reacción. La IC_{50} se determinó usando Graph Pad Prism mediante un ajuste de curva de cuatro parámetros.

Ejemplo 6: Inhibidores de HDAC en células PBMC y células NSCLC y activación de linfocitos T

El propósito de los siguientes ejemplos fue evaluar la actividad preclínica del compuesto A inhibidor de HDAC6 solo y el potencial de combinar el compuesto A con JQ1 (un inhibidor de BET) en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas. En estos ejemplos, se utilizó (+)-JQ1 (denominado JQ1 en los ejemplos).

I. Efectos de los inhibidores de HDAC sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos

La inhibición de HDAC provoca la detención del crecimiento tumoral en modelos animales inmunocompetentes. Los efectos de la inhibición de HDAC de clase I y clase II sobre los leucocitos se investigaron usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de donantes sanos. Las PBMC se cultivaron con el compuesto A y los resultados se compararon con un panel de inhibidores de HDAC con selectividad variable para HDAC6. Este panel incluyó inhibidores selectivos de HDAC6 compuesto B, compuesto C, compuesto D y tubastatina A; y un inhibidor selectivo de HDAC1/2/3 (HDAC de clase I), entinostat (MS-275) (Tabla 1).

Tabla 1. Inhibidores de HDAC probados con PBMC de donantes sanos y datos de ensayos bioquímicos de HDAC.

Compuesto	MW	Datos de ensayo bioquímico HDAC IC ₅₀ (nM)	
Compuesto A	433.5	HDAC6 = 10	HDAC3 = 84
Compuesto B	468.0	HDAC6 = 4	HDAC3 = 76
Compuesto C	330.4	HDAC6 = 7	HDAC1 = 2123 HDAC2 = 2570 HDAC3 = 11223
Compuesto D	270.3	HDAC6 = 2	HDAC1 = 94 HDAC2 = 128 HDAC3 = 219
Tubastatina	371.9	HDAC6 = 15	HDAC1 = 16400 HDAC2 = >30.000 HDAC3 = >30,000
Entinostat	376.4	Inhibidor de HDAC clase I HDAC1 = 510 HDAC3 = 1700	

Las PBMC se cultivaron con inhibidores de HDAC, durante 24 horas, después de lo cual se evaluó por FACS la frecuencia de los subconjuntos de células T. Se utilizó DMSO como control. En particular, la viabilidad de las células cultivadas durante 24 horas con estos inhibidores de HDAC fue muy similar (Figura 1A). Con respecto a los subtipos celulares, la frecuencia de las células T convencionales CD4⁺ FOXP3⁻ y CD8⁺ no se vio afectada significativamente por estos fármacos (Figura 1B). El porcentaje de CD4⁺ FOXP3⁺ Tregs dentro de las PBMC se redujo de manera más significativa cuando se cultivó con el compuesto A o el compuesto B mientras el efecto todavía estaba presente con el compuesto D o entinostat (Figura 1C). Curiosamente, los inhibidores altamente selectivos de HDAC6, el compuesto C y la tubastatina A, no afectaron significativamente la frecuencia de Treg, lo que sugiere que la inhibición de HDAC de Clase I por compuestos como el compuesto A, el compuesto B y el entinostat contribuye a la reducción observada en la frecuencia de Treg.

II. Efectos del compuesto A o entinostat sobre células de cáncer de pulmón de células no pequeñas

A continuación, se cultivaron PBMC obtenidas de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o suspensiones de células individuales en masa recogidas de tumores disociados recién resacados con compuesto A de 2.5 µm o entinostat de 2.5 µm durante 24 horas, después de lo cual se determinó el fenotipo de monocitos CD3⁺ CD14⁺ o Los macrófagos tumorales CD45⁺ CD68⁺ CD11b⁺ respectivamente, se evaluaron mediante FACS. Se utilizó DMSO como control. El análisis de citometría de flujo de subconjuntos de leucocitos dentro de los cultivos celulares reveló que el compuesto A redujo sustancialmente las proporciones de Treg en relación con el tratamiento con DMSO en PBMC de pacientes (Figura 2A, p = 0.04) y en células tumorales de pacientes (Figura 2B, p = 0.05), de manera

similar a lo observado en las PBMC de donantes sanos (Figura 1C). El tratamiento con el compuesto A también redujo las proporciones de Treg en relación con el tratamiento con entinostat en PBMC de pacientes (Figura 2A).

III. Efectos adicionales del compuesto A o entinostat

Paralelamente a estas observaciones, la expresión del marcador de activación CD69 estuvo sustancialmente regulada positivamente en células T CD8+ y CD4+ convencionales en cultivos de PBMC tanto en pacientes (Figura 3A, $p = 0.003$; Figura 3B, $p = 0.01$) como en donantes sanos (Figura 3C, ** indica valor de $p < 0.001$; Figura 3D, * indica valor de $p < 0.05$) en presencia del compuesto A pero no de entinostat, lo que sugiere que el compuesto A promueve un mayor perfil de activación (Figura 3E).

Un inhibidor selectivo de HDAC6 (Compuesto A) redujo la frecuencia de CD4+ FOXP3+ Tregs y promovió la activación transitoria de linfocitos T periféricos y asociados a tumores.

Ejemplo 7: Inhibidores selectivos de HDAC6 y cambios funcionales en las APC

La inhibición de HDAC6 puede efectuar cambios funcionales en las APC en un mecanismo que implica la regulación de la producción de citocinas inflamatorias. Se investigaron los efectos del compuesto A, inhibidor selectivo de HDAC6, sobre las APC con respecto al fenotipo y la función. Específicamente, se investigó el fenotipo de los monocitos CD14+CD11b+ en la sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con NSCLC, o el de los macrófagos CD14-CD68+CD11b+ dentro de tumores de NSCLC desagregados. Tras un cultivo de 24 horas con el compuesto A, la fracción de monocitos CD14+ reguló positivamente la expresión de las moléculas del MHC de clase II, así como CD86 pero no CD80, cambios fenotípicos que se asocian con una mayor capacidad de cebado de las APC. Por el contrario, ni la adición de DMSO ni de entinostat regularon positivamente la expresión de estas proteínas (Figura 4A; $p = 0.04$). Se observó un patrón similar de aumento de expresión de MHC clase II y CD86 en los macrófagos CD14-CD68+CD11b+ dentro de los cultivos de células tumorales 2-D (Figura 4B) y en PBMC obtenidas de donantes sanos (Figura 4C) cuando se incubaron con el compuesto A. Este hallazgo demuestra un efecto modulador único del compuesto A en células monocíticas humanas y macrófagos asociados a tumores, y sugiere que promueve cambios fenotípicos que respaldarían una presentación de antígeno potenciada y capacidades coestimuladoras. En apoyo de esta idea, los monocitos CD14+ expuestos al compuesto A fueron superiores en la inducción de respuestas proliferativas de células T alogénicas en reacciones mixtas de linfocitos (Figura 4D). Las células CD14+ purificadas dentro de PBMC de pacientes que se habían cultivado con el compuesto A o entinostat durante 24 horas se incubaron con células T purificadas marcadas con CellTrace Violet (CTV) de PBMC de donantes alogénicos durante 6 días en presencia de 20 UI/mL de IL2 recombinante humana.

Un inhibidor selectivo de HDAC6 (Compuesto A) promovió una mayor expresión de MHC y moléculas coestimuladoras en monocitos humanos y macrófagos asociados a tumores y aumentó su función para estimular una mayor proliferación de células T.

Ejemplo 8: Inhibidores selectivos de HDAC6 y células inmunitarias asociadas a tumores

Las células inmunitarias asociadas a tumores son importantes para determinar el curso de la progresión del tumor y la inmunidad antitumoral. Se investigaron los efectos de un inhibidor selectivo de HDAC6 sobre los cambios fenotípicos y funcionales, especialmente en el contexto de los antígenos tumorales. Específicamente, se estudiaron los efectos de un inhibidor selectivo de HDAC6 en las células inmunitarias que se infiltran en adenocarcinomas de pulmón que se desarrollan espontáneamente en ratones genéticamente modificados totalmente inmunocompetentes que albergan células activadoras de mutación *Kras*^{G12D} y pérdida concurrente *p53* (designada como KP), o aquellos con mutaciones T790M/L858R EGFR (designadas TL). Los tumores de pulmón (confirmados por MRI) que se desarrollaron espontáneamente en ratones que albergaban LSL-KrasG12D/*p53*^{fl} (KP) o LSL-EGFR (TL) tras la administración intranasal de adenovirus-cre recombinasa se escindieron después de un tratamiento de 7 días con el compuesto A o vehículo. Se generaron suspensiones de células individuales de nódulos de tumores de pulmón y se sometieron a análisis FACS para evaluar las proporciones, el fenotipo y la función de los subconjuntos de células inmunitarias CD45+ en los tumores aislados de ratones KP y TL.

Se trataron ratones con adenocarcinomas existentes una vez al día con el compuesto A durante siete días antes de la evaluación de los tumores disociados mediante citometría de flujo multiparamétrica integral. Bajo este tratamiento a corto plazo, se observaron aumentos modestos en la frecuencia de células T CD8+ infiltrantes de tumores y disminuciones significativas en las células Treg CD4+Foxp3- entre las células linfoides, lo que resultó en una elevación significativa de las proporciones CD8:Treg en los tumores tratados (Figura 5A-5C). Estos aumentos en las proporciones CD8:Treg a menudo se asocian con una mayor respuesta antitumoral. Aunque no hubo cambios fenotípicos sustanciales con respecto a la expresión de la molécula receptora inhibidora (Figura 5D-5G), las células T CD8+ infiltrantes de tumores en ratones tratados con el compuesto A exhibieron niveles de expresión aumentados del marcador de activación CD69 y demostraron una capacidad potenciada para secretar el efector citocina IFN- γ así como TNF- α después de la estimulación ex vivo en comparación con células equivalentes en el grupo de control de vehículo (Figura 5H).

Además, de manera similar al compuesto A, el compuesto B aumentó la proporción CD8:Treg en los tumores, aumentó la activación de las células T CD8 (por aumento del marcador de activación CD69) y aumentó la expresión de MHCII

en macrófagos asociados a tumores (Figura 5I). Se tiñeron suspensiones de células individuales de nódulos de tumores de pulmón de ratones KP tratados con el compuesto B o vehículo durante 7 días y luego se sometieron a análisis FACS para evaluar las proporciones, el fenotipo y la función de los subconjuntos de células inmunitarias CD45⁺. De acuerdo con los hallazgos para el compuesto A, RNA-Seq de células individuales reveló que varios genes asociados con la activación de las células T y la función efectora, incluidos *Cd69*, *Sell* (*Cd62L*), *Cd44*, y *Prf1* (*perforina*) estaban regulados positivamente en células T infiltrantes de tumores de ratones KP tratados con el compuesto A en comparación con células equivalentes derivadas de los tumores del grupo vehículo (Figura 5N). Se tiñeron suspensiones de células individuales de nódulos de tumores de pulmón de ratones KP y TL tratados con el compuesto A o vehículo durante 7 días y luego se sometieron a análisis FACS para evaluar las proporciones, el fenotipo y la función de los subconjuntos de células inmunitarias CD45⁺. Entre las poblaciones de células mieloides, los macrófagos asociados a tumores CD11c⁺CD11b^{lo} (TAM; Figura 5J) mostraron niveles de expresión significativamente elevados de MHC clase II, así como de la molécula coestimuladora CD86 (Figuras 5K-5M). En apoyo de este fenotipo, el TAMS expuesto al compuesto A analizado mediante secuenciación de ARN unicelular mostró una mayor expresión de genes clave asociados con la expresión del MHC clase II, incluyendo *Cd74* y *H2-Aa* en relación con sus homólogos en los ratones de control (Figura 5N).

Por tanto, en consonancia con las observaciones *in vitro*, estos hallazgos indicaron que tras el tratamiento con el compuesto A los macrófagos infiltrantes de tumores experimentaron cambios análogos a las APC que estaban en un estado más maduro y que las células T circundantes mostraban un perfil más activado/efector. El compuesto A medió cambios inmunodinámicos y fenotípicos positivos en subconjuntos de células inmunitarias. Cuando se administró como agente único, el compuesto A sólo dio como resultado un retraso marginal del crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes modificados genéticamente que albergaban adenocarcinomas de pulmón con tratamiento concurrente mutación *Kras* y deficiencia *p53* o EGFR mutante (Figura 6, datos no mostrados). A los ratones KP con cargas tumorales de aproximadamente 200 mm³ se les inyectó IP una vez al día con el compuesto A solo, JQ1 solo o la combinación de los dos fármacos. El crecimiento del tumor se controló semanalmente mediante MRI.

Un inhibidor selectivo de HDAC6 (Compuesto A) promovió cambios fenotípicos que facilitaron el cebado de células T infiltrantes de tumores en un modelo de NSCLC.

Ejemplo 9: Compuesto A combinado con JQ1 en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas

Un tratamiento combinado con un inhibidor selectivo de HDAC6 y un agente inmunomodulador complementario puede lograr mayores niveles de control inmunológico del crecimiento tumoral en estos modelos de NSCLC. Anteriormente se demostró que JQ1 tiene un efecto antitumoral en ratones KP, en parte debido a la regulación negativa de MYC y la inducción de apoptosis en células tumorales. Desde la perspectiva de las células inmunitarias, a diferencia de las células T CD8⁺ convencionales, las Treg expuestas a JQ1 mostraron niveles de expresión disminuidos de PD-1 y Foxp3, y fueron menos supresoras que sus contrapartes no expuestas (Figura 7A-7C). Estos efectos de JQ1, cuando se combinan con los efectos inmunomoduladores del compuesto A, pueden fomentar un microambiente tumoral que favorece una estimulación más fuerte de las células T que se infiltran en el tumor y una respuesta antitumoral aumentada. Las células T se aislaron del bazo de ratones de tipo salvaje y se clasificaron en subconjuntos CD3⁺CD25⁻ (células T) o CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} (Treg) y posteriormente se cultivaron en presencia o ausencia de JQ1 (1 µM). Los cultivos se complementaron con 100 UI/mL de IL-2 recombinante. Las células se lavaron después de dos días de cultivo y se evaluó su fenotipo mediante FACS. Para la dilución de CFSE que se muestra en la figura 7C, se cocultivaron 2 × 10⁵ células T purificadas marcadas con CFSE obtenidas del bazo de ratones sin tratamiento previo con 1.0 × 10⁵ células del bazo con depleción de T tratadas con mitomicina C que sirvieron como APC. Luego se agregaron 0.5 µg de anti-CD3 soluble a cada pocillo junto con números graduados de Treg (indicados por las proporciones de células Treg:T).

Se trataron ratones portadores de adenocarcinoma de pulmón con el compuesto A y/o JQ1 en estudios de eficacia a largo plazo. A ratones inmunocompetentes portadores de tumores se les administró una dosificación crónica del compuesto A y/o JQ1, y se evaluó la cinética de crecimiento tumoral entre los grupos de tratamiento frente a los controles tratados con vehículo. Específicamente, a ratones KP con cargas tumorales de aproximadamente 200 mm³ se les inyectó IP una vez al día con el compuesto A solo, JQ1 solo o la combinación de los dos fármacos con o sin anticuerpos depletores contra CD4 o CD8. El crecimiento del tumor se controló semanalmente mediante MRI. En ratones KP, la monoterapia con el compuesto A o JQ1 provocó un retraso marginal o moderado en el crecimiento del tumor, respectivamente, pero el tratamiento combinado con ambos agentes produjo una detención significativa del crecimiento del tumor (Figura 6 y Figura 8A). Estos efectos dependieron en gran medida de las células T CD8⁺ y CD4⁺, ya que la detención del crecimiento tumoral observada con la combinación de ambos agentes se anuló tras la incorporación de CD8 o anticuerpos agotadores de CD4 en el régimen de tratamiento (Figura 8A). Además, se produjo una disminución de ki67 y un aumento de la expresión de caspase-3 en células tumorales con una combinación farmacéutica del tratamiento con Compuesto A y JQ-1 en comparación con los tratamientos con un solo agente. En particular, se trataron ratones KP con vehículo, Compuesto A, JQ1 o una combinación de Compuesto A y JQ1, durante 1 semana y luego se fijó una pequeña sección de pulmón en formalina al 10 %. Esto condujo a una proliferación reducida y a un aumento de la apoptosis de las células tumorales tras la combinación de los dos agentes (Figura 8B). Además, la terapia combinada condujo a una supervivencia libre de progresión más prolongada en comparación con cualquiera de los agentes solos (Figura 8C), lo que sugiere que JQ1 tuvo sinergia con el compuesto A para impulsar la respuesta antitumoral mediada por células T. Al igual que en los ratones KP, la combinación también fue eficaz en

ratones con tumores de pulmón EGFR (TL) mutantes, así como en carcinomas de pulmón de Lewis, como lo demuestra la marcada inhibición del crecimiento tumoral en cada uno de estos modelos (Figura 8D y Figura 8E). A ratones TL con cargas tumorales de aproximadamente 200 mm³ se les inyectó IP una vez al día con la combinación del compuesto A y JQ1 y se midió el volumen del tumor mediante MRI (Figura 8D). Se implantaron células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) (500K células/implantación) en los ratones C57BL/6 (B6) en 1 implantación/ratón. Tres días después de la implantación, los ratones se agruparon aleatoriamente en 5 por grupo para el tratamiento con vehículo, JQ1 y/o compuesto A como se indica en la figura 8E. El tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calcula en $0.5 \times L \times W \times W$. Estos datos sugieren que los beneficios terapéuticos de este enfoque combinatorio se extienden más allá de los adenocarcinomas de pulmón impulsados por la expresión ectópica de mutaciones conductoras en los GEMM hasta los caracterizados por el desarrollo espontáneo y el melanoma.

El perfil inmunológico de los nódulos tumorales reveló además que, en comparación con los tratamientos con un solo agente, las células linfoides que se infiltraban en los tumores de los ratones KP tratados con la combinación de los dos agentes albergaban proporciones CD8:Treg significativamente mayores, presumiblemente como resultado de fracciones Treg altamente reducidas (Figuras 9A y 9B). Para el perfil inmunológico, se sacrificaron cohortes de ratones después de 4-6 semanas de tratamiento y las suspensiones de células tumorales se sometieron a análisis FACS. Las células T CD8+ estaban más activadas, como lo demuestra el aumento de la expresión de CD69 (Figura 9C). Además, las células inmunitarias aisladas de tumores de ratones tratados con los fármacos indicados se estimularon ex vivo durante 6 horas en presencia del tapón de Golgi. Estas células T CD8+ infiltrantes de tumores demostraron una capacidad potenciada para secretar la citocina efectora IFN- γ , así como una mayor desgranulación, como lo indica la tinción con CD107a (Figuras 9D y 9E). Suspensiones celulares generadas a partir de nódulos tumorales extirpados de ratones que fueron tratados con JQ1 y/o el compuesto A que se clasificaron en tres poblaciones: Células T CD25-CD3+, células tumorales CD45-Epcam y CD11b^{lo}CD11c+ TAM. Se cocultivaron números equivalentes de cada una de estas poblaciones durante dos días en presencia de lisado de células tumorales. Cuando se cocultivaron números equivalentes de células T, TAM y células tumorales EpCam+ separadas de nódulos tumorales de ratones tratados con el compuesto A y/o JQ1 junto con lisado de células tumorales, se observó una mayor proporción de muerte de células tumorales en el presencia de células T aisladas de los tumores de ratones tratados con agente dual (Figura 9F). Esto demostró que el tratamiento combinado da como resultado un mayor potencial de destrucción de tumores de las células T infiltrantes de tumores. Con respecto a los TAM, el tratamiento con el compuesto A, ya sea solo o en combinación con JQ1, promovió notablemente la regulación positiva de las moléculas de MHC clase II y CD86 (Figuras 9G y 9H). En conjunto, estos hallazgos demostraron que el compuesto A, inhibidor selectivo de HDAC6, en combinación con el inhibidor del bromodominio JQ1, tenía efectos inmunomoduladores que se sinergizaban para potenciar una sólida respuesta antitumoral mediada por sistema inmunológico. Es decir, un inhibidor del bromodominio BET (JQ1) con un inhibidor selectivo de HDAC6 (Compuesto A) potenció la supresión inmunodependiente del crecimiento tumoral.

Ejemplo 10: Otros métodos

Ratones

Ratones genéticamente modificados que albergan *Kras*^{+LSL-G12D}*Trp53*^{L/L} (KP) o *EGFR*^{LSL-T790M/L858R} (TL) han sido descritos previamente (DuPage, M., A.L. Dooley and T. Jacks, *Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase*. Nat Protoc. 2009. 4(7): p. 1064-72). Para la inducción de tumores de pulmón, los ratones recibieron 1×10^6 cfu adenovirus que codifica cre por vía intranasal a las 5-6 semanas de edad. La formación del tumor (por lo general entre 6 y 8 semanas después de la inoculación) y el volumen se confirmaron mediante MRI y se cuantificaron usando el software de corte 3D. Se adquirieron ratones C57BL/6 de Taconic Farms (Pekín, China). Todos los ratones se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos.

Fármacos, anticuerpos y reactivos

El compuesto A (ricolinostat) fue proporcionado por Acetylon Pharmaceuticals (Boston, MA). El compuesto A se formuló en DMSO al 10 % y 90 % de dextrosa al 5 %, y se administró a ratones a 50 mg/kg I.P. a diario. La tubastatina se obtuvo de APEXBio (Houston, TX). La tubastatina se formuló en DMSO al 10 % y 90 % de solución salina al 0.9 % y se administró a ratones a 25 mg/kg I.P. a diario. JQ1 fue amablemente proporcionado por James Bradner (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). JQ1 se formuló en DMSO al 10 % y 90 % de 2-hidroxipropil β -ciclodextrina al 10 % (Sigma) y se administró a ratones a 25 mg/kg I.P. a diario. El control del vehículo se preparó diluyendo DMSO en el vehículo del fármaco relacionado. Anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.72) e IgG de rata (LTF-2) se adquirieron de BioXcell. A los ratones se les administraron primero anticuerpos durante dos días consecutivos antes del tratamiento con una combinación del compuesto A y JQ1, y luego se les dosificó dos veces por semana a 400 μ g/ratón/tiempo I.P. con anticuerpos. La depleción de los tipos de células relevantes se confirmó mediante citometría de flujo un día después de la segunda dosis usando sangre periférica obtenida de la vena de la cola. Los anticuerpos humanos y de ratón usados en el estudio para los análisis de citometría de flujo se adquirieron de Biolegend, Ebioscience y BD Pharmingen. Las citocinas humanas recombinantes IL-2, IL-4 y GM-CSF se adquirieron en peprotech (NJ).

Perfil tumoral y citometría de flujo

Para generar suspensiones celulares, se extirparon nódulos tumorales de los pulmones de ratones KP y TL y se cortaron en trozos pequeños, seguido de una disociación adicional en solución reguladora RPMI-1640/FBS al 5 % que contenía 100 U/ml de colagenasa tipo IV (Invitrogen) y 50 ug/ml de DNasa I (Roche) durante 45 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células se trataron con solución reguladora de lisis de glóbulos rojos y se filtraron a través de un filtro celular de 70 µm. Después de la centrifugación, el sedimento celular se resuspendió en 1XPBS/2 S. Se contaron las células y $\sim 0.5 \times 10^6$ células se tiñeron para marcadores de superficie en PBS + 2 % de FBS durante 15 minutos a 4 °C. La tinción intracelular se realizó para Foxp3, Ki67, CTLA-4 y Bcl-2, usando la solución reguladora de tinción Foxp3 según las instrucciones del fabricante, mientras que se utilizó el kit cytofix/cytoperm (BD Bioscience) para la tinción con citocinas intracelulares. Brevemente, las células se tiñeron para marcadores de superficie que incluyen CD4, CD8, CD3, seguido de tinción intracelular con anti-IFN- γ conjugado con PE, anti-TNF- α conjugado con BV421, IL-2 conjugado con APC, perforina conjugada con FITC y CD107a (donde se indique), o mAb de isotipo coincidente después de la permeabilización y fijación. En todas las muestras teñidas, las células muertas se excluyeron usando el kit de tinción de células muertas Live/Dead Fixable (Invitrogen). Las células se adquirieron en LSR Fortessa (BD Biosciences) y se analizaron con el software flowjo (Treestar). La estrategia de activación para el análisis FACS se muestra en la figura 10.

Purificación celular y estudios in vitro

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradiente de Ficoll a partir de muestras de sangre fresca o congelada obtenidas de donantes sanos y pacientes que dieron su consentimiento según los protocolos institucionales aprobados por el IRB. Cuando se congelaron, las PBMC se descongelaron y se dejaron reposar en medio completo al 10 % (RPMI 1640 suplementado con suero humano combinado al 10 %, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL y L-glutamina 2 mM) a 37 °C, durante 6 horas después de las cuales las células (0.5×10^6) se cultivaron con el compuesto A (2.5 µM), entinostat (2.5 µM) o JQ1 (1 µM) durante 24 o 72 horas. Luego las células se lavaron y se sometieron a análisis fenotípico mediante FACS. En algunos experimentos, estos cultivos se realizaron con monocitos CD14+ purificados o células T CD3+ después de las purificaciones a partir de PBMC completas.

Para los ensayos de proliferación de células T, las células T se aislaron de PBMC mediante selección positiva usando un kit de enriquecimiento de células T (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células eran por lo general ~ 90 % puras. Luego, las células T purificadas se marcaron con CFSE 2.5 µM o CellTrace Violet (CTV) a 37 °C, durante 7 minutos. Las células se lavaron tres veces con RPMI+10 % de FBS, se contaron y se usaron como células respondedoras. Se cultivaron células CD14+ purificadas aisladas de PBMC de pacientes mediante selección positiva usando microperlas CD14 con el compuesto A o entinostat durante 24 horas, después de lo cual las células se lavaron tres veces antes del cocultivo con células T alogénicas en reacciones de linfocitos mixtos.

Para los ensayos de detección de citocinas intracelulares, se obtuvieron células inmunitarias de tumores de ratones tratados o de control después de la separación en gradiente de Ficoll como se describió anteriormente. 1×10^6 células se cultivaron con PMA (50 ng) e ionomicina (500 ng) durante 6 horas a 37 °C, y se agregó GolgiPlug (BD Pharmingen) durante las últimas 5 horas de cultivo. Para ensayos equivalentes que utilizan PBMC humanas, 0.5×10^6 células se estimularon de manera similar antes del análisis.

Secuenciación de ARN unicelular de células T y TAM que se infiltran en tumores

Macrófagos asociados a tumores (TAM; CD45+CD11c+CD11b^{lo}) y células T CD45+CD3+CD25^{lo/-} se clasificaron en placas de 96 pocillos que contenían 50 µl de 1X PBS con inhibidor de ribonucleasa recombinante (Life Technologies) aislados de tejidos tumorales mediante clasificación FACS. Brevemente, se incubaron suspensiones de células tumorales con colorante fijable vivo/muerto después del bloqueo de Fc γ R y posteriormente se tiñeron con anticuerpos contra CD45, CD3, CD8, CD11b y CD11c. Las bibliotecas Smart-Seq2 fueron preparadas por Broad Technology Labs y secuenciadas por Broad Genomics Platform.

Análisis estadístico

La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student para comparaciones entre dos grupos o Anova unidireccional para comparaciones de múltiples grupos usando el software GraphPad Prism. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*), valores de $p < 0.01$ se consideraron muy significativos (**), y valores de $p < 0.001$ se consideraron altamente significativos (***).

Sumario de los ejemplos anteriores

Los experimentos anteriores demuestran que el entinostat, un agente selectivo de HDAC de Clase 1, reproducía sólo parcialmente algunos de los efectos del compuesto A (selectivo de HDAC6 con actividad débil contra HDAC1/2/3). Por tanto, los efectos inmunomoduladores observados del compuesto A fueron probablemente una característica única e inesperada de sus actividades inhibitorias relativas sobre HDAC6 y HDAC de Clase 1.

El compuesto A tiene el potencial de ajustar los eventos inmunológicos asociados con la presentación del antígeno. En un entorno patológico o de enfermedad, las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales inmaduras deben "recoger", procesar y presentar antígenos relevantes mientras experimentan cambios fenotípicos hacia un

estado más maduro. Cuando están presentes en tal estado, poseen una capacidad potenciada de presentación de antígenos y de cebado de células T debido a un aumento en su expresión de MHC clase II y moléculas coestimuladoras. El aumento de la expresión del MHC de clase II, así como de la molécula coestimuladora CD86, como se observó en los macrófagos asociados a tumores (TAM), tras el tratamiento con el compuesto A en ratones portadores de tumores de pulmón, fue, por tanto, consistente con la noción de que el compuesto A sirvió como un agente modulador único, promoviendo cambios fenotípicos que favorecieron una mejor entrega de señales coestimuladoras y presentación de antígenos. En apoyo de este punto estuvo el hallazgo de que los monocitos CD14+ expuestos al compuesto A de PBMC de pacientes eran mejores para impulsar la proliferación de células T alorreactivas. Esto es en gran medida una función del grado de estimulación derivada de la participación de las células T en moléculas extrañas del MHC, así como de la coestimulación presente en las APC. Además, el aumento observado en la expresión de fosfo-STAT3 y CD69 en las células T expuestas al compuesto A también sugirió que puede tener un efecto de cebado directo en las células T de una manera dependiente de la activación de STAT3. De hecho, se ha demostrado que la activación de STAT3 induce la expresión de CD69 y, por consiguiente, la activación de las células T en un modelo de células T alorreactivas. Tales efectos activadores pueden ser beneficiosos para la amplificación del cebado de células T impulsado por antígenos inducido por TCR, especialmente en el contexto de antígenos asociados a tumores.

La administración del compuesto A puede facilitar una mejor preparación de células T en pacientes con cáncer. Esta idea fue respaldada por el aumento de la activación y la función efectora potenciada de las células T CD8+ infiltrantes de tumores observadas en ratones portadores de tumores que fueron tratados con el compuesto A. Aunque por sí solo no fue eficaz para amortiguar el crecimiento tumoral en el modelo GEM de NSCLC, El compuesto A dio como resultado una notable eficacia antitumoral mediada por células T cuando se combinó con JQ1.

A medida que las células T reguladoras CD4+FOXP3+ se acumulan en muchos cánceres sólidos, los agentes que tienen el potencial de atacar estas células pueden ofrecer beneficios terapéuticos. Como se divulga, una combinación de un tratamiento con un inhibidor selectivo de HDAC6 (Compuesto A) y un inhibidor de BET (JQ1) redujo fracciones de células Treg pero no de células T convencionales dentro del microambiente tumoral en ratones tratados. Esto sugirió que las células Treg pueden ser más susceptibles a modificaciones epigenéticas que sus homólogas de células T convencionales. Aunque los niveles de Foxp3 disminuyeron en las células Treg que se salvaron del compuesto A *in vitro*, este efecto fue sólo moderado *en vivo*. JQ1, por otro lado, exhibió un efecto más profundo evidenciado por la reducción del nivel de expresión de Foxp3 y la función de las células Treg *in vitro* además de una reducción más sustancial de las proporciones de Treg en tumores de ratones tratados con JQ1. El compuesto A y JQ1 pueden modular preferiblemente la expresión del gen FOXP3 o la estabilidad de la proteína y, por consiguiente, la supervivencia y actividad general de estas células. Estos efectos están respaldados por informes existentes que demuestran que ciertos inhibidores de HDAC afectan la biología de Treg, ya que se sabe que el estado de acetilación de las histonas por HAT/HDAC afecta la expresión y la estabilidad del gen FOXP3. Las variaciones en los loci genéticos o en la región proteica a la que se dirigen diferentes HDAC pueden afectar la actividad de Treg en respuesta a diferentes inhibidores de HDAC. Además, el contexto inflamatorio asociado con diferentes estados patológicos puede dictar cómo ciertos inhibidores de HDAC afectan su actividad.

Sin pretender quedar vinculado a ninguna teoría, el compuesto A puede desempeñar un papel pleiotrópico en las células inmunitarias y puede funcionar reduciendo el número de células Treg, aumentando la activación transitoria de células T independiente de TCR y promoviendo la función de APC. JQ1, por otro lado, altera aún más la actividad supresora de Treg, que se considera un mecanismo clave que impide la respuesta antitumoral mediada inmune. JQ1 tuvo sinergia con el compuesto A, reduciendo aún más las proporciones de Treg e interrumpiendo la función supresora de las Treg residuales presentes en el lecho tumoral. El efecto neto es la promoción de una respuesta antitumoral orquestada por leucocitos mediante la optimización de la administración de antígenos, lo que aumenta las señales coestimuladoras y reduce los mecanismos celulares inhibidores. La anulación de la detención del crecimiento tumoral observada con la terapia con el compuesto A y JQ1 tras el agotamiento de las células T demostró que las células T eran actores clave en la eficacia del tratamiento combinatorio en este modelo.

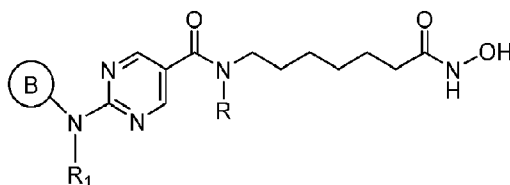
La combinación del compuesto A y JQ1 produjo un potente efecto antitumoral mediado por el sistema inmunológico en tumores de pulmón provocados por diferentes genotipos de mutación, lo que prolongó la supervivencia de los ratones portadores de tumores. Los efectos inmunomoduladores no descritos anteriormente de estos dos agentes respaldan una combinación farmacéutica racional que comprende un inhibidor selectivo de HDAC6 y un inhibidor de BET para intervenciones terapéuticas en el cáncer, especialmente en los adenocarcinomas de pulmón. Además, las dosificaciones usadas en este documento son consistentes con la aplicación clínica actual. No se observaron signos de toxicidad. El compuesto A y JQ1 se pueden utilizar como terapias "híbridas" que aprovechan no solo sus efectos antitumorales directos sino también los efectos indirectos a través de la remodelación periférica de la dinámica y la función de las células inmunitarias, convergiendo para fomentar un fuerte beneficio anticancerígeno.

A menos que se defina lo contrario, a todos los términos técnicos y científicos usados en este documento se les otorga el significado comúnmente conocido para un experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que el cáncer es cáncer de pulmón, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor selectivo de la histona desacetilasa (HDAC6), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un bromodominio e inhibidor del motivo extraterminal (BET), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en la que el inhibidor selectivo de HDAC6 es un compuesto de fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que,

el anillo B es arilo o heteroarilo;

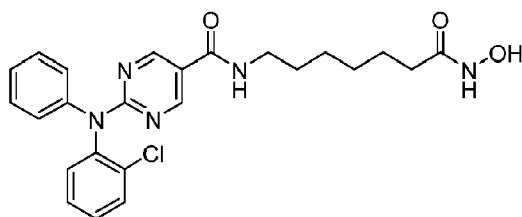
R₁ es un arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con OH, halo o alquilo C₁₋₆;

y

R es H o alquilo C₁₋₆; y

en la que el inhibidor de BET se selecciona del grupo que consiste en N-[6-(3-metanosulfonamido-4-metilfenil)-3-metil-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazin-8-il]carbamato (bromosporina), 2-[2-(3-cloro-4-metoxifenil)etil]-5-(dimetil-1,2-oxazol-4-il)-1-[(2S)-2-(morfolin-4-il)propil]-1H-1,3-benzodiazol (CBP30), (6S)-4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-acetamida (CPI-203), 2-[(4S)-6-(4-clorofenil)-1-metil-4H-[1,2]oxazolo[5,4-d][2]benzazepin-4-il]acetamida (CPI-0610), [(2S)-5-(ciclobutiloxi)-3,4-dihidro-2-metil-6-[1-(4-piperidinil)-1H-pirazol-4-il]-1(2H)-quinolinil]ciclopropilmetanona (FT-1101), 7-(3,5-dimetil-1,2-oxazol-4-il)-8-metoxi-1-[(1R)-1-piridin-2-ilet]l]-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (GSK2820151), 7,3,5-dimetil-4-isoxazolil-1,3-dihidro-8-metoxi-1-[1R-1-(2-piridinil)etil]-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (I-BET151), ácido 4-[(2S,4R)-1-acetil-4-[(4-clorofenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-6-quinolinil]-benzoico (I-BET726), (S)-2-(6-(4-clorofenil)-8-metoxi-4H-benzo[f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-4-il)-N-etilacetamida (I-BET-762), 7-(3,5-Dimetilisoxazol-4-il)-4-piridin-2-il-4,5-dihidroimidazo[1,5,4-de][1,4]benzoxazin-2(1H)-ona (INCB054329), 8-(6,7-dihidro-6-metil-7-oxo-1H-pirrol-2,3-c)piridin-4-il)-2,2,4-trimetil-6-(metilsulfonil)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (INCB057643), 3-(4-(2-(5-(3,5)-dimetilisoxazol-4-il)-1-(2-morfolinoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)fenoxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (ISOX DUAL), (6S) ácido 4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina-6-acético, éster 1,1-dimetiletílico (JQ1), 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona (LY294002), 8-fenil-2-(1-piperazinil)-4H-1-benzopiran-4-ona, diclorhidrato (LY303511), (E)-4-[2-(2-amino-4-hidroxi-5-metilfenil)diazenil]-N-2-piridinilbencenosulfonamida (MS436), 4-(4-clorofenil)-N-(4-hidroxifenil)-2,3,9-trimetil-, (6S)-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina-6-acetamida (MK8628), 4-bromo-N-(2,3-dihidro-6-metoxi-1,3-dimetil-2-oxo-1H-bencimidazol-5-il)-2-metil-bencenosulfonamida (OF-1), 3-(3,5-dimetil-4-isoxazolil)-5-hidroxi-α-fenilbencenometanol (OXF BD 02), 2-metoxi-N-(3-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolin-6-il)bencenosulfonamida (PFI-1), (2E)-1-(2-hidroxifenil)-3-[(1R,4R)-5-(2-piridinil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-2-propen-1-ona (PFI-3), 2-metoxi-N-(3-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolin-6-il)bencenosulfonamida (PF-6405761), 2-[4-(2-hidroxietoxi)-3,5-dimetilfenil]-5,7-dimetoxi-4(3H)-quinazolinona (RVX-208), (S)-2-(4-(4-clorofenil)-2,3,9-trimetil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-il)acetamida (TEN-010), 4-acetil-N-[5-[(diethylamino)sulfonil]-2-hidroxifenil]-3-etil-5-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (XD 14), y ZEN003694, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

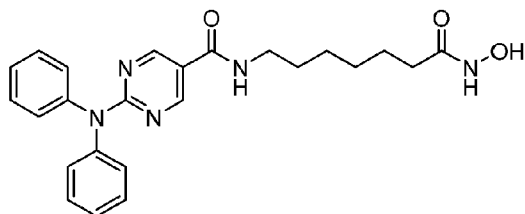
2. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula I es:



(A)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

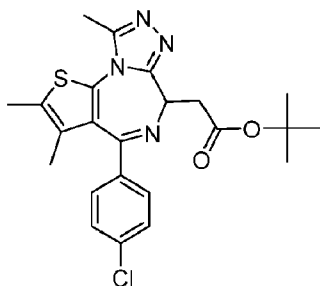
3. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula I es:



(B)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de BET es JQ1:



(JQ1),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. La combinación farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la combinación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

10 6. La combinación farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas o tumor carcinoide de pulmón.

7. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

15 8. La combinación farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se administran sustancialmente al mismo tiempo.

9. La combinación farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el inhibidor selectivo de HDAC6 y el inhibidor de BET se administran en momentos diferentes.

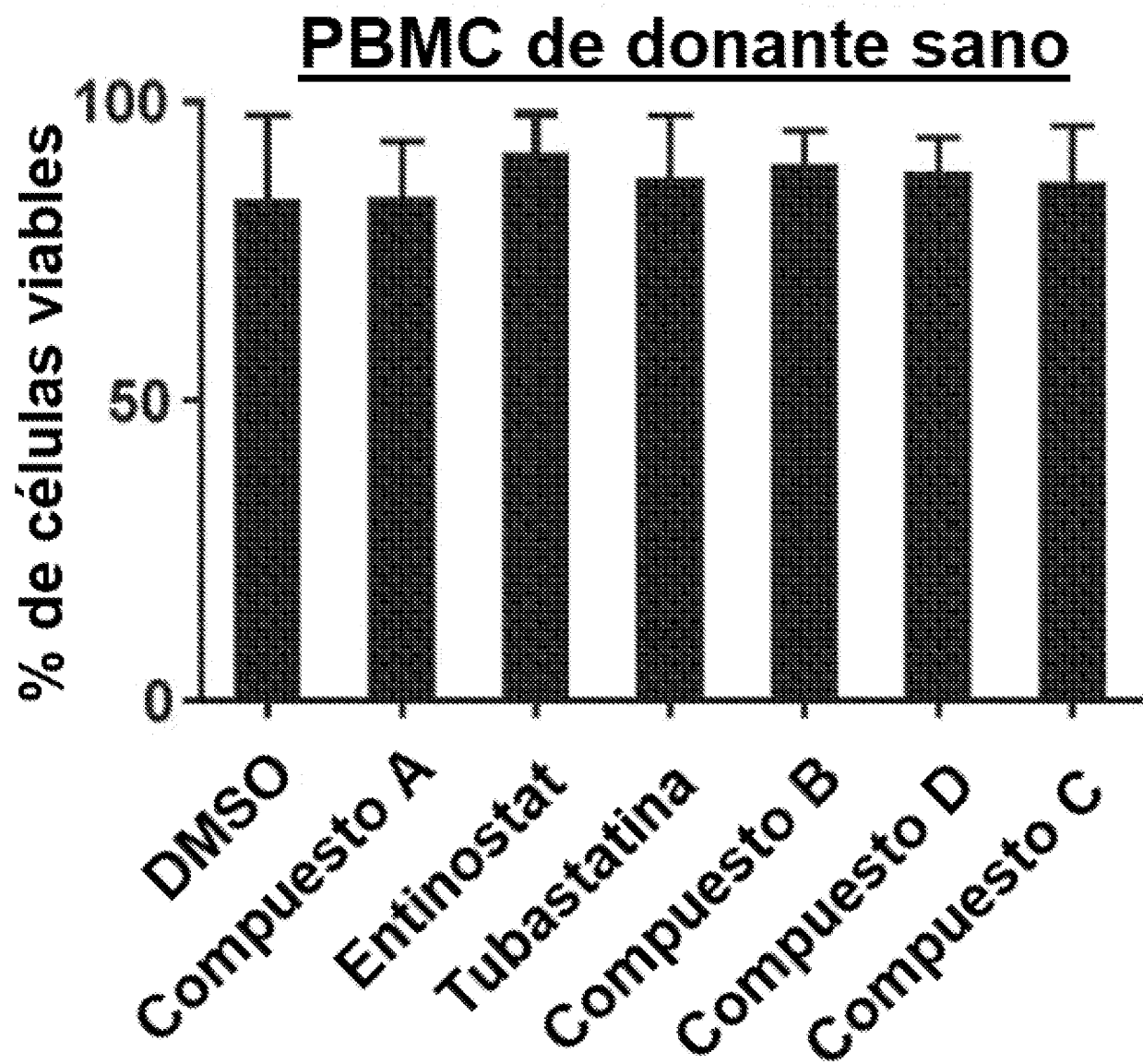


Fig. 1A

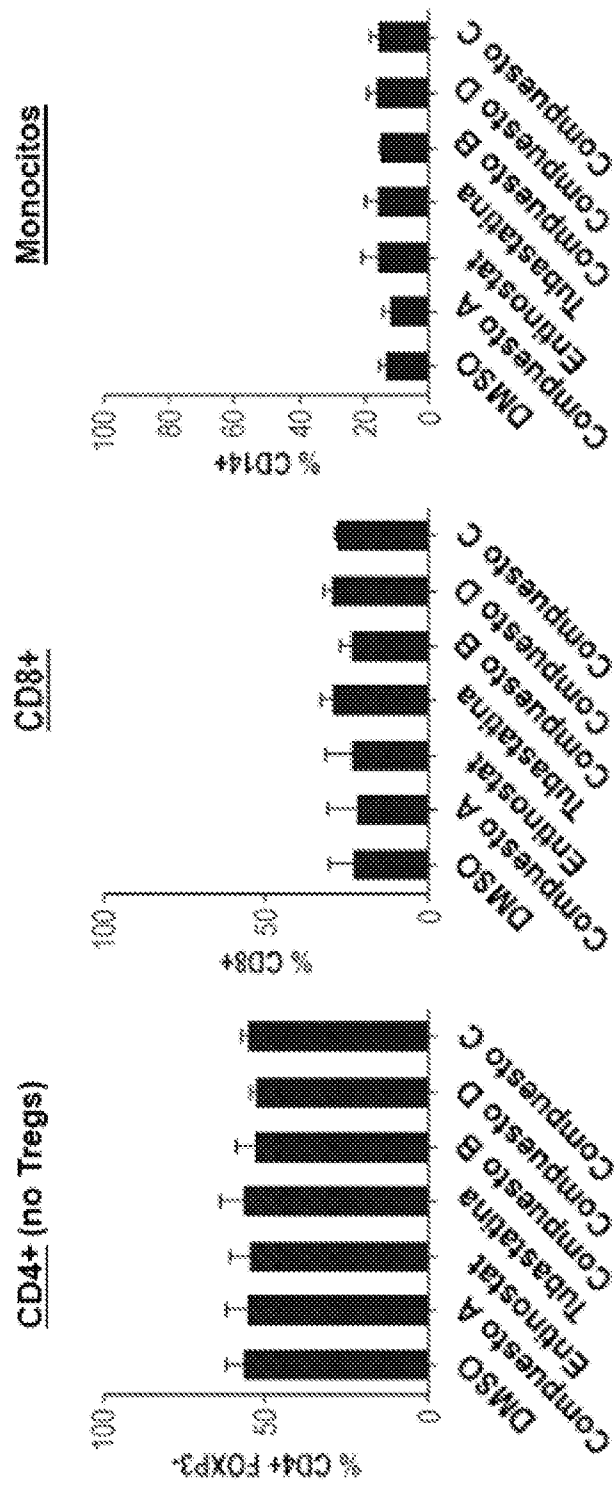


Fig. 1B

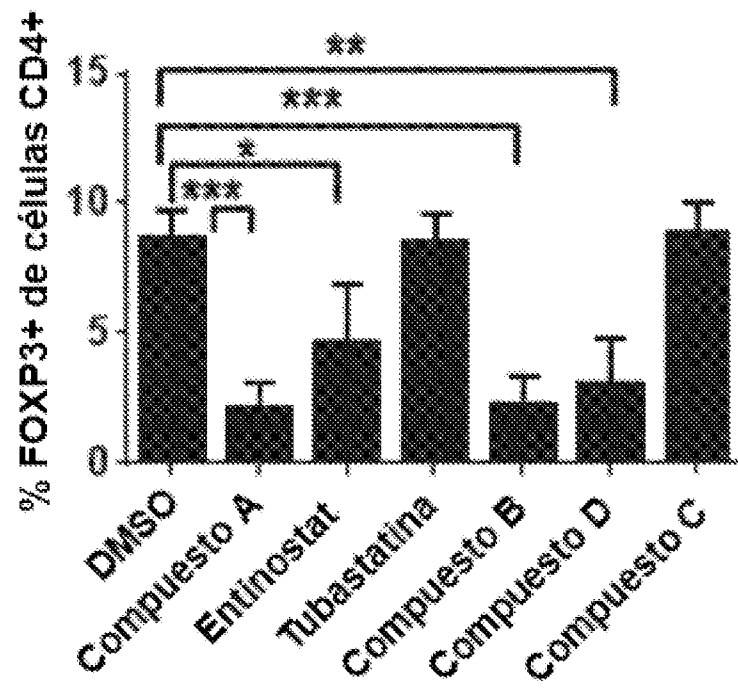


Fig. 1C

Tumor del paciente

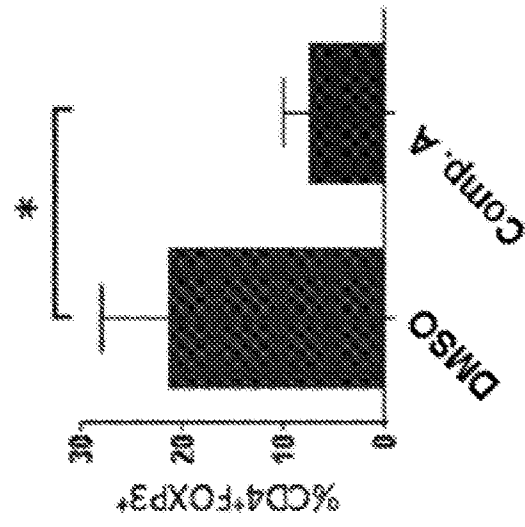


Fig. 2B

PBMC del paciente

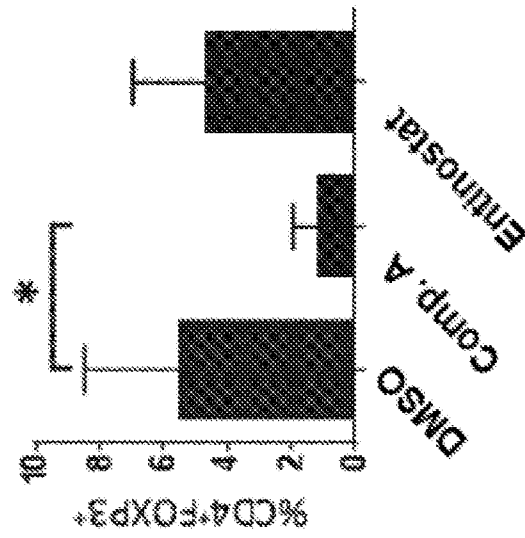


Fig. 2A

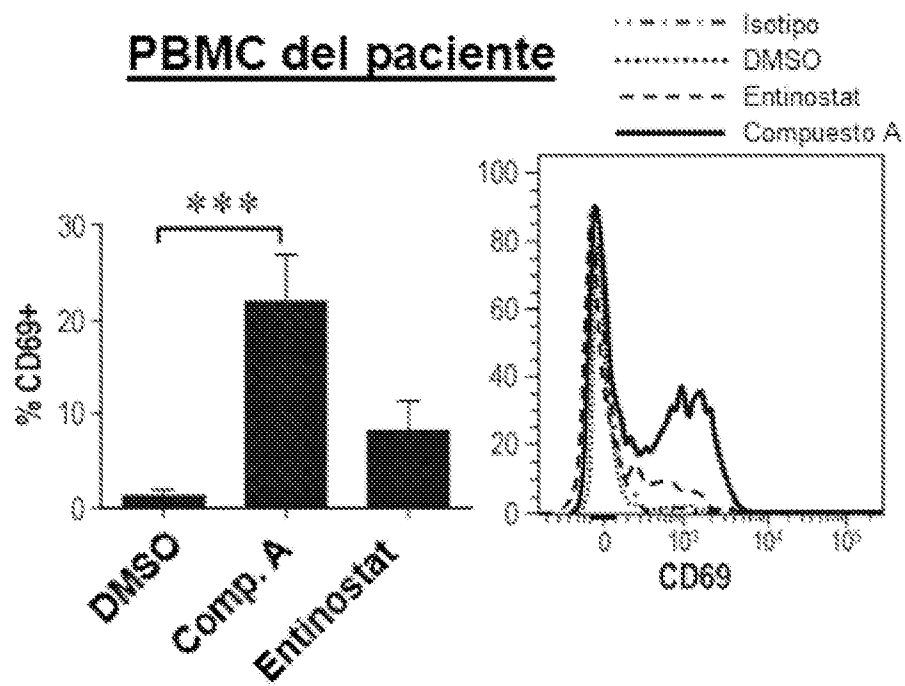


Fig. 3A

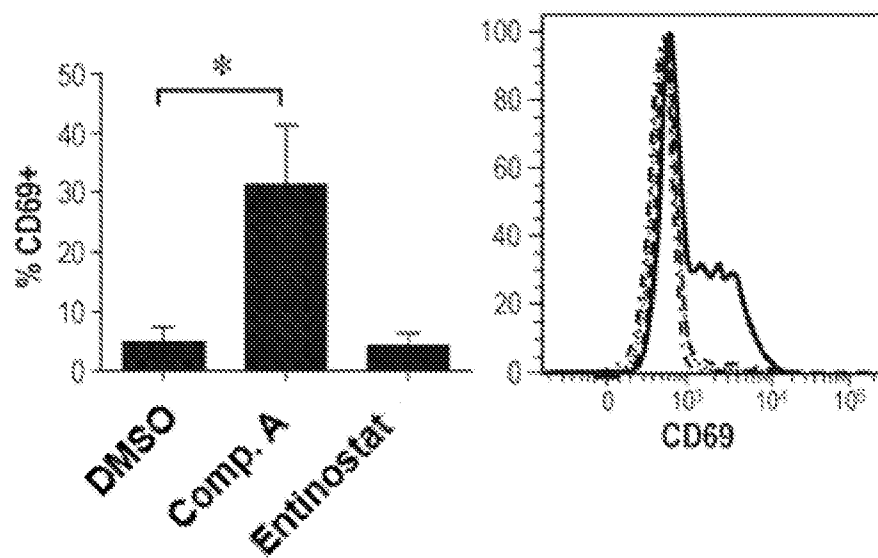


Fig. 3B

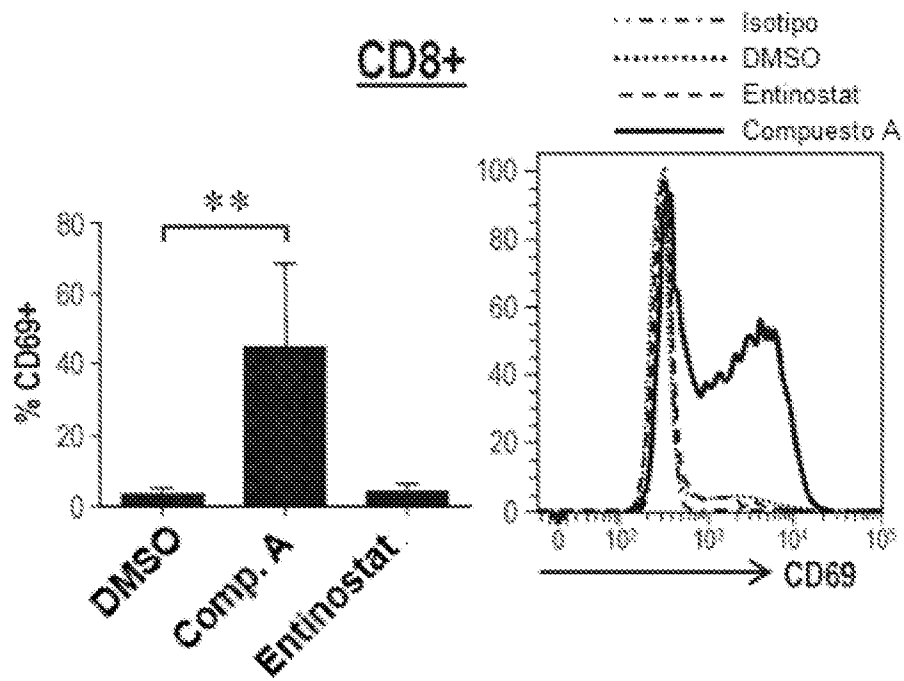


Fig. 3C

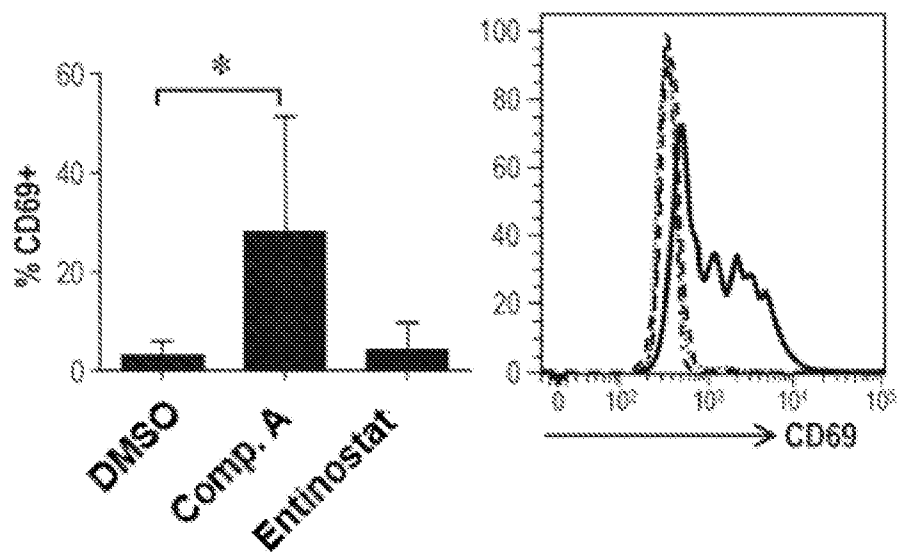
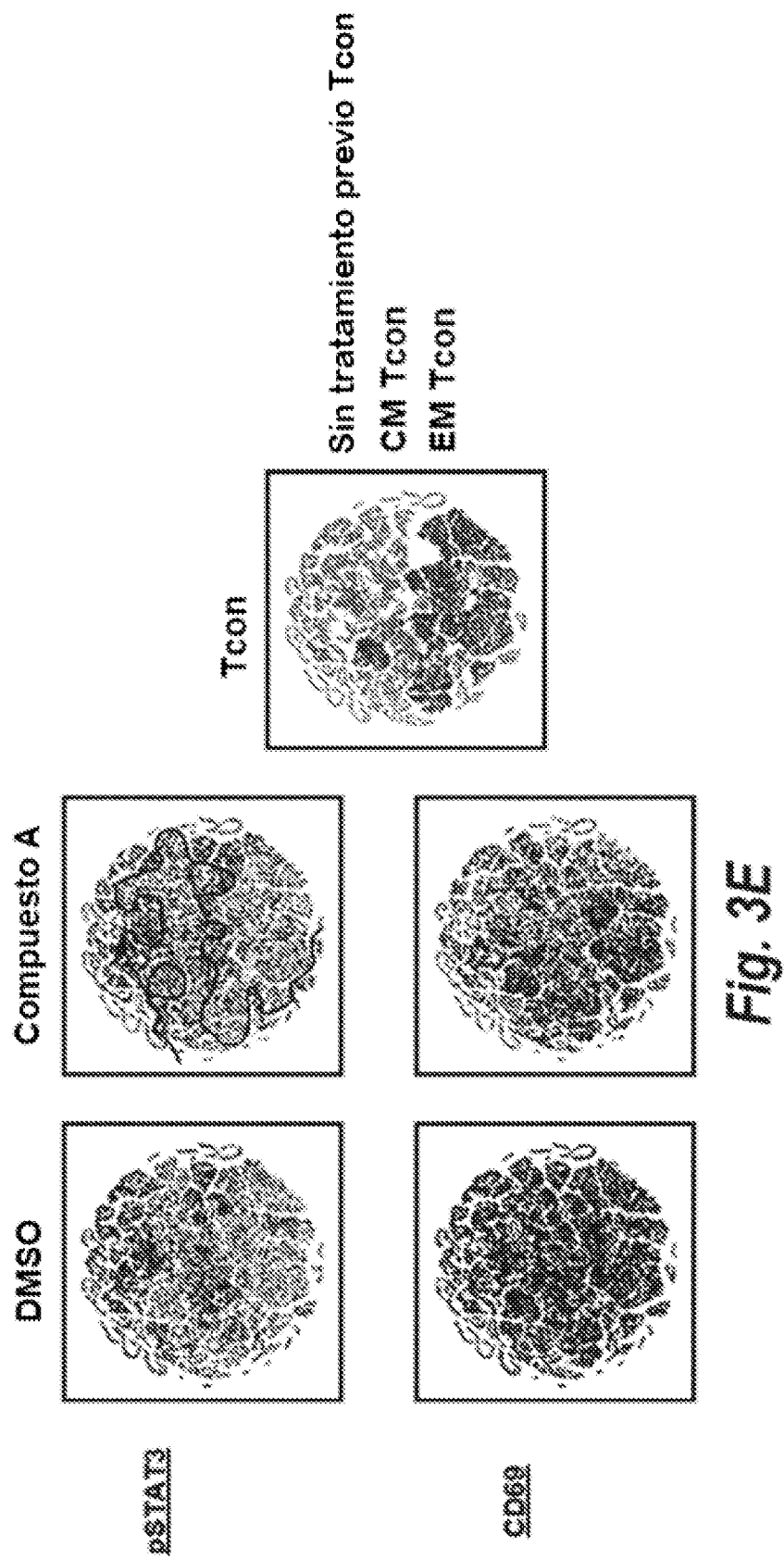


Fig. 3D



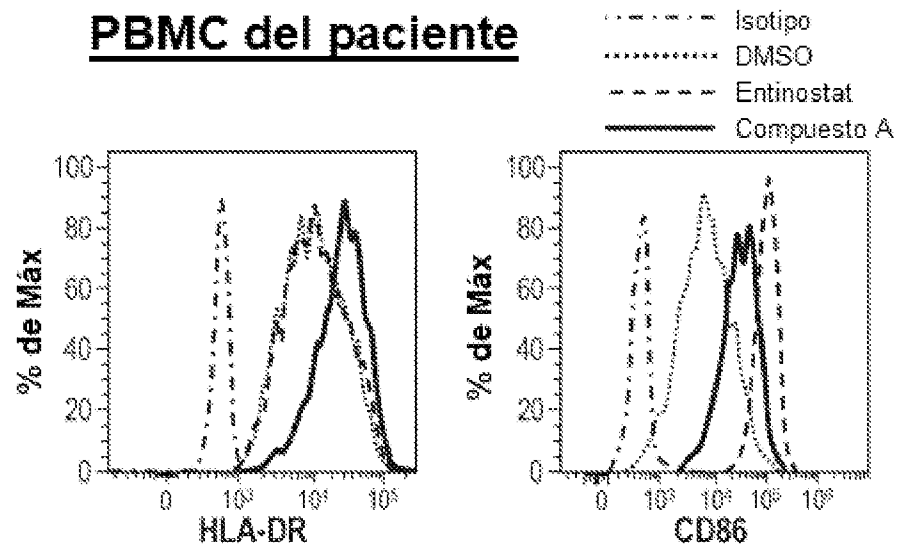


Fig. 4A

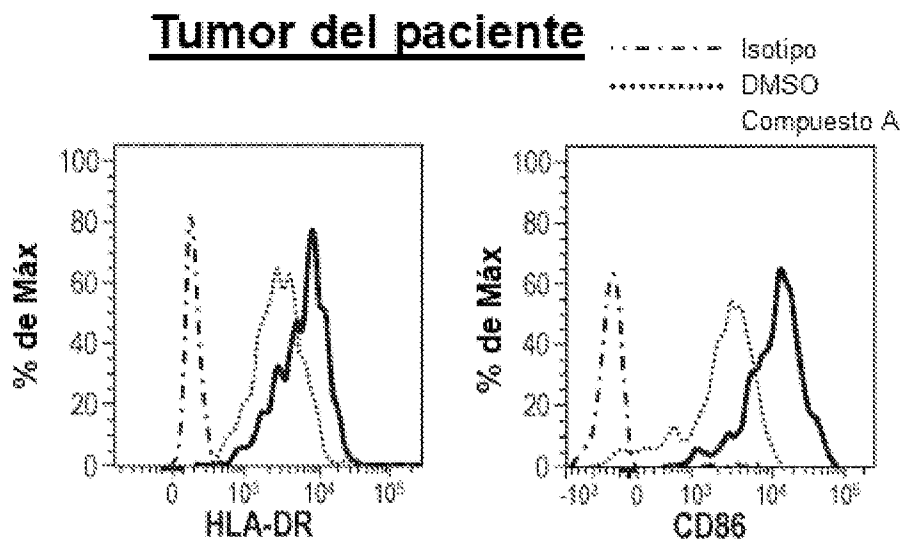


Fig. 4B

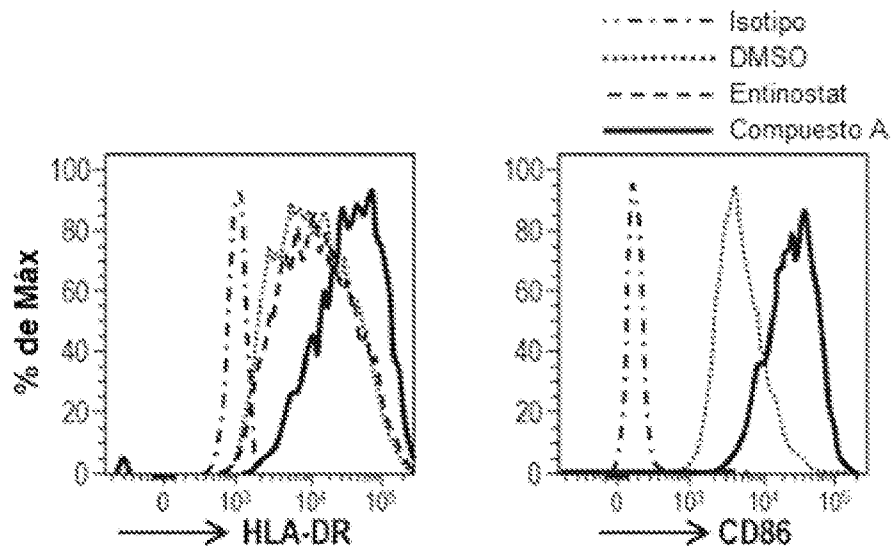


Fig. 4C

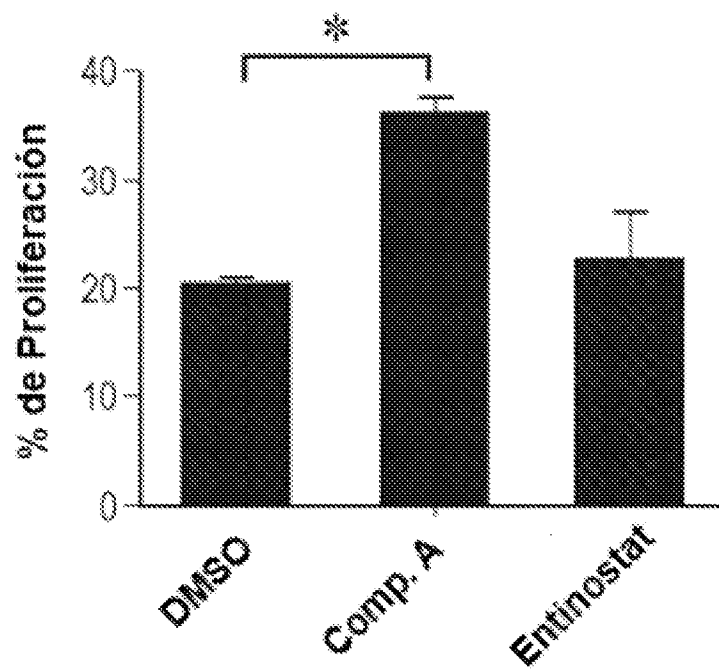


Fig. 4D

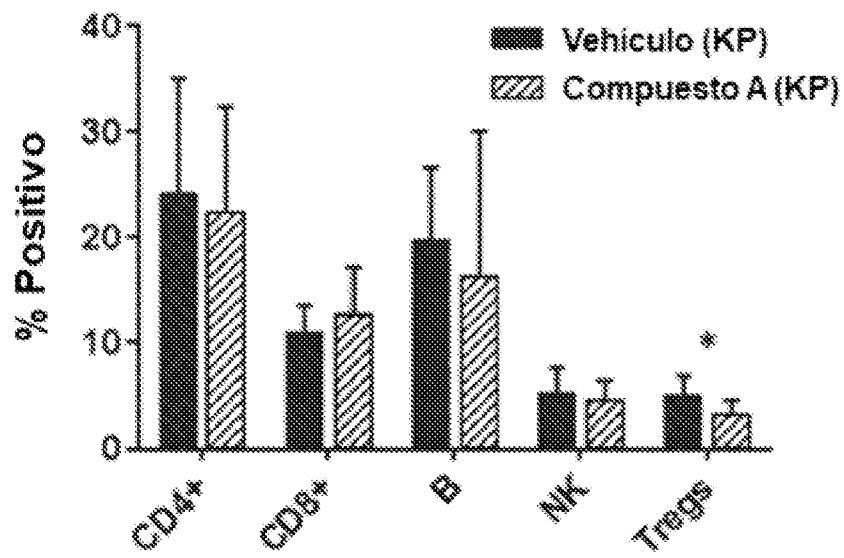


Fig. 5A

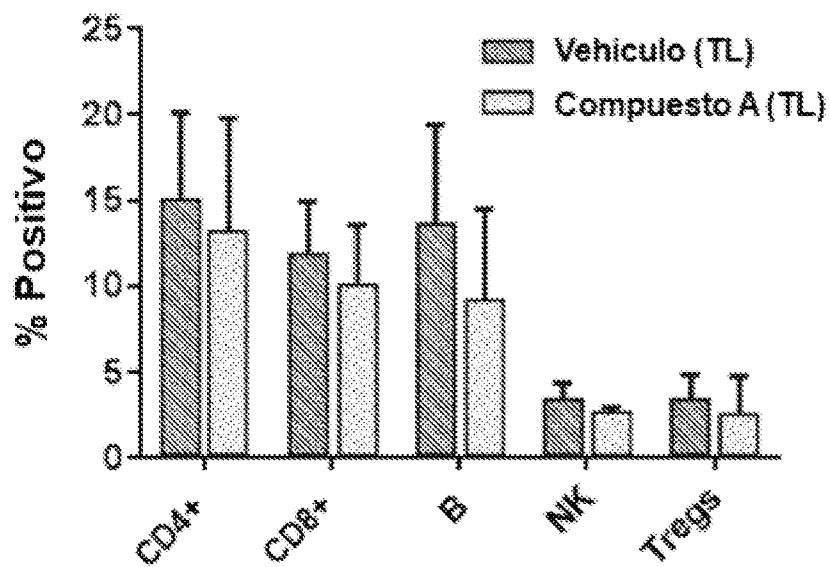
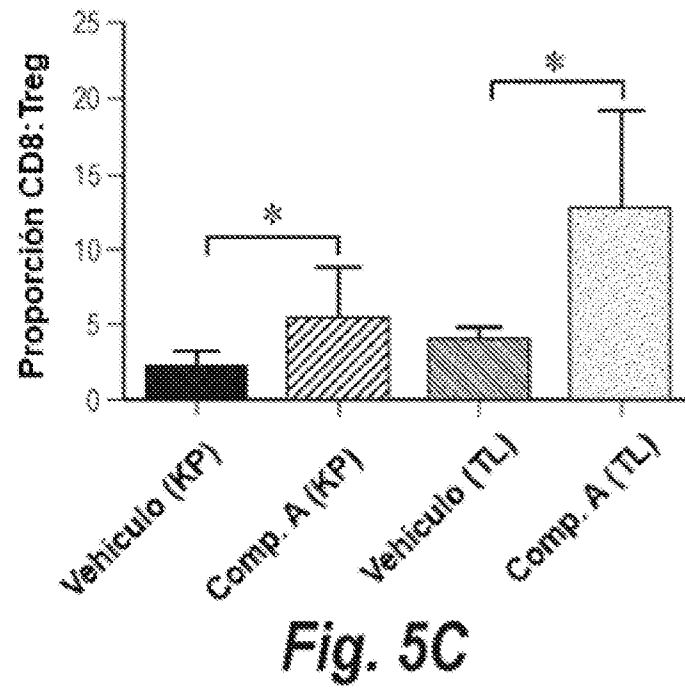


Fig. 5B



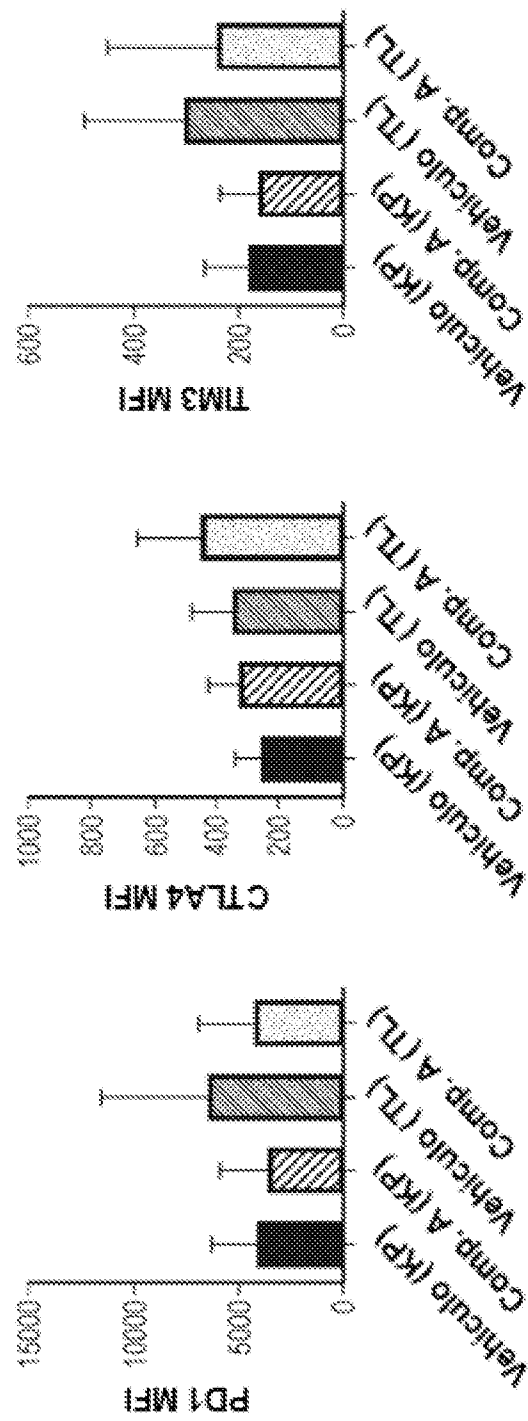


Fig. 5D

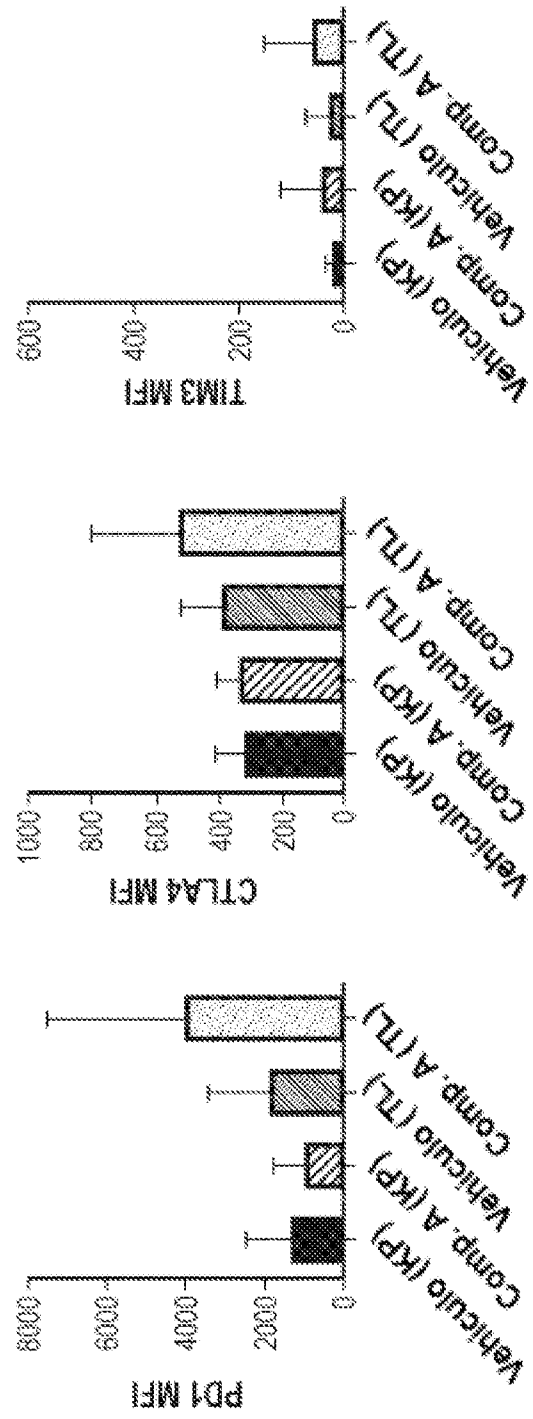


Fig. 5E

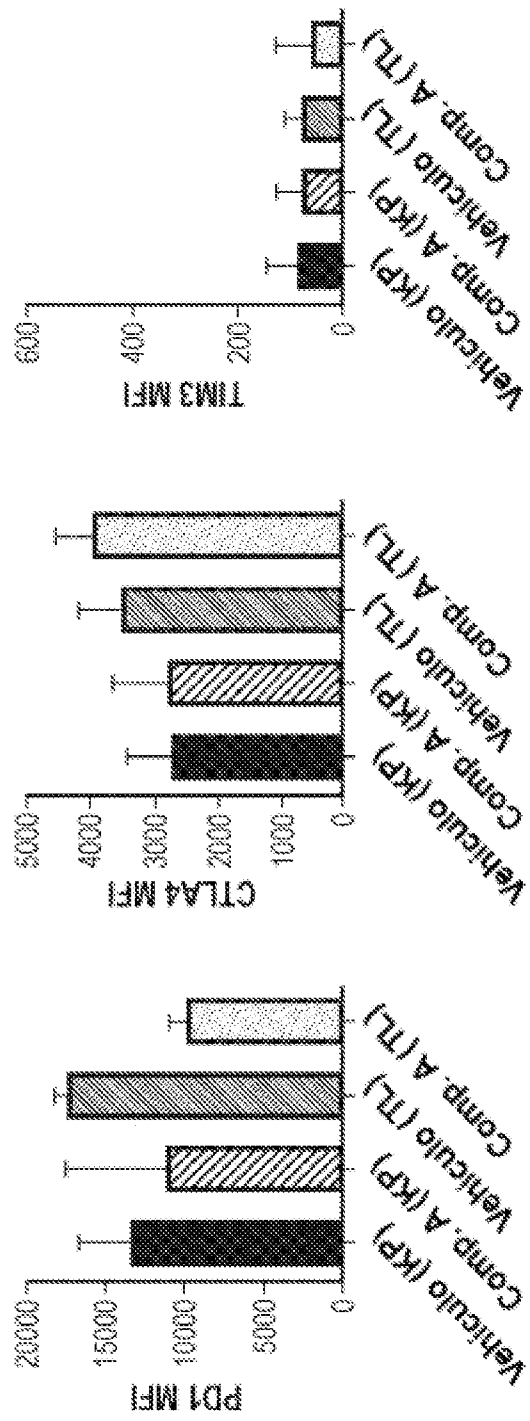


Fig. 5F

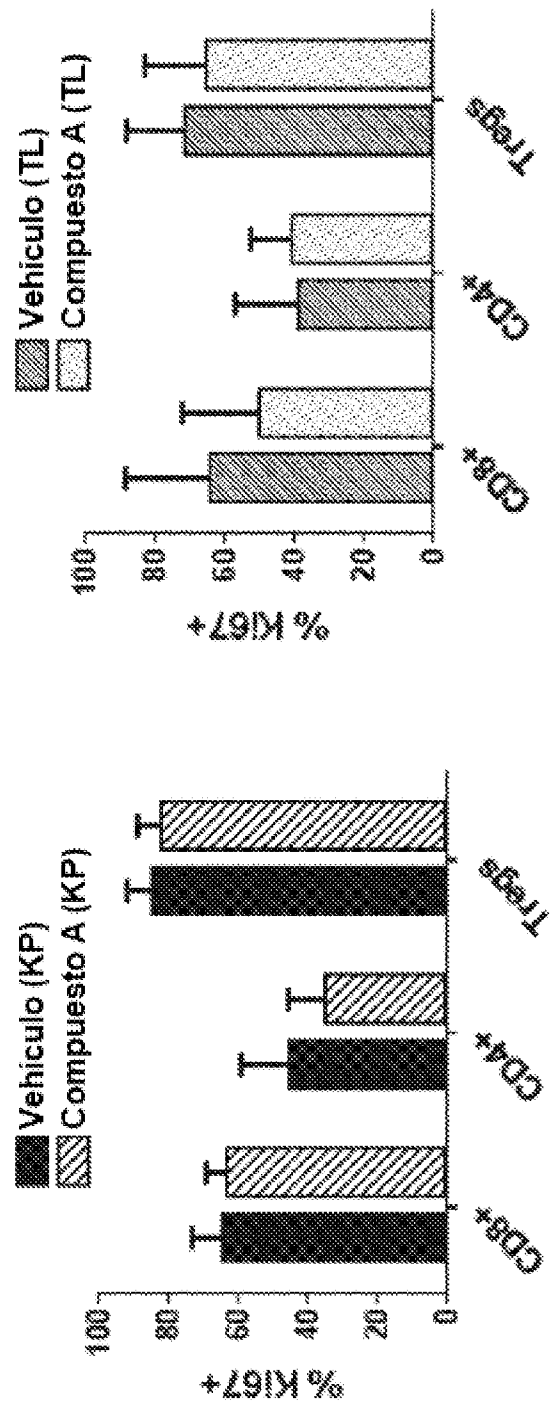


Fig. 5G

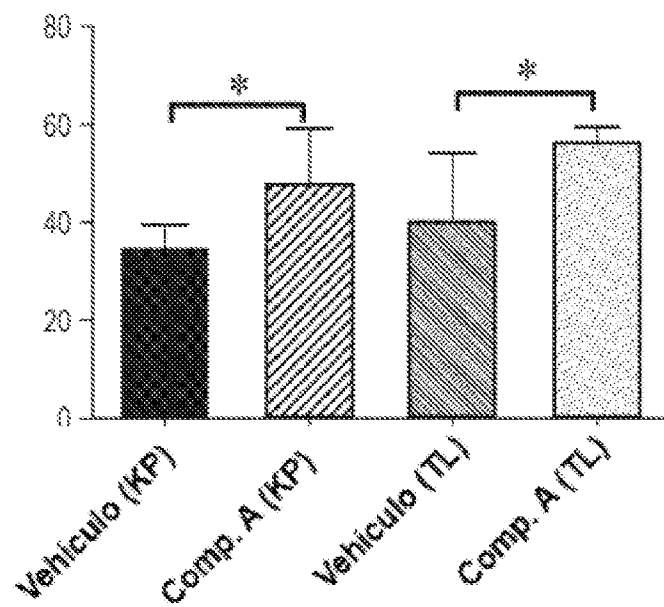


Fig. 5H

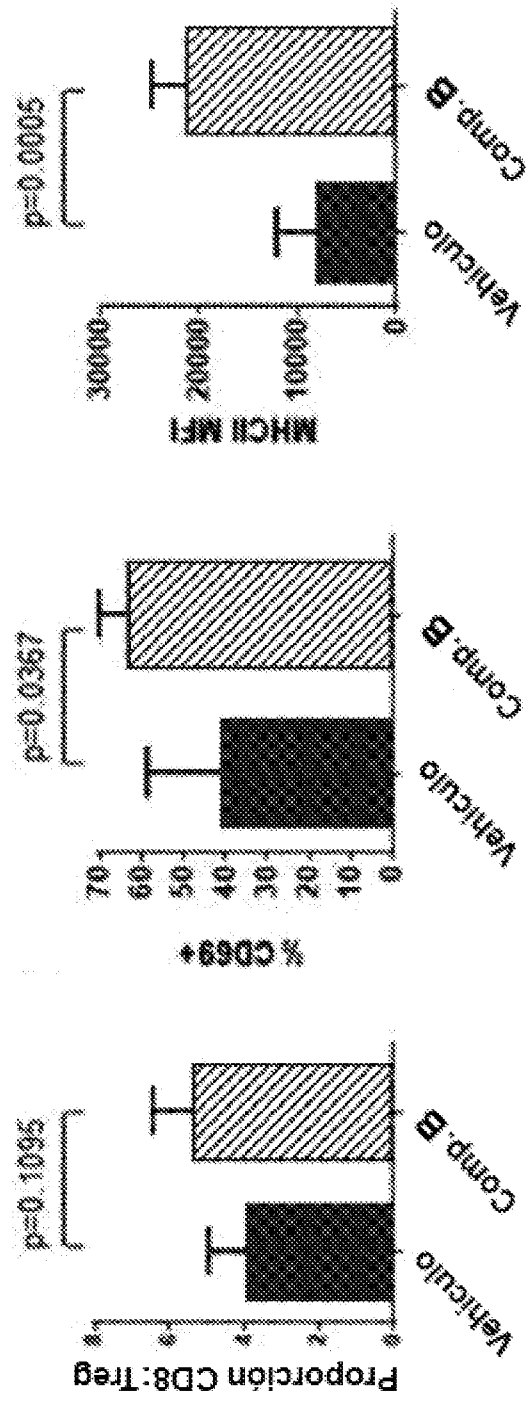


Fig. 5I

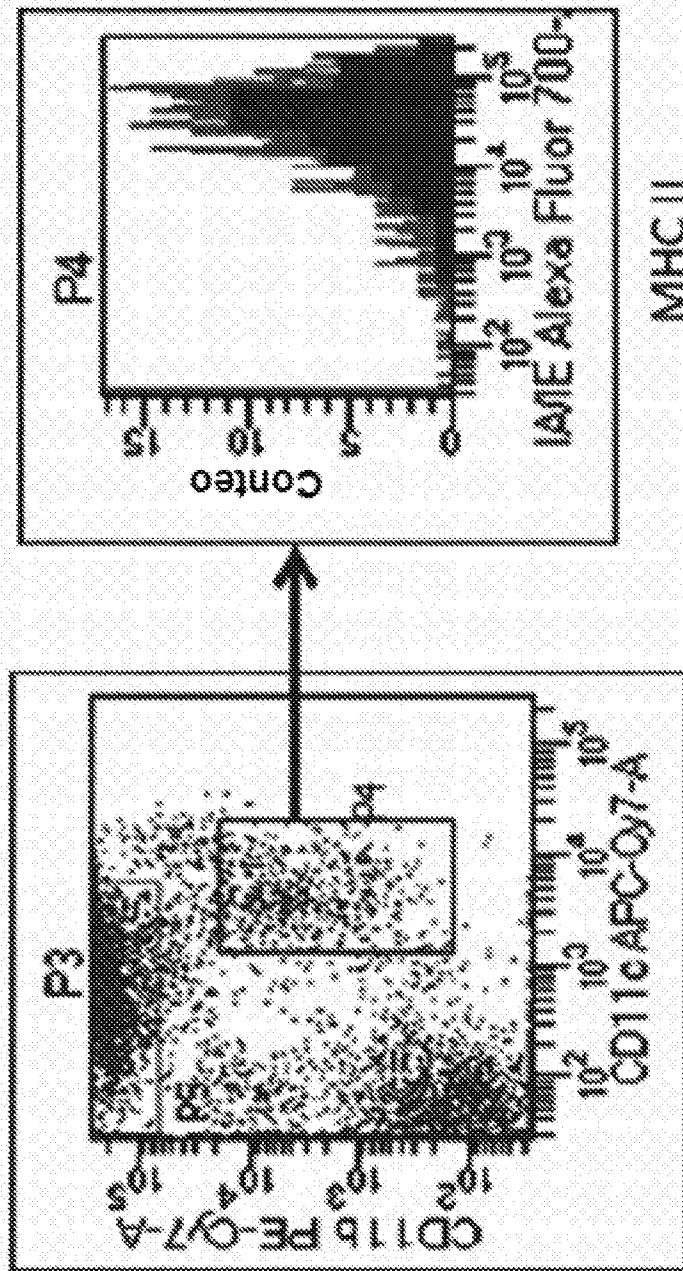


Fig. 5J

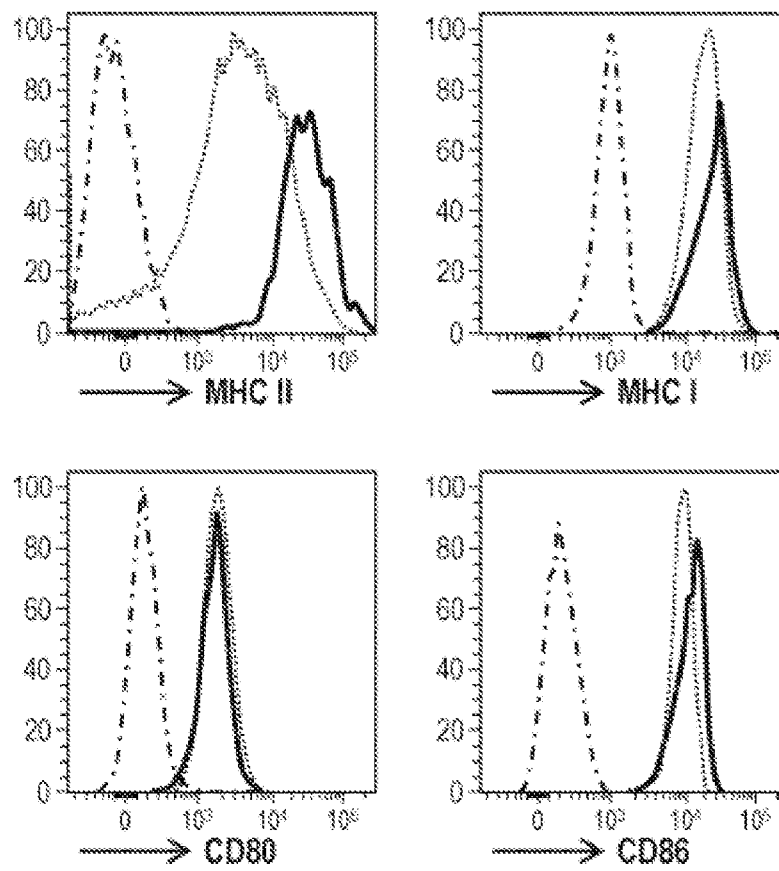
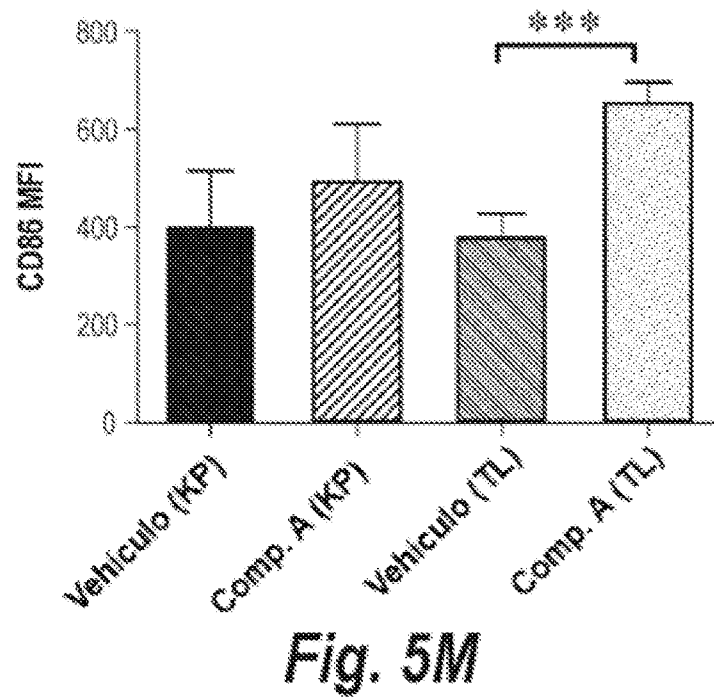
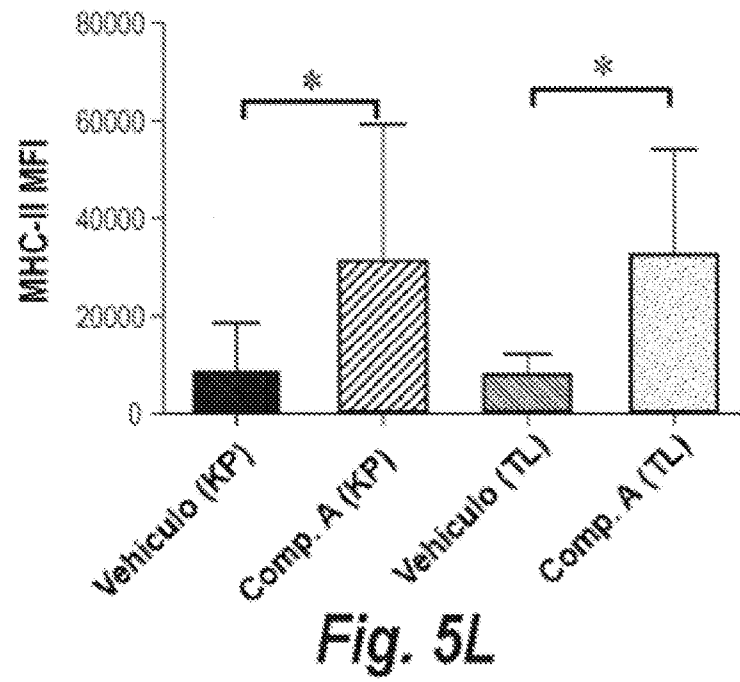


Fig. 5K



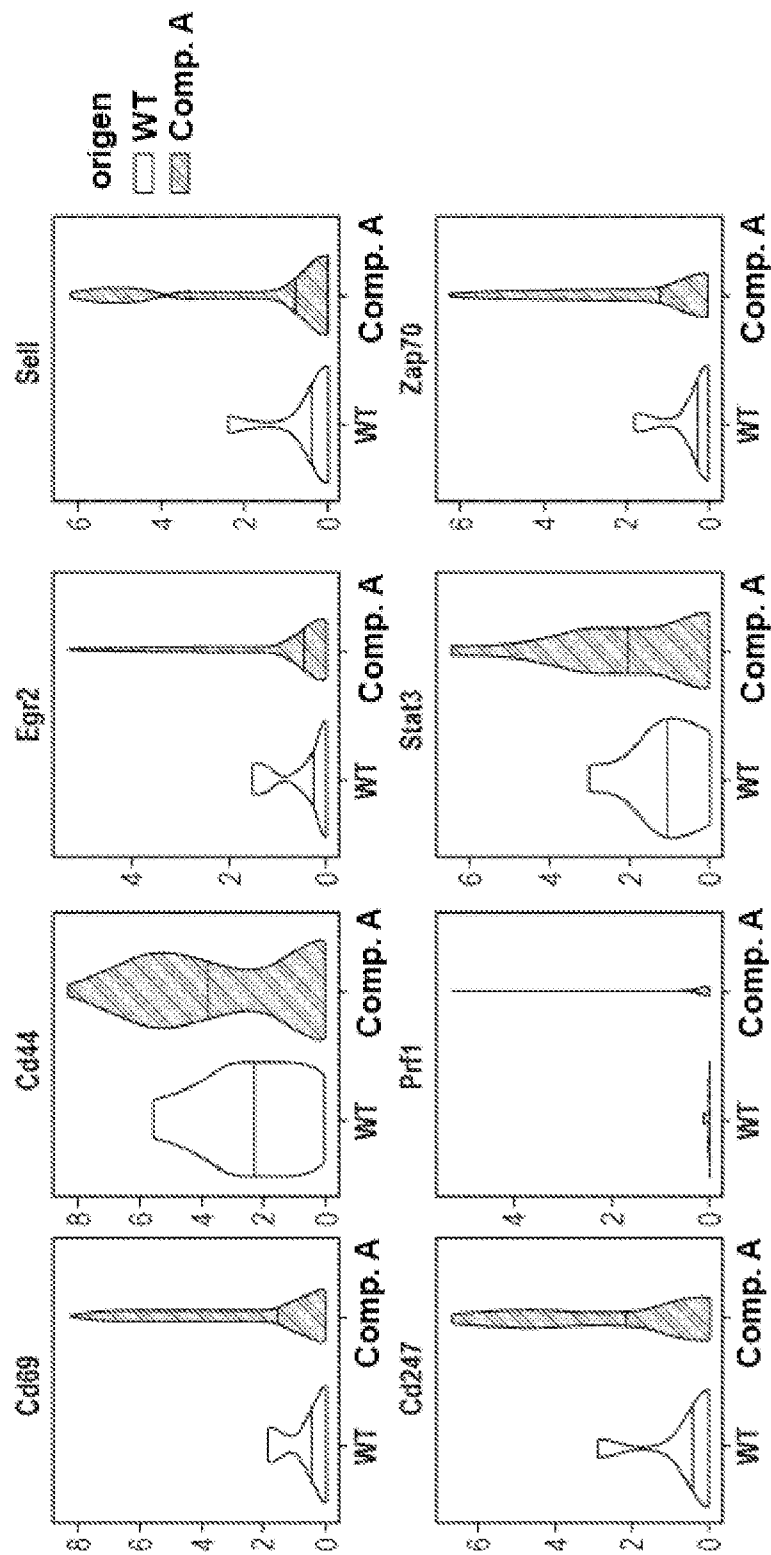
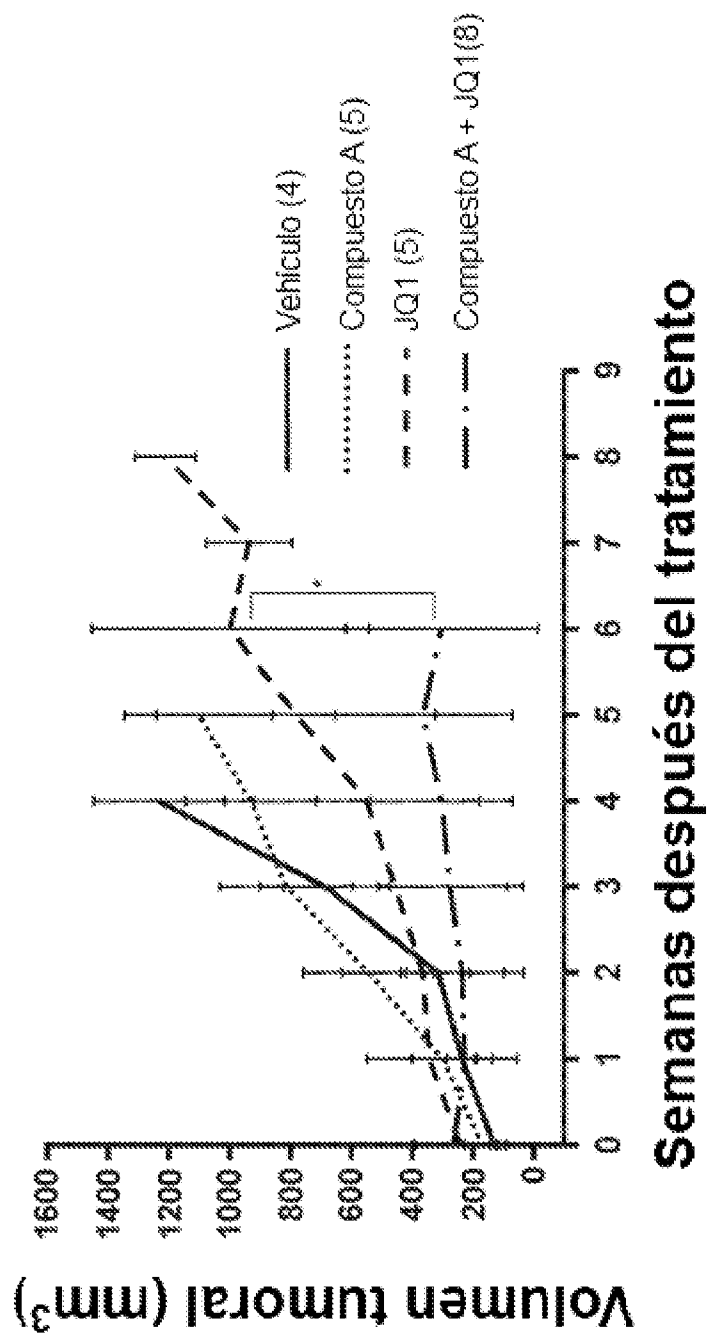


Fig. 5N

**Fig. 6**

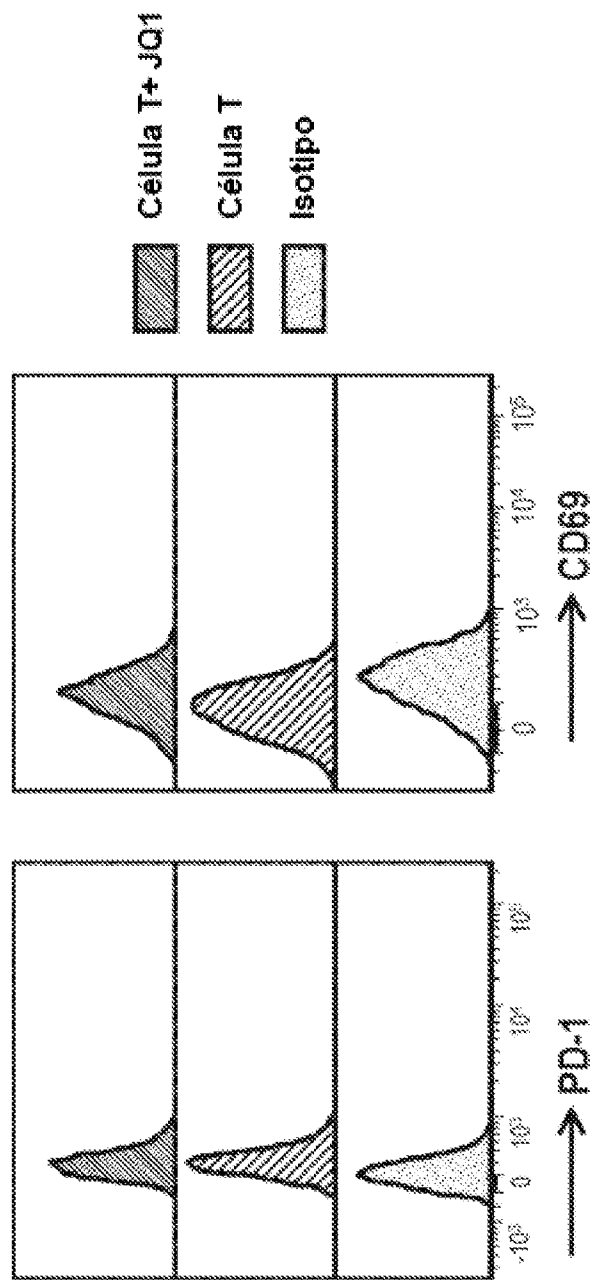


Fig. 7A

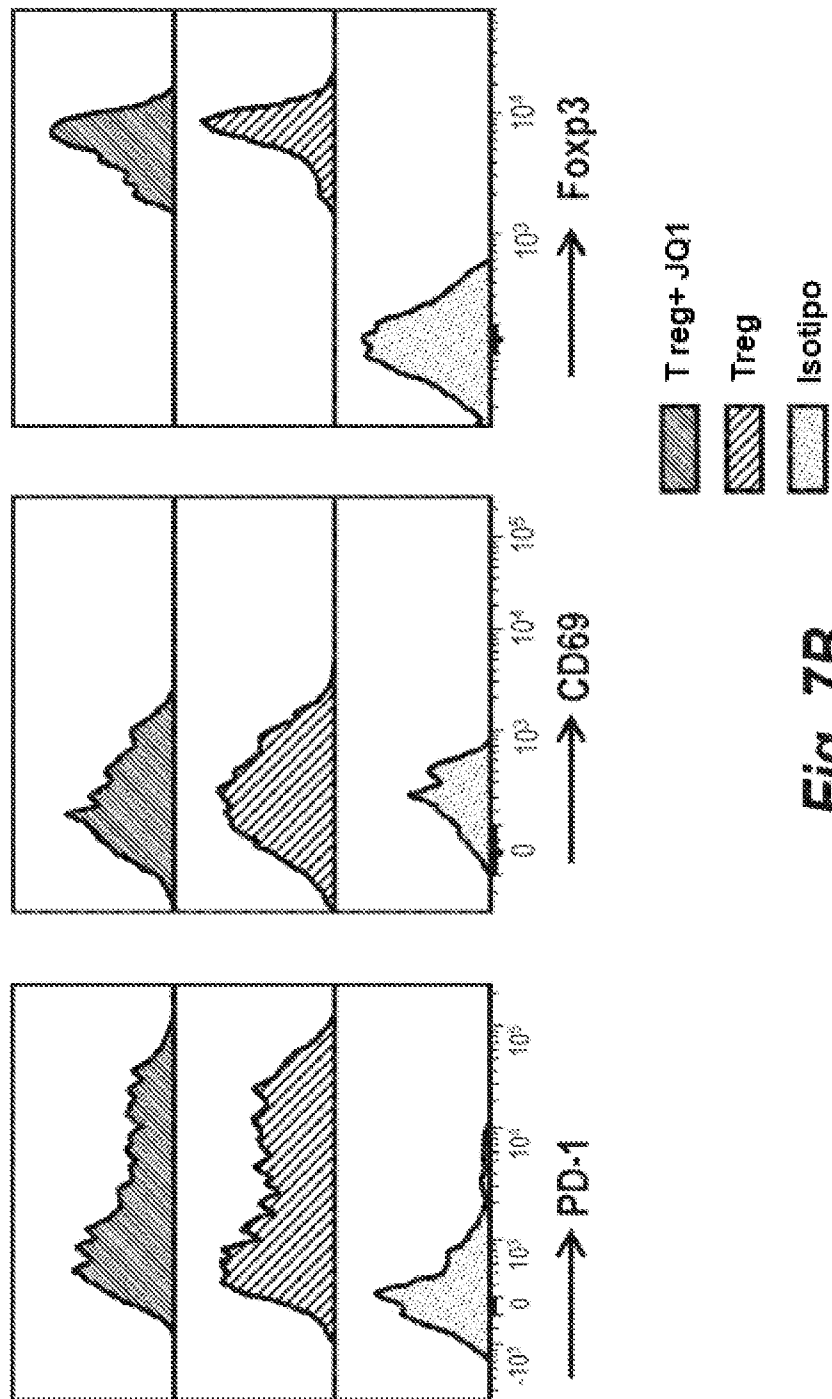


Fig. 7B

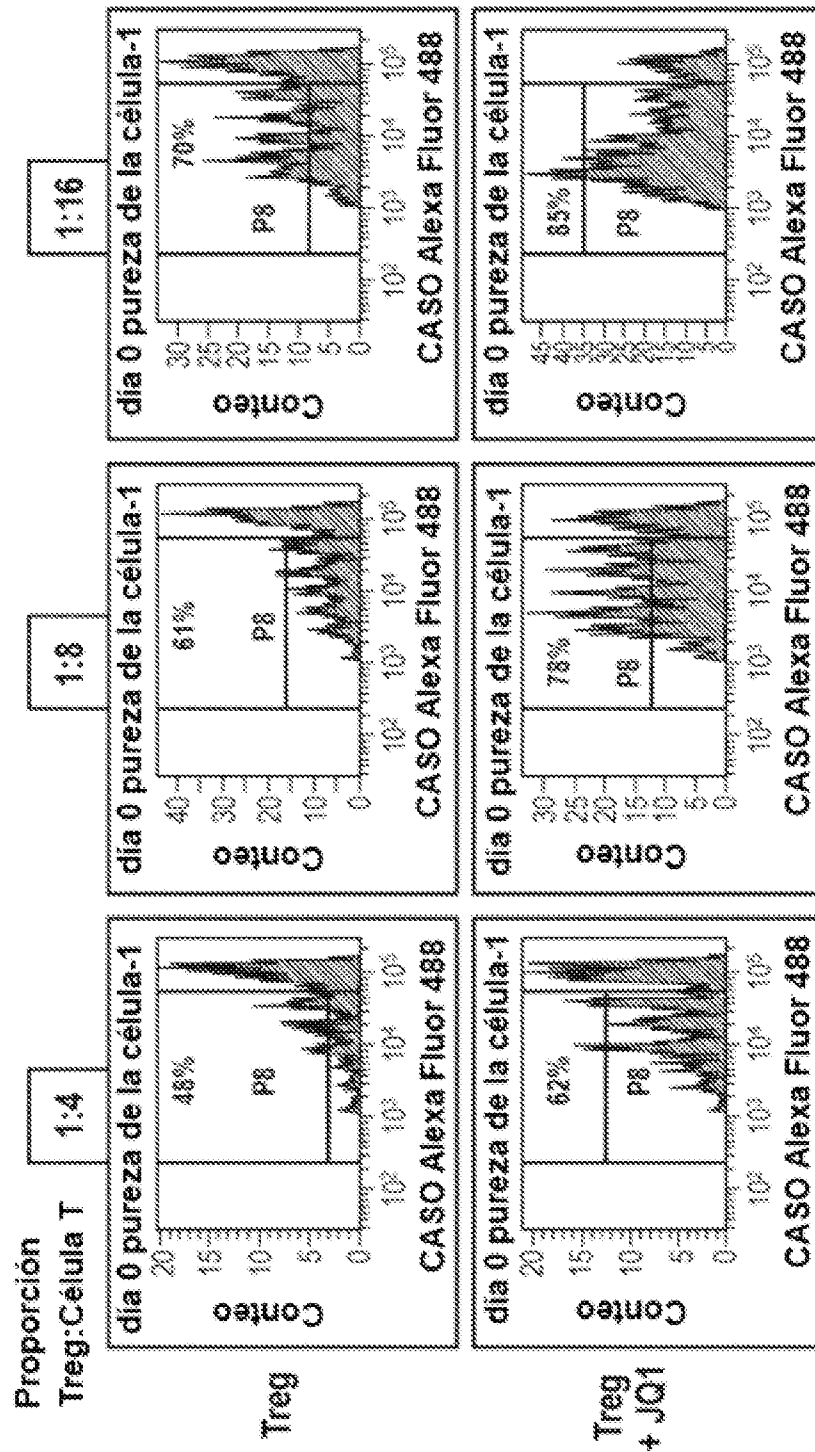


Fig. 7C

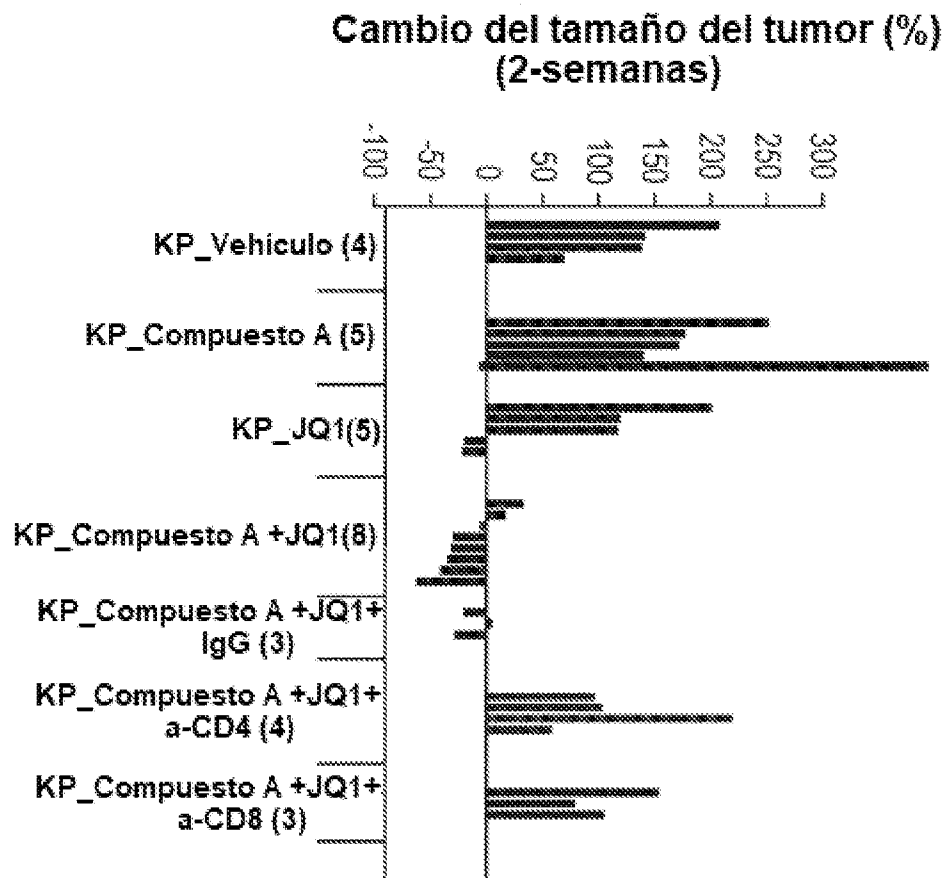
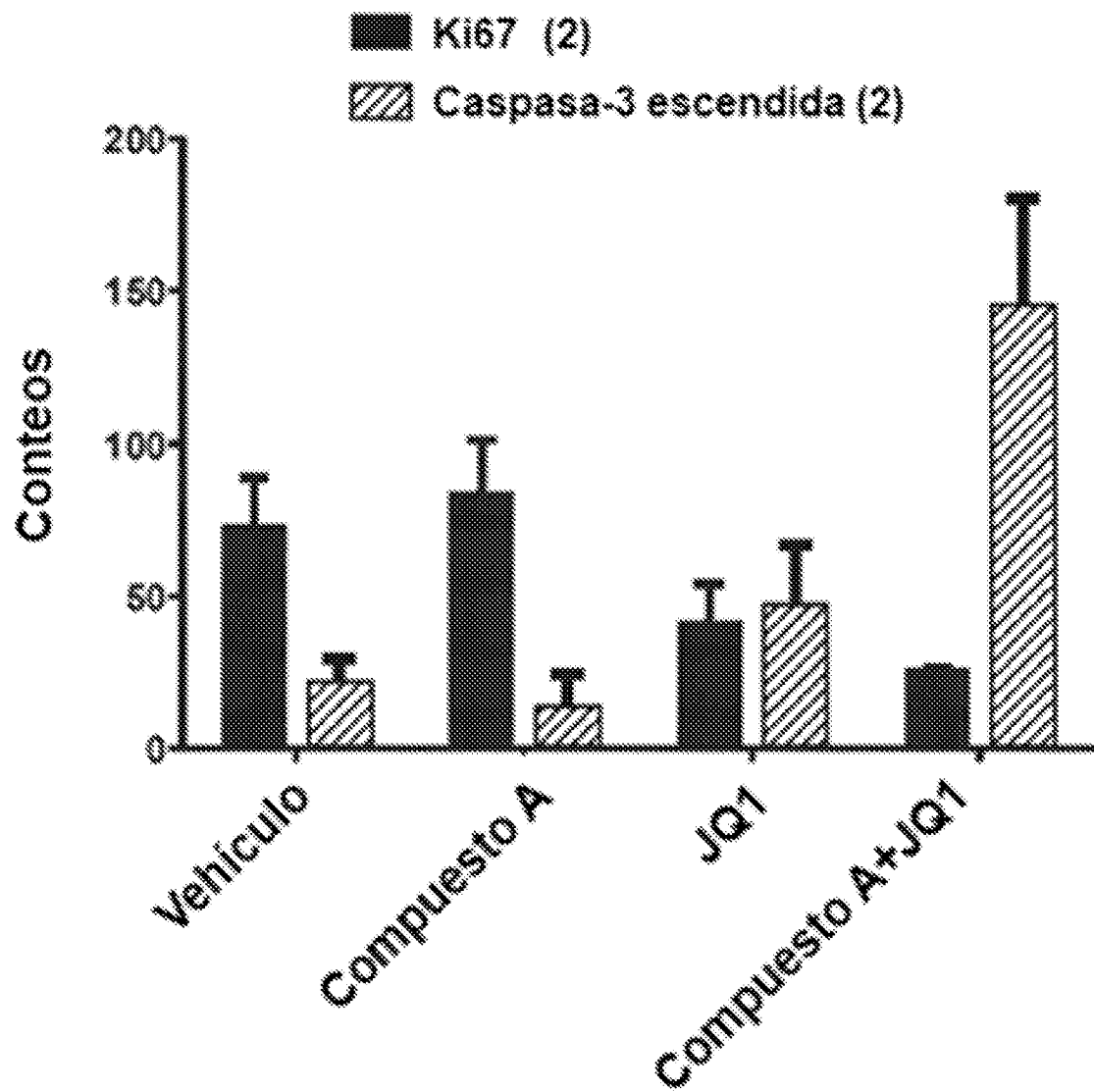


Fig. 8A

*Fig. 8B*

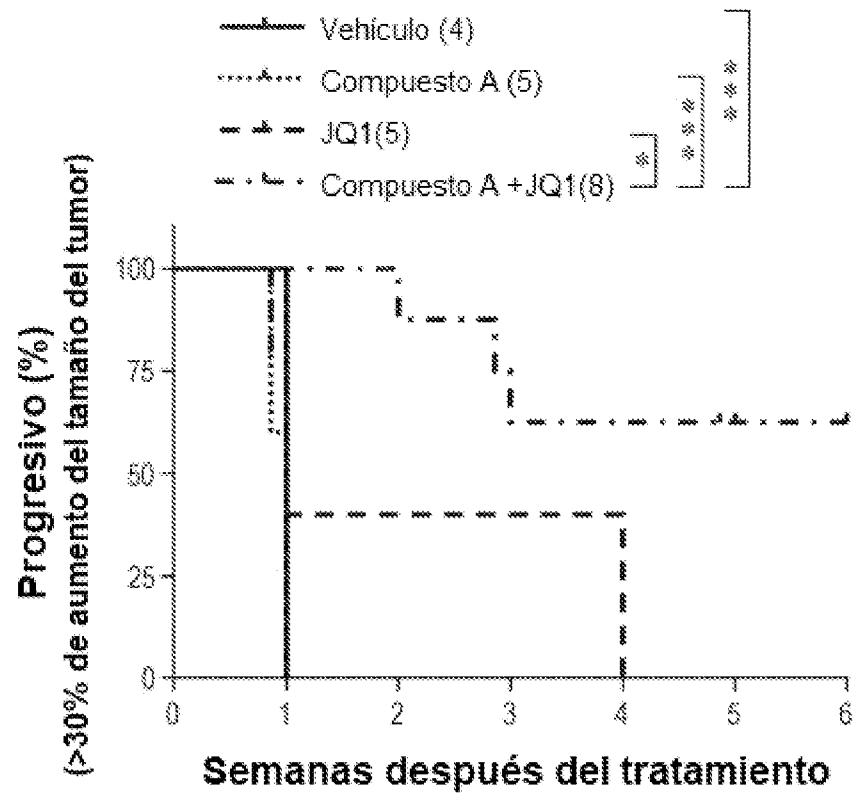
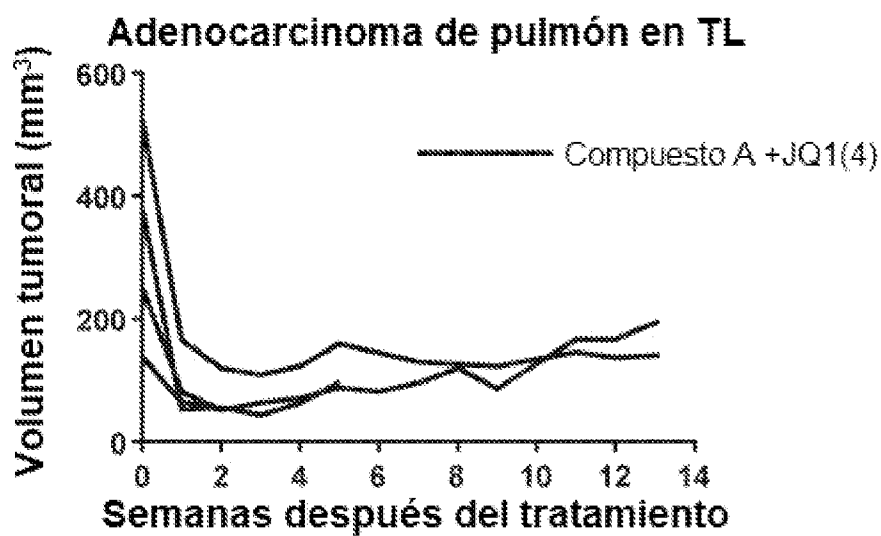
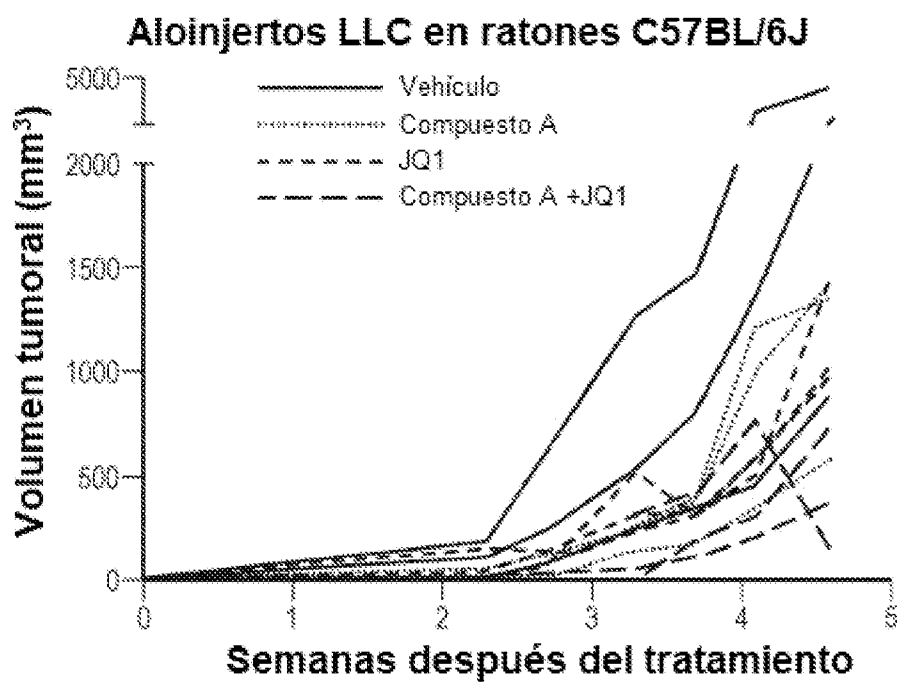
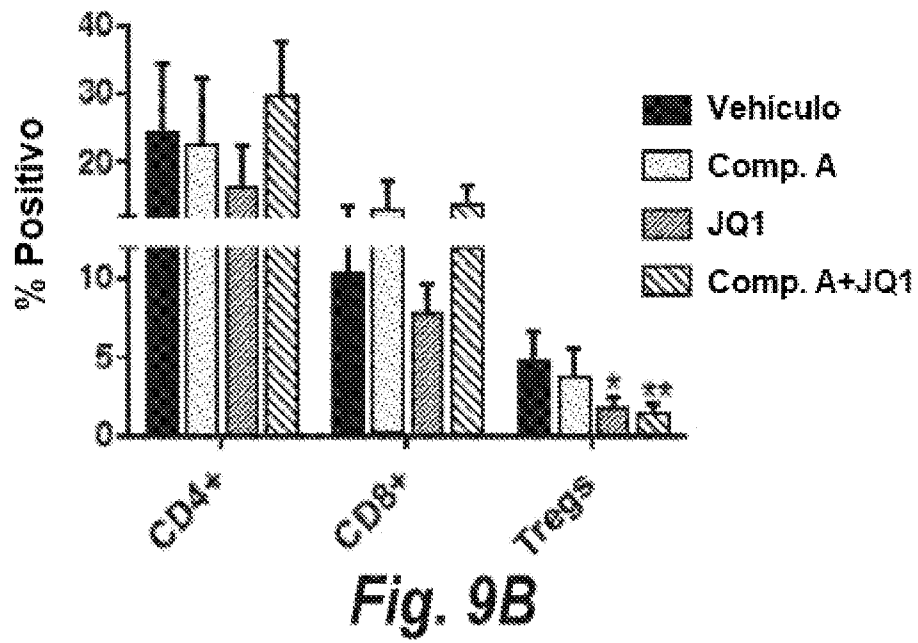
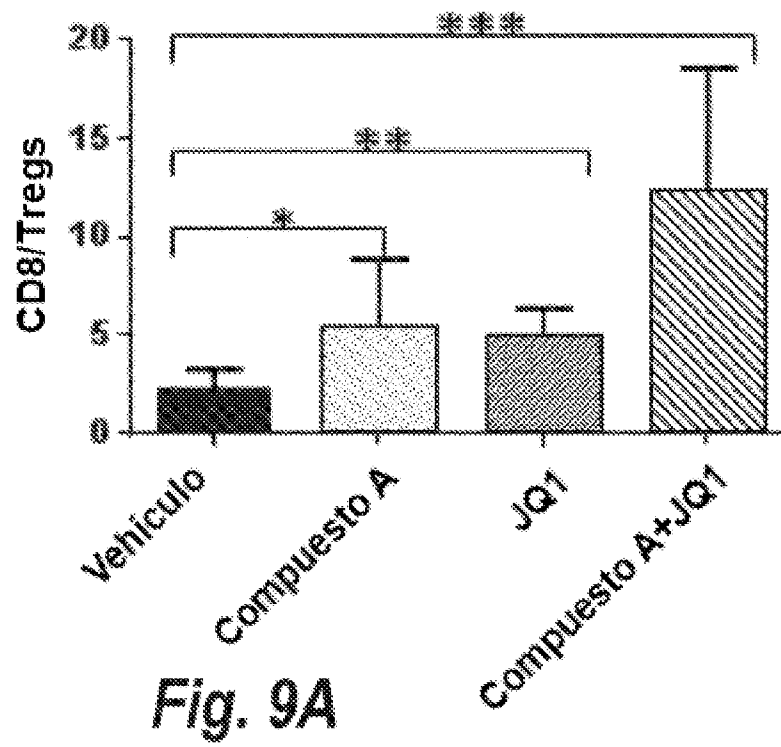
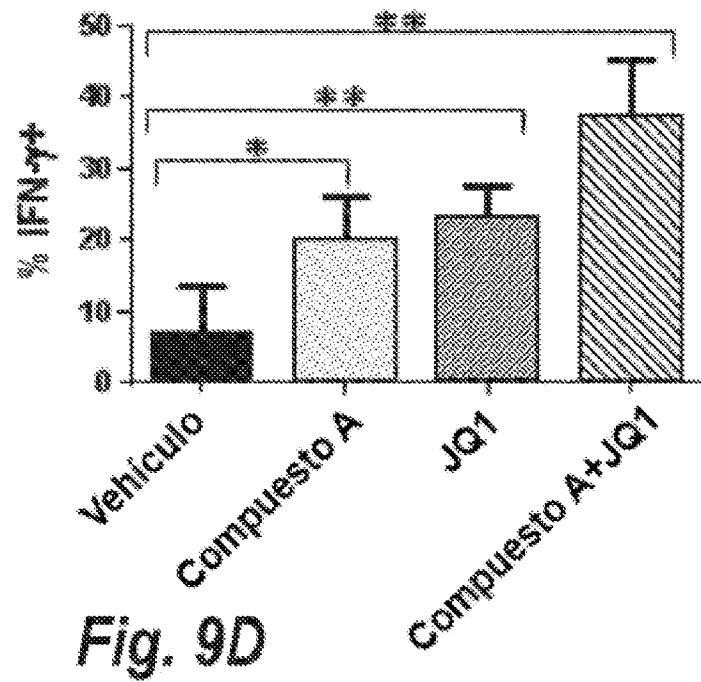
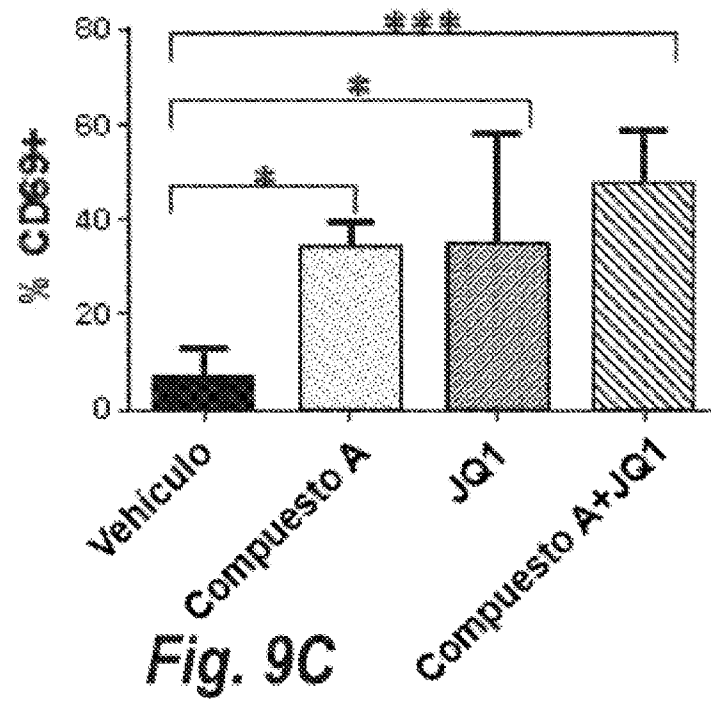


Fig. 8C

*Fig. 8D**Fig. 8E*





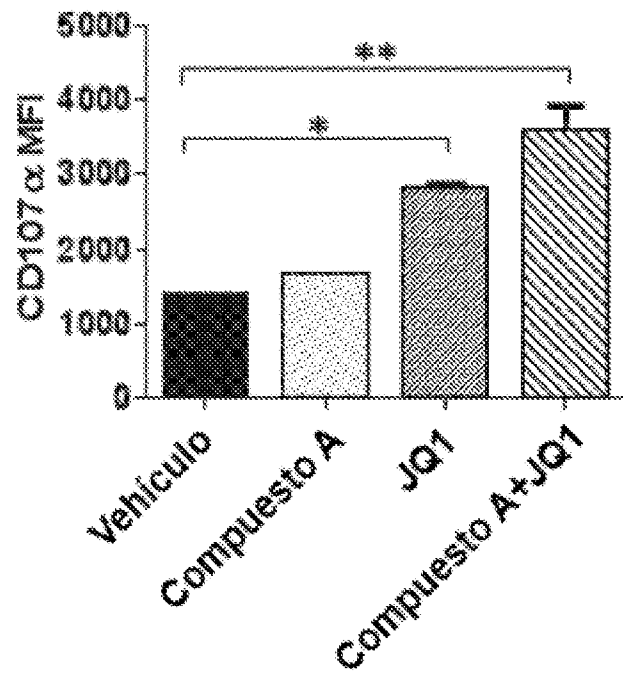


Fig. 9E

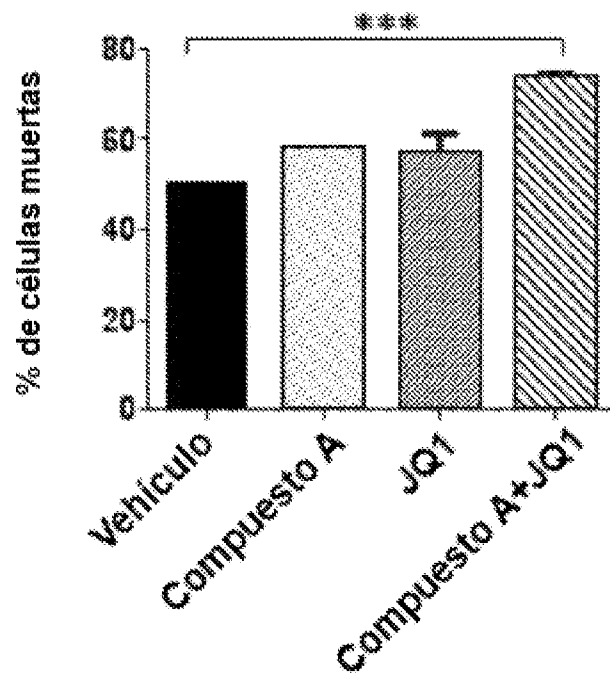
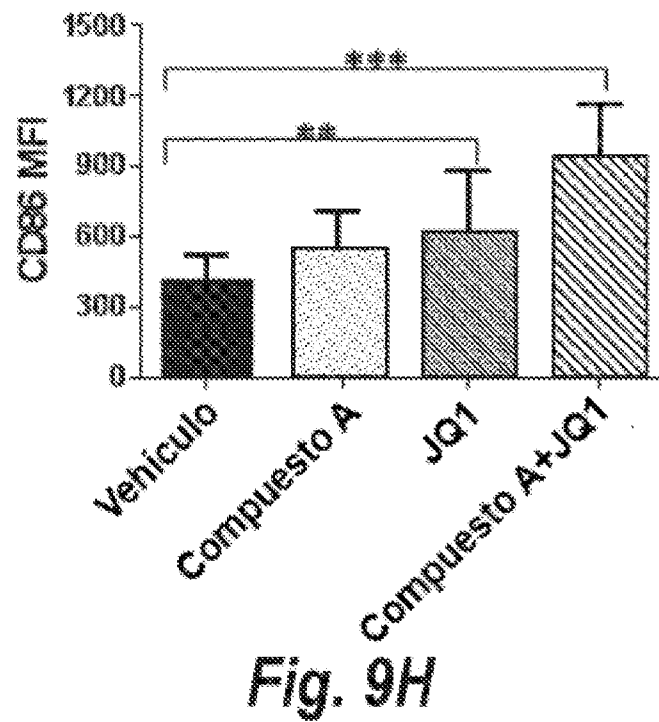
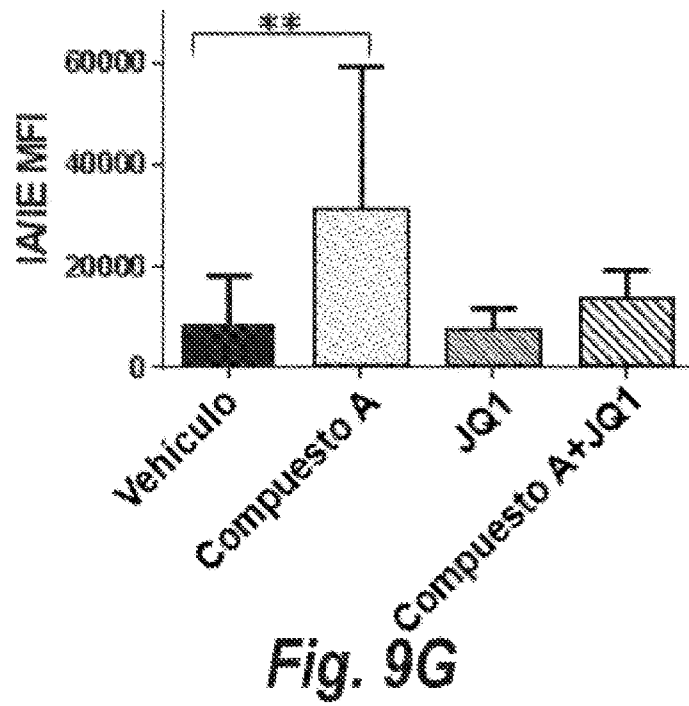


Fig. 9F



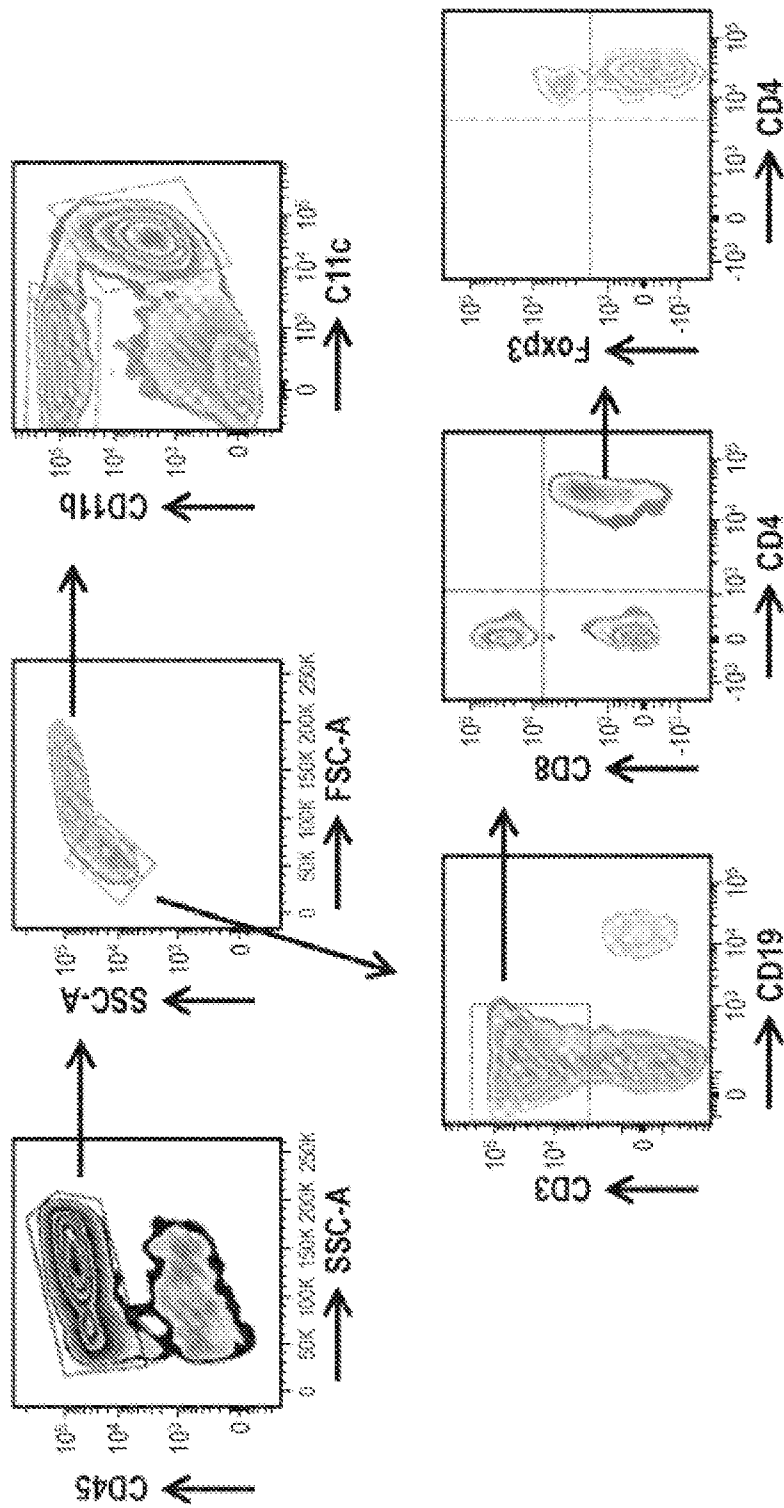


Fig. 10