

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 913**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2018** **PCT/US2018/041230**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2019** **WO19014100**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2018** **E 18746444 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 3651766**

54 Título: **4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo como compuesto antiproliferativo**

30 Prioridad:

10.07.2017 US 201762530778 P
30.11.2017 US 201762593185 P
23.05.2018 US 201862675581 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2024

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

ALEXANDER, MATTHEW, D.;
ARTMAN, GERALD, D., III;
BRAY, GORDON, L.;
CARMICHAEL, JAMES;
CARRANCIO, SORAYA;
CATHERS, BRIAN E.;
CORREA, MATTHEW, D.;
HANSEN, JOSHUA;
HAVENS, COURTNEY, G.;
KERCHER, TIMOTHY, S.;
LOPEZ-GIRONA, ANTONIA;
LU, XIAOLING;
MAN, HON-WAH;
NAGY, MARK, A.;
NARLA, RAMA, K.;
PICCOTTI, JOSEPH, R.;
PIERCE, DANIEL, W.;
TAVARES-GRECO, PAULA, A.;
WHITEFIELD, BRANDON, W.;
WONG, LILLY, L. y
ZOU, NANFEI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 992 913 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

4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo como compuesto antiproliferativo

1. CAMPO

Se proporciona aquí 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o un enantiómero, una mezcla de dichos compuestos para su uso en enantiómeros, un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y dichos compuestos para su uso en métodos para tratar, prevenir o gestionar el mieloma múltiple. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y usos de las composiciones, incluidos tratamientos combinados.

2. ANTECEDENTES

El mieloma múltiple (MM) es un cáncer de células plasmáticas en la médula ósea. Normalmente, las células plasmáticas producen anticuerpos y desempeñan una función clave en la función inmunitaria. Sin embargo, el crecimiento descontrolado de estas células ocasiona dolor y fracturas óseas, anemia, infecciones y otras complicaciones. El mieloma múltiple es el segundo tumor maligno hematológico más común, aunque las causas exactas del mieloma múltiple siguen siendo desconocidas. El mieloma múltiple ocasiona altos niveles de proteínas en la sangre, la orina y los órganos, que incluyen, pero sin limitación, proteína M y otras inmunoglobulinas (anticuerpos), albúmina y beta-2-microglobulina, excepto en algunos pacientes (que se estiman del 1% al 5%) cuyas células de mieloma no secretan estas proteínas (denominado mieloma no secretor). La proteína M, abreviatura de proteína monoclonal, también conocida como paraproteína, es una proteína particularmente anormal producida por las células plasmáticas del mieloma y se puede encontrar en la sangre o la orina de casi todos los pacientes con mieloma múltiple, excepto de los pacientes que tienen mieloma no secretor o cuyas células de mieloma producen cadenas ligeras de inmunoglobulina con cadena pesada.

Los síntomas esqueléticos, que incluyen dolor óseo, se encuentran entre los síntomas clínicamente más significativos del mieloma múltiple. Las células plasmáticas malignas liberan factores estimulantes de osteoclastos (que incluyen IL-1, IL-6 y TNF) que causan la lixiviación del calcio de los huesos, provocando lesiones líticas; otro síntoma es la hipercalcemia. Los factores estimulantes de osteoclastos, también denominados citocinas, pueden prevenir la apoptosis, o la muerte de las células del mieloma. El cincuenta por ciento de los pacientes presentan lesiones esqueléticas relacionadas con el mieloma detectables radiológicamente en el momento del diagnóstico. Otros síntomas clínicos comunes del mieloma múltiple incluyen polineuropatía, anemia, hiperviscosidad, infecciones e insuficiencia renal.

La terapia actual para el mieloma múltiple puede implicar uno o más de cirugía, trasplante de células madre, quimioterapia, inmunoterapia y/o radioterapia para erradicar las células de mieloma múltiple en un paciente. Todos los enfoques terapéuticos actuales presentan inconvenientes significativos para el paciente.

En la última década, novedosos agentes terapéuticos, en particular fármacos inmunomoduladores, tales como lenalidomida y pomalidomida, aumentaron significativamente las tasas de respuesta y prolongaron la supervivencia sin progresión (PFS) y la supervivencia general (OS) en pacientes con mieloma múltiple. Sin embargo, muchos pacientes con mieloma múltiple presentan niveles persistentes de enfermedad residual que se encuentran por debajo de la sensibilidad de la morfología de la médula ósea (MO), electroforesis de proteína con inmunofijación y cuantificación de cadenas ligeras, incluso después de que estos pacientes hayan logrado una respuesta completa (CR), y a la larga, provocarán una recaída de la enfermedad. La enfermedad mínima residual (MRD) en el mieloma es un factor pronóstico independiente de la supervivencia sin progresión (PFS) y se considera un criterio de valoración de ensayo sustitutivo para mejorar la identificación de tratamientos eficaces, en particular para ensayos de primera línea, que actualmente requieren de 5 a 10 años de seguimiento para identificar diferencias en la supervivencia. La monitorización de la enfermedad mínima residual (MRD) en pacientes con mieloma múltiple proporciona así un valor pronóstico en la predicción de PFS y OS y la toma de decisiones del tratamiento. La detección de la enfermedad mínima residual (MRD) en el mieloma puede usar un umbral del 0,01% (10^{-4}) después del tratamiento, es decir, tener 10^{-4} células o menos células de mieloma múltiple como una proporción de células mononucleares de médula total se considera MRD-negativa, y tener 10^{-4} células o más MRD-positiva. El umbral de MRD de 10^{-4} se basó originariamente en la capacidad técnica, pero la detección cuantitativa de la MRD es actualmente posible a 10^{-5} por citometría de flujo y 10^{-6} por secuenciación de alto rendimiento (Rawstron et al., Blood 2015; 125(12): 1932-1935). Los métodos de medición de la EMR incluyen secuenciación de ADN de VDJ, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (incluyendo PCR específica de alelos, PCR de ASO) y citometría de flujo multiparamétrica (CFM). Los ensayos de MRD, por ejemplo, basados en la medición del perfil de clonotipos, también se describen en la patente de Estados Unidos N° 8.628.927, de Faham et al.

Matyskiela et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2018, Vol. 61, páginas 535-542, describen un modulador de cereblon CC-220 en la degradación de Ikaros y Aiolos.

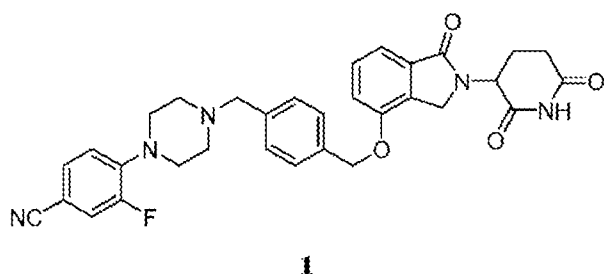
El documento WO 2014/025960 se refiere a 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y su uso en el tratamiento, prevención y/o gestión de cánceres.

Existe una necesidad significativa de compuestos seguros y eficaces y métodos de tratamiento, prevención y gestión del mieloma múltiple, que incluyan a pacientes cuyo mieloma múltiple acaba de ser diagnosticado o es resistente a tratamientos convencionales, mientras se reducen o evitan las toxicidades y/o los efectos secundarios asociados a las terapias convencionales.

La cita o identificación de cualquier referencia en la Sección 2 de esta solicitud no debe interpretarse como una admisión de que la referencia es técnica anterior a la presente solicitud.

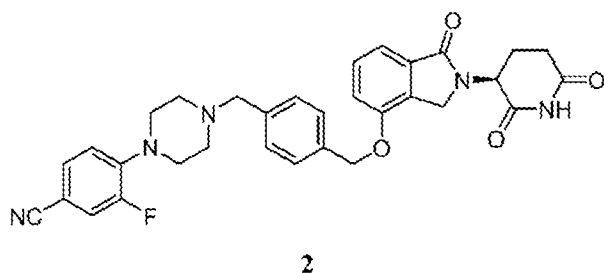
3. SUMARIO

Se proporcionan compuestos de la invención, composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos, y los compuestos para uso en métodos para tratar el mieloma múltiple. El compuesto para uso en las composiciones y métodos aquí es 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 1):



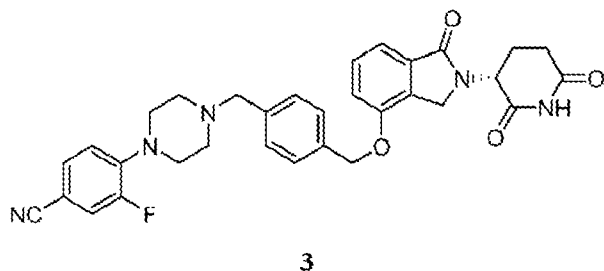
o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto para uso en las composiciones y métodos proporcionados aquí es (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 2):



o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, el compuesto para uso en las composiciones y métodos proporcionados aquí es (R)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 3):



o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas formuladas para administración por una vía y medios apropiados que contienen concentraciones eficaces de los compuestos proporcionados aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero,

isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y que opcionalmente comprenden al menos un vehículo farmacéutico.

En una realización, las composiciones farmacéuticas suministran cantidades eficaces para el tratamiento del mieloma múltiple. En una realización, las composiciones farmacéuticas suministran cantidades eficaces para la prevención de mieloma múltiple. En una realización, las composiciones farmacéuticas suministran cantidades eficaces para la mejora de mieloma múltiple.

También se proporcionan aquí compuestos o composiciones de la invención para uso en métodos de terapias de combinación, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que las terapias de combinación comprenden la administración de compuestos o composiciones de la invención en combinación con una terapia, por ejemplo otro agente farmacéutico con actividad frente al mieloma múltiple o sus síntomas. Los ejemplos de terapias dentro del alcance de los métodos incluyen, pero no se limitan a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica, trasplante de células madre, terapia celular y combinaciones de los mismos.

Los compuestos o composiciones proporcionados aquí, o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden administrar simultáneamente con, antes de, o después de la administración de una o más de las terapias anteriores. También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto proporcionado en el presente documento y una o más de las terapias anteriores.

En una realización, se administran cantidades eficaces de los compuestos o composiciones que contienen concentraciones terapéuticamente eficaces de los compuestos a un individuo que presenta los síntomas de mieloma múltiple que se va a tratar. Las cantidades son eficaces para mejorar o eliminar uno o más síntomas del mieloma múltiple. Al practicar los métodos de tratamiento, se administran cantidades eficaces de los compuestos o composiciones que contienen concentraciones terapéuticamente eficaces de los compuestos a un paciente con mieloma múltiple que lo necesita.

Además, se proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Opcionalmente, asociado a dicho o dichos recipientes puede encontrarse un aviso en la forma prescrita por parte de una agencia gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la autorización por parte de la agencia de la elaboración, el uso o la venta para la administración en seres humanos. El envase o kit puede presentar una etiqueta con información referente al modo de administración, la secuencia de administración del fármaco (por ejemplo, por separado, de forma secuencial o concurrente), o similares.

Estos y otros aspectos del objeto descrito en el presente documento resultarán evidentes mediante referencia a la descripción detallada siguiente.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el entendido por un experto normal en la técnica. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para un término en el presente documento, prevalecen las que se encuentran en la presente sección, a menos que se indique lo contrario.

" IC_{50} " se refiere a una cantidad, concentración o dosis de un compuesto de prueba particular que logra una inhibición del 50% de una respuesta máxima, tal como la unión al receptor, la actividad del receptor, el crecimiento o la proliferación celular, medida a través de cualquiera de los ensayos *in vitro* o basados en células descritos aquí.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de amina, tales como, pero no limitadas a, *N,N'*-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, amoníaco, dietanolamina y otras hidroxialquilaminas, etilendiamina, *N*-metilglucamina, procaína, *N*-bencilfenetilamina, 1-*para*-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbencimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina y tris(hidroximetil)aminometano; sales de metales alcalinos, tales como, pero no se limitan a, litio, potasio y sodio; sales de metales alcalino-térreos, tales como, pero no se limitan a, bario, calcio y magnesio; sales de metales de transición, tales como, pero no se limitan a, zinc; y otras sales metálicas, tales como, pero no se limitan a, hidrogenofosfato de sodio y fosfato disódico; y también incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales, tales como, pero no se limitan a, hidroclouros y sulfatos; y sales de ácidos orgánicos, tales como, pero no se limitan a, acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos, fumaratos, y sulfonatos orgánicos.

A menos que se establezca específicamente de otro modo, donde un compuesto puede asumir formas tautómeras, regioisómeras y/o estereoisoméricas alternativas, todos los isómeros alternativos pretenden estar englobados

dentro del alcance de la materia reivindicada. Por ejemplo, aunque un compuesto pueda tener una de dos formas tautómeras, se pretende que ambos tautómeros estén incluidos en el presente documento.

Por lo tanto, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden ser enantioméricamente puros, o ser mezclas estereoisoméricas o diaestereoméricas. Tal como se utiliza en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "estereoisoméricamente puro" significa una composición que comprende un estereoisómero de un compuesto y está sustancialmente desprovista de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral estará sustancialmente desprovista del enantiómero opuesto del compuesto. Una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene dos centros quirales estará sustancialmente desprovista de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoisoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente el 80% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 20% en peso de otros estereoisómeros del compuesto, de forma más preferida más de aproximadamente el 90% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 10% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, de forma incluso más preferida más de aproximadamente el 95% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 5% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, y de la forma más preferida más de aproximadamente el 97% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 3% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto. Un compuesto estereoisoméricamente puro, tal como se utiliza en el presente documento, comprende más de aproximadamente el 80% en peso de un estereoisómero del compuesto, de forma más preferida más de aproximadamente el 90% en peso de un estereoisómero del compuesto, de forma incluso más preferida más de aproximadamente el 95% en peso de un estereoisómero del compuesto y de la forma más preferida más de aproximadamente el 97% en peso de un estereoisómero del compuesto. Tal como se utiliza en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, la expresión "estereoisoméricamente enriquecida" significa una composición que comprende más de aproximadamente el 60% en peso de un estereoisómero de un compuesto, preferentemente más de aproximadamente el 70% en peso, de forma más preferida más de aproximadamente el 80% en peso de un estereoisómero de un compuesto. Tal como se utiliza en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "enantioméricamente puro" significa una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral. De manera similar, la expresión "estereoisoméricamente enriquecida" significa una composición estereoisoméricamente enriquecida de un compuesto que tiene un centro quiral. Tal como se utiliza en el presente documento, mezclas estereoisoméricas o diaestereoméricas significa una composición que comprende más de un estereoisómero de un compuesto. Una mezcla estereoisomérica típica de un compuesto comprende aproximadamente el 50% en peso de un estereoisómero del compuesto y aproximadamente el 50% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o comprende más de aproximadamente el 50% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 50% en peso de otros estereoisómeros del compuesto, o comprende más de aproximadamente el 45% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 55% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o comprende más de aproximadamente el 40% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 60% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o comprende más de aproximadamente el 35% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 65% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto.

Se debe entender que los compuestos proporcionados en el presente documento pueden contener centros quirales. Dichos centros quirales pueden ser o de la configuración (*R*) o (*S*), o pueden ser una mezcla de los mismos. Se debe entender que los centros quirales de los compuestos proporcionados en el presente documento pueden experimentar epimerización *in vivo*. Como tal, un experto en la técnica reconocerá que la administración de un compuesto en su forma (*R*) es equivalente, para los compuestos que sufren epimerización *in vivo*, a la administración del compuesto en su forma (*S*).

Pueden prepararse isómeros ópticamente activos (+) y (-), (*R*) y (*S*), o (*D*) y (*L*), usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales, tales como cromatografía en una fase estacionaria quiral.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "isotópologo" es un compuesto isotópicamente enriquecido. El término "isotópicamente enriquecido" se refiere a un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. "Enriquecido isotópicamente" también se puede referir a un compuesto que contiene al menos un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. La expresión "composición isotópica" se refiere a la cantidad de cada isótopo presente en un átomo determinado. Los compuestos radiomarcados y enriquecidos isotópicamente son útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo agentes terapéuticos para el mieloma múltiple, reactivos de investigación, por ejemplo reactivos de ensayos de unión, y agentes de diagnóstico, por ejemplo agentes de formación de imágenes *in vivo*. Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos tal como se describen en el presente documento, ya sean radiactivas o no, estén incluidas dentro del alcance de las formas de realización proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporcionan isotópologos de los compuestos, por ejemplo, los isotópologos del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 son compuestos enriquecidos con deuterio, carbono-13 o nitrógeno-15. En algunas formas de realización, los isotópologos

proporcionados en el presente documento son compuestos enriquecidos con deuterio. En algunas realizaciones, los isotopólogos proporcionados aquí son compuestos enriquecidos con deuterio, en los que el enriquecimiento con deuterio se produce en el centro quiral.

- 5 En la descripción, en el presente documento, si tiene lugar cualquier discrepancia entre un nombre químico y la estructura química, rige la estructura.

10 Tal como se utiliza en el presente documento "mieloma múltiple" se refiere a afecciones hematológicas caracterizadas por células plasmáticas malignas e incluye los siguientes trastornos: gammapatía monoclonal de significación indeterminada (MGUS); mieloma múltiple de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo; mieloma múltiple recién diagnosticado (incluidos mieloma múltiple recién diagnosticado de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo); mieloma múltiple apto para trasplante y no apto para trasplante; mieloma múltiple latente (inactivo) (incluidos mieloma múltiple latente de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo); mieloma múltiple activo; plasmocitoma solitario; plasmacitoma extramedular; leucemia de células plasmáticas; mieloma múltiple del sistema nervioso central; mieloma de cadena ligera; mieloma no secretor; mieloma de inmunoglobulina D; y mieloma de inmunoglobulina E; y mieloma múltiple caracterizado por anomalías genéticas, tales como translocaciones de ciclina D (por ejemplo, t(11;14)(q13;q32); t(6;14)(p21; 32); t(12;14)(p13;q32); o t(6;20); translocaciones de MMSET (por ejemplo, t(4;14)(p16;q32)); translocaciones de MAP (por ejemplo, t(14;16)(q32;q32); t(20; 22); t(16; 22)(q11;q13); o t(14;20)(q32;q11)); u otros factores cromosómicos (por ejemplo, delección de 17p13, o cromosoma 13; del(17/17p), no hiperdiploidía y ganancia(1q)).

25 Tal como se utilizan en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, los términos "tratan", "tratar" y "tratamiento" se refieren a aliviar o reducir la intensidad de un síntoma asociado a la enfermedad o afección que se está tratando, por ejemplo, un mieloma múltiple.

30 El término "prevención" incluye la inhibición de un síntoma de la enfermedad o trastorno particular, por ejemplo, mieloma múltiple. En algunas formas de realización, los pacientes con antecedentes familiares de mieloma múltiple son candidatos a regímenes preventivos. En general, el término "prevenir" se refiere a la administración del fármaco antes de la aparición de los síntomas, particularmente a pacientes en riesgo de mieloma múltiple.

35 Tal como se utiliza en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "gestionar" abarca prevenir la reaparición de la enfermedad o trastorno particular, tal como el mieloma múltiple, en un paciente que lo ha padecido, prolongar el tiempo que un paciente que ha padecido la enfermedad o el trastorno continúa en remisión, reducir las tasas de mortalidad de los pacientes y/o mantener una reducción en la intensidad o evitar un síntoma asociado a la enfermedad o afección que se está gestionando.

Tal como se utiliza en el presente documento, "sujeto" o "paciente" es un animal, normalmente un mamífero, que incluye un ser humano, tal como un paciente humano.

40 El término "recaída" se refiere a una situación en la que los pacientes que han tenido una remisión del mieloma múltiple después de la terapia, presentan un regreso de las células de mieloma y/o una reducción de células normales en la médula.

45 El término "refractario o resistente" se refiere a una circunstancia en la que pacientes, incluso después de un tratamiento intensivo, presentan células de mieloma residuales y/o una reducción de células normales en la médula.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, "terapia de inducción" se refiere al primer tratamiento administrado para una enfermedad, o el primer tratamiento administrado con la intención de inducir la remisión completa en una enfermedad, tal como el cáncer. Cuando se usa sola, la terapia de inducción es la que se acepta como el mejor tratamiento disponible. Si se detecta cáncer residual, los pacientes se tratan con otra terapia, denominada reinducción. Si el paciente se encuentra en remisión completa después de la terapia de inducción, entonces se administra terapia adicional de consolidación y/o mantenimiento para prolongar la remisión o para, potencialmente, curar al paciente.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, "terapia de consolidación" se refiere al tratamiento administrado para una enfermedad después de que se haya logrado la remisión por primera vez. Por ejemplo, la terapia de consolidación para el cáncer es el tratamiento administrado después de que el cáncer haya desaparecido tras la terapia inicial. La terapia de consolidación pueden incluir radioterapia, trasplante de células madre o tratamiento con farmacoterapia para el cáncer. La terapia de consolidación también se denomina terapia de intensificación y terapia posremisión.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, "terapia de mantenimiento" se refiere al tratamiento administrado para una enfermedad después de que se logre la remisión o la mejor respuesta, para prevenir o retrasar la recaída. La terapia de mantenimiento puede incluir quimioterapia, terapia hormonal o terapia dirigida.

65

"Remisión", tal como se utiliza en el presente documento, es una disminución o desaparición de signos y síntomas de un cáncer, por ejemplo, mieloma múltiple. En una remisión parcial, algunos, pero no todos, los signos y síntomas del cáncer han desaparecido. En una remisión completa, todos los signos y síntomas del cáncer han desaparecido, aunque el cáncer todavía puede permanecer en el cuerpo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "trasplante" se refiere a terapia de alta dosis con rescate de células madre. Las células madre hematopoyéticas (sangre) o de médula ósea no se usan como tratamiento sino para rescatar al paciente después de la terapia de alta dosis, por ejemplo, quimioterapia y/o radiación de alta dosis. El trasplante incluye el trasplante de células madre "autólogo" (TACM), que se refiere al uso de las propias células madre del paciente que se recolectan y se utilizan como células de reemplazo. En algunas formas de realización, el trasplante también incluye trasplante en tándem o trasplantes múltiples.

Tal como se utiliza en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" de un compuesto se refieren a una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento, la prevención y/o la gestión de una enfermedad, por ejemplo, mieloma múltiple, o para retardar o minimizar uno o más síntomas asociados a la enfermedad o trastorno que se va a tratar. Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" pueden abarcar una cantidad que mejora la terapia general, reduce o evita síntomas o causas de la enfermedad o trastorno, o potencia la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

Los términos "coadministración" y "en combinación con" incluyen la administración de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, un compuesto proporcionado en el presente documento y otro agente contra el mieloma múltiple, agente contra el cáncer o agente para un tratamiento de apoyo) ya sea de forma simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo específicos. En una forma de realización, los agentes están presentes en la célula o en el cuerpo del paciente al mismo tiempo o ejercen su efecto biológico o terapéutico al mismo tiempo. En una forma de realización, los agentes terapéuticos se encuentran en la misma composición o forma de dosificación unitaria. En otra forma de realización, los agentes terapéuticos se encuentran en composiciones o formas de dosificación unitarias separadas.

El término "agente para tratamiento de apoyo" se refiere a cualquier sustancia que trata, previene o aborda un efecto adverso del tratamiento con el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómeros, isotopólogos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El término "terapia biológica" se refiere a la administración de agentes terapéuticos biológicos tales como sangre del cordón umbilical, células madre, factores de crecimiento y similares.

En el contexto de un cáncer, tal como mieloma múltiple, la inhibición puede evaluarse mediante la inhibición de la progresión de la enfermedad, la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción del tumor primario, el alivio de los síntomas relacionados con el tumor, la inhibición de factores secretados por el tumor, el retardo en la aparición de tumores primarios o secundarios, la ralentización del desarrollo de tumores primarios o secundarios, la disminución de la aparición de tumores primarios o secundarios, la ralentización o la disminución de la gravedad de los efectos secundarios de la enfermedad, la detención del crecimiento tumoral y la regresión de los tumores, el aumento del tiempo hasta la progresión (TTP), el aumento de la supervivencia sin progresión (PFS), el aumento de la supervivencia general (OS), entre otros. OS, tal como se utiliza en el presente documento, significa el tiempo desde el comienzo del tratamiento hasta el fallecimiento debido a cualquier causa. TTP, tal como se utiliza en el presente documento, significa el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la progresión del tumor; la TTP no incluye fallecimientos. En una forma de realización, PFS significa el tiempo desde el comienzo del tratamiento hasta la progresión tumoral o el fallecimiento. En una forma de realización, PFS significa el tiempo desde la primera dosis del compuesto hasta la primera manifestación de la progresión de la enfermedad o el fallecimiento debido a cualquier causa. En una forma de realización, las tasas de PFS se calcularán usando las estimaciones de Kaplan-Meier. La supervivencia sin eventos (EFS) significa el tiempo desde el comienzo del tratamiento hasta el fracaso de cualquier tratamiento, que incluye la progresión de la enfermedad, la interrupción del tratamiento por cualquier motivo, o el fallecimiento. En una forma de realización, la tasa de respuesta general (ORR) significa el porcentaje de pacientes que logran una respuesta. En una forma de realización, ORR significa la suma del porcentaje de pacientes que logran respuestas completas y parciales. En una forma de realización, ORR significa el porcentaje de pacientes cuya mejor respuesta \geq respuesta parcial (PR), según los criterios de respuesta uniforme de IMWG. En una forma de realización, la duración de la respuesta (DoR) es el tiempo desde que se logra una respuesta hasta la recaída o progresión de la enfermedad. En una forma de realización, la DoR es el tiempo desde que se logra una respuesta \geq respuesta parcial (PR) hasta la recaída o progresión de la enfermedad. En una forma de realización, la DoR es el tiempo desde la primera documentación de una respuesta hasta la primera documentación de enfermedad progresiva o fallecimiento. En una forma de realización, la DoR es el tiempo desde la primera documentación de una respuesta \geq respuesta parcial (PR) hasta la primera documentación de enfermedad progresiva o fallecimiento. En una forma de realización, el tiempo hasta la respuesta (TTR) significa el tiempo desde la primera dosis de compuesto hasta la primera documentación de una respuesta. En una forma de realización, TTR significa el tiempo desde la primera dosis de compuesto hasta la primera documentación de una respuesta \geq respuesta parcial (PR). En el extremo, la inhibición completa se denomina en el presente documento

prevención o quimioprevención. En este contexto, el término "prevención" incluye o bien la prevención de la aparición de cáncer clínicamente evidente en su totalidad o bien la prevención la aparición de un estadio preclínicamente evidente de un cáncer. También se pretende que esté abarcada por esta definición la prevención de la transformación en células malignas o la detención o reversión de la progresión de células premalignas a células malignas. Esto incluye el tratamiento profiláctico de los que se encuentren en riesgo de desarrollar un cáncer.

En determinadas formas de realización, el tratamiento del mieloma múltiple puede evaluarse mediante los criterios de respuesta uniforme internacionales para el mieloma múltiple (IURC) (véase Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006; (10) 10: 1-7), usando las definiciones de respuestas y criterios de valoración que se muestran a continuación:

Subcategoría de respuesta	Criterios de respuesta ^a
sCR	CR tal como se define a continuación más relación de FLC normal y ausencia de células clonales en la médula ósea ^b por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia ^c
CR	Inmunofijación negativa en el suero y la orina y Desaparición de cualquier plasmocitoma de tejidos blandos y <5% de células plasmáticas en la médula ósea ^b
VGPR	Proteína M en suero y orina detectable por inmunofijación pero no por electroforesis o reducción del 90% o superior en el nivel de proteína M en suero más proteína M en orina <100 mg durante 24 h
PR	Reducción ≥50 % de la proteína M sérica y reducción de la proteína M urinaria de 24 h de ≥90% o <200 mg por 24 h Si la proteína M sérica y urinaria no son medibles, ^d se observa una disminución ≥50% en la diferencia entre pacientes afectados y no afectados. Se requieren los niveles de CLL en lugar de los criterios de proteína M Si la proteína M en suero y orina no puede medirse, y el ensayo de cadenas ligeras libres en suero tampoco puede medirse, se requiere ≥50% de reducción en células plasmáticas en lugar de proteína M, siempre que el porcentaje basal de células plasmática en la médula ósea sea ≥30%
SD (no recomendado para su uso como un indicador de respuesta; la estabilidad de la enfermedad se describe mejor proporcionando las estimaciones del tiempo hasta la progresión)	Además de los criterios enumerados anteriormente, si está presente en el nivel basal, también se requiere ≥50% de reducción en el tamaño de los plasmocitomas de tejido blando No se cumplen los criterios para CR, VGPR, PR o enfermedad progresiva
Abreviaturas: CR, respuesta completa; FLC, cadena ligera libre; PR, respuesta parcial; SD, enfermedad estable; sCR, respuesta completa rigurosa; VGPR, respuesta parcial muy buena.	
^a Todas las categorías de respuesta requieren dos evaluaciones consecutivas hechas en cualquier momento antes de la institución de cualquier terapia nueva; todas las categorías también requieren evidencia no conocida de lesiones óseas progresivas o nuevas si se realizaron estudios radiográficos. No se requieren estudios radiográficos para cumplir estos requisitos de respuesta.	
^b No es necesaria una confirmación con una repetición de la biopsia de médula ósea.	
^c La presencia/ausencia de células clonales se basa en la relación κ/λ. Una relación κ/λ anormal por inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia requiere un mínimo de 100 células plasmáticas para el análisis. Una relación anormal que refleja la presencia de un clon anormal es κ/λ de >4:1 o <1:2.	
^d Enfermedad medible definida mediante al menos una de las siguientes mediciones: Células plasmáticas de médula ósea ≥30%; Proteína M sérica ≥1 g/dl (≥10 g/l) [10 g/l]; Proteína M urinaria ≥200 mg/24 h; Ensayo de CLL séricas: nivel de CLL afectado ≥10 mg/dl (≥100 mg/l); la relación de CLL en suero proporcionada es anormal.	

Tal como se utiliza en el presente documento, el estado de ECOG se refiere al estado funcional del Grupo Oncológico Cooperativo del Este (ECOG) (Oken M, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982;5(6):649-655), tal como se muestra a continuación:

Puntuación	Descripción
0	Completamente activo, capaz de realizar todas las actividades previas a la enfermedad sin restricciones
1	Restringido en actividad física extrema, pero capaz de caminar y capaz de realizar trabajos de naturaleza liviana o sedentaria, por ejemplo, tareas ligeras del hogar, trabajo de oficina.
2	Capaz de caminar y capaz de cuidarse a sí mismo, pero incapaz de realizar cualquier actividad laboral. Levantado y moviéndose más del 50% de las horas de vigilia.
3	Capaz de cuidarse a sí mismo solo de forma limitada, encamado o confinado a la silla durante más del 50% de las horas de vigilia.
4	Completamente incapacitado. No puede cuidarse a sí mismo. Totalmente encamado o confinado a la silla.
5	Fallecido

El término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un valor que no es superior al 10% por encima o por debajo del valor que se modifica mediante el término. Por ejemplo, el término "aproximadamente 10 mg/m²" significa un intervalo de 9 mg/m² a 11 mg/m².

B. Breve descripción de las figuras

Figura 1. (A) Cambio en la inducción de apoptosis, medido por el área bajo la curva de la inducción, en número de veces, de caspasa 3 (también conocido como índice de apoptosis) a lo largo del tiempo en células H929-1051 resistentes a lenalidomida. Abscisa: log nM (compuesto), ordenada: índice de apoptosis. Las líneas de mejor ajuste son una ecuación logística de 3 parámetros calculada en GraphPad Prism. (B) El área bajo la curva de las curvas de respuesta frente a la concentración para el Compuesto 1 y el Compuesto A en células H929-1051 se usó para comparar la capacidad de los compuestos para inducir la apoptosis después de una exposición de 6 h y posterior dilución, lo que dio como resultado una reducción de alrededor de 20 veces de la concentración del compuesto.

Figura 2. Comparación de la actividad antiproliferativa del tratamiento combinado con pomalidomida-dexametasona y el agente único Compuesto 2 (A), y con el tratamiento combinado con Compuesto 2-dexametasona (B) en células de MM resistentes a lenalidomida H929-1051. La proliferación se evaluó mediante un ensayo de determinación de ATP (CellTiter-Glo) después de 120 h de tratamiento. El porcentaje de control se calculó restando el fondo y normalizando al control de DMSO (100% de control). Cada punto de datos representa la media de al menos tres experimentos independientes por duplicado.

Figura 3. Se evaluaron los efectos antiproliferativos sobre (A) PBMC no estimuladas y (B) THLE-2, tratadas con el Compuesto 2 durante 72 h, usando un ensayo de determinación de ATP (CellTiter-Glo). El porcentaje de control se calculó restando el fondo y normalizando al control de DMSO (100% de control).

Figura 4. Actividad antitumoral del Compuesto 2 con dosificación continua en el modelo de xenoinjerto H929-1051 resistente a lenalidomida. A ratones SCID hembra se les inocularon 10×10^6 células tumorales H929-1051 en el flanco derecho. Los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento (n = 10/grupo) en el momento del inicio del tratamiento. El tratamiento del artículo de prueba comenzó el día 14 cuando los tumores medían aproximadamente 120 mm³.

Figura 5: Actividad antiproliferativa del Compuesto 2 en líneas celulares de mieloma múltiple agrupadas por translocaciones cromosómicas. El gráfico representa el área bajo la curva (AUC) de las curvas de crecimiento de concentración-respuesta que miden el número de células vivas mediante citometría de flujo para 15 líneas celulares de MM que contienen translocaciones comunes encontradas en MM. El valor de AUC informado corresponde al área bajo la curva de respuesta frente a la dosis, en la que los valores de 0 corresponden a una reducción completa de la proliferación/viabilidad en todas las dosis, y los valores de 10000 corresponden a ninguna reducción de la proliferación/viabilidad. Las líneas celulares se agrupan en primer lugar por la translocación cromosómica encontrada y, en segundo lugar, por si se sabe que la translocación es de alto riesgo o no.

Figura 6: Actividad antiproliferativa del Compuesto 2 y pomalidomida en líneas celulares de mieloma múltiple resistentes a lenalidomida y pomalidomida. CI_{50} = concentración del Compuesto 2 y pomalidomida que da como resultado una inhibición del 50% del crecimiento celular en comparación con el control. El gráfico que muestra la comparación de los valores de CI_{50} antiproliferativos del Compuesto 2 y pomalidomida (barras) se determinó usando el ensayo de CellTiter-Glo en líneas celulares de MM parentales (DF15, NCI-H929 y OPM2), resistentes a lenalidomida (NCI-H929-1051) o resistentes a pomalidomida (NCI-H929-P01, OPM2-P01, OPM2-P1, OPM2-P10 y DF15R) presentadas en la Tabla 11.

Figura 7: Estrategia de selección para subpoblaciones mieloides.

Figura 8: Últimas etapas de la diferenciación de progenitores de neutrófilos in vitro - efectos de exposiciones diarias cortas al Compuesto 2 durante hasta tres días. Las células $CD34^+$ derivadas de médula ósea de un donante sano se expusieron al Compuesto 2 en concentraciones de 1, 10 y 100 nM en cada uno de 1, 2, o 3 días consecutivos. Sólo se incluyeron en el análisis células vivas. Los datos son la media de los resultados para los donantes 1 y 2, y representan un ejemplo del porcentaje de células de Etapa III y Etapa IV definidas como $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$ y $CD34^+/CD33^-/CD11b^+$, respectivamente, después de 6 h de exposición.

Figura 9: Maduración tardía de los progenitores de neutrófilos después de exposiciones de 6 horas al Compuesto 2 durante 3 días consecutivos. Las células $CD34^+$ derivadas de médula ósea de un donante sano se expusieron al Compuesto 2 en concentraciones de 1, 10 o 100 nM durante 6 h en cada uno de los 3 días consecutivos a partir del día 10. Los datos representan el porcentaje medio de células de Etapa III definidas como $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, y el porcentaje de células de Etapa IV definidas como $CD34^+/CD33^-/CD11b^+$ de los donantes n.º 1 y n.º 2. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 10: Maduración tardía de los progenitores de neutrófilos después de exposiciones de 6 horas al Compuesto 2 durante 5 días consecutivos. Las células $CD34^+$ derivadas de médula ósea de un donante sano se expusieron al Compuesto 2 en concentraciones de 1, 10 o 100 nM durante 6 h en cada uno de los 5 días consecutivos a partir del día 10. Los datos representan el porcentaje medio de células de Etapa III definidas como $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, y el porcentaje de células de Etapa IV definidas como $CD34^+/CD33^-/CD11b^+$ de los donantes n.º 1 y n.º 2. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 11: Diagramas de programa de tratamiento para dexametasona como agente único.

Figura 12: Porcentaje de neutrófilos maduros durante la diferenciación mieloides después de una exposición a dexametasona o al Compuesto 2 solos o en combinación en diferentes concentraciones. Las células $CD34^+$ derivadas de médula ósea de donante sano se expusieron al Compuesto 2 (durante 6 h) y a dexametasona (durante 30 h) solos (fila superior), o en combinación (fila inferior), en concentraciones de 1, 10 o 100 nM el día 13. En cada uno de los paneles inferiores, se varió la concentración del Compuesto 2, y la concentración de dexametasona se mantuvo constante a 1 nM (izquierda), 10 nM (centro) o 100 nM (derecha). Para las combinaciones, los cultivos se expusieron a ambos agentes simultáneamente durante 6 h. Después, las células se lavaron y se volvieron a incubar con dexametasona durante las siguientes 24 h. Después, las células se lavaron y se volvieron a incubar sin el Compuesto 2 ni dexametasona durante el resto del estudio. Los datos representan el porcentaje de células de la Etapa IV definidas como $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$ de los donantes 3, 4 y 5. La línea roja representa el 50% del nivel de células de la Etapa IV en el control de DMSO.

Figura 13: Efecto del tratamiento con dexametasona sola o en combinación con el Compuesto 2, lenalidomida y pomalidomida, sobre la apoptosis en una línea celular de mieloma múltiple resistente a lenalidomida. El eje y muestra el cambio, en número de veces, para la caspasa-3 de DMSO, y el eje x es la concentración logarítmica de dexametasona.

Figura 14: El Compuesto 2 activa directamente las células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) para lisar las células de leucemia eritromielocítica K562 de una manera dependiente de la concentración. (Izquierda) Gráficos representativos de clasificación de células activadas por fluorescencia de células K562 cocultivadas con PBMC humanas que se habían preincubado con Compuesto 2, lenalidomida, pomalidomida, o DMSO. (Derecha) Datos brutos del porcentaje de células K562 marcadas con PI-Anexina V que muestran una disminución dependiente de la concentración en células K562 viables en co-cultivo. Los datos se presentan como media con barras de error que representan el error estándar de la media.

Figura 15: Las células inmunes se activan directamente mediante el Compuesto 2 para lisar líneas celulares de mieloma múltiple sensibles y resistentes a lenalidomida. Las células mononucleares de sangre periférica de donantes (PBMC) (células efectoras) se trataron previamente con los artículos de prueba indicados o el Compuesto 2 durante 2 h antes de cultivarlas en placas revestidas con anticuerpo anti-CD3 durante 72 h. Antes del cocultivo con líneas celulares de mieloma múltiple marcadas con CFSE

sin tratar, las PBMC se lavaron y se colocaron en medios sin compuesto presente, y después se cocultivaron con las líneas celulares de mieloma múltiple (células diana) durante 24 h. Se observó un aumento en la muerte de células de mieloma múltiple mediada por células inmunitarias en las PBMC tratadas con el Compuesto 2 cocultivadas (relación diana:efector de 1:5) con (A) células NCI-H929 o (B) células H929-1051.

Figura 16: Las células inmunes cebadas con compuestos muestran una mayor destrucción de células tumorales cuando las células de mieloma múltiple se tratan previamente con lenalidomida, pomalidomida o Compuesto 2 antes del cocultivo. Células mononucleares de sangre periférica se preincubaron con lenalidomida, pomalidomida o Compuesto 2 durante 2 h antes de cultivarlas en placas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 durante 72 horas. Al mismo tiempo, 4 líneas de células de mieloma múltiple (MM) se cultivaron en un medio que contenía artículos de prueba. Después de 72 h, las células se co-cultivaron juntas durante 24 h (relación diana:efector [T:E] de 1:5). Se evidenció un aumento en la muerte de MM mediada por células inmunes en los cocultivos (gráficos a la derecha en cada fila) en comparación con los cultivos individuales de MM (gráficos a la izquierda en cada fila) en todos los tipos de células analizados: líneas celulares (A) NCI-H929, (B) H929-1051, (C) OPM2 y (D) OPM2 P10. Los compuestos tuvieron poco efecto sobre la viabilidad de las PBMC (mostrado en los gráficos del centro en cada fila).

Figura 17: El Compuesto 2 aumenta la expresión de CD38 en líneas celulares de MM. Se evaluó la expresión de CD38 en la superficie celular en células de MM pretratadas con Compuesto 2 o pomalidomida durante 72 h. Los efectos de la respuesta a la dosis se muestran para las líneas celulares OPM-2 y OPM-2.P10.

Figura 18: El Compuesto 2 aumenta la ADCC mediada por daratumumab de las células de MM. Se trataron siete líneas de células de MM con concentraciones subletales del Compuesto 2 o pomalidomida durante 72 h antes del cocultivo con células NK en una relación efector a diana [E:T] de 10:1 para el ensayo de ADCC. Los gráficos ilustran datos representativos obtenidos para las 7 líneas celulares de MM. Los ensayos se realizaron dos veces con células NK de dos donantes diferentes. El control de DMSO es la actividad de las células NK de referencia con células tumorales no tratadas; el Isotipo y Dara son la actividad de las células NK en presencia del control de isotipo y daratumumab, respectivamente, con células tumorales no tratadas; el Isotipo + Compuesto y Dara + Compuesto son la actividad de las células NK en presencia del control de isotipo y daratumumab, respectivamente, con células tumorales tratadas.

Figura 19: El Compuesto 2 mejora la ADCP mediada por daratumumab de las células de MM. Los ensayos de fagocitosis se realizaron con una relación efector a diana [E:T] de 2: 1. Seis líneas de células de MM +/- pretratamiento con Compuesto 2 o pomalidomida se sometieron a ADCP mediada por daratumumab. A) Imágenes representativas de ADCP con la línea celular OPM2. Los macrófagos están en rojo y las células OPM2 están en verde. B) Cuantificación de la fagocitosis por citometría de flujo. El control de DMSO es la actividad de las células NK de referencia con células tumorales no tratadas; el Isotipo y Dara son la actividad de las células NK en presencia del control de isotipo y daratumumab, respectivamente, con células tumorales no tratadas; el Isotipo + Compuesto y Dara + Compuesto son la actividad de las células NK en presencia del control de isotipo y daratumumab, respectivamente, con células tumorales tratadas.

Figura 20: La combinación del Compuesto 2 con un inhibidor del proteasoma da como resultado un aumento de la apoptosis en modelos de células de MM. Las líneas de células de MM se trataron con un pulso de bortezomib o DMSO durante 1 hora, seguido de un lavado. Las células pretratadas se incubaron con diferentes concentraciones del Compuesto 2 durante 72 h, seguido de la tinción de las muestras con disolución de 7-AAD y Anexina-V y análisis mediante citometría de flujo. A) Porcentaje de células vivas del Compuesto 2 solo o con pretratamiento con bortezomib. B) Diagramas de dispersión de células OPM2-P10 en las diversas condiciones de tratamiento.

Figura 21: Combinación del Compuesto 2 con bortezomib o carfilzomib en células de MM. Se trataron cuatro líneas de células de MM con un pulso de bortezomib o DMSO durante 1 hora, seguido de un lavado. Las células pretratadas se incubaron con diferentes concentraciones del Compuesto 2 durante 72 horas, seguido de la tinción de las muestras con solución de 7-AAD y Anexina-V y análisis mediante citometría de flujo. A) Efecto antiproliferativo del Compuesto 2 solo o con pretratamiento con bortezomib. B) Efecto antiproliferativo del Compuesto 2 solo o con pretratamiento con carfilzomib. DRC = curva respuesta a la dosis

Figura 22. Se muestra el tratamiento de células de MM con el Compuesto 2 en combinación con inhibidores de la histona desacetilasa, agentes de quimioterapia, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de Mcl-1, inhibidores de BET, o inhibidores de LSD-1. Se realizaron cálculos de sinergia para el tratamiento con el Compuesto 2 en combinación con 13 inhibidores de molécula pequeña a través de un panel de líneas celulares de MM. Las cajas de color azul ilustran el porcentaje de pocillos que son sinérgicos cuando se

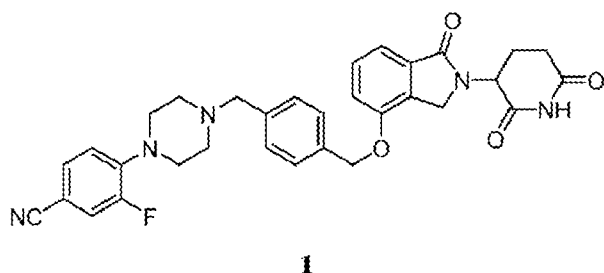
combinan con el Compuesto 2. El * representa la significancia de la diferencia de respuesta de superficie con respecto al modelo nulo.

Figura 23: Efecto del tratamiento con Compuesto 2 (0,1 mg/kg, qd) y dexametasona (0,5 mg/kg, qd) como agentes únicos y en combinación en el modelo de xenoinjerto H929-1051 resistente a lenalidomida.

Figura 24: Actividad antitumoral del Compuesto 2 solo y en combinación con bortezomib en un modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple/plasmocitoma NCI-H929 (H929-1051) resistente a lenalidomida. Los días de dosificación se indican con flechas en el eje X.

C. Compuestos

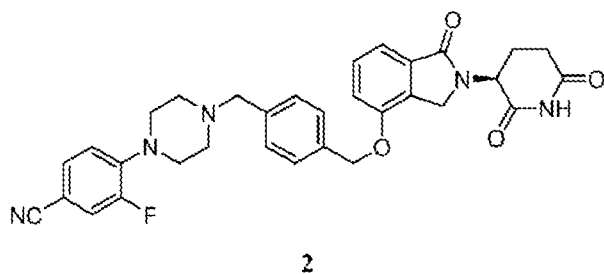
Se proporciona aquí el compuesto 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, denominado "Compuesto 1":



o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones, el compuesto para uso en las composiciones y métodos proporcionados aquí es el Compuesto 1, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

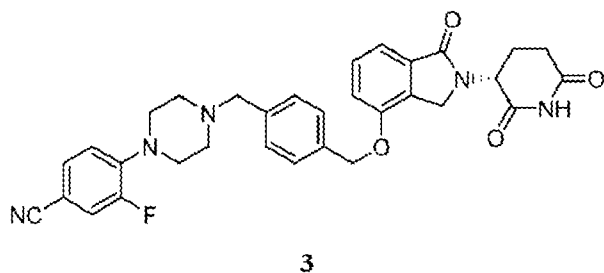
También se proporciona aquí el compuesto (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, denominado "Compuesto 2":



o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones, el compuesto para uso en las composiciones y métodos proporcionados aquí es el Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporciona aquí el compuesto (R)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, denominado "Compuesto 3":



o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones, el compuesto para uso en las composiciones y métodos proporcionados aquí es el Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Se proporciona aquí el Compuesto 1. Se proporciona aquí un tautómero del Compuesto 1. Se proporciona aquí un enantiómero del Compuesto 1. Se proporciona aquí una mezcla de enantiómeros del Compuesto 1. Se proporciona aquí una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1.

10 Se proporciona aquí el Compuesto 2. Se proporciona aquí un tautómero del Compuesto 2. Se proporciona aquí una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 2.

Se proporciona aquí el Compuesto 3. Se proporciona aquí un tautómero del Compuesto 3. Se proporciona aquí una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 3.

15 También se proporcionan aquí análogos isotópicamente enriquecidos de los compuestos proporcionados aquí. El enriquecimiento isotópico (por ejemplo, deuteración o enriquecimiento de deuterio) de productos farmacéuticos para mejorar la farmacocinética ("PK"), la farmacodinámica ("PD") y los perfiles de toxicidad, se ha demostrado previamente con algunas clases de medicamentos. Véase, por ejemplo, Lijinsky *et al.*, *Food Cosmet. Toxicol.*, 20: 393 (1982); Lijinsky *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 69: 1127 (1982); Mangold *et al.*, *Mutation Res.* 308: 33 (1994); Gordon *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, 15: 589 (1987); Zello *et al.*, *Metabolism*, 43: 487 (1994); Gately *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 27: 388 (1986); Wade D, *Chem. Biol. Interact.* 117: 191 (1999). Sin limitarse a ninguna teoría en particular, el enriquecimiento isotópico de un compuesto se puede usar, por ejemplo, para (1) reducir o eliminar metabolitos no deseados, (2) aumentar la vida media del fármaco original, (3) disminuir el número de dosis necesarias para lograr un efecto deseado, (4) disminuir la cantidad de una dosis necesaria para lograr un efecto deseado, (5) aumentar la formación de metabolitos activos, si se forman, y/o (6) disminuir la producción de metabolitos perjudiciales en tejidos específicos y/o crear un fármaco más eficaz y/o un fármaco más seguro para la terapia de combinación, ya sea que la terapia de combinación sea intencional o no. El reemplazo de un átomo por uno de sus isótopos suele dar como resultado un cambio en la velocidad de reacción de una reacción química. Este fenómeno se conoce como efecto isotópico cinético («EIC»). Por ejemplo, si se rompe un enlace C-H durante una etapa determinante de la velocidad en una reacción química (es decir, la etapa con la energía del estado de transición más elevada), la sustitución de ese hidrógeno por un deuterio provocará una reducción en la velocidad de reacción y el proceso se ralentizará. Este fenómeno se conoce como efecto isotópico cinético de deuterio («EICD»). (Véase, p. ej., Foster *et al.*, *Adv. Drug Res.*, vol. 14, págs. 1-36 (1985); Kushner *et al.*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 77, págs. 79-88 (1999)). La magnitud del EICD se puede expresar como la relación entre las velocidades de una reacción determinada en la que se rompe un enlace C-H y la misma reacción en la que se sustituye el hidrógeno por deuterio. El EICD puede variar en el intervalo desde aproximadamente 1 (no existe efecto isotópico) hasta números muy grandes tales como 50 o más, lo que significa que la reacción puede ser 50, o más, veces más lenta cuando se sustituye el hidrógeno por deuterio. Sin pretender vincularse a ninguna teoría particular, unos valores de EICD elevados pueden ser debidos en parte a un fenómeno conocido como el efecto túnel, que es una consecuencia del principio de incertidumbre. El efecto túnel tiene lugar debido a la masa pequeña de un átomo de hidrógeno y se produce porque los estados de transición que involucran a un protón se pueden formar en ocasiones en ausencia de la energía de activación requerida. Debido a que el deuterio tiene más masa que el hidrógeno, estadísticamente tiene una probabilidad mucho menor de experimentar este fenómeno.

45 El tritio («T») es un isótopo radiactivo del hidrógeno, que se utiliza en investigación, reactores de fusión, generadores de neutrones y productos radiofarmacéuticos. El tritio es un átomo de hidrógeno que tiene 2 neutrones en el núcleo y tiene un peso atómico cercano a 3. Se encuentra de forma natural en el medio ambiente en concentraciones muy bajas, de la forma más habitual se encuentra como T₂O. El tritio se descompone lentamente (semivida = 12,3 años) y emite una partícula beta de energía baja que no puede penetrar en la capa externa del cuerpo humano. La exposición interna es el principal riesgo asociado con este isótopo, a pesar de ello debe ingerirse en grandes cantidades para que suponga un riesgo significativo para la salud. En comparación con el deuterio, se debe consumir una cantidad menor de tritio antes de que alcance niveles peligrosos. La sustitución del hidrógeno por tritio («T») da como resultado un enlace aún más fuerte que el deuterio y produce unos efectos isotópicos numéricamente más grandes.

55 De forma similar, la sustitución de otros elementos por isótopos, que incluyen, pero no se limitan a, ¹³C o ¹⁴C para el carbono, ³³S, ³⁴S o ³⁶S para el azufre, ¹⁵N para el nitrógeno, y ¹⁷O u ¹⁸O para el oxígeno, proporcionará unos efectos isotópicos cinéticos similares.

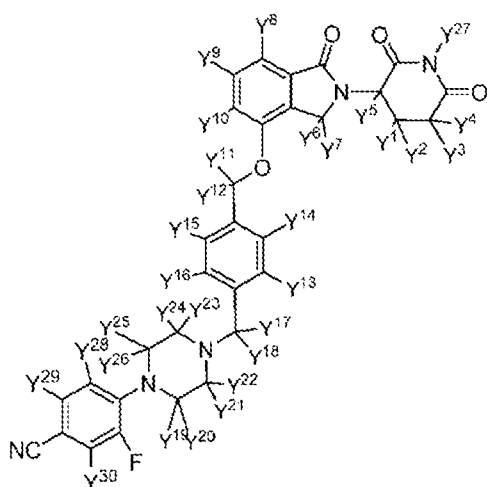
60 El cuerpo animal expresa una variedad de enzimas con el fin de eliminar sustancias extrañas, tales como agentes terapéuticos, de su sistema de circulación. Ejemplos de dichas enzimas incluyen las enzimas del citocromo P450 ("CYP"), esterasas, proteasas, reductasas, deshidrogenasas, y monoaminooxidasas, para reaccionar con estas sustancias extrañas y convertirlas en intermedios o metabolitos más polares para la excreción renal. Algunas de las reacciones metabólicas más comunes de los compuestos farmacéuticos implican la oxidación de un enlace carbono-hidrógeno (C-H) a un enlace pi carbono-oxígeno (C=O) o carbono-carbono (C-C). Los metabolitos resultantes pueden ser estables o inestables en condiciones fisiológicas, y pueden tener perfiles farmacocinéticos,

farmacodinámicos y de toxicidad aguda y a largo plazo sustancialmente diferentes con respecto a los compuestos originales. En el caso de muchos fármacos, estas oxidaciones son rápidas. Como resultado, estos fármacos a menudo requieren la administración de dosis diarias múltiples o altas.

El enriquecimiento isotópico en ciertas posiciones de un compuesto proporcionado aquí puede producir un KIE detectable que afecta los perfiles farmacocinéticos, farmacológicos y/o toxicológicos de un compuesto proporcionado aquí en comparación con un compuesto similar que tiene una composición isotópica natural. En una realización, el enriquecimiento de deuterio se realiza en el sitio de escisión del enlace C-H durante el metabolismo.

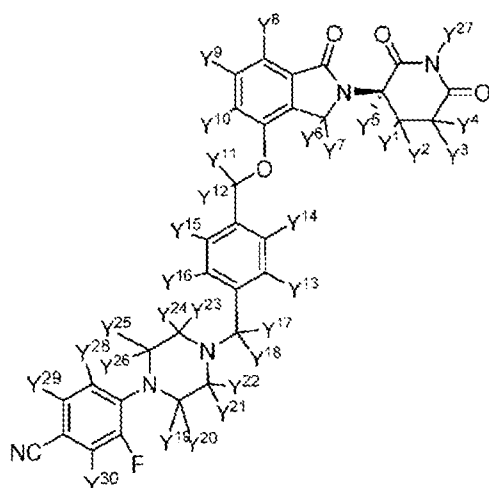
En una realización, se proporciona aquí un isotópologo del Compuesto 1, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el isotópologo del Compuesto 1 es un Compuesto 1 enriquecido con deuterio, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el isotópologo del Compuesto 1 es un Compuesto 1 enriquecido con deuterio, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el enriquecimiento en deuterio ocurre en el centro quiral. En otra realización, se proporciona aquí un isotópologo del Compuesto 2, o un tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el isotópologo del Compuesto 2 es un Compuesto 2 enriquecido con deuterio, o un tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el isotópologo del Compuesto 2 es un Compuesto 2 enriquecido con deuterio, o un tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el enriquecimiento de deuterio ocurre en el centro quiral.

En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí isotópogos de 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que una o más posiciones atómicas de la molécula de 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo está/están isotópicamente enriquecidas, por ejemplo con deuterio. Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan compuestos de la siguiente fórmula:

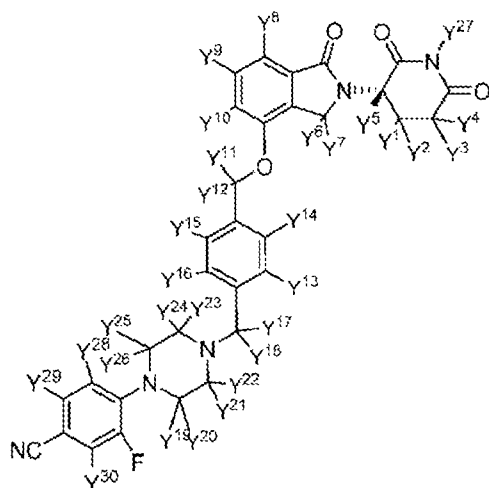


en la que uno o más átomos de Y (es decir, Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶, Y⁷, Y⁸, Y⁹, Y¹⁰, Y¹¹, Y¹², Y¹³, Y¹⁴, Y¹⁵, Y¹⁶, Y¹⁷, Y¹⁸, Y¹⁹, Y²⁰, Y²¹, Y²², Y²³, Y²⁴, Y²⁵, Y²⁶, Y²⁷, Y²⁸, Y²⁹, e Y³⁰) es/son hidrógeno(s) isotópicamente enriquecido(s) con deuterio, y cualquier átomo(s) de Y restante(s) es/son átomo(s) de hidrógeno no enriquecido(s).

En una realización, el compuesto tiene la siguiente fórmula:



En una realización, el compuesto tiene la siguiente fórmula:



5

En ciertas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o todos los átomos de Y indicados están enriquecidos isotópicamente con deuterio, y cualquier átomo(s) de Y restante(s) es/son hidrógeno(s) no enriquecido(s). En una realización, uno de los átomos Y indicados está isotópicamente enriquecido con deuterio, y cualesquiera átomos Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y⁵ está enriquecido con deuterio.

10

En ciertas realizaciones, uno o más átomos de Y en la porción de glutarimida de los compuestos Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, e Y²⁷) están enriquecidos con deuterio. En ciertas realizaciones, uno o más átomos de Y en la porción de isoindolinona de los compuestos Y⁶, Y⁷, Y⁸, Y⁹, e Y¹⁰) están enriquecidos con deuterio. En ciertas realizaciones, uno o más átomos de Y en la porción de fenilalquilo de los compuestos Y¹¹, Y¹², Y¹³, Y¹⁴, Y¹⁵, Y¹⁶, Y¹⁷, e Y¹⁸) están enriquecidos con deuterio. En ciertas realizaciones, uno o más átomos de Y en la porción de piperazina de los compuestos Y¹⁹, Y²⁰, Y²¹, Y²², Y²³, Y²⁴, Y²⁵, e Y²⁶) están enriquecidos con deuterio. En ciertas realizaciones, uno o más átomos de Y en la porción de anillo de fenilo distante de los compuestos (Y²⁸, Y²⁹, e Y³⁰) están enriquecidos con deuterio. Un compuesto proporcionado aquí puede ser cualquier combinación de enriquecimientos de deuterio como se describe aquí. En otras palabras, cualquier combinación de la porción de glutarimida enriquecida con deuterio, la porción de isoindolina enriquecida con deuterio, la porción de fenilalquilo enriquecida con deuterio, la porción de piperazina enriquecida con deuterio, y la porción de anillo de fenilo distante enriquecida con deuterio queda comprendida aquí.

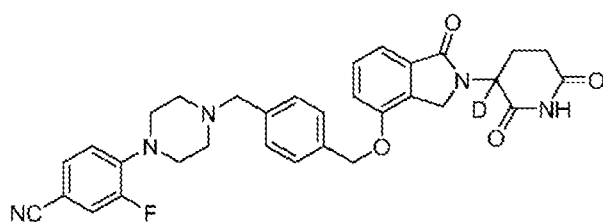
25

En una realización, Y¹ e Y² están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y³ e Y⁴ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y⁵ está enriquecido con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y¹ a Y⁵ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y³ a Y⁵ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una

30

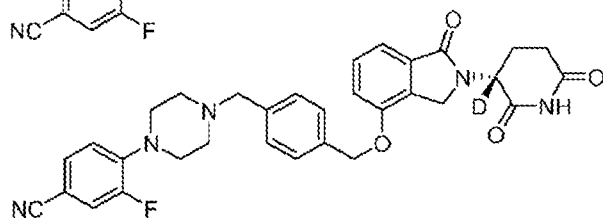
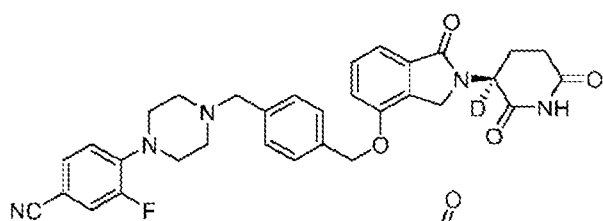
realización, Y⁶ e Y⁷ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y⁸ a Y¹⁰ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y¹¹ e Y¹² están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y¹³ a Y¹⁶ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y¹⁷ e Y¹⁸ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y¹¹ a Y¹⁸ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y¹⁹ a Y²⁶ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y²⁷ está enriquecido con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos. En una realización, Y²⁸ a Y³⁰ están enriquecidos con deuterio, y cualesquiera átomos de Y restantes son hidrógenos no enriquecidos.

En una realización, el isotópologo del Compuesto 1 es el Compuesto 1-D:



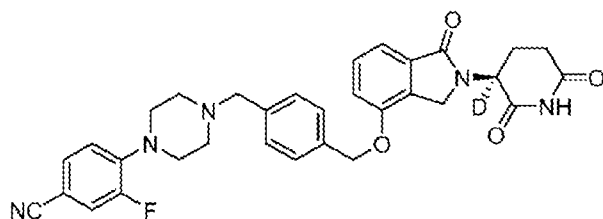
(1-D).

En otra realización, el isotópologo del Compuesto 1 es una mezcla de



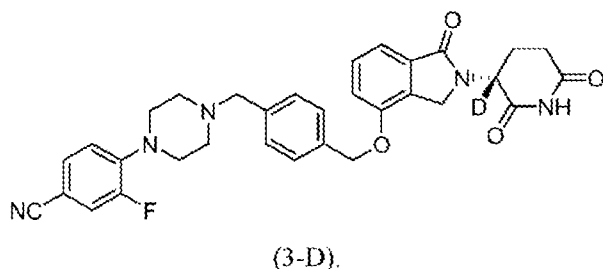
y

En todavía otra realización, el isotópologo del Compuesto 2 es el Compuesto 2-D.



(2-D).

En todavía otra realización, el isotópologo del Compuesto 3 es el Compuesto 3-D.



En ciertas realizaciones, cualquiera de las posiciones enriquecidas con deuterio tiene independientemente una abundancia de deuterio de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o alrededor de 100%. En una realización, Y⁵ está enriquecido con deuterio, y tiene una abundancia de deuterio de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o alrededor de 100%.

En una realización, el D (en el centro quiral) en el Compuesto 1-D tiene una abundancia de deuterio de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o alrededor de 100%. En una realización, el D tiene una abundancia de deuterio de al menos 90%.

En una realización, la D (en el centro quiral) en el Compuesto 2-D tiene una abundancia de deuterio de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o alrededor de 100%. En una realización, el D tiene una abundancia de deuterio de al menos 90%.

En una realización, el D (en el centro quiral) en el Compuesto 3-D tiene una abundancia de deuterio de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o alrededor de 100%. En una realización, el D tiene una abundancia de deuterio de al menos 90%.

En ciertas realizaciones, un compuesto enriquecido con deuterio proporcionado aquí tiene un exceso enantiomérico de al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%. Ejemplos adicionales de pureza estereoisomérica incluyen un exceso enantiomérico de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99%.

En una realización, el Compuesto 2-D tiene un exceso enantiomérico de al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%. En una realización, el Compuesto 2-D tiene un exceso enantiomérico de al menos 90%.

En una realización, el Compuesto 3-D tiene un exceso enantiomérico de al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%. En una realización, el Compuesto 3-D tiene un exceso enantiomérico de al menos 90%.

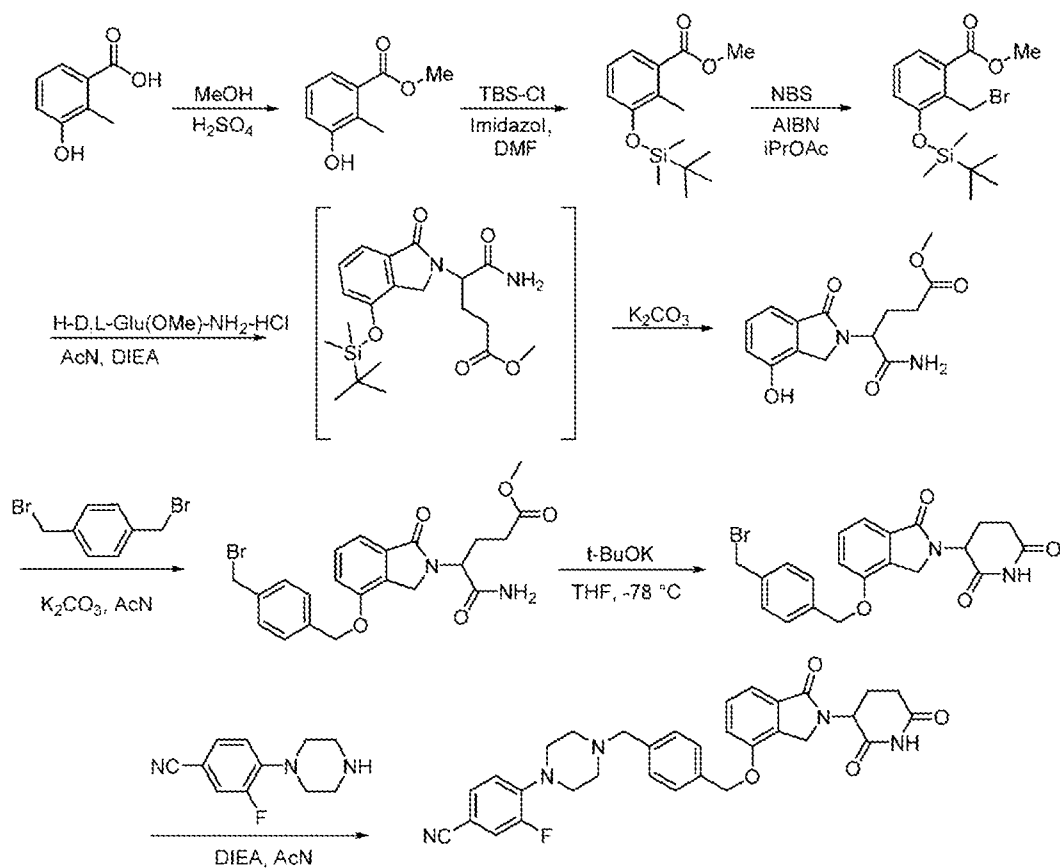
Los compuestos enriquecidos con deuterio proporcionados aquí se pueden preparar según el esquema sintético y los ejemplos proporcionados aquí, pero usando material(es) de partida enriquecido(s) con deuterio correspondiente(s). Los compuestos enriquecidos con deuterio proporcionados aquí también se pueden preparar según la química general conocida por los expertos en la técnica para preparar compuestos de isoindolinona y glutarimida enriquecidos con deuterio, incluidos, pero no limitados a, los descritos en los documentos WO 2014/039421 y WO 2014/116573.

D. Preparación del Compuesto 1, Compuesto 2 y Compuesto 3

Se describen métodos para preparar los compuestos de la invención, pero no se reivindican. Las realizaciones de estos métodos de preparación descritas en la sección "D. Preparación del Compuesto 1, Compuesto 2 y Compuesto 3 no son realizaciones de la invención reivindicada. Los compuestos proporcionados aquí se pueden preparar mediante métodos conocidos por un experto en la técnica y siguiendo procedimientos similares a los descritos en la sección de Ejemplos aquí y modificaciones rutinarias de los mismos. Un Esquema de reacción a modo de ejemplo para la preparación de los compuestos se ilustra a continuación en el Esquema 1 para el Compuesto 1, Compuesto 2 y Compuesto 3, y Esquema 2 para el Compuesto 2.

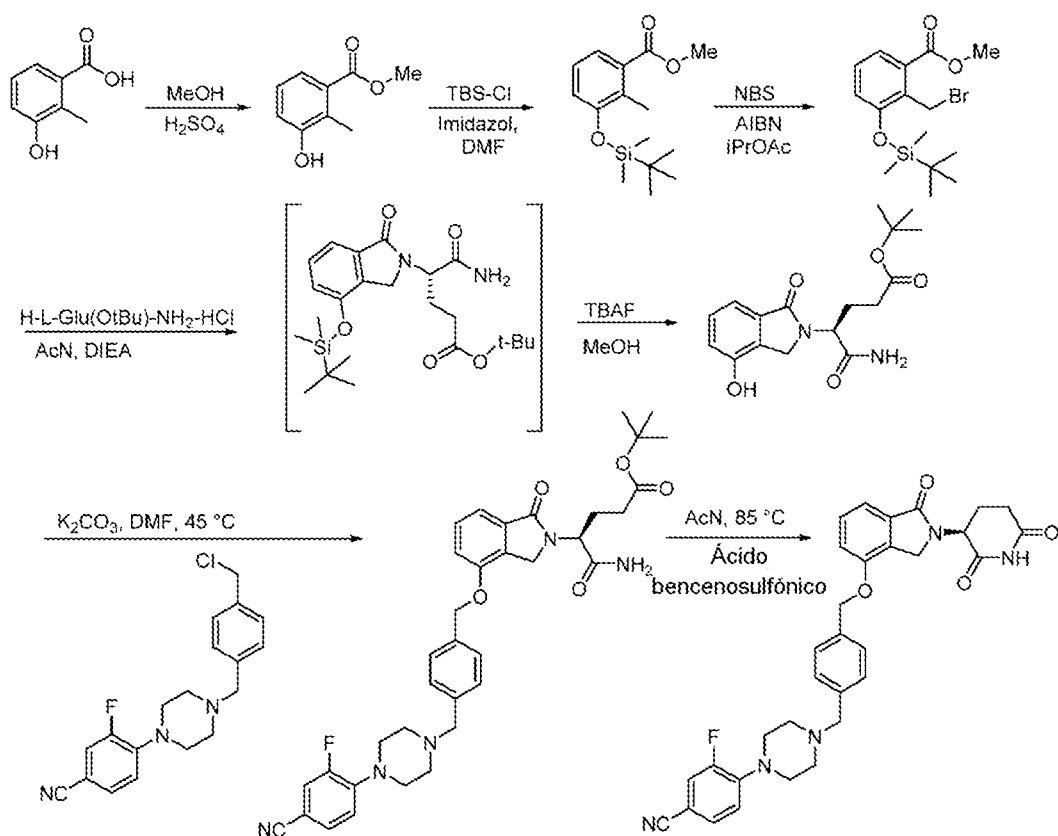
Como se muestra en el Esquema 1, la protección del ácido 3-hidroxi-2-metilbenzoico (por, por ejemplo, formación de éster metílico y terc-butil(dimetil)silil éter) fue seguida de bromación, por ejemplo, usando N-bromosuccinimida

y azobisisobutironitrilo. La reacción con metil-4,5-diamino-5-oxo-pentanoato (también conocido como HD,L-Glu(OMe)-NH₂), en presencia de una base (tal como DIEA), dio como resultado la formación de isoindolina derivatizada, que fue seguido de la desprotección de TBS usando una base, tal como carbonato de potasio. La reacción de la isoindolina derivatizada con 1,4-bis(bromometil)benceno en presencia de una base (tal como carbonato de potasio) fue seguida de la formación de glutarimida en presencia de terc-butoxido de potasio. Finalmente, la reacción con 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo proporcionó el Compuesto 1 diana. La separación quiral proporciona el Compuesto 2 y el Compuesto 3.



Esquema 1

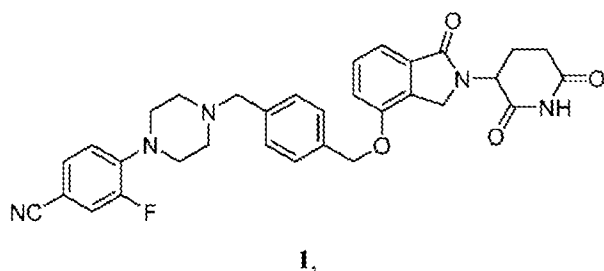
Alternativamente, como se ejemplifica en el Esquema 2, la reacción del intermedio 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo con el (4S)-4,5-diamino-5-oxo-pentanoato de terc-butilo quiral (también denominado HL-Glu(OtBu)-NH₂; la reacción con HD-Glu(OtBu)-NH₂ proporciona el enantiómero opuesto), en presencia de una base (tal como DIEA), dio como resultado la formación de isoindolina derivatizada, que fue seguido de la desprotección de TBS usando fluoruro de tetrabutilamonio. La reacción de la isoindolina derivatizada con 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o una sal del mismo, en presencia de una base (tal como carbonato de potasio), seguido de desprotección y formación de glutarimida proporcionó el Compuesto 2 diana.



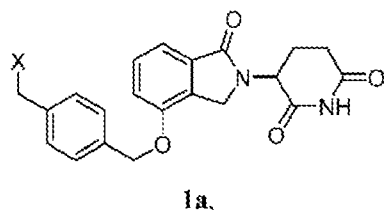
Un experto en la técnica sabría cómo modificar los procedimientos expuestos en los esquemas y ejemplos ilustrativos para llegar a los productos deseados.

5

En un aspecto, se proporcionan aquí métodos para preparar el Compuesto 1,

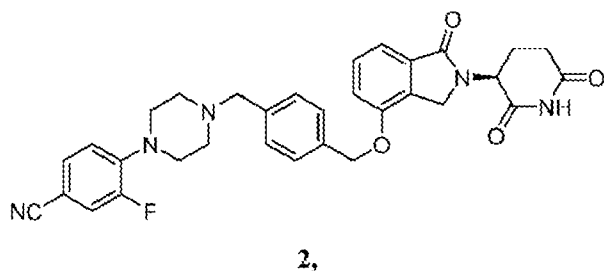


10 o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el Compuesto 1a

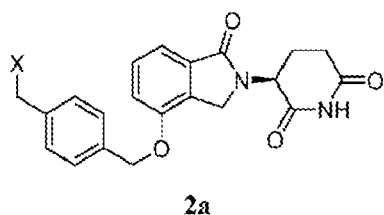


15 o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, con 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo, en un disolvente orgánico en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1; en el que X es un grupo saliente.

En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1, por ejemplo el Compuesto 2,



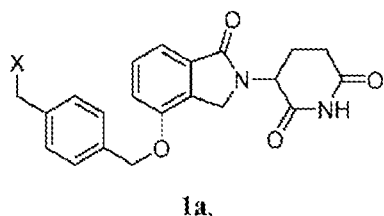
comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1a, por ejemplo el Compuesto 2a



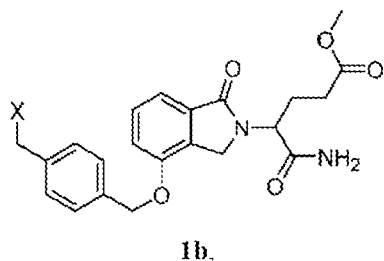
con 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo, en un disolvente orgánico en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 2; en el que X es un grupo saliente.

En una realización, X es halógeno, por ejemplo Br o Cl. En otra realización, X es metanosulfonato (también denominado -OM). En una realización, el disolvente es acetonitrilo, THF, o DMSO. En otra, la base es DIEA o TEA. En algunas realizaciones, el contacto se realiza a temperatura elevada, por ejemplo a alrededor de 35 °C hasta alrededor de 50 °C.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además preparar el Compuesto 1a,



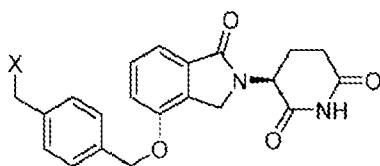
o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el compuesto 1b



o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o

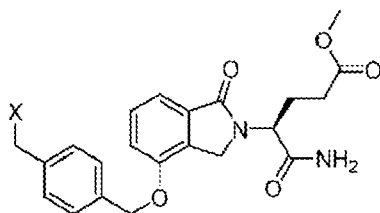
isotópologo del mismo, con terc-butóxido de potasio, en un disolvente orgánico, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1a.

En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1a, por ejemplo el Compuesto 2a,



2a,

comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1b, por ejemplo el Compuesto 2b

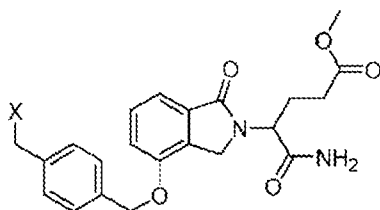


2b

con terc-butoxido de potasio, en un disolvente orgánico, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 2a.

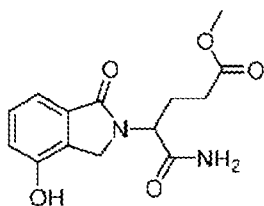
En una realización, X es Br. En una realización, el disolvente es THF. En algunas realizaciones, el contacto se realiza a temperatura reducida, por ejemplo, a alrededor de -70 °C hasta alrededor de -80 °C.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además preparar el Compuesto 1b,



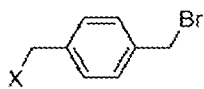
1b,

o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el compuesto 1c



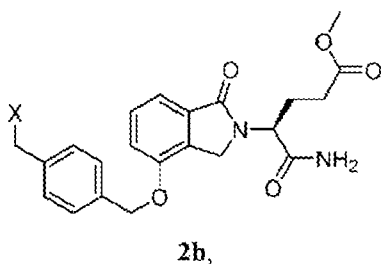
1c,

o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, con

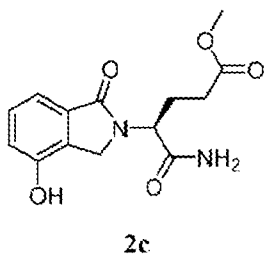


en un disolvente orgánico, en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1b.

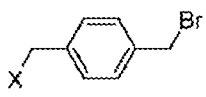
En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1b, por ejemplo el Compuesto 2b,



comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1c, por ejemplo el Compuesto 2c



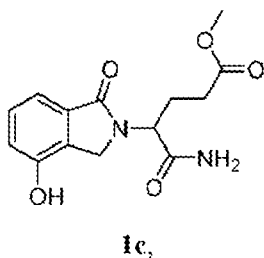
con



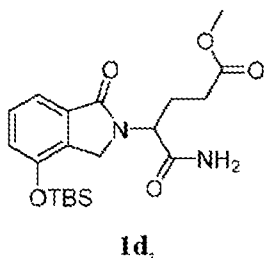
en un disolvente orgánico, en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1b.

En una realización, X es Br. En una realización, el disolvente es acetonitrilo. En algunas realizaciones, la base es carbonato de potasio. En algunas realizaciones, el contacto se realiza a temperatura elevada, por ejemplo a alrededor de 50 °C hasta alrededor de 70 °C.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además preparar el Compuesto 1c,

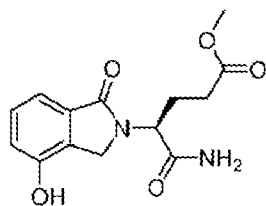


o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el compuesto 1d



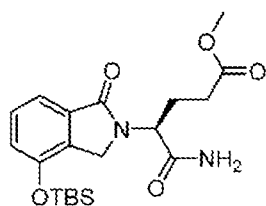
o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, con una base en un disolvente, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1c.

En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1c, por ejemplo el Compuesto 2c,



2c,

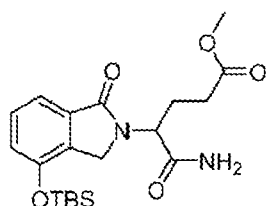
5 comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1d, por ejemplo el Compuesto 2d



2d

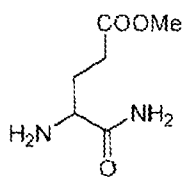
10 con una base en un disolvente, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 2c. En una realización, el disolvente es agua. En algunas realizaciones, la base es carbonato de potasio.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además preparar el Compuesto 1d,



1d,

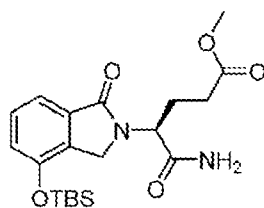
15 o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el compuesto 1e



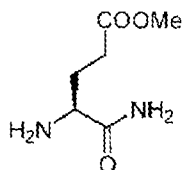
1e,

20 o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, con 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxibenzoato de metilo en un disolvente, en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1d.

25 En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1d, por ejemplo el Compuesto 2d,

**2d,**

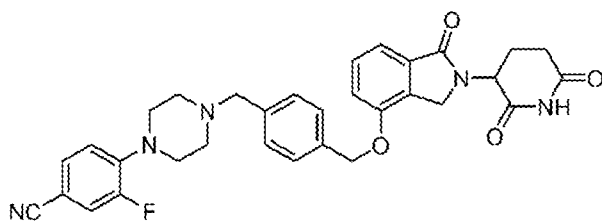
comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1e, por ejemplo el Compuesto 2e

**2e**

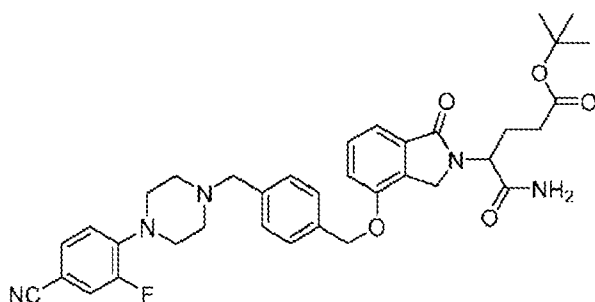
con 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo en un disolvente, en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 2d.

En una realización, el disolvente es acetonitrilo. En algunas realizaciones, la base es DIEA. En algunas otras realizaciones, el contacto se realiza a temperatura elevada, por ejemplo a alrededor de 50 °C hasta alrededor de 70 °C.

En otro aspecto, se proporcionan aquí métodos para preparar el Compuesto 1,

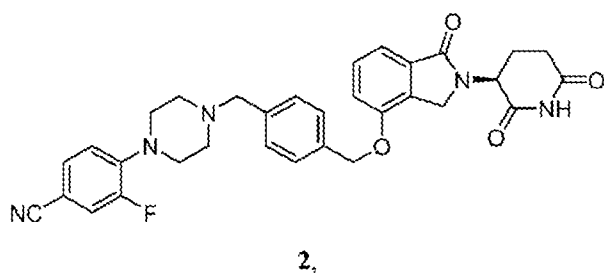
**1,**

o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el Compuesto 1f

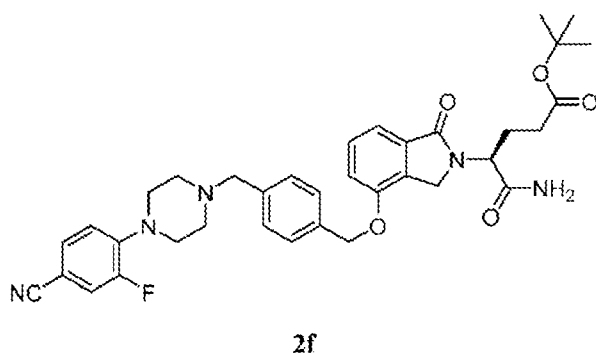
**1f,**

o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, con un ácido, en un disolvente orgánico, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1.

En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1, por ejemplo el Compuesto 2,



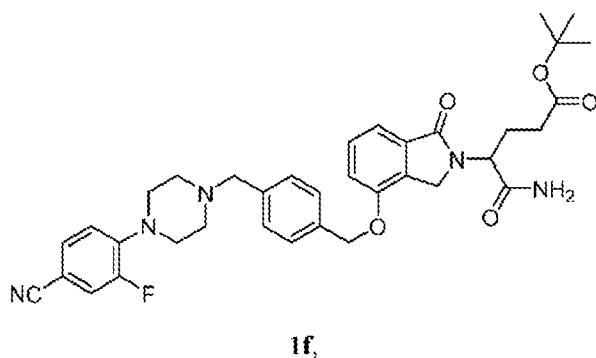
comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1f, por ejemplo el Compuesto 2f



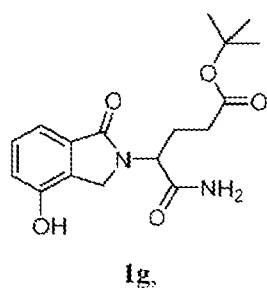
con un ácido, en un disolvente orgánico, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 2.

En una realización, el disolvente es acetonitrilo. En otro, el ácido es ácido benenosulfónico. En algunas realizaciones, el contacto se realiza a temperatura elevada, por ejemplo a alrededor de 75 °C hasta alrededor de 95 °C.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además preparar el Compuesto 1f,

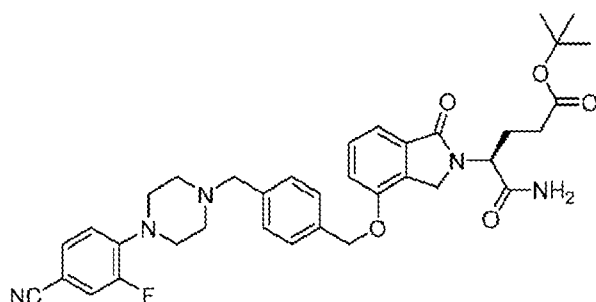


o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto el Compuesto 1g



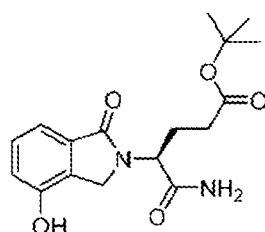
o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, tautómero, o isotópologo del mismo, con 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o una sal del mismo, en un disolvente, en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 1f.

En una realización, el método es un método para preparar un enantiómero del Compuesto 1f, por ejemplo el Compuesto 2f,



21.

5 comprendiendo el método poner en contacto un enantiómero del Compuesto 1a, por ejemplo el Compuesto 2a



2g

10 con 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o una sal del mismo, en un disolvente, en presencia de una base, en condiciones adecuadas para proporcionar el Compuesto 2f.

En una realización, el disolvente es DMF. En una realización, el disolvente es DMSO. En otro, la base es carbonato de potasio. En algunas realizaciones, el contacto se realiza a temperatura elevada, por ejemplo a alrededor de 35 °C hasta alrededor de 55 °C.

En algunas realizaciones, los métodos para preparar el Compuesto 1f comprenden además un método de purificación, comprendiendo el método de purificación (i) poner en contacto el Compuesto 1f (base libre) con un ácido en un primer disolvente; (ii) filtrar para proporcionar la sal ácida del Compuesto 1f; y (iii) lavar la sal ácida del Compuesto 1f en un segundo disolvente con una base para proporcionar el Compuesto 1f (base libre). En una realización, el ácido es ácido tartárico (por ejemplo, ácido L-tartárico). En una realización, el primer disolvente es metanol. En una realización, la sal ácida del Compuesto 1f es una sal de tartrato (por ejemplo, sal de ácido L-tartárico) del Compuesto 1f. En una realización, el segundo disolvente es 2-metiltetrahidrofurano. En una realización, la base es carbonato de potasio.

En algunas realizaciones, los métodos para preparar un enantiómero del Compuesto 1f, por ejemplo el Compuesto 2f, comprenden además un método de purificación, comprendiendo el método de purificación (i) poner en contacto el Compuesto 2f (base libre) con un ácido en un primer disolvente; (ii) filtrar para proporcionar la sal ácida del Compuesto 2f, y (iii) lavar la sal ácida del Compuesto 2f en un segundo disolvente con una base para proporcionar el Compuesto 2f (base libre). En una realización, el ácido es ácido tartárico (por ejemplo, ácido L-tartárico). En una realización, el primer disolvente es metanol. En una realización, la sal ácida del Compuesto 2f es una sal de tartrato (por ejemplo, sal de ácido L-tartárico) del Compuesto 2f. En una realización, el segundo disolvente es 2-metiltetrahidrofurano. En una realización, la base es carbonato de potasio.

35 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además preparar 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o una sal del mismo, comprendiendo los métodos poner en contacto 4-(clorometil)benzaldehído con 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo, en un disolvente, en presencia de un agente reductor, en condiciones adecuadas para proporcionar 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo.

40 En una realización, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio ($\text{NaBH}(\text{OAc})_4$). En una realización, el disolvente es tolueno. En una realización, el contacto se realiza en presencia de un ácido. En una realización, el ácido es ácido acético.

En una realización, el 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo, o una sal del mismo, preparado y usado en los métodos proporcionados aquí es una sal de HCl de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-

fluorobenzonitrilo. En una realización, la sal de HCl se prepara poniendo en contacto la base libre de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo con ácido clorhídrico en isopropanol.

E. Usos en métodos de tratamiento y prevención

Sorprendentemente, se ha descubierto que el Compuesto 1, el Compuesto 2 y el Compuesto 3 son compuestos antimieloma muy potentes que tienen características distintivas, tales como un perfil de seguridad mejorado, que incluye la muerte selectiva de células de mieloma múltiple en comparación con las células normales, una actividad reducida en receptores fuera de la diana, y una inhibición reducida de la enzima CYP, lo que reduce el potencial de interacciones farmacológicas adversas.

En una realización, el método es para tratar el mieloma múltiple, que comprende administrar a un paciente el Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para tratar el mieloma múltiple, en el que el método comprende administrar dicho compuesto a un paciente.

En una realización, el método es para tratar el mieloma múltiple, que comprende administrar a un paciente el Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento del mieloma múltiple, en el que el método comprende administrar dicho compuesto a un paciente.

En una realización, el método es para tratar el mieloma múltiple, que comprende administrar a un paciente el Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento del mieloma múltiple, en el que el método comprende administrar dicho compuesto a un paciente.

En una realización, el método es para prevenir el mieloma múltiple, que comprende administrar a un paciente un compuesto proporcionado aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, se proporciona aquí un compuesto proporcionado aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para prevenir el mieloma múltiple, en el que el método comprende administrar dicho compuesto a un paciente.

En otra realización, el método es para gestionar el mieloma múltiple, que comprende administrar a un paciente un compuesto proporcionado aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, se proporciona aquí un compuesto proporcionado aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de gestión del mieloma múltiple, en el que el método comprende administrar dicho compuesto a un paciente.

En una realización, el método es para inducir una respuesta terapéutica evaluada con los Criterios Internacionales Uniformes de Respuesta para el Mieloma Múltiple (IURC) (véase Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006; (10) 10: 1-7) de un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr una respuesta completa estricta, una respuesta completa, o una respuesta parcial muy buena, según lo determinado por los Criterios Internacionales Uniformes de Respuesta para el Mieloma Múltiple (IURC) en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr en un paciente un aumento en la supervivencia general, supervivencia libre de progresión, supervivencia libre de eventos, tiempo hasta la progresión, o supervivencia libre de enfermedad, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr un aumento en la supervivencia general en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr un aumento en la supervivencia libre de progresión en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto

descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr un aumento en la supervivencia libre de eventos en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr un aumento en el tiempo hasta la progresión en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple. En otra realización, el método es para lograr un aumento en la supervivencia libre de enfermedad en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que tiene mieloma múltiple.

También se proporcionan aquí compuestos o composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento de pacientes que se han tratado previamente para mieloma múltiple pero que no responden a terapias estándar, así como aquellos que no han sido tratados previamente. También se incluyen compuestos o composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento de pacientes que se han sometido a cirugía en un intento de tratar el mieloma múltiple, así como también de aquellos que no lo han hecho. También se proporcionan aquí compuestos o composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento de pacientes que se han sometido previamente a una terapia de trasplante, así como de aquellos que no lo han hecho.

Los métodos incluyen tratamiento del mieloma múltiple que es recidivante, insensible o resistente. Los métodos incluyen la prevención del mieloma múltiple que es recidivante, insensible o resistente. Los métodos incluyen el abordaje del mieloma múltiple que es recidivante, insensible o resistente. En algunas de dichas realizaciones, el mieloma es mieloma múltiple de recaída primaria, secundaria, terciaria, cuádruple o quíntuple. En una realización, los métodos reducen, mantienen o eliminan la enfermedad mínima residual (EMR). En una realización, los métodos abarcan el tratamiento, la prevención o la gestión de diversos tipos de mieloma múltiple, tales como gammapatía monoclonal de significancia incierta (MGUS), mieloma múltiple de riesgo bajo, riesgo intermedio, y riesgo alto, mieloma múltiple de reciente diagnóstico (incluido mieloma múltiple de reciente diagnóstico de riesgo bajo, riesgo intermedio, y riesgo alto), mieloma múltiple elegible para trasplante y no elegible para trasplante, mieloma múltiple latente (indolente) (incluido mieloma múltiple latente de riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto), mieloma múltiple activo, plasmocitoma solitario, plasmocitoma extramedular, leucemia de células plasmáticas, mieloma múltiple del sistema nervioso central, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, mieloma de inmunoglobulina D y mieloma de inmunoglobulina E, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito aquí. En otra realización, los métodos abarcan el tratamiento, la prevención o el manejo del mieloma múltiple caracterizado por anomalías genéticas, tales como translocaciones de ciclina D (por ejemplo, t(11;14)(q13;q32); t(6;14)(p21;32); t(12;14)(p13;q32); o t(6;20);); translocaciones de MMSET (por ejemplo, t(4;14)(p16;q32); translocaciones de MAF (por ejemplo, t(14;16)(q32;q32); t(20;22); t(16; 22)(q11;q13); o t(14;20)(q32;q11)); u otros factores cromosómicos (por ejemplo, delección de 17p13, o cromosoma 13; del(17/17p), no hiperdiploidía, y ganancia(1q)), administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito aquí.

En una realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de inducción. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de inducción. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de inducción. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de consolidación. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de consolidación. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de consolidación. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

como terapia de mantenimiento. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de mantenimiento. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de mantenimiento.

En una forma de realización particular de los procedimientos descritos en el presente documento, el mieloma múltiple es leucemia de células plasmáticas.

En una forma de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, el mieloma múltiple es mieloma múltiple de alto riesgo. En algunas de tales formas de realización, el mieloma múltiple de alto riesgo es recidivante o refractario. En una forma de realización, el mieloma múltiple de riesgo alto es mieloma múltiple que ha recaído en un plazo 12 meses desde el primer tratamiento. En otra forma de realización más, el mieloma múltiple de alto riesgo es mieloma múltiple que se caracteriza por anomalías genéticas, por ejemplo, una o más de del(17/17p) y t(14;16)(q32;q32). En algunas de tales formas de realización, el mieloma múltiple de alto riesgo es recidivante o refractario a uno, dos o tres tratamientos previos.

En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación p53. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación Q331. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación R273H. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación K132. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación K132N. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación R337. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación R337L. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación W146. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación S261. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación S261T. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación E286. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación E286K. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación R175. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación R175H. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación E258. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación E258K. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación A161. En una forma de realización, la mutación p53 es una mutación A161T.

En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por delección homocigota de p53. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por delección homocigota de p53 de tipo silvestre.

En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por p53 de tipo silvestre.

En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de uno o más conductores oncogénicos. En una forma de realización, los, uno o más, impulsores oncogénicos se seleccionan del grupo que consiste en C-MAF, MAFB, FGFR3, MMset, Ciclina D1 y Ciclina D. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de C-MAF. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de MAFB. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de FGFR3 y MMset. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de C-MAF, FGFR3 y MMset. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de la ciclina D1. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de MAFB y ciclina D1. En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la activación de la ciclina D.

En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una o más translocaciones cromosómicas. En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(14;16). En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(14;20). En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(4;14). En una forma de realización, las translocaciones cromosómicas son t(4;14) y t(14;16). En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(11;14). En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(6;20). En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(20;22). En una forma de realización, las translocaciones cromosómicas son t(6;20) y t(20;22). En una forma de realización, la translocación cromosómica es t(16;22). En una forma de realización, las translocaciones cromosómicas son t(14;16) y t(16;22). En una realización, las translocaciones cromosómicas son t(14;20) y t(11;14).

En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación p53 Q331, por activación de C-MAF, y por una translocación cromosómica en t(14;16). En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por delección homocigota de p53, por activación de C-MAF, y por una translocación cromosómica en t(14;16). En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación p53 K132N, por activación de MAFB, y por una translocación cromosómica en t(14;20). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por p53 de tipo salvaje, por activación de FGFR3 y MMset, y por una translocación cromosómica en t(4;14). En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por p53 de tipo silvestre, por activación de C-MAF y por una translocación cromosómica en t(14;16). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por la delección homocigótica de p53, por la activación de FGFR3, MMset y C-MAF, y por translocaciones cromosómicas en t(4;14) y t(14;16). En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por delección homocigota de p53, por activación de ciclina D1 y por una translocación cromosómica en t(11;14). En una

realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación R337L de p53, por activación de ciclina D 1, y por una translocación cromosómica en t(11;14). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación W146 de p53, por la activación de FGFR3 y MMset, y por una translocación cromosómica en t(4; 14). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación S261T de p53, por la activación de MAFB, y por translocaciones cromosómicas en t(6;20) y t(20;22). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación E286K de p53, por la activación de FGFR3 y MMset, y por una translocación cromosómica en t(4; 14). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación R175H de p53, por la activación de FGFR3 y MMset, y por una translocación cromosómica en t(4; 14). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación E258K de p53, por la activación de C-MAF, y por translocaciones cromosómicas en t(14; 16) y t(16;22). En una forma de realización, el mieloma múltiple se caracteriza por p53 de tipo silvestre, por activación de MAFB y ciclina D1, y por translocaciones cromosómicas en t(14;20) y t(11;14). En una realización, el mieloma múltiple se caracteriza por una mutación A161T de p53, por activación de ciclina D, y por una translocación cromosómica en t(11;14).

En algunas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple de diagnóstico reciente elegible para trasplante. En otra forma de realización, el mieloma múltiple es mieloma múltiple recién diagnosticado no apto para trasplante.

En otras formas de realización más, el mieloma múltiple se caracteriza por progresión temprana (por ejemplo, inferior a 12 meses) tras el tratamiento inicial. En otras formas de realización más, el mieloma múltiple se caracteriza por progresión temprana (por ejemplo, inferior a 12 meses) tras el trasplante de células madres autólogas. En otra forma de realización, el mieloma múltiple es insensible a lenalidomida. En otra forma de realización, el mieloma múltiple es insensible a pomalidomida. En algunas de dichas formas de realización, se predice que el mieloma múltiple es refractario a pomalidomida (por ejemplo, por caracterización molecular). En otra forma de realización, el mieloma múltiple es recidivante o refractario a 3 o más tratamientos y se expuso a un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, oprozomib o marizomib) y un compuesto inmunomodulador (por ejemplo talidomida, lenalidomida, pomalidomida, iberdomida o avadomida), o fue doblemente refractario a un inhibidor del proteasoma y un compuesto inmunomodulador. En otras formas de realización más, el mieloma múltiple es recidivante o refractario a 3 o más terapias anteriores, que incluyen, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal CD38 (mAb CD38, por ejemplo, daratumumab o isatuximab), un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, ixazomib o marizomib) y un compuesto inmunomodulador (por ejemplo, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, iberdomida o avadomida) o doblementerefractario a un inhibidor del proteasoma o compuesto inmunomodulador y un mAb CD38. En otras formas de realización más, el mieloma múltiple es triplemente refractario, por ejemplo, el mieloma múltiple es refractario a un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, oprozomib o marizomib), un compuesto inmunomodulador (por ejemplo talidomida, lenalidomida, pomalidomida, iberdomida o avadomida), y otro agente activo, tal como se describe en el presente documento.

En algunas de dichas realizaciones, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de inducción. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de inducción. En otra realización, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como terapia de inducción.

En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar, prevenir y/o gestionar el mieloma múltiple, incluido el mieloma múltiple recidivante/refractario en pacientes con función renal deteriorada, o un síntoma del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un paciente que tiene mieloma múltiple recidivante/refractario con función renal deteriorada.

En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar, prevenir y/o gestionar el mieloma múltiple, incluido el mieloma múltiple recidivante o refractario en pacientes frágiles, o un síntoma del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un paciente frágil que tiene mieloma múltiple. En algunas de dichas formas de realización, el paciente con fragilidad se caracteriza por no ser apto para terapia de inducción, o intolerancia al tratamiento con dexametasona. En algunas de dichas formas de realización, el paciente con fragilidad es un anciano, mayor de 65 años.

En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar, prevenir o gestionar el mieloma múltiple, que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en los que el mieloma múltiple es un mieloma múltiple recidivante/refractario de cuarta línea. En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar, prevenir o gestionar el mieloma múltiple, que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en los que el mieloma múltiple es un mieloma múltiple recidivante/refractario de cuarta línea. En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar,

Los métodos son para tratar, prevenir o gestionar el mieloma múltiple, que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en los que el mieloma múltiple es un mieloma múltiple recién diagnosticado y no elegible para trasplante. En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar, prevenir o gestionar el mieloma múltiple, que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 3, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en los que el mieloma múltiple es un mieloma múltiple recién diagnosticado y no elegible para trasplante.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto es de alrededor de 0,01 a alrededor de 25 mg por día, de alrededor de 0,01 a alrededor de 10 mg por día, de alrededor de 0,01 a alrededor de 5 mg por día, de alrededor de 0,01 a alrededor de 2 mg por día, de alrededor de 0,01 a alrededor de 1 mg por día, de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,5 mg por día, de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,25 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 25 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 5 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 2 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 1 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 0,5 mg por día, de alrededor de 0,1 a alrededor de 0,25 mg por día, de alrededor de 0,5 a alrededor de 25 mg por día, de alrededor de 0,5 a alrededor de 10 mg por día, de alrededor de 0,5 a alrededor de 5 mg por día, de alrededor de 0,5 a alrededor de 2 mg por día, de alrededor de 0,5 a alrededor de 1 mg por día, de alrededor de 1 a alrededor de 25 mg por día, de alrededor de 1 a alrededor de 10 mg por día, de alrededor de 1 a alrededor de 5 mg por día, de alrededor de 1 a alrededor de 2,5 mg por día, o de alrededor de 1 a alrededor de 2 mg por día. En una forma de realización, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 es de aproximadamente 0,1 mg por día a aproximadamente 0,4 mg por día.

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz es aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, o aproximadamente 25 mg por día. En algunas de dichas formas de realización, la cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6 o aproximadamente 0,7 mg por día.

En una realización, el intervalo de dosis diaria recomendada del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para las afecciones descritas aquí se encuentra dentro del intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 25 mg por día, preferiblemente administrado como una dosis única una vez al día, o en dosis divididas a lo largo de un día. En otras formas de realización, la dosis está comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por día. Las dosis específicas por día incluyen 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 mg por día. Dosis más específicas por día incluyen 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 mg por día.

En una realización específica, la dosis inicial recomendada puede ser 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o 25 mg por día. En otra forma de realización, la dosis inicial recomendada puede ser de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 mg por día. La dosis puede aumentarse escalonadamente hasta 1, 2, 3, 4 o 5 mg por día.

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz es desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 5 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 4 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 3 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 2 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 1 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,05 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,04 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,03 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,02 mg/kg/día, desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,01 mg/kg/día, o desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,005 mg/kg/día.

La dosis administrada también se puede expresar en unidades distintas de mg/kg/día. Por ejemplo, las dosis para administración parenteral se pueden expresar como mg/m²/día. Una persona con conocimientos medios en la técnica sabría fácilmente cómo convertir dosis de mg/kg/día en mg/m²/día dada la altura o el peso de un sujeto o ambos (véase www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm). Por ejemplo, una dosis de 1 mg/kg/día para un ser humano de 65 kg es aproximadamente equivalente a 38 mg/m²/día.

En ciertas realizaciones, el paciente a tratar con uno de los métodos no se ha tratado con terapia para mieloma múltiple antes de la administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas realizaciones, el paciente a tratar con uno de los métodos se ha tratado con terapia para mieloma múltiple antes de la administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas

realizaciones, el paciente a tratar con uno de los métodos ha desarrollado resistencia a fármacos frente a la terapia contra el mieloma múltiple. En algunas de tales formas de realización, el paciente ha desarrollado resistencia a una, dos o tres terapias contra el mieloma múltiple, seleccionándose las terapias de un anticuerpo monoclonal CD38 (mAb CD38, por ejemplo, daratumumab o isatuximab), un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, ixazomib o marizomib) y un compuesto inmunomodulador (por ejemplo talidomida, lenalidomida, pomalidomida, iberdomida o avadomida).

Los métodos engloban tratar un paciente independientemente de la edad del paciente. En algunas formas de realización, el sujeto tiene 18 años o más. En otras formas de realización, el sujeto tiene más de 18, 25, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 años. En otras formas de realización, el sujeto tiene menos de 65 años. En otras formas de realización, el sujeto tiene más de 65 años. En una forma de realización, el sujeto es un sujeto anciano con mieloma múltiple, tal como un sujeto mayor de 65 años. En una forma de realización, el sujeto es un sujeto anciano con mieloma múltiple, tal como un sujeto mayor de 75 años.

Dependiendo del estado de la enfermedad a tratar y la condición del sujeto, el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden administrar por vía oral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, CIV, inyección o infusión intracisternal, inyección subcutánea, o implante), inhalación, nasal, vaginal, rectal, sublingual, o tópica (por ejemplo, transdérmica o local). El Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden formular, solos o juntos, en una unidad de dosificación adecuada con excipientes, portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, apropiados para cada vía de administración.

En una realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran por vía oral. En otra realización, el compuesto del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran por vía parenteral. En otra realización más, el compuesto del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran por vía intravenosa.

El Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden administrar como una dosis única, tal como, por ejemplo, una única inyección en bolo, o comprimidos o píldoras orales; o a lo largo del tiempo, tal como, por ejemplo, una infusión continua a lo largo del tiempo, o dosis en bolo divididas a lo largo del tiempo. Los compuestos como se describen aquí se pueden administrar repetidamente si es necesario, por ejemplo, hasta que el paciente experimente una enfermedad estable o regresión, o hasta que el paciente experimente una progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. La estabilidad de la enfermedad o la ausencia de la misma se determina mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como la evaluación de los síntomas del paciente, examen físico, visualización del tumor mediante imágenes utilizando rayos X, TAC, TEP o IRM y otras modalidades de evaluación comúnmente aceptadas.

El Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden administrar una vez al día (QD o qd), o dividirse en múltiples dosis diarias, tal como dos veces al día (BID o bid), tres veces al día (TID o tid) y cuatro veces al día (QID o qid). Además, la administración puede ser continua (es decir, diariamente durante días consecutivos o todos los días), intermitente, por ejemplo en ciclos (es decir, incluyendo días, semanas o meses de descanso sin fármaco). Como se usa aquí, el término "diariamente" pretende significar que un compuesto terapéutico, tal como el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una o más de una vez al día, por ejemplo durante un período de tiempo. El término "continua" pretende significar que un compuesto terapéutico, tal como el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra diariamente durante un período ininterrumpido de al menos 7 días hasta 52 semanas. El término "intermitente" o "intermitentemente", como se usa aquí, pretende significar detenerse y reiniciarse a intervalos regulares o irregulares. Por ejemplo, la administración intermitente del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, es la administración durante uno a seis días por semana, la administración en ciclos (por ejemplo, administración diaria durante dos a ocho semanas consecutivas, después un período de descanso sin administración durante hasta una semana), o la administración en días alternos. El término "en ciclos", como se usa aquí, pretende significar que un compuesto terapéutico, tal como el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra diariamente o de forma continua pero con un período de descanso. En algunas de tales realizaciones, la administración se realiza

una vez al día durante dos a seis días, después un período de descanso sin administración durante cinco a siete días.

En algunas realizaciones, la frecuencia de la administración está en el intervalo de aproximadamente una dosis al día a aproximadamente una dosis al mes. En determinadas formas de realización, la administración es de una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas. En una realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran una vez al día. En otra realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran dos veces al día. En aún otra realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran tres veces al día. En todavía otra realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran cuatro veces al día.

En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 20 días, seguido de un periodo de descanso. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 15 días, seguido de un periodo de descanso. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 7 días, seguido de un periodo de descanso. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 5 días, seguido de un periodo de descanso. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 4 días, seguido de un periodo de descanso. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra en un ciclo de tratamiento que incluye un periodo de administración de hasta 3 días, seguido de un periodo de descanso.

En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 14 días, seguido de un periodo de descanso. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 7 días, seguido de un periodo de descanso. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 5 días, seguido de un periodo de descanso. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 4 días, seguido de un periodo de descanso. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 3 días, seguido de un periodo de descanso.

En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 11 días. En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 10 días. En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 2 días. En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 3 días. En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 4 días. En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 5 días. En una forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 6 días. En otra forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 7 días. En otra forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 8 días. En otra forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 9 días. En otra forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 10 días. En otra forma de realización, el periodo de descanso es de aproximadamente 11 días.

En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 15 días, seguido de un periodo de descanso de aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 10 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso de aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 10 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 7 días, seguido de un periodo de descanso de aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 10 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 5 días, seguido de un periodo de descanso de aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 10 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 3 días, seguido de un periodo de descanso de aproximadamente 10 días hasta aproximadamente 15 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 3 días, seguido de un periodo de descanso de aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 15 días.

En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 15 días, seguido de un periodo de descanso de 7 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso de 5 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso de 4 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso de 3 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 10 días, seguido de un periodo de descanso de 2 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 7 días, seguido de un periodo de descanso de 7 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 5 días, seguido de un periodo de descanso de 5 días. En una forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 3 días, seguido de un periodo de descanso de 11 días. En otra forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 5 días, seguido de un periodo de descanso de 9 días. En otra forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 5 días, seguido de un periodo de descanso de 2 días. En otra forma de realización, el ciclo de tratamiento incluye un periodo de administración de hasta 3 días, seguido de un periodo de descanso de 4 días.

En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 5 de un ciclo de 28 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 10 de un ciclo de 28 días. En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 21 de un ciclo de 28 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 5 de un ciclo de 7 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 7 de un ciclo de 7 días. En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 los días 1 a 10 y los días 15 a 24 de un ciclo de 28 días (en adelante denominado ciclo de dosificación 20/28). En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 3 y días 15 a 18 de un ciclo de 28 días. En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 los días 1 a 7 y los días 15 a 21 de un ciclo de 28 días (en adelante denominado ciclo de dosificación 14/28). En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 los días 1 a 5 y los días 15 a 19 de un ciclo de 28 días (en adelante denominado ciclo de dosificación 10/28). En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 los días 1 a 3 y los días 15 a 17 de un ciclo de 28 días (en adelante denominado ciclo de dosificación 6/28).

En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 14 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 4 y 8 a 11 de un ciclo de 21 días. En una realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 5 y 8 a 12 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 5 y 11 a 15 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 5, 8 a 12 y 15 a 19 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 4, 8 a 11 y 15 a 18 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 4, 8 a 10 y 15 a 17 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 3, y 8 a 11 de un ciclo de 21 días. En otra realización, el ciclo de tratamiento incluye una administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en los días 1 a 3 y 11 a 13 de un ciclo de 21 días.

Cualquier ciclo de tratamiento descrito en el presente documento se puede repetir durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más ciclos. En determinados casos, el ciclo de tratamiento tal como se describe en el presente documento incluye de 1 a aproximadamente 24 ciclos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 ciclos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 ciclos. En determinados casos, un ciclo de tratamiento tal como se describe en el presente documento incluye de 1 a aproximadamente 4 ciclos. En determinadas formas de realización, el ciclo 1 a 4 son todos ciclos de 28 días. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 se administra durante 1 a 13 ciclos de 28 días (por ejemplo, aproximadamente 1 año). En determinados casos, la terapia cíclica no se limita al número de ciclos, y la terapia continúa hasta la progresión de la enfermedad. Los ciclos pueden en determinados casos incluir la variación de la duración de los periodos de administración y/o los periodos de descanso descritos en el presente documento.

En una realización, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg/día, 0,2 mg/día, 0,3 mg/día, 0,4 mg/día, 0,5 mg/día, 0,6 mg/día, 0,7 mg/día, 0,8 mg/día, 0,9 mg/día, 1,0 mg/día, 5,0 mg/día, o 10 mg/día, administrada una vez al día. En una
5 realización, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg/día, 0,2 mg/día, 0,3 mg/día, 0,4 mg/día, 0,5 mg/día, 0,6 mg/día, 0,7 mg/día o 0,8 mg/día, administrada una vez al día. En algunas de dichas realizaciones, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 una vez al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, o 0,5 mg en los días 1 a 10 de un ciclo de 28 días. En algunas
10 de dichas realizaciones, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 una vez al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg o 0,5 mg en los días 1 a 10 y 15 a 24 de un ciclo de 28 días. En algunas de dichas realizaciones, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 una vez al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg en los días 1 a 10 y 15 a 24 de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el ciclo de
15 tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 dos veces al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg o 0,5 mg en los días 1 a 3 de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 dos veces al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg o 0,5 mg en los días 1 a 3 y 15 a 19 de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el ciclo de tratamiento incluye administrar el
20 Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 dos veces al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg o 0,5 mg en los días 1 a 3 y 15 a 17 de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el ciclo de tratamiento incluye administrar el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3 dos veces al día en una cantidad de dosis de aproximadamente 0,2 mg en los días 1 a 3 y 15 a 17 de un ciclo de 28 días. En una de tales formas de realización, el compuesto se administra los días 1 a 3 (mañana y noche), el día 14 (solo por la noche), los días
25 15 y 16 (mañana y noche), y el día 17 (solo por la mañana) de un ciclo de 28 días, por ejemplo en el Ciclo 1.

F. Terapia de combinación con un segundo agente activo

El Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de
30 enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, también se pueden combinar o usar junto con (por ejemplo, antes, durante, o después de) una terapia convencional que incluye, pero no se limita a, cirugía, terapia biológica (incluyendo inmunoterapia, por ejemplo con inhibidores de puntos de control), radioterapia, quimioterapia, trasplante de células madre, terapia celular, u otra terapia no basada en fármacos que se usa actualmente para tratar, prevenir o controlar el mieloma múltiple. El uso combinado del
35 compuesto proporcionado en el presente documento y la terapia convencional puede proporcionar un régimen de tratamiento excepcional que es inesperadamente eficaz en ciertos pacientes. Sin estar limitados por la teoría, se cree que el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 pueden proporcionar efectos aditivos o sinérgicos cuando se administran simultáneamente con la terapia convencional.

Como se analiza en otra parte aquí, se abarca aquí un compuesto o composición de la invención para uso en un
40 método para reducir, tratar y/o prevenir efectos adversos o no deseados asociados con la terapia convencional que incluye, pero no se limita a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica e inmunoterapia. Un compuesto proporcionado aquí, por ejemplo el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y otro ingrediente
45 activo se pueden administrar a un paciente antes, durante o después de la aparición del efecto adverso asociado con la terapia convencional.

El Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 proporcionados aquí, o un enantiómero, mezcla de
50 enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, también se pueden combinar o usar en combinación con otros agentes terapéuticos útiles en el tratamiento y/o prevención del mieloma múltiple descrito aquí.

En una realización, el método es para tratar, prevenir o controlar el mieloma múltiple, que comprende administrar
55 a un paciente el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en combinación con uno o más segundos agentes activos, y opcionalmente en combinación con radioterapia, transfusiones de sangre, o cirugía.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término «combinado/a» incluye el uso de más de una terapia (p.
60 ej., uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos). Sin embargo, el uso del término «combinado/a» no restringe el orden en el que se administran las terapias (p. ej., agentes profilácticos y/o terapéuticos) a un paciente con una enfermedad o trastorno. Una primera terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico tal como un compuesto proporcionado aquí, por ejemplo Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo o sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se puede administrar
65 antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posteriormente a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos,

30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después de) la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) al sujeto. También se contempla aquí la triple terapia, así como la cuádruple. En una realización, la segunda terapia es dexametasona.

La administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y uno o más segundos agentes activos a un paciente puede ocurrir simultánea o secuencialmente por la misma o diferentes vías de administración. La idoneidad de una determinada vía de administración empleada para un agente activo particular dependerá del propio agente activo (por ejemplo, si puede administrarse por vía oral sin descomponerse antes de entrar en el torrente sanguíneo).

La vía de administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos es independiente de la vía de administración de una segunda terapia. En una realización, el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra por vía oral. En otra realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 se administran por vía intravenosa. Por lo tanto, según estas realizaciones, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran por vía oral o intravenosa, y la segunda terapia se puede administrar por vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, por inhalación, vaginal, intraocular, mediante administración local por catéter o endoprótesis, subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intratecal, o en una forma de dosificación de liberación lenta. En una realización, el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y una segunda terapia se administran mediante el mismo modo de administración, por vía oral o intravenosa. En otra realización, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran mediante un modo de administración, por ejemplo por vía intravenosa, mientras que el segundo agente (un agente anti-mieloma múltiple) se administra mediante otro modo de administración, por ejemplo por vía oral.

En una realización, el segundo agente activo se administra por vía intravenosa o subcutánea y una o dos veces al día en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 1000 mg, de alrededor de 5 a alrededor de 500 mg, de alrededor de 10 a alrededor de 350 mg, o de alrededor de 50 a alrededor de 200 mg. La cantidad específica del segundo agente activo dependerá del agente específico usado, el tipo de mieloma múltiple que se esté tratando o gestionando, la gravedad y el estadio de la enfermedad, y la cantidad de Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, proporcionados aquí, y cualquier agente activo adicional opcional administrado concurrentemente al paciente.

En los métodos y composiciones proporcionados aquí se pueden usar uno o más segundos ingredientes junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3. Los segundos agentes activos pueden ser moléculas grandes (por ejemplo, proteínas), moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas sintéticas inorgánicas, organometálicas u orgánicas), o terapias celulares (por ejemplo, células CAR).

Los ejemplos de segundos agentes activos que se pueden usar en los métodos y composiciones descritos aquí incluyen uno o más de melfalán, vincristina, ciclofosfamida, etopósido, doxorubicina, bendamustina, obinutuzumab, un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, oprozomib o marizomib), un inhibidor de la histona desacetilasa (por ejemplo, panobinostat, ACY241), un inhibidor de BET (por ejemplo, GSK525762A, OTX015, BMS-986158, TEN-010, CPI-0610, INCB54329, BAY1238097, FT-1101, ABBV-075, BI 894999, GS-5829, GSK1210151A (I-BET-151), CPI-203, RVX-208, XD46, MS436, PFI-1, RVX2135, ZEN3365, XD14, ARV-771, MZ-1, PLX5117, 4-[2-(ciclopropilmetoxi)-5-(metanosulfonil)fenil]-2-metilisoquinolin-1(2H)-ona, EP11313 y EP11336), un inhibidor de BCL2 (por ejemplo, venetoclax o navitoclax), un inhibidor de MCL-1 (por ejemplo, AZD5991, AMG176, MIK665, S64315, o S63845), un inhibidor de LSD-1 (por ejemplo, ORY-1001, ORY-2001, INCB-59872, IMG-7289, TAK-418, GSK-2879552, 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo o una sal del mismo), un corticosteroide (por ejemplo, prednisona), dexametasona; un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-CS1, tal como elotuzumab; un anticuerpo anti-CD38, tal como daratumumab o isatuximab; o un anticuerpo anti-BCMA o un conjugado de anticuerpo, tal como GSK2857916 o BI 836909), un inhibidor de puntos de control (como se describe aquí), o células CAR (como se describe aquí).

En una realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es dexametasona.

En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 4, 8 y 11 de un ciclo de 21 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 de un ciclo de 28 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 10, 15 y 22 del ciclo 1. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 3, 15 y 17 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 4 mg los días 1, 3, 14 y 17 del ciclo 1.

En algunas otras realizaciones, la dexametasona se administra en una dosis de 8 mg en los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días. En algunas otras realizaciones, la dexametasona se administra en una dosis de 8 mg en los días 1, 4, 8 y 11 de un ciclo de 21 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 8 mg los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 8 mg los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 de un ciclo de 28 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 8 mg los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 8 mg los días 1, 10, 15 y 22 del ciclo 1. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 8 mg los días 1, 3, 15 y 17 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 8 mg los días 1, 3, 14 y 17 del ciclo 1.

En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 4, 8 y 11 de un ciclo de 21 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 de un ciclo de 28 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 10, 15 y 22 del ciclo 1. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 3, 15 y 17 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 10 mg los días 1, 3, 14 y 17 del ciclo 1.

En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 4, 8 y 11 de un ciclo de 21 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 de un ciclo de 28 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 10, 15 y 22 del ciclo 1. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 3, 15 y 17 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 20 mg los días 1, 3, 14 y 17 del ciclo 1.

En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 4, 8 y 11 de un ciclo de 21 días. En algunas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 10, 15 y 22 del ciclo 1. En algunas otras formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 de un ciclo de 28 días. En otras dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 28 días. En otras dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 3, 15 y 17 de un ciclo de 28 días. En una de dichas formas de realización, la dexametasona se administra a una dosis de 40 mg los días 1, 3, 14 y 17 del ciclo 1.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es bortezumib. En aún otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es daratumumab. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona. En algunas realizaciones, los métodos comprenden la administración del Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, con un inhibidor de proteasoma como se describe aquí, un inhibidor de CD38 como se describe aquí, y un corticosteroide como se describe aquí.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es panobinostat. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es ACY241. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es vincristina. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es ciclofosfamida. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es etopósido. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es doxorubicina. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es venetoclax. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es AMG176. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es MIK665. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es GSK525762A. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es OTX015. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-2-metilisoquinolin-1(2H)-ona. En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En otra realización, el segundo agente activo usado junto con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los métodos y composiciones descritos aquí es 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo, o una sal del mismo (por ejemplo, una sal de besilato).

En algunas de dichas formas de realización, los procedimientos comprenden además la administración de dexametasona.

En ciertas realizaciones, el Compuesto 1, Compuesto 2 o Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en combinación con inhibidores de puntos de control. En una realización, se usa un inhibidor de puntos de control en combinación con el Compuesto 1, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en relación con los métodos proporcionados aquí. En otra realización, se usan dos inhibidores de puntos de control en combinación con el Compuesto 1, o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en relación con los métodos proporcionados aquí. En aún otra realización, se usan tres o más inhibidores de puntos de control en combinación con el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en relación con los métodos proporcionados aquí.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibidor de un punto de control inmunitario" o "inhibidor de un punto de control" se refiere a moléculas que, de manera total o parcial, reducen, inhiben, interfieren con, o modulan una o más proteínas que son puntos de control. Sin estar limitado por ninguna teoría particular, las proteínas que son puntos de control regulan la activación o función de los linfocitos T. Se conocen numerosas proteínas que son puntos de control, tales como CTLA-4 y sus ligandos CD80 y CD86; y PD-1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12, 252-264). Al parecer estas proteínas son responsables de las interacciones coestimuladoras o inhibitoras de las respuestas de los linfocitos T. Al parecer las proteínas que son puntos de control inmunitario regulan y mantienen la autotolerancia y la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas. Los inhibidores de un punto de control inmunitario incluyen anticuerpos o se derivan de anticuerpos.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de CTLA-4. En una forma de realización, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo anti-CTLA-4. Algunos ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 incluyen, pero sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos Nº 5.811.097, 5.811.097, 5.855.887, 6.051.227, 6.207.157, 6.682.736, 6.984.720 y 7.605.238. En una forma de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es tremelimumab (también conocido como ticilimumab o CP-675 206). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab (también conocido como MDX-010 o MDX-101). El ipilimumab es un anticuerpo de tipo IgG monoclonal completamente humano que se une a CTLA-4. El ipilimumab se comercializa con el nombre comercial Yervoy™.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de PD-1/PD-L1. Ejemplos de inhibidores de PD-1/PD-L1 incluyen, pero sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos Nº 7.488.802; 7.943.743; 8.008.449; 8.168.757; 8.217.149 y las publicaciones de solicitud de patente PCT Nº WO2003042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 y WO2011161699.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de PD-1. En una forma de realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es BGB-A317, nivolumab (también conocido como ONO-4538, BMS-936558 o MDX1106) o pembrolizumab (también conocido como MK-3475, SCH 900475 o lambrolizumab). En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. El nivolumab es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 de tipo IgG4 humana, y se comercializa con el nombre comercial Opdivo™. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. El pembrolizumab es un anticuerpo de tipo IgG4 monoclonal humanizado y se comercializa con el nombre comercial Keytruda™. En otra forma de realización más, el anticuerpo anti-PD-1 es CT-011, un anticuerpo humanizado. El CT-011 administrado solo no consigue mostrar respuesta en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) en una recaída. En otra forma de realización más, el anticuerpo anti-PD-1 es AMP-224, una proteína de fusión. En otra forma de realización, el anticuerpo contra PD-1 es BGB-A317. BGB-A317 es un anticuerpo monoclonal en el que la capacidad de unirse al receptor I gamma de Fc se diseña específicamente por ingeniería genética, y que tiene una firma de unión única a PD-1 con alta afinidad y especificidad de diana superior.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de PD-L1. En una forma de realización, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (durvalumab). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es BMS-936559 (también conocido como MDX-1105-01). En otra forma de realización más, el inhibidor de PD-L1 es atezolizumab (también conocido como MPDL3280A y Tecentriq®).

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de PD-L2. En una forma de realización, el inhibidor de PD-L2 es un anticuerpo anti-PD-L2. En una forma de realización, el anticuerpo anti-PD-L2 es rHlgM12B7A.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor del gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3). En una forma de realización, el inhibidor de LAG-3 es IMP321, una proteína de fusión de tipo Ig soluble

(Brignone et al., J. Immunol., 2007, 179, 4202-4211). En otra forma de realización, el inhibidor de LAG-3 es BMS-986016.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de B7. En una forma de realización, el inhibidor de B7 es un inhibidor de B7-H3 o un inhibidor de B7-H4. En una forma de realización, el inhibidor de B7-H3 es MGA271, un anticuerpo anti-B7-H3 (Loo et al., Clin. Cancer Res., 2012, 3834).

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de TIM3 (dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 de mucina) (Fourcade et al., J. Exp. Med., 2010, 207, 2175-86; Sakuishi et al., J. Exp. Med., 2010, 207, 2187-94).

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un agonista de OX40 (CD134). En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un anticuerpo anti-OX40. En una forma de realización, el anticuerpo anti-OX40 es anti-OX-40. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-OX40 es MEDI6469.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un agonista de GITR. En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un anticuerpo anti-GITR. En una forma de realización, el anticuerpo anti-GITR es TRX518.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un agonista de CD137. En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un anticuerpo anti-CD137. En una forma de realización, el anticuerpo anti-CD137 es urelumab. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-CD137 es PF-05082566.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un agonista de CD40. En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un anticuerpo anti-CD40. En una forma de realización, el anticuerpo anti-CD40 es CF-870 893.

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es interleucina-15 humana recombinante (rhIL-15).

En una forma de realización, el inhibidor de un punto de control es un inhibidor de IDO. En una forma de realización, el inhibidor de IDO es INCB024360. En otra forma de realización, el inhibidor de IDO es indoximod.

En ciertas realizaciones, las terapias de combinación incluyen dos o más de los inhibidores del punto de control descritos en el presente documento (incluyendo inhibidores del punto de control de la misma clase o diferentes). Además, las terapias de combinación descritas en el presente documento se pueden usar en combinación con uno o más segundos agentes activos, tal como se describe en el presente documento, cuando corresponda, para tratar enfermedades descritas en el presente documento y entendidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3 se pueden usar en combinación con una o más células inmunitarias que expresan uno o más receptores de antígeno quiméricos (CAR) en su superficie (por ejemplo, una célula inmunitaria modificada). En general, los CAR comprenden un dominio extracelular de una primera proteína (por ejemplo, una proteína de unión al antígeno), un dominio transmembranario y un dominio de señalización intracelular. En determinadas formas de realización, una vez que el dominio extracelular se une a una proteína diana, tal como un antígeno asociado a un tumor (TAA) o un antígeno específico de un tumor (TSA), se genera una señal a través del dominio de señalización intracelular que activa la célula inmunitaria, por ejemplo, para dirigirse a una célula que expresa la proteína diana y destruirla.

Dominios extracelulares: Los dominios extracelulares de los CAR se unen a un antígeno de interés. En determinadas formas de realización, el dominio extracelular del CAR comprende un receptor, o una porción de un receptor, que se une a dicho antígeno. En determinadas formas de realización, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo. En formas de realización específicas, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio Fv monocatenario (scFv). El dominio Fv monocatenario puede comprender, por ejemplo, una V_L unida a V_H mediante un enlazador flexible, en el que dichas V_L y V_H son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

En ciertas realizaciones, el antígeno reconocido por el dominio extracelular de un polipéptido descrito aquí es un antígeno asociado a un tumor (TAA) o un antígeno específico de un tumor (TSA). En diversas formas de realización específicas, el antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es, sin limitación, Her2, antígeno de células madre prostáticas (PSCA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno-125 del cáncer (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), proteína de la membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado al melanoma-24 (MAGE), CD19, CD22, CD27, CD30, CD34, CD45, CD70, CD99, CD117, EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prostateína, TARP (proteína del marco de lectura alterno del receptor gamma de linfocitos T), Trp-p8, STEAPI (antígeno epitelial de seis transmembranas de la próstata 1), cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno de HMB-45, proteína melan-A (antígeno de

melanoma reconocido por linfocitos T; MART-I), mio-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor-1 de transcripción de la tiroides, la forma dimérica de la isoenzima piruvato cinasa de tipo M2 (M2-PK de tumor), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal. En determinadas formas de realización diferentes, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un CAR es integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ (CD61), galactina o Ral-B.

En determinadas formas de realización, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un CAR es un antígeno de cáncer/testículo (CT), por ejemplo, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ES0-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCPI o TPTE.

En determinadas formas de realización diferentes, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un CAR es un carbohidrato o gangliósido, por ejemplo, fuc-GMI, GM2 (antígeno oncofetal inmunogénico-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3 y similares.

En ciertas otras realizaciones, el TAA o TSA reconocido por el dominio extracelular de un CAR es alfa-actinina-4, Bage-1, BCR-ABL, proteína de fusión Bcr-Abl, beta-catenina, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, proteína de fusión dek-can, EBNA, EF2, antígenos del virus de Epstein Barr, proteína de fusión ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, y 3, neo-PAP, miosina clase I, OS-9, proteína de fusión pm1-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, triosafosfato isomerasa, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, HRas, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-Catenina, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, C0-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB70K, NY-C0-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP, o TPS.

En diversas formas de realización específicas, el antígeno asociado a un tumor o antígeno específico de un tumor es un antígeno de un tumor relacionado con LMA tal como se describe en S. Anguille et al, Leukemia (2012), 26, 2186-2196.

Los expertos en la técnica conocen otros antígenos asociados a un tumor y específicos de un tumor.

En la técnica se conocen receptores, anticuerpos y scFv que se unen a TSA y TAA, útiles en la construcción de receptores quiméricos para antígenos, ya que son secuencias de nucleótidos que los codifican.

En determinadas formas de realización específicas, el antígeno reconocido por el dominio extracelular de un receptor quimérico para el antígeno es un antígeno que no se considera, en general, que sea un TSA o un TAA, pero que se asocia, sin embargo, con las células tumorales o con el daño provocado por un tumor. En determinadas formas de realización, por ejemplo, el antígeno es, por ejemplo, un factor de crecimiento, una citocina o interleucina, por ejemplo, un factor de crecimiento, una citocina o interleucina que se asocia con la angiogénesis o vasculogénesis. Los factores de crecimiento, citocinas o interleucinas de este tipo pueden incluir, por ejemplo., el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o interleucina-8 (IL-8). Los tumores también pueden crear un entorno local hipóxico para el tumor. Como tal, en otras formas de realización específicas, el antígeno es un factor asociado a hipoxia, por ejemplo, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β . Los tumores también pueden causar daño localizado en el tejido normal, provocando la liberación de moléculas conocidas como moléculas de patrón molecular asociadas al daño (DAMP; también conocidas como alarminas). En determinadas formas de realización específicas diferentes, por lo tanto, el antígeno es una DAMP, por ejemplo, una proteína de choque térmico, proteína asociada a la cromatina de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB 1), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), amiloide A del suero (SAA), o puede ser un ácido desoxirribonucleico, adenosina trifosfato, ácido úrico o sulfato de heparina.

Dominio transmembrana: En determinadas formas de realización, el dominio extracelular del CAR se une al dominio transmembrana del polipéptido mediante una secuencia de polipéptido enlazadora, espaciadora o de tipo bisagra, por ejemplo, una secuencia de CD28 o una secuencia de CTLA4. El dominio transmembrana se puede obtener o se puede derivar del dominio transmembrana de cualquier proteína transmembrana y puede incluir la totalidad o una porción de dicho dominio transmembrana. En realizaciones específicas, el dominio transmembrana se puede obtener o puede derivar de, p. ej., CD8, CD16, un receptor de citocina y receptor de interleucina, o un factor de crecimiento receptor, o similares.

Dominios de señalización intracelular: En determinadas formas de realización, el dominio intracelular de un CAR es o comprende un dominio intracelular o motivo de una proteína que se expresa sobre la superficie de linfocitos T y desencadena la activación y/o proliferación de dichos linfocitos T. Un dominio o motivo de este tipo es capaz de transmitir una señal primaria de unión al antígeno que es necesaria para la activación de un linfocito T como

respuesta a la unión del antígeno a la porción extracelular del CAR. Normalmente, este dominio o motivo comprende, o es, un ITAM (motivo de activación del inmunoceptor basado en tirosina). Algunos polipéptidos que contienen ITAM adecuados para CAR incluyen, por ejemplo, la cadena zeta de CD3 (CD3 ζ) o porciones que contienen ITAM de la misma. En una forma de realización específica, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ . En otras formas de realización específicas, el dominio intracelular es de una cadena de receptores de linfocitos, una proteína del complejo TCR/CD3, una subunidad de receptor de Fe o una subunidad de receptor de IL-2. En determinadas formas de realización, el CAR comprende adicionalmente uno o más dominios o motivos coestimuladores, por ejemplo, como parte del dominio intracelular del polipéptido. Los, uno o más, dominios o motivos coestimulantes pueden ser, o pueden comprender, uno o más de una secuencia de polipéptidos de CD27 coestimulante, una secuencia de polipéptidos de CD28 coestimulante, una secuencia de polipéptidos de OX40 (CD134) coestimulante, una secuencia de polipéptidos de 4-1BB (CD137) coestimulante, o una secuencia de polipéptidos coestimulante de linfocitos T inducibles coestimulantes (ICOS), u otro dominio o motivo coestimulante, o cualquier combinación de los mismos.

El CAR también puede comprender un motivo de supervivencia de linfocitos T. El motivo de supervivencia de linfocitos T puede ser cualquier motivo o secuencia de polipéptido que facilite la supervivencia del linfocito T después de la estimulación por parte de un antígeno. En determinadas formas de realización, el motivo de supervivencia de linfocitos T es, o se deriva de, CD3, CD28, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21 o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).

Las células inmunitarias modificadas que expresan los CAR pueden ser, por ejemplo, linfocitos T (linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+), linfocitos citotóxicos (CTL) o linfocitos T citolíticos (NK). Los linfocitos T usados en las composiciones y métodos proporcionados aquí pueden ser linfocitos T vírgenes o linfocitos T restringidos por MHC. En determinadas formas de realización, los linfocitos T son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En determinadas formas de realización, los linfocitos T se han aislado a partir de una biopsia de un tumor, o se han expandido a partir de linfocitos T aislados de una biopsia de un tumor. En determinadas formas de realización diferentes, los linfocitos T se han aislado de, o se han expandido a partir de, linfocitos T aislados de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o linfa. Las células inmunitarias que se van a utilizar para generar células inmunitarias modificadas que expresan un CAR se pueden aislar utilizando procedimientos rutinarios aceptados en la técnica, por ejemplo, extracción de sangre seguida de aféresis y opcionalmente aislamiento o clasificación de células mediado por anticuerpos.

Las células inmunitarias modificadas son preferentemente autólogas para un individuo al que se van a administrar las células inmunitarias modificadas. En determinadas formas de realización diferentes, las células inmunitarias modificadas son alogénas para un individuo al que se van a administrar las células inmunitarias modificadas. En los casos en los que se utilizan células NK o linfocitos T alogénos para preparar linfocitos T modificados, es preferible seleccionar linfocitos T o células NK que reduzcan la posibilidad de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en el individuo. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, se seleccionan linfocitos T específicos de un virus para la preparación de linfocitos T modificados; cabrá esperar que tales linfocitos tengan una capacidad nativa enormemente reducida para unirse a, y así llegar a ser activados por, cualesquiera antígenos del receptor. En determinadas formas de realización, el rechazo mediado por el receptor de los linfocitos T alogénos se puede reducir mediante la coadministración al huésped de uno o más agentes inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, ciclofosfamida o similares.

Los linfocitos T, por ejemplo linfocitos T no modificados, o linfocitos T que expresan CD3 y CD28, o que comprenden un polipéptido que comprende un dominio de señalización de CD3 ζ y un dominio coestimulador de CD28, se pueden expandir usando anticuerpos contra CD3 y CD28, por ejemplo anticuerpos unidos a perlas; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 5.948.893; 6.534.055; 6.352.694; 6.692.964; 6.887.466; y 6.905.681.

Las células inmunitarias modificadas, por ejemplo, los linfocitos T modificados, pueden comprender opcionalmente un "gen suicida" o "interruptor de seguridad" que permite la destrucción de sustancialmente todas las células inmunitarias modificadas cuando se desee. Por ejemplo, los linfocitos T modificados, en determinadas formas de realización, pueden comprender un gen de timidina-cinasa del VHS (HSV-TK), que provoca la muerte de los linfocitos T modificados tras el contacto con ganciclovir. En otra forma de realización, los linfocitos T modificados comprenden una caspasa inducible, por ejemplo, una caspasa 9 inducible (caspasa9i), por ejemplo, una proteína de fusión entre la caspasa9 y la proteína de unión de FK506 humana que permite la dimerización utilizando una molécula farmacéutica específica pequeña. Véase Straathof et al., Blood 105(11):4247-4254 (2005).

En ciertas realizaciones, el Compuesto 1, el Compuesto 2 o el Compuesto 3, como se proporcionan aquí, se administran a pacientes con diversos tipos o estadios de mieloma múltiple en combinación con células T con receptores de antígeno quiméricos (CAR). En determinadas formas de realización, el linfocito T CAR en la combinación se dirige al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), y en formas de realización más específicas, el linfocito T CAR es bb2121 o bb21217. En algunas formas de realización, el linfocito T CAR es JCARH125.

G. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento contienen cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más de los compuestos proporcionados en el presente documento y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos se pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas, tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración por vía oral o en soluciones o suspensiones estériles para administración oftálmica o parenteral, así como preparado de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco. Normalmente, los compuestos descritos anteriormente se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, séptima edición, 1999).

En las composiciones, concentraciones eficaces de uno o más compuestos o sales farmacéuticamente aceptables se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico adecuado. En ciertas realizaciones, las concentraciones de los compuestos en las composiciones son eficaces para la administración de una cantidad, tras la administración, que trata, previene o mejora uno o más de los síntomas y/o la progresión del mieloma múltiple.

Normalmente, las composiciones se formulan para la administración de dosis individuales. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, se suspende, se dispersa o se mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de forma que la afección tratada se alivie o mejore. Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para administración de los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera de dichos vehículos conocidos por los expertos en la técnica por ser adecuados para el modo de administración particular.

Además, los compuestos se pueden formular como el único principio farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros principios activos. Las suspensiones liposómicas, que incluyen liposomas dirigidos a un tejido, tales como liposomas dirigidos a un tumor, también pueden ser adecuadas como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones de liposomas tal como se conoce en la técnica. Brevemente, se pueden formar liposomas, tales como vesículas multilaminares (VML), secando fosfatidil colina de huevo y fosfatidil serina de cerebro (relación molar 7:3) en el interior de un matraz. Se añade una solución de un compuesto proporcionado en el presente documento en solución salina tamponada con fosfato que carece de cationes divalentes (PBS) y el matraz se agita hasta que se disperse la película de lípido. Las vesículas resultantes se lavan para retirar el compuesto no encapsulado, se sedimentan por centrifugación y a continuación se suspenden de nuevo en PBS.

El compuesto activo se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* descritos en el presente documento y después se extrapola de los mismos para las dosis para seres humanos.

La concentración de compuesto activo en la composición farmacéutica dependerá de las tasas de absorción, distribución tisular, inactivación, metabolismo y eliminación del compuesto activo, las características fisicoquímicas del compuesto, el programa de administración y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la cantidad que se suministra es suficiente para mejorar uno o más de los síntomas del cáncer, incluidos los tumores sólidos y tumores de transmisión hemática.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir cualquiera de los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol, dimetilacetamida u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos y fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. Los preparados parenterales se pueden encerrar en ampollas, plumas, jeringas desechables o viales de dosis única o de múltiples dosis fabricados de vidrio, plástico u otro material adecuado.

En casos en los que los compuestos presenten una solubilidad insuficiente, se pueden usar procedimientos de solubilización de compuestos. Tales procedimientos son conocidos por los expertos en esta técnica, e incluyen, pero sin limitación, el uso de codisolventes, tales como sulfoxido de dimetilo (DMSO), el uso de tensioactivos, tales como TWEEN®, o la disolución en bicarbonato sódico acuoso.

Tras la mezcla o adición del o de los compuestos, la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similares. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, que incluyen el modo previsto de administración y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección tratada y se puede determinar empíricamente.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para administración a seres humanos y animales en formas farmacéuticas unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, y soluciones o suspensiones de uso oral, y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y sales de los mismos se formulan y administran en formas farmacéuticas unitarias o formas farmacéuticas múltiples. Las formas farmacéuticas unitarias, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente tal como se conoce en la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo, portador o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas individualmente envasados. Las formas farmacéuticas unitarias se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma farmacéutica múltiple es una pluralidad de formas farmacéuticas unitarias idénticas envasadas en un único recipiente para su administración en una forma farmacéutica unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, una forma farmacéutica múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el envase.

Se pueden preparar formas farmacéuticas o composiciones que contienen principio activo en el intervalo del 0,005% al 100% estando constituido el resto por un portador no tóxico. Para su administración por vía oral, una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable se forma por la incorporación de cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como, por ejemplo calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, derivados de celulosa, croscarmelosa sódica, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio o sacarina sódica. Dichas composiciones incluyen soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación mantenida, tales como, pero sin limitación, implantes y sistemas de administración microencapsulada, y polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como colágeno, etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros. Los procedimientos de preparación de estas composiciones son conocidos por los expertos en la técnica.

Los compuestos activos o las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar con vehículos que protegen el compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación con el tiempo.

Las composiciones pueden incluir otros compuestos activos para obtener combinaciones deseadas de propiedades. Los compuestos proporcionados en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, tal como se describen en el presente documento, también pueden administrarse ventajosamente para fines terapéuticos o profilácticos, junto con otro agente farmacológico conocido en la técnica general por ser de valor en el tratamiento de una o más de las enfermedades o afecciones médicas indicadas anteriormente en el presente documento, tales como enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Debe entenderse que dicha terapia de combinación constituye un aspecto adicional de las composiciones y procedimientos de tratamiento proporcionados en el presente documento.

H. Evaluación de la actividad y propiedades de los compuestos

Están disponibles procedimientos fisiológicos, farmacológicos y bioquímicos convencionales para someter a ensayo los compuestos para identificar aquellos que poseen las propiedades deseadas, que incluyen actividad proliferativa anti-mieloma múltiple y perfil de seguridad adecuado. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos bioquímicos, tales como ensayos de unión, ensayos de incorporación de radiactividad, así como una diversidad de ensayos basados en células.

Los derivados de isoindolinona y sus usos terapéuticos se han descrito, por ejemplo, en: la patente de Estados Unidos Nº 8.518.972. Sorprendentemente, el Compuesto 1, el Compuesto 2 y el Compuesto 3 exhiben propiedades inesperadas y beneficiosas, como se muestra en la sección Ejemplos. Estas propiedades beneficiosas incluyen una potencia significativamente mayor contra el mieloma múltiple, mayores niveles de apoptosis, y una respuesta de combinación más potente y eficaz con dexametasona, y sorprendentemente un perfil de seguridad mejorado, como lo demuestra la actividad funcional reducida en los receptores adrenérgicos $\alpha 1$ y de dopamina D2 (in vitro, así como in vivo), una selectividad mejorada para matar células (como lo demuestra la muerte reducida de células que no son de mieloma) , y una inhibición reducida de CYP3A4.

6. EJEMPLOS

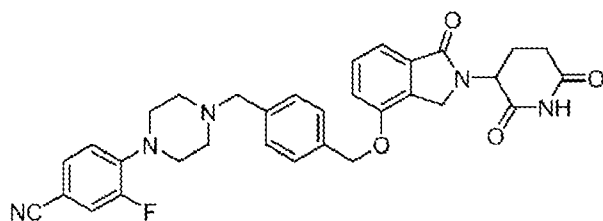
Ciertas realizaciones de la invención se ilustran por los siguientes ejemplos no limitantes.

Abreviaturas:

5	AcN/ACN	Acetonitrilo
	AIBN	
10		Azobisisobutironitrilo
	Boc	
15		<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
	BoczO	
		Dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
20	tBuOK	
		<i>tert</i> -Butóxido de potasio
25	DIEA	
		Diisopropiletilamina
	DMF	
30		N,N'-Dimetilformamida
	DMSO	
35		Dimetilsulfóxido
	EtOAc	
		Acetato de etilo
40	IPA	
		Isopropanol o 2-propanol
45	MeOH	
		Metanol
	MM	
50		Mieloma múltiple
	NBS	
55		N-Bromosuccinimida
	RMN	
		Resonancia magnética nuclear
60	PBMC	
		Célula mononuclear de sangre periférica humana
65	i-ProAc	

Acetato de isopropilo
TBS
5 terc-Butil-dimetilsililo
TBSCl
10 Dimetilsililcloruro de terc-butilo
THF
Tetrahidrofurano
15 TLC
Cromatografía en capa fina
20 TMSCl
Cloruro de trimetilsililo

Ejemplo 1: Síntesis de 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 1).



Ácido 2-amino-5-metoxi-5-oxopentanoico. A una suspensión de ácido 2-aminopentanodioico (250 g, 1,70 moles) en metanol seco (2,5 l) bajo nitrógeno se añadió cloruro de trimetilsililo (277 g, 2,55 moles) durante 30 min. La disolución transparente resultante se agitó a temperatura ambiente (20 °C) durante 30 min. La RMN ¹H mostró que el material de partida se consumió completamente. La mezcla de reacción se usó en la siguiente etapa sin tratamiento adicional. ¹H RMN: 400 MHz CD₃OD δ: 4,17-4,15 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,70-2,60 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 2H).

Ácido 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-5-metoxi-5-oxopentanoico. A la disolución anterior se añadió trietilamina (275 g, 2,72 moles) y dicarbonato de di-terc-butilo (447,35 g, 2,05 moles). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 h. La disolución se concentró hasta sequedad, después se añadió agua (2,5 l) para disolver el residuo. La disolución acuosa resultante se lavó con acetato de etilo (200 ml), después se acidificó a pH = 3 con HCl (1 N), y se extrajo con acetato de etilo (1 l × 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (800 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron para ofrecer ácido 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-5-metoxi-5-oxo-pentanoico (250 g, rendimiento del 56%, dos etapas) como un sólido blanco. ¹H RMN: 400 MHz CD₃OD δ: 4,18-4,11 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,48-2,43 (m, 2H), 2,21-2,15 (m, 1H), 1,95-1,91 (m, 1H), 1,46 (s, 9H).

5-Amino-4-(terc-butoxicarbonilamino)-5-oxo-pentanoato de metilo. A una disolución de ácido 2-((terc-butoxicarbonilamino)-5-metoxi-5-oxo-pentanoico (200 g, 765 mmoles) en 1,4-dioxano (1,5 l) se añadieron dicarbonato de di-terc-butilo (267 g, 1,22 moles) y piridina (121 g, 1,53 moles). Después de que la mezcla de reacción se agitara a 25 °C durante 30 min, se añadió carbonato de amonio (182 g, 2,30 moles) a la mezcla y se agitó durante 16 h adicionales a 25 °C. El disolvente orgánico se retiró por evaporación rotatoria, el residuo se acidificó por HCl (6 M) hasta pH = 3 y luego se extrajo con acetato de etilo (800 ml × 3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (800 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. a presión reducida para ofrecer 5-amino-4-(terc-butoxicarbonil amino)-5-oxo-pentanoato de metilo (180 g, rendimiento del 90 %) como un sólido blanco. ¹H RMN: 400 MHz CDCl₃ δ: 6,51 (s, 1H), 5,94 (s, 1H), 5,43 (s, 1H), 4,21 (s, 1H), 3,63 (s, 3H), 2,59-2,40 (m, 2H), 2,15-2,11 (m, 1H), 1,94-1,90 (m, 1H), 1,42 (s, 9H).

Hidrocloreuro de 4,5-diamino-5-oxo-pentanoato de metilo. Una mezcla de 5-amino-4-(terc-butoxicarbonilamino)-5-oxo-pentanoato de metilo (180 g, 692 mmol) y HCl/acetato de etilo (300 ml, 4 M) se agitó a 25 °C durante 12 h. El sólido precipitado se recogió por filtración a vacío y se lavó con acetato de etilo (500 ml) para dar hidrocloreuro de 4,5-diamino-5-oxo-pentanoato de metilo (130 g, rendimiento del 95 %) como un sólido blanco. ¹H RMN: 400 MHz CD₃OD δ: 4,00-3,96 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 2,59-2,52 (m, 2H), 2,22-2,13 (m, 2H).

3-Hidroxi-2-metil-benzoato de metilo. Se realizaron cuatro lotes (200 g cada uno) en paralelo. A una solución de ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico (200 g, 1,31 mol) en metanol (4,0 l) se añadió ácido sulfúrico concentrado (47,7 g, 486 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 17 h, y se concentró hasta 800 ml. La mezcla resultante se enfrió hasta 20 °C, y se vertió lentamente en agua (400 ml) durante 30 minutos. Se añadió agua (1200 ml) a 20 °C durante 3 h, y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 1 h. El sólido precipitado se recogió mediante filtración a vacío (cuatro lotes combinados), y se lavó tres veces con agua/metanol (1000 ml, 9:1) o hasta que el filtrado tuviera un pH > 3. El sólido se secó a vacío a 45 °C para dar 3-hidroxi-2-metilbenzoato de metilo (700 g, rendimiento del 80,4 %) en forma de un sólido gris. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ δ: 9,70 (s, 1H), 7,18 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 7,09 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,00 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,29 (s, 3H).

3-[terc-Butil(dimetil)silil]oxi-2-metil-benzoato de metilo. Se realizaron dos lotes (240 g cada uno) en paralelo. A una disolución de 3-hidroxi-2-metilbenzoato de metilo (240 g, 1,44 moles) en DMF (1,40 l) se añadieron imidazol (246 g, 3,61 moles) y cloruro de terc-butil-dimetilsililo (238 g, 1,58 moles) a 5 °C. Después de la adición, la mezcla se calentó hasta 20 °C, y se agitó durante 6 h. Se añadió acetato de isopropilo (1700 ml), y entonces se añadió lentamente agua (2000 ml) mientras que la temperatura se mantuvo por debajo de 30 °C. La mezcla resultante se agitó, seguido de separación de la fase orgánica. La fase orgánica combinada (dos lotes combinados) se lavó con agua (1700 ml × 3) y se concentró a ~1500 ml (KF < 0,05 %). El producto se almacenó como una solución de acetato de isopropilo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

2-(Bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo. Se realizaron dos lotes (~375 g cada uno) en paralelo. A la solución en acetato de isopropilo de 3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-2-metil-benzoato de metilo (~375 g, 1,34 mol) se añadieron N-bromosuccinimida (274 g, 1,54 mol) y azobisisobutironitrilo (4,40 g, 26,8 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 70 °C durante al menos 1 h, y se agitó a 70 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 20 °C y se mantuvo a 20 °C durante al menos 1 h. Los dos lotes de sólido (succinimida) se eliminaron por filtración y se lavaron con acetato de isopropilo (700 ml). El filtrado se lavó con solución de sulfito de sodio (700 g) en agua (6000 ml), seguido de agua (1500 ml). La capa orgánica se destiló al vacío a 45 °C hasta sequedad para dar 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo (920 g, rendimiento del 95,5 %) como un aceite naranja oscuro. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ δ: 7,45 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,36 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,13 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 1,02 (s, 9H), 0,29 (s, 6H).

5-Amino-4-[4-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-1-oxoisoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de metilo. A una disolución con agitación de clorhidrato de 4,5-diamino-5-oxo-pentanoato de metilo (74,5 g, 379 mmoles) en acetonitrilo (2,50 l) se añadió 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo (125 g, 348 mmoles). A la suspensión se añadió diisopropiletilamina (89,9 g, 696 mmoles) a través de un embudo de adición durante 10 min y entonces la mezcla se agitó a 60 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (1,0 l), se lavó con HCl (1 N, 1,0 l), bicarbonato sódico (sat., 1,0 l) y salmuera (1,0 L) sucesivamente. La fase orgánica se concentró dando el 5-amino-4-[4-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de metilo en bruto (108 g, bruto) como un sólido amarillo claro. LCMS: m/z 407,3 [M+1]⁺.

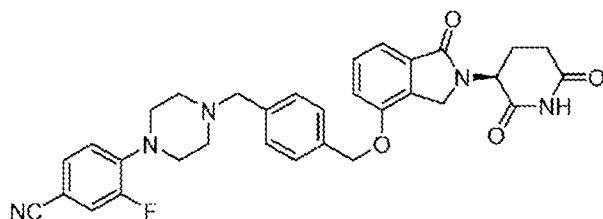
5-Amino-4-(4-hidroxi-1-oxo-isoindolin-2-il)-5-oxo-pentanoato de metilo. A una disolución agitada y fría de 5-amino-4-[4-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de metilo (108 g, 266 mmol) en N,N-dimetilformamida (350 ml) se añadió carbonato de potasio (14,7 g, 106 mmol) en agua (40 ml) en porciones durante 5 min. La mezcla de reacción resultante se agitó a 15 °C durante 15 h. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo, y se añadió lentamente HCl (12 M, 15 ml) a 0-5 °C. Se añadió acetonitrilo (200 ml) a la mezcla, y se formó un precipitado. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y se filtró. La torta de filtración se lavó con acetato de etilo (200 ml × 5) dando el producto (55 g). El filtrado se concentró a alto vacío dando un producto en bruto (100 g) que se disolvió en diclorometano (1,0 l) y se dejó que reposara a 15 °C durante 16 horas. Se formó un sólido blanco que se filtró dando 5 g de producto. Los sólidos se combinaron para dar 5-amino-4-(4-hidroxi-1-oxo-isoindolin-2-il)-5-oxo-pentanoato de metilo (60 g, rendimiento del 77 %) como un sólido blanco. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ δ: 7,58 (s, 1H), 7,31 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,19-7,14 (m, 2H), 7,01 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,75-4,71 (m, 1H), 4,50 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,32 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 3,51 (s, 3H), 2,29-2,18 (m, 3H), 2,09-1,99 (m, 1H).

5-Amino-4-[4-[[4-(bromometil)fenil]metoxi]-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de metilo. Se realizaron dos reacciones (25 g, 85,5 mmoles) en paralelo. Una mezcla de 1,4-bis(bromometil)benceno (67,7 g, 257 mmol), carbonato de potasio (11,8 g, 85,5 mmol) y 5-amino-4-(4-hidroxi-1-oxo-isoindolin-2-il)-5-oxopentanoato de metilo (25 g, 85,5 mmol) en acetonitrilo (1 l) se agitó a 60 °C durante 16 h. Los dos lotes se combinaron, y la mezcla se enfrió hasta 15 °C y se filtró. El filtrado se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluido con 50 % de éter de petróleo en acetato de etilo hasta 100 % de acetato de etilo) para proporcionar 5-amino-4-[4-[[4-(bromometil)fenil]metoxi]-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de metilo (52 g, rendimiento del 63 %) como un sólido blanco. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ δ: 7,59 (s, 1H), 7,50-7,44 (m, 5H), 7,32-7,28 (m, 2H), 7,19 (s, 1H), 5,26 (s, 2H), 4,79-4,71 (m, 3H), 4,55 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,43 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 3,52 (s, 3H), 2,30-2,19 (m, 3H), 2,10-2,08 (m, 1H).

3-[4-[[4-(bromometil)fenil]metoxi]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona. Se realizaron dos reacciones (28,5 g, 60,0 mmoles) en paralelo. Se disolvió 5-amino-4-[4-[[4-(bromometil)fenil]metoxi]-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxopentanoato de metilo (28,5 g, 60,0 mmoles) en tetrahidrofurano (720 ml) y la disolución se enfrió en baño de nieve carbónica/acetona hasta -70 °C. Mientras se agitaba, se añadió terc-butoxido de potasio (7,4 g, 66,0 mmoles) en una porción a la disolución transparente. La mezcla de reacción viró a amarillo pálido y la agitación continuó durante 2 h adicionales a -70 °C. Se transfirió rápidamente una disolución enfriada de HCl (1 N, 260 ml) a la mezcla de reacción mientras se mantenía la temperatura a -70 °C. La mezcla viró inmediatamente a blanco lechoso y se retiró el baño de nieve carbónica/acetona. La mezcla se concentró para retirar la mayoría del tetrahidrofurano. Tras la concentración de la mezcla de reacción, se formó un precipitado blanco. La suspensión blanca se diluyó con agua (500 ml) y luego se filtró. La torta de filtración se lavó con agua (500 ml) y se secó en estufa de vacío a 40 °C durante 12 h, luego se lavó con acetato de etilo (500 ml). Los lotes se combinaron para dar 3-[4-[[4-(bromometil)fenil]metoxi]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (49,85 g, 93 %) como un sólido amarillo claro. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ δ: 10,95 (s, 1H), 7,51-7,41 (m, 5H), 7,35-7,28 (m, 2H), 5,23 (s, 2H), 5,12-5,07 (m, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,41 (d, J= 17,6 Hz, 1H), 4,25 (d, J= 17,6 Hz, 1H), 2,90-2,84 (m, 1H), 2,58-2,53 (m, 1H), 2,44-2,41 (m, 1H), 1,98-1,95 (m, 1H).

4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo. Se colocó 3-(4-(4-(bromometil)bencil)oxi)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona (5,0 g, 11,28 mmol) en un matraz con 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo (2,315 g, 11,28 mmol), diisopropiletilamina (5,91 ml, 33,8 mmol) y acetonitrilo (100 ml). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 18 h. Los orgánicos volátiles se eliminaron a presión reducida, y la purificación por métodos convencionales proporcionó 4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,97 (s, 1H), 7,68 (dd, J=1,96, 13,45 Hz, 1H), 7,56 (dd, J=1,77, 8,38 Hz, 1H), 7,43-7,52 (m, 3H), 7,30-7,38 (m, 4H), 7,11 (t, J=8,80 Hz, 1H), 5,24 (s, 2H), 5,11 (dd, J=5,14, 13,33 Hz, 1H), 4,37-4,46 (m, 1H), 4,22-4,30 (m, 1H), 3,54 (s, 2H), 3,12-3,23 (m, 4H), 2,84-2,98 (m, 1H), 2,52-2,62 (m, 5H), 2,36-2,48 (m, 1H), 1,92-2,04 (m, 1H). MS (ESI) m/z 568,2 [M+1]⁺. Anal. Calculado para C₃₂H₃₀FN₅O₄: C, 67,71; H, 5,33; N, 12,34. observado: C, 67,50; H, 5,44; N 12,34.

Ejemplo 2: Síntesis de (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 2)



(4S)-5-Amino-4-(benciloxicarbonilamino)-5-oxopentanoato de terc-butilo. A una solución de ácido (2S)-2-(benciloxicarbonilamino)-5-terc-butoxi-5-oxo-pentanoico (150 g, 445 mmol) en 1,4-dioxano (1,50 l) se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (155 g, 711 mmol), piridina (70,3 g, 889 mmol) y bicarbonato de amonio (105 g, 1,33 mol). La mezcla de reacción se agitó a 18 °C durante 16 h, y después se concentró. El residuo se disolvió en acetato de etilo (5,0 l) y agua (5,0 l), la capa orgánica se separó y se lavó con HCl (3,0 ml, 1 N), bicarbonato de sodio saturado (3,0 l), salmuera (3,0 l), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se concentró para dar (4S)-5-amino-4-(benciloxicarbonilamino)-5-oxopentanoato de terc-butilo bruto (450 g, bruto) como un sólido blanco, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H RMN 400 MHz DMSO-d₆ δ: 7,35-7,30 (m, 5H), 7,02 (s, 1H), 5,01 (d, J= 3,2 Hz, 1H), 3,93-3,90 (m, 1H), 2,20 (t, J= 8,0 Hz, 2H), 1,88-1,84 (m, 1H), 1,72-1,69 (m, 1H), 1,35 (s, 9H).

(4S)-4,5-Diamino-5-oxopentanoato de terc-butilo. A una disolución de (4S)-5-amino-4-(benciloxicarbonilamino)-5-oxo-pentanoato de terc-butilo (112 g, 333 mmol) en metanol (1,0 l) se añadió paladio sobre carbono al 10% (15 g) en atmósfera de nitrógeno. La suspensión se desgasificó a vacío y se purgó con hidrógeno varias veces. La mezcla se agitó bajo gas hidrógeno (40 psi) a 30 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró para dar (4S)-4,5-diamino-5-oxo-pentanoato de terc-butilo bruto como un aceite incoloro. ¹H RMN 400 MHz DMSO-d₆ δ: 7,30 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 3,10-3,07 (m, 1H), 2,27-2,23 (m, 2H), 1,69-1,78 (m, 1H), 1,59-1,55 (m, 1H), 1,38 (s, 9H).

3-Hidroxi-2-metil-benzoato de metilo. Se realizaron cuatro lotes (200 g cada uno) en paralelo. A una solución de ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico (200 g, 1,31 mol) en metanol (4,0 l) se añadió ácido sulfúrico concentrado (47,7 g, 486 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 17 h. La mezcla de reacción se concentró hasta 800 ml. La mezcla resultante se enfrió hasta 20 °C, y se vertió lentamente en agua (400 ml) durante 30 minutos. Se añadió agua (1200 ml) a 20 °C durante 3 h, y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 1 h. El sólido precipitado se recogió por filtración a vacío (se combinaron cuatro lotes), y se lavó tres veces con agua/metanol (1000 ml, 9:1) o hasta que el filtrado tenía un pH > 3. El sólido se secó a vacío a 45 °C para dar 3-hidroxi-2-metil-benzoato de

metilo (700 g, rendimiento del 80,4 %) como un sólido gris. ^1H RMN: 400 MHz DMSO- d_6 δ : 9,70 (s, 1H), 7,18 (t, J =6,8 Hz, 1H), 7,09 (t, J =7,6 Hz, 1H), 7,00 (t, J =6,8 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,29 (s, 3H).

3-[terc-Butil(dimetil)silil]oxi-2-metil-benzoato de metilo. Se realizaron dos lotes (240 g cada uno) en paralelo. A una disolución de 3-hidroxi-2-metilbenzoato de metilo (240 g, 1,44 moles) en N,N-dimetilformamida (1,40 l) se añadieron imidazol (246 g, 3,61 moles) y cloruro de terc-butil-dimetilsililo (238 g, 1,58 moles) a 5 °C. Después de la adición, la mezcla se calentó hasta 20 °C y se agitó durante 6 h. Se añadió acetato de isopropilo (1700 ml), y entonces se añadió lentamente agua (2000 ml) mientras que la temperatura se mantuvo por debajo de 30 °C. La mezcla resultante se agitó, seguido de separación de la fase orgánica. Los extractos orgánicos combinados (dos lotes combinados) se lavaron con agua (1700 ml \times 3) y se concentraron hasta -1500 ml (KF<0,05%). El producto se almacenó como una solución de acetato de isopropilo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

2-(Bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo. Se realizaron dos lotes (~375 g cada uno) en paralelo. A la solución en acetato de isopropilo de 3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-2-metil-benzoato de metilo (-375 g, 1,34 mol) se añadieron N-bromosuccinimida (274 g, 1,54 mol) y azobisisobutironitrilo (4,40 g, 26,8 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 70 °C durante al menos 1 h, y se agitó a 70 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 20 °C, y se mantuvo a 20 °C durante al menos 1 h. Los dos lotes de sólido (succinimida) se eliminaron por filtración y se lavaron con acetato de isopropilo (700 ml). El filtrado se lavó con solución de sulfito de sodio (700 g) en agua (6000 ml), seguido de agua (1500 ml). La capa orgánica se destiló al vacío a 45 °C hasta sequedad para dar 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo (920 g, 95,5% de rendimiento) como un aceite naranja oscuro. ^1H RMN: 400 MHz DMSO- d_6 δ : 7,45 (d, J =6,8 Hz, 1H), 7,36 (t, J =8,0 Hz, 1H), 7,13 (t, J =7,2 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 1,02 (s, 9H), 0,29 (s, 6H).

(4S)-5-Amino-4-[4-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de terc-butilo. A una disolución de (4S)-4,5-diamino-5-oxopentanoato de terc-butilo (130 g, 643 mmoles) en acetonitrilo (4,0 L) se añadió 2-(bromometil)-3-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-benzoato de metilo (210 g, 584 mmoles) y diisopropiletilamina (113 g, 877 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró para eliminar la mayor parte del acetonitrilo, el residuo se disolvió en metil terc-butil éter (2,0 l) y agua (1,5 l), la capa orgánica se lavó con fosfato monopotásico saturado (1,0 l \times 2), salmuera (1,0 l), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se concentró para dar (4S)-5-amino-4-[4-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de terc-butilo bruto (524 g), que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(4S)-5-Amino-4-(4-hidroxi-1-oxo-isoindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo. A una solución de (4S)-5-amino-4-[4-[terc-butil(dimetil)silil]oxi-1-oxo-isoindolin-2-il]-5-oxo-pentanoato de terc-butilo (275 g, 613 mmol) en metanol (2,0 l) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio trihidratado (38,7 g, 123 mmol). La mezcla se agitó a 18 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró para eliminar la mayor parte del metanol, el residuo se disolvió en diclorometano/agua (3 l/2 l), la capa orgánica se separó y se lavó con salmuera (1,0 l), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se concentró para dar el producto bruto, que se purificó mediante una columna de gel de sílice para dar el producto (260 g). El producto se añadió a acetonitrilo (750 ml), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 2 h, se enfrió hasta 18 °C, y se agitó durante otras 2 h. El sólido se filtró, y la torta se secó para dar (4S)-5-amino-4-(4-hidroxi-1-oxo-isoindolin-2-il)-5-oxo-pentanoato de terc-butilo (248 g, rendimiento del 60,5 %) como un sólido gris. ^1H RMN 400 MHz DMSO- d_6 δ : 10,00 (s, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,29 (t, J =7,6 Hz, 1H), 7,14 (d, J =4,8 Hz, 2H), 4,72-4,68 (m, 1H), 4,49-4,28 (m, 2H), 2,17-1,97 (m, 4H), 1,31 (s, 9H).

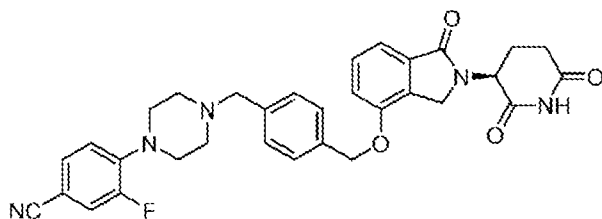
4-(4-(4-(Clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo. Se dispuso 1,4-bis(clorometil)benceno (51,2 g, 292 mmol) en un matraz con acetonitrilo (195 ml) y N,N-dimetilformamida (195 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron todos los sólidos. Después, se añadió diisopropilamina (51,1 ml, 292 mmol) junto con 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo (20 g, 97 mmol). La reacción se calentó hasta 60 °C durante 1 h. El acetonitrilo se retiró a presión reducida. La mezcla restante se repartió entre acetato de etilo (1,0 l), agua (700 ml) y salmuera (300 ml). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo dos veces. Se combinaron los extractos orgánicos volátiles y se retiraron a presión reducida. El sólido se disolvió en diclorometano mínimo y se purificó sobre columna de gel de sílice (0-100% de acetato de etilo en hexanos en 3 l). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y los extractos orgánicos volátiles se retiraron a presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano mínimo y se purificó una segunda vez sobre columna de gel de sílice (10% de acetato de etilo isocrático en hexanos en 800 ml, seguido de 20-80% de acetato de etilo en hexanos en 4 l). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se eliminaron a presión reducida para obtener 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (22,7 g, 66,0 mmol, rendimiento del 67,7 %) como un sólido blanquecino. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,33 - 7,39 (m, 5 H) 7,29 (d, J =1,96 Hz, 1 H) 7,25 (d, J =1,96 Hz, 1 H) 6,91 (t, J =8,56 Hz, 1 H) 4,60 (s, 2 H) 3,58 (s, 2 H) 3,19 - 3,27 (m, 4 H) 2,58 - 2,66 (m, 4 H). MS (ESI) m/z 344,2 $[M+1]^+$.

(S)-5-Amino-4-(4-(4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)benciloxi)-1-oxoisoindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo Se dispuso (S)-5-amino-4-(4-hidroxi-1-oxoisoindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo (22,05 g, 65,9 mmol) en un matraz con 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (22,67 g, 65,9 mmol), carbonato de potasio (18,23 g, 132 mmol) y N,N-dimetilformamida (330 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 45 °C durante 16 h. La reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se filtró. El filtrado se repartió

con acetato de etilo (900 ml) y agua (600 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se aisló y se lavó con agua (600 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y las sustancias volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo se trató con acetato de etilo al 20% en hexanos y las sustancias volátiles se retiraron a presión reducida proporcionando (S)-5-amino-4-(4-((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo (44,02 g, 68,6 mmol, 104% de rendimiento) como un sólido blanquecino. El rendimiento fue ligeramente superior al cuantitativo a medida que quedaba algo de DMF. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,43 - 7,49 (m, 2 H) 7,40 (s, 4 H) 7,36 (dd, J=8,38, 1,28 Hz, 1 H) 7,29 (d, J=1,96 Hz, 1 H) 7,26 (d, J=1,83 Hz, 1 H) 7,11 (dd, J=7,64, 1,16 Hz, 1 H) 6,92 (t, J=8,50 Hz, 1 H) 6,23 (s, 1 H) 5,24 - 5,32 (m, 1 H) 5,15 (s, 2 H) 4,86 - 4,94 (m, 1 H) 4,38 - 4,55 (m, 2 H) 3,61 (s, 2 H) 3,18 - 3,32 (m, 4 H) 2,58 - 2,70 (m, 4 H) 2,09 - 2,47 (m, 4 H) 1,43 (s, 8 H). MS (ESI) m/z 642,4 [M+1]⁺.

(S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo. Se dispuso (S)-5-amino-4-(4-((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo (12,1 g, 18,86 mmol) en un vial con acetonitrilo (189 ml) y ácido benenosulfónico (3,96 g, 24,51 mmol). La mezcla de reacción se dispuso al vacío y se purgó con nitrógeno. Esto se repitió una vez más y la mezcla se calentó después hasta 85 °C durante la noche en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción caliente se vertió directamente en 2 embudos de decantación que contenían diclorometano (1000 ml) y acetato de etilo (300 ml). A esta mezcla se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (900 ml), agua (100 ml) y salmuera (450 ml). La fase orgánica se aisló y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (800 ml) y acetato de etilo (200 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron. La purificación por métodos estándar proporcionó el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10,96 (s, 1 H) 7,68 (dd, J=13,45, 1,83 Hz, 1 H) 7,56 (dd, J=8,44, 1,83 Hz, 1 H) 7,43 - 7,52 (m, 3 H) 7,29 - 7,39 (m, 4 H) 7,11 (t, J=8,80 Hz, 1 H) 5,24 (s, 2 H) 5,11 (dd, J=13,20, 5,14 Hz, 1 H) 4,22 - 4,46 (m, 2 H) 3,54 (s, 2 H) 3,12 - 3,22 (m, 4 H) 2,85 - 2,97 (m, 1 H) 2,53 - 2,62 (m, 2 H) 2,38 - 2,48 (m, 2 H) 1,93 - 2,03 (m, 1 H). MS (ESI) m/z 568,2 [M+1]⁺.

Ejemplo 3: Síntesis de (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 2)



Hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo. A una disolución de 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo (100 g) en tolueno (1400 ml) se cargó ácido acético (28 ml) a 25 °C, y la mezcla de reacción se mantuvo durante 30 min. Se cargó 4-(clorometil)benzaldehído (79 g) a 25 °C, y la mezcla se mantuvo durante 2 h. Se cargó triacetoxiborohidruro de sodio (52 g cada uno) a 25 °C cada 30 min tres veces. La mezcla se agitó a 25 °C durante alrededor de 10 h. Se cargó agua (600 ml) durante 1 hora mientras se mantenía la temperatura del lote por debajo de 30 °C. Se separó la mayor parte de la capa inferior. La mezcla se filtró, y la capa inferior se separó. La capa orgánica se lavó con agua (200 ml). A la capa orgánica se cargó IPA (75 ml), HCl 5-6 N en IPA (8 ml), y luego una suspensión de semillas de hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (2 g) en tolueno (20 ml). A la mezcla se cargó HCl 5-6 N en IPA (115 ml) a 25 °C durante 2 h. La mezcla se mantuvo durante alrededor de 10 h, y después se filtró para dar un sólido bruto. El sólido se lavó con tolueno (400 ml) y se secó en un horno de vacío para dar hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo como un sólido amarillo pálido (152 g, rendimiento del 82 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 11,82 (s, 1H), 7,50-7,79 (m, 6H), 7,18-7,24 (m, 1H), 4,80 (s, 2H), 4,38-4,39 (m, 2H), 3,44-3,70 (m, 2H), 3,14-3,44 (m, 6H).

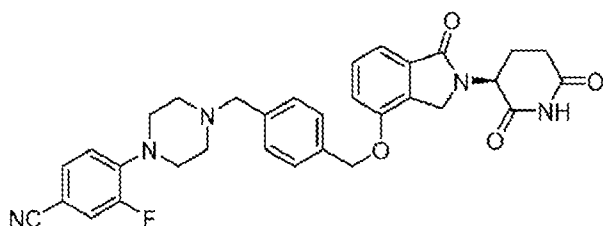
Tartrato de (S)-5-amino-4-(4-((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo. A una mezcla de hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (100 g) y (S)-5-amino-4-(4-hidroxi-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo (97 g) en DMF (600 ml) se cargó carbonato de potasio (K₂CO₃) (75 g) a 35 °C, y la mezcla de reacción se mantuvo durante 24 h. A la mezcla se cargó trietilamina (11 ml), y la mezcla se agitó a 45 °C durante alrededor de 2 h. A la mezcla se cargó EtOAc (1 l), y disolución acuosa de carbonato de potasio (5 %, 500 ml). La capa orgánica se lavó con disolución acuosa de cloruro de sodio (5%, 500 ml). A la mezcla se cargó Ecosorb C948 E-pak (30 g), y se dejó reposar durante 2 h. La mezcla se filtró. A la mezcla se cargó una disolución de ácido L-tartárico (47 g) en metanol (850 ml) a 45 °C, y la mezcla se mantuvo durante 2 h. La mezcla se enfrió hasta 25 °C. Los sólidos se filtraron para dar la sal de tartrato de (S)-5-amino-4-(4-((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de terc-butilo. (145 g, rendimiento del 70 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,31 (s, 9H), 1,87 - 2,27 (m, 4H), 2,55 (s, 4H), 3,18 (s, 4H), 4,29 (s, 2H), 4,36 - 4,62 (m, 2H), 4,71 (dd, J =

4,2, 10,0 Hz, 1H), 5,22 (s, 2H), 7,10 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 7,18 (s, 1H), 7,29 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,33 - 7,40 (m, 2H), 7,40 - 7,51 (m, 3H), 7,51 - 7,63 (m, 2H).

(S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo.

La disolución de la sal tartrato de (S)-5-amino-4-(4-(((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de *tert*-butilo (100 g) en 2-metiltetrahidrofurano (1 l) se lavó con disolución acuosa de carbonato de potasio (10 %, 85 ml). La capa inferior se separó. El disolvente 2-metiltetrahidrofurano se cambió por acetonitrilo para dar una disolución. A la disolución se añadió ácido bencenosulfónico (60 g) en acetonitrilo (200 ml) a 70 °C durante 2 h. La purificación por métodos estándar proporcionó el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,96 (s, 1 H) 7,68 (dd, J=13,45, 1,83 Hz, 1 H) 7,56 (dd, J=8,44, 1,83 Hz, 1 H) 7,43 - 7,52 (m, 3 H) 7,29 - 7,39 (m, 4 H) 7,11 (t, J=8,80 Hz, 1 H) 5,24 (s, 2 H) 5,11 (dd, J=13,20, 5,14 Hz, 1 H) 4,22 - 4,46 (m, 2 H) 3,54 (s, 2 H) 3,12 - 3,22 (m, 4 H) 2,85 - 2,97 (m, 1 H) 2,53 - 2,62 (m, 2 H) 2,38 - 2,48 (m, 2 H) 1,93 - 2,03 (m, 1 H). MS (ESI) m/z 568,2 [M+1]⁺.

Ejemplo 4: Síntesis de (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (Compuesto 2)



Hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo. A una disolución de 3-fluoro-4-(piperazin-1-il)benzonitrilo (100 g) en tolueno (1400 ml) se cargó ácido acético (28 ml) a 25 °C, y la mezcla se mantuvo durante 30 min. Se cargó 4-(clorometil)benzaldehído (79 g) a 25 °C, y la mezcla se mantuvo durante 2 h. Se cargó triacetoxiborohidruro de sodio (52 g cada uno) a 25 °C cada 30 min tres veces. La mezcla se agitó a 25 °C durante alrededor de 10 h. Se cargó agua (600 ml) durante 1 hora mientras se mantenía la temperatura del lote por debajo de 30 °C. Se separó la mayor parte de la capa inferior. La mezcla se filtró, y la capa inferior se separó. La capa orgánica se lavó con agua (200 ml). A la capa orgánica se cargó IPA (75 ml), HCl 5-6 N en IPA (8 ml), y después una suspensión de semillas de hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (2 g) en tolueno (20 ml). A la mezcla se cargó HCl 5-6 N en IPA (115 ml) a 25 °C durante 2 h. La mezcla se mantuvo durante alrededor de 10 h, y después se filtró para dar un sólido bruto. El sólido se lavó con tolueno (400 ml), y se secó en un horno de vacío para dar hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo como un sólido amarillo pálido (152 g, rendimiento del 82 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11,82 (s, 1H), 7,50-7,79 (m, 6H), 7,18-7,24 (m, 1H), 4,80 (s, 2H), 4,38-4,39 (m, 2H), 3,44-3,70 (m, 2H), 3,14-3,44 (m, 6H).

(S)-5-amino-4-(4-(((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de *tert*-butilo.

A una mezcla de hidrocloreto de 4-(4-(4-(clorometil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo (100 g) y (S)-5-amino-4-(4-hidroxi-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de *tert*-butilo (88 g) en dimetilsulfóxido (DMSO) (700 ml) se cargó carbonato de potasio (K₂CO₃) (73 g) a 35 °C, y la mezcla se mantuvo durante 24 h. A la mezcla se cargó EtOAc (1,2 l) y agua (1,1 l). La capa orgánica se lavó con disolución acuosa de cloruro de sodio (5 %, 1 l). A la mezcla se cargó n-heptano (200 ml). La mezcla se lavó con ácido acético acuoso (3 %, 1 l), agua (1 l), disolución acuosa de K₃PO₄ (20 %, 10 l), y agua (10 l). El disolvente se destiló hasta alrededor de 1,2 l. La mezcla se cristalizó con n-heptano para dar (S)-5-amino-4-(4-(((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de *tert*-butilo (143 g, rendimiento del 85 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,43 - 7,49 (m, 2 H) 7,40 (s, 4 H) 7,36 (dd, J=8,38, 1,28 Hz, 1 H) 7,29 (d, J=1,96 Hz, 1 H) 7,26 (d, J=1,83 Hz, 1 H) 7,11 (dd, J=7,64, 1,16 Hz, 1 H) 6,92 (t, J=8,50 Hz, 1 H) 6,23 (s, 1 H) 5,24 - 5,32 (m, 1 H) 5,15 (s, 2 H) 4,86 - 4,94 (m, 1 H) 4,38 - 4,55 (m, 2 H) 3,61 (s, 2 H) 3,18 - 3,32 (m, 4 H) 2,58 - 2,70 (m, 4 H) 2,09 - 2,47 (m, 4 H) 1,43 (s, 8 H).

(S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-3-fluorobenzonitrilo.

La disolución de (S)-5-amino-4-(4-(((4-(4-ciano-2-fluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)-5-oxopentanoato de *tert*-butilo (100 g) en acetonitrilo (1 l) se mantuvo a 70 °C. A la disolución se añadió ácido bencenosulfónico (74 g) en acetonitrilo (200 ml) a 70 °C durante 2 h. La purificación por métodos estándar proporcionó el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,96 (s, 1 H) 7,68 (dd, J=13,45, 1,83 Hz, 1 H) 7,56 (dd, J=8,44, 1,83 Hz, 1 H) 7,43 - 7,52 (m, 3 H) 7,29 - 7,39 (m, 4 H) 7,11 (t, J=8,80 Hz, 1 H) 5,24 (s, 2 H) 5,11 (dd, J=13,20, 5,14 Hz, 1 H) 4,22 - 4,46 (m, 2 H) 3,54 (s, 2 H) 3,12 - 3,22 (m, 4 H) 2,85 - 2,97 (m, 1 H) 2,53 - 2,62 (m, 2 H) 2,38 - 2,48 (m, 2 H) 1,93 - 2,03 (m, 1 H). MS (ESI) m/z 568,2 [M+1]⁺.

Ejemplo 5: 4-(4-(4-(((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)bencil)piperazin-1-il)-2,2,3,3,5,5,6,6-d8)-3-fluorobenzonitrilo

4-(4-(4-(((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolin-4-il)oxi)metil)encil)piperazin-1-il-2,2,3,3,5,5,6,6-d8)-3-fluorobenzonitrilo. A una disolución de 3-[4-[[4-(bromometil)fenil]metoxi]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidin-2,6-diona (736 mg, 1,66 mmol) y 3-fluoro-4-(piperazin-1-il-2,2,3,3,5,5,6,6-d⁸)benzonitrilo (425 mg, 1,99 mmol) en DMF seco (5,0 ml) se añadió DIEA (0,870 ml, 4,99 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtró (membrana de nailon de 0,45 µm), y la disolución se purificó mediante métodos estándar para dar el producto del título (532 mg, 56 %). LCMS (ESI) *m/z* 576,4 [M+H]⁺.

Materiales de cultivo celular: Las líneas celulares de mieloma múltiple humanas se adquirieron de los proveedores, y se cultivaron a 37 °C con 5 % de CO₂ en el medio como se indica en la Tabla 1. Las líneas celulares resistentes a lenalidomida y pomalidomida se obtuvieron mediante procedimientos tales como los descritos anteriormente de manera general (López-Girona et al *Leukemia* 2012; 26(11): 2335). Todas las líneas celulares se mantuvieron en fase logarítmica, y se supervisaron la densidad y la viabilidad celulares mediante exclusión con azul de tripano usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR (Beckman Coulter, Brea, CA).

Línea celular MM	Proveedor/Fuente	Número catálogo	de	Condiciones cultivo	de
NCI-H929	ATCC (Manassas, VA)	CRL-9068		RPMI-1640, FBS al 10%	
NCI-H929-1051	- desarrollado internamente, producido resistente a lenalidomida	NA		RPMI-1640, FBS al 10%	
OPM2	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-50		RPMI-1640, FBS al 10%	
OPM2-P10	- desarrollado internamente, producido resistente a lenalidomida 10 μ M	NA		RPMI-1640, FBS al 10%	

Ensayos de apoptosis celular: Se evaluó la capacidad de los compuestos para inducir apoptosis en líneas celulares de MM seleccionadas, en los puntos de tiempo y concentraciones de compuestos indicados. Como

marcador de apoptosis, se midió el nivel de actividad de la caspasa-3 en células de MM usando formación de imágenes de células vivas. Para obtener imágenes de células en suspensión, placas de 96 pocillos se recubrieron con fibronectina para que las células se adhirieran y quedaran planas en el fondo de la placa. Las células se añadieron a placas de 96 pocillos usando un dispensador de reactivos Multidrop Combi (Thermo Scientific, Waltham, MA) la noche anterior a la adición del compuesto. Los compuestos se colocaron sobre las células en el pocillo correspondiente de una placa de 96 pocillos usando un dispensador digital Hewlett-Packard D300 (Tecan, Männedorf, Suiza). Las líneas de células de MM se trataron con el compuesto, y a las 6 h se cambió el medio para imitar el recambio del compuesto in vivo, lo que dio como resultado una dilución de alrededor de 20 veces la concentración del compuesto. Las células se cultivaron en presencia del sustrato enzimático de caspasa-3 NucView 488 (Biotium), y se incubaron en un sistema de análisis de células vivas IncuCyte ZOOM (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI) alojado en una incubadora estándar. La escisión del sustrato de la enzima Caspasa-3 y la confluencia celular en cada pocillo se detectaron mediante imágenes a 10x en el sistema IncuCyte ZOOM cada 4-6 h durante 5 días. Cada pocillo/condición se ensayó por replicado en la misma placa, y cada condición fue el promedio de 4 imágenes de 10x capturadas en cada punto de tiempo.

Resultados. El Compuesto 1 y el Compuesto 2 demuestran actividad antiproliferativa frente a líneas celulares MM Las líneas celulares MM seleccionadas para este estudio eran líneas sensibles y resistentes a lenalidomida y/o pomalidomida (tabla 1), dos agentes usados clínicamente para tratar pacientes con mieloma. La proliferación se evaluó usando el ensayo CellTiter-Glo®. Los resultados para los cultivos incubados con los compuestos se normalizaron con respecto a los resultados para los cultivos de control para cada línea celular. La CI_{50} para la inhibición del crecimiento celular por los compuestos se determinó para cada línea celular usando el software ActivityBase. El Compuesto 1 y el Compuesto 2 inhibieron de forma potente la proliferación celular en las cuatro líneas celulares, como se determinó mediante la evaluación cuantitativa de los niveles de ATP presentes en el medio después de 120 h. Los valores de CI_{50} antiproliferativos del Compuesto 1 y el Compuesto 2 oscilaron entre 0,07 nM y 19 nM (Tabla 2). El Compuesto 1 y el Compuesto 2 mostraron una actividad antiproliferativa de mieloma múltiple muy potente incluso en líneas celulares que eran resistentes a lenalidomida y/o pomalidomida.

Tabla 2: Inhibición del crecimiento celular por el compuesto 1 y el compuesto 2 en líneas celulares MM en cultivo líquido

Compuesto N.º	NCI-H929 120 h CI_{50}	NCI-H929.1051 120 h CI_{50}	OPM-2 120 h CI_{50}	OPM-2.P10 120 h CI_{50}
1	<0,5 nM	2,5 nM	<0,5 nM	19 nM
2	0,07 nM	1,0 nM	0,07 nM	4,3 nM

El compuesto 1 indujo apoptosis en líneas celulares de mieloma múltiple. Se investigaron los efectos de los compuestos sobre la apoptosis en líneas celulares de MM. Para determinar la capacidad de los compuestos para inducir apoptosis y caracterizar cinéticamente el inicio de este proceso, se midió la inducción de caspasa-3 a lo largo del tiempo en células H929-1051 resistentes a lenalidomida (Figura 1). Las células H929-1051 se incubaron con los compuestos a concentraciones de 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM, y se evaluó la apoptosis a lo largo del tiempo. Los resultados mostraron que, para las células H929-1051, todas las concentraciones del Compuesto 1 indujeron apoptosis, comenzando a alrededor de las 48 h y alcanzando una inducción casi máxima a ~72 h de incubación. A continuación, se calculó el área bajo la curva (AUC) para cada concentración, y se usó para generar las curvas de concentración-respuesta para cada compuesto. Esto proporcionó pruebas cuantitativas de la capacidad del Compuesto 1 para inducir apoptosis en H929-1051. Sorprendentemente, la inducción de apoptosis por el Compuesto 1 fue significativamente mayor que la inducción de apoptosis observada para el compuesto informado previamente 3-(4-((4-((4-(2,4-difluorofenil)piperazin-1-il)metil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidin-2,6-diona (Ejemplo 5.285 en la patente de EE. UU. n.º 8.518.972) (Compuesto A). Como se muestra en la Fig. 1B, la inducción apoptótica (medida por el AUC total) por el Compuesto 1 aumentó casi un 30 % (126 %) en comparación con la inducción apoptótica por el Compuesto A.

Combinación con Dexametasona. Se evaluó la actividad de la pomalidomida con la del Compuesto 2, solos o en combinación con dexametasona, en un panel de líneas celulares de MM. La Figura 2 es un conjunto representativo de curvas de respuesta frente a la dosis en la línea celular H929-1051 resistente a lenalidomida, que demuestra que el agente único Compuesto 2 es 10 veces más potente que una combinación de pomalidomida-dexametasona y casi tan eficaz (Figura 2, panel A). Sorprendentemente, cuando el Compuesto 2 se combina con dexametasona, no sólo crea una respuesta más potente, sino que también mejora drásticamente la eficacia (Figura 2, panel B); se logra una muerte celular casi completa. La Tabla 3 resume la potencia (CI_{50}) de los estudios de agente único y combinación con dexametasona realizados en la línea celular H929-1051. Se enumeran los valores IC_{50} s de pomalidomida o del Compuesto 2 como agentes únicos, y la combinación de 1, 0,1 o 0,01 μ M de dexametasona (Dex) en células resistentes a lenalidomida (H929-1051). Cada CI_{50} es el promedio de al menos 3 experimentos independientes. La proliferación se monitorizó el día 5 usando Cell Titer-Glo. De manera consistente, el Compuesto 2 en combinación con dexametasona fue drásticamente más activo que la pomalidomida en combinación con dexametasona, y esta mayor actividad se logró a concentraciones de dexametasona 10-100 veces más bajas. En conjunto, estos datos indican el potencial para una mayor seguridad del tratamiento combinado del Compuesto 2

y dexametasona, al permitir el uso de dosis más bajas de dexametasona manteniendo al mismo tiempo la eficacia y la sinergia.

Tabla 3: Comparación de los valores de Cl_{50} antiproliferativos del Compuesto 2 y la pomalidomida como agentes únicos o en combinación con dexametasona en la línea celular H929-1051 resistente a lenalidomida

	Agente único μM	Cl_{50}	Combinación con dexametasona 1 μM Cl_{50}	Combinación con dexametasona 0,1 μM Cl_{50}	Combinación con dexametasona 0,01 μM Cl_{50}
Pomalidomida	>10 μM		0,01884 μM	0,11824 μM	3,837 μM
Compuesto 2	0,00098 μM		0,000018 μM	0,0000429 μM	0,00041 μM

Evaluación de seguridad *in vitro* según lo evaluado por la selectividad antiproliferativa sobre células normales. Para demostrar que el Compuesto 2 no es generalmente citotóxico, se realizó una prueba de contraexamen frente a la línea celular derivada de hepatocitos humanos inmortalizada (pero no tumorigénica) THLE-2 (Pfeifer et al, Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(11):5123-7) y frente a PBMC humanas primarias y sanas (Figura 3). El Compuesto 2 tuvo poco efecto antiproliferativo sobre las células THLE-2 ($Cl_{50} > 10 \mu M$) o en las PBMC humanas primarias no estimuladas ($Cl_{50} > 10 \mu M$) en comparación con las líneas celulares de MM mostradas anteriormente.

Actividad antitumoral del Compuesto 2 en un modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple resistente a lenalidomida. El propósito del estudio fue probar la actividad antitumoral del agente único del Compuesto 2 en un modelo de xenoinjerto H929-1051 con una dosis diaria (QD) de 1, 3, 10 y 30 mg/kg. Se observó una actividad antitumoral significativa ($p < 0,0001$) en todos los niveles de dosis, con una reducción del volumen tumoral del 75 %, 86 %, 84 % y 85 % a 1, 3, 10 y 30 mg/kg, respectivamente (Figura 4).

Conclusión: tomados en conjunto, estos datos muestran que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 muestran una actividad antimieloma múltiple muy potente, y sorprendentemente muestran niveles significativamente mayores de apoptosis en comparación con los compuestos informados previamente, el Compuesto A y la pomalidomida. Además, el Compuesto 2, combinado con dexametasona, no sólo crea una respuesta más potente, sino que la eficacia también mejora drásticamente. Además, se demostró la muerte selectiva de células del mieloma múltiple en comparación con las células normales.

Ejemplo 7: Efectos fuera de la diana del Compuesto 1/Compuesto 2 y sus implicaciones.

Receptores adrenérgicos α_1 y de dopamina D2. Procedimientos: Los ensayos de unión y funcionales para los receptores adrenérgicos α_1 y de dopamina D2 se realizaron por Eurofins Cerep de acuerdo con sus procedimientos.

Receptor adrenérgico α_1 . Unión a 10 μM . El ensayo de unión evaluó la afinidad del artículo de ensayo por el receptor adrenérgico α_1 no selectivo en la corteza cerebral de rata. Los homogeneizados de membrana de la corteza cerebral se incubaron por duplicado durante 60 minutos a temperatura ambiente con 0,25 nM de [3H]prazosina en ausencia o presencia de artículos de prueba a 10 μM . Después del periodo de incubación, las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio, los filtros se secaron y después se contaron para determinar la radiactividad usando un contador de centelleo. Los resultados se expresan como porcentaje medio de inhibición de la unión del radioligando de control.

Cl_{50} de unión. Para determinar la IC_{50} de unión para el receptor adrenérgico α_1 no selectivo, se incubaron concentraciones variables del artículo de prueba por duplicado con 0,25 nM de [3H]prazosina. El compuesto A se sometió a ensayo a 0,01-30 μM . El Compuesto B, el enantiómero S del Compuesto A, se sometió a ensayo a 0,0003-10 μM . El Compuesto 1 y el Compuesto 2, el enantiómero S del Compuesto 1, se sometieron a ensayo a 0,03-100 μM . La radiactividad se midió tal como se ha descrito anteriormente. La Cl_{50} se definió como la concentración que provoca la inhibición semimáxima de la unión específica del control.

Actividad antagonista. Los efectos antagónicos de los compuestos de prueba sobre los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1B} se midieron usando células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con receptores humanos. La actividad antagonista se determinó midiendo el efecto del compuesto sobre la movilización de calcio inducida por el agonista (epinefrina) en el ensayo del receptor α_{1A} o los niveles de AMPc en el ensayo del receptor α_{1B} . En estos experimentos, las células CHO se incubaron por duplicado a temperatura ambiente con el artículo de prueba y epinefrina a 3 nM en los ensayos del receptor α_{1A} o a 3000 nM en el ensayo del receptor α_{1B} . El Compuesto A se probó en el ensayo del receptor α_{1A} a 0,01-30 μM . El Compuesto B se probó en los ensayos de los receptores α_{1A} y α_{1B} a 0,0003-30 μM . El Compuesto 1 y el Compuesto 2 se analizaron entre 0,03 y 30 μM en el ensayo del receptor α_{1A} y entre 0,03 y 100 μM en el ensayo del receptor α_{1B} . En el ensayo del receptor α_{1A} , los niveles de calcio citosólico se midieron fluorométricamente usando la sonda fluorescente Fluo4 Direct. Los niveles de AMPc

intracelular en el ensayo del receptor adrenérgico α_{1B} se midieron mediante fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF). La Cl_{50} del antagonismo se definió como la concentración que provoca una inhibición semimáxima de la respuesta del agonista de control.

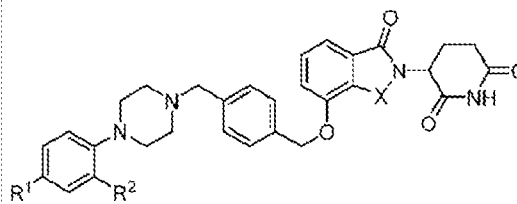
Receptor D2 de dopamina. Unión a 10 μM . El ensayo de unión evaluó la afinidad de los artículos de ensayo para el receptor de dopamina D2 en células de riñón embrionario humano transfectadas (HEK)-293. Para determinar la unión en el ensayo del receptor D_{2S}, el artículo de prueba se incubó con 0,3 nM de [³H] metilspiperona o 1 nM de [³H] 7-hidroxi-2-N,N-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT). También se usó [³H] metilspiperona a 0,3 nM como ligando de control en el ensayo de unión de D_{2L}. Se incubaron homogeneizados de membrana celular por duplicado a temperatura ambiente durante 60 minutos con ligando en ausencia o presencia de artículos de ensayo a 10 μM . Después del periodo de incubación, las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio, los filtros se secaron y después se contaron para determinar la radiactividad usando un contador de centelleo. Los resultados se expresan como porcentaje medio de inhibición de la unión del radioligando de control.

Cl_{50} de unión. Para determinar la Cl_{50} de unión en los ensayos del receptor D2, se probaron HEK-293 como se describió anteriormente, pero con concentraciones variables del artículo de prueba. El Compuesto A se probó a 0,01-30 μM en el ensayo de unión del radioligando D_{2S}. El Compuesto B se probó a 0,0003-10 μM en los ensayos de unión D_{2S} y D_{2L}. El Compuesto 1 se analizó a 0,03-100 μM en los ensayos de D_{2S} y D_{2L}, mientras que el Compuesto 2 se analizó a 0,03-100 μM en el ensayo de D_{2S} y a 0,01-100 μM en los ensayos de D_{2L}. La Cl_{50} se definió como la concentración que provoca la inhibición semimáxima de la unión específica del control.

Actividad agonista. El agonismo de los compuestos de ensayo sobre la receptor de dopamina D_{2S} se evaluó usando células HEK-293 transfectadas con receptor humano. La actividad agonista se determinó midiendo el efecto del compuesto sobre la modulación de impedancia. En estos experimentos, se incubaron células HEK-293 por duplicado a 28 °C con el artículo de ensayo. El compuesto A se sometió a ensayo a 0,01-30 μM . El Compuesto B se sometió a ensayo a 0,0003-10 μM , mientras que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 se sometieron a ensayo a 0,01-10 μM . Se usó dopamina (3 μM) como control agonista. Las mediciones de impedancia se supervisaron durante 10 minutos después de la adición del ligando usando espectroscopia dieléctrica celular. La CE_{50} se definió como la concentración que provoca una respuesta semimáxima, en comparación con la respuesta del agonista de control (dopamina).

Resultados. Se evaluó la unión a 10 μM en los receptores adrenérgico α_1 y D2 de dopamina para el Compuesto 1, el Compuesto 2, el Compuesto A, el Compuesto B y una serie de compuestos ejemplificados en la patente de EE. UU. n.º 8.518.972 (Tabla 4). Si bien los compuestos previamente descritos inhibieron completamente la unión del ligando en ambos receptores, sorprendentemente, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 presentaron una capacidad muy disminuida para inhibir la unión del ligando, mostrando solo el 67/62% (receptor adrenérgico α_1) y el 55/52% (dopamina D_{2S}) de inhibición de la unión del ligando, respectivamente. Por lo tanto, se analizó más a fondo el efecto diferenciado del Compuesto 1 y del Compuesto 2, en comparación con el Compuesto A y el Compuesto B, en los receptores adrenérgico α_1 y D2 de dopamina.

Tabla 4. Efectos del Compuesto A, Compuesto B, Compuesto 1 y Compuesto 2 y compuestos previamente descritos sobre el receptor adrenérgico α_1 y de dopamina D2

						
Compuesto N°	1 R	2 R	X	Estéreo	Adrenérgico α_1	Dopamina D _{2S}
					% de inh. (a 10 μM)	% de inh. (a 10 μM)
1	CN	F	CH ₂	rac	67	55
2	CN	F	CH ₂	S	62	52
A	F	F	CH ₂	rac	102	99
B	F	F	CH ₂	S	98	99
Ej. 5.229	H	H	CH ₂	rac	98,3	98,7
Ej. 5.273	F	H	CH ₂	rac	100,3	94,7
Ej. 5.289	F	H	CO	rac	97,9	92,4

Los efectos detallados del Compuesto A, Compuesto B, Compuesto 1 y Compuesto 2 sobre el receptor adrenérgico α_1 se resumen en la Tabla 5. El Compuesto A inhibió la unión del ligando al receptor adrenérgico α_1 en un 102 %. La Cl_{50} de unión para el Compuesto A al receptor fue 0,064 μ M. Se demostró que el Compuesto A es un fuerte antagonista del receptor adrenérgico α_{1A} , con una Cl_{50} de 0,014 μ M. De manera similar, el Compuesto B inhibió la unión del ligando al receptor adrenérgico α_1 en un 98-100 % a 10 μ M, y tuvo una Cl_{50} de unión de 0,024 μ M. Se observó un fuerte antagonismo del receptor adrenérgico α_1 con el Compuesto B, con valores de Cl_{50} de 0,0064 y 0,078 μ M en los receptores α_{1A} y α_{1B} , respectivamente. Sorprendentemente, por el contrario, se demostró que tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 tienen una actividad débil sobre el receptor adrenérgico α_1 . Los valores de Cl_{50} para el antagonismo del receptor por el Compuesto 1 fueron 0,98 μ M y 6,9 μ M para los receptores α_{1A} y α_{1B} , respectivamente. Se observaron resultados comparables para el Compuesto 2.

Tabla 5. Efectos del Compuesto A, Compuesto B, Compuesto 1 y Compuesto 2 sobre el receptor adrenérgico α_1

Compuesto	α_1 (no selectivo) % de inhibición (10 μ M)	α_1 (no selectivo) Cl_{50} de unión (μ M)	Antagonismo (μ M)	
			α_{1A}	α_{1B}
Compuesto A	102	0,064	0,014	ND
Compuesto B	98, 100 ^a	0,024	0,0064	0,078
Compuesto 1	67	3,9	0,98	6,9
Compuesto 2	62	1,3 (estimado)	0,58	2,4
^a Experimentos independientes.				
ND, no determinado				

Receptor D2 de dopamina. Los efectos del Compuesto A, Compuesto B, Compuesto 1 y Compuesto 2 sobre el receptor D2 de dopamina se resumen en la Tabla 6. El Compuesto A inhibió la unión del ligando al receptor D_{2S} de dopamina en un 99 %. La Cl_{50} de unión del Compuesto A al receptor D_{2S} fue 0,15 μ M. Se demostró que el Compuesto A es un agonista parcial del receptor D_{2S} de dopamina, con una CE_{50} de 0,016 μ M. De manera similar, el Compuesto B inhibió el receptor D_{2S} en un 99 % a 10 μ M, y tuvo una Cl_{50} de unión de 0,084 y 0,016-0,047 μ M sobre los receptores D_{2L} y D_{2S} , respectivamente. Sorprendentemente, por el contrario, se demostró que tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 tienen una actividad débil sobre el receptor de dopamina D2, con una inhibición a 10 μ M de ≤ 55 % y valores de Cl_{50} de unión ≥ 2 μ M. El agonismo funcional (CE_{50}) del Compuesto B en el receptor de dopamina D_{2S} en tres estudios independientes fue >10 , 2,7 y 1,9 μ M. Aunque el grado de agonismo del Compuesto B sobre el receptor D_{2S} fue menor que el observado para el Compuesto A, hubo una tendencia hacia un mayor agonismo del Compuesto B en comparación con el Compuesto 1 y el Compuesto 2. Tomados en conjunto, los datos de % de inhibición de la unión a 10 μ M, Cl_{50} de unión y Cl_{50} de agonismo demostraron una actividad más fuerte del Compuesto A y el Compuesto B sobre el receptor de dopamina D2 en comparación con el Compuesto 1 y el Compuesto 2. Esta observación es consistente con la evidencia del agonismo de la dopamina D2 (es decir, disminución de la motilidad/vaciamiento gástrico) en ratas con el Compuesto A, pero no con el Compuesto 1 (como se analiza a continuación).

Tabla 6. Efectos del Compuesto A, Compuesto B, Compuesto 1 y Compuesto 2 sobre el receptor D2 de dopamina

Compuesto	% de inhibición (10 μ M)		Cl_{50} de unión (μ M)		CE_{50} del agonismo de D_{2S} (μ M)
	D_{2L}	D_{2S}	D_{2L}	D_{2S}	
Compuesto A	ND	99	ND	0,15	0,016
Compuesto B	103	99, 99 ^a	0,084	0,016, 0,021, 0,047 ^a	>10 , 2,7, 1,9 ^a
Compuesto 1	55	55	2,3	7,4	Negativo
Compuesto 2	ND	52	3 (estimado)	2 (estimado)	>10
^a Experimentos independientes; ND, no determinado					

Estudios exploratorios de toxicología de 7 días en ratas macho. Métodos. A ratas CD-IGS macho ($n = 5$ /grupo para la evaluación toxicológica; $n = 4$ /grupo para la evaluación toxicocinética) se les administró una dosis diaria por sonda oral (10 ml/kg) con vehículo (0,5 % HPMC/0,25 % Tween-80 en 50 mM de citrato, pH 2,6-2,8) o artículos de prueba (Compuesto A o Compuesto 1) a 100, 300 o 1000 mg/kg/día durante 7 días consecutivos. Se recogieron muestras de sangre para toxicocinética los días 1 y 7. Todas las ratas se observaron para detectar signos clínicos

de toxicidad antes de la dosis, aproximadamente 1 hora después de la dosis los días 1 a 7, y antes de la necropsia el día 8. El peso corporal se registró en el momento de la aleatorización, antes de la dosificación los días 1 a 7, y antes de la necropsia. Las muestras para análisis de hematología y bioquímica de sangre se recogieron el día 8, aproximadamente 24 horas después de la última dosis. Las ratas se sacrificaron el día 8 para la necropsia. La evaluación de la anatomopatología consistió en la observación macroscópica, el peso de los órganos y el examen histopatológico de tejidos seleccionados.

Resultados. Tras la administración oral diaria del Compuesto A durante 7 días consecutivos, la exposición sistémica (AUC_{0-t}) aumentó de manera dependiente de la dosis desde 100 hasta 1000 mg/kg. La exposición el día 7 fue aproximadamente de 3 a 7 veces mayor que la del día 1. Las AUC en el día 7 fueron 441, 1230 y 1760 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a 100, 300 y 1000 mg/kg, respectivamente. Se observaron signos clínicos de toxicidad (postura encorvada, piloerección, y disminución de la actividad) y disminución del peso corporal con dosis ≥ 300 mg/kg. No se observó aumento de peso corporal con 100 mg/kg. Se observó contenido estomacal anormal (material de pienso, seco) de forma macroscópica a ≥ 100 mg/kg, sin correlación microscópica. Este hallazgo sugiere una disminución de la motilidad/vaciamiento gástrico, y es consistente con la actividad agonista sobre el receptor D_2 de dopamina. Los hallazgos microscópicos relacionados con el artículo de prueba se limitaron a una necrosis miocárdica multifocal mínima y a una infiltración de células mixtas en los corazones de las ratas en todos los niveles de dosis. Aunque aún queda por determinar la causa exacta de esta lesión cardíaca, el hallazgo es consistente con el agonismo del receptor de dopamina D_2 y/o el antagonismo del receptor adrenérgico α_1 . Las alteraciones de estos receptores pueden conducir a vasodilatación, dando como resultado disminución del flujo sanguíneo, hipotensión y taquicardia refleja. La ubicación de las lesiones cardíacas (ápice, superficie endocárdica de los ventrículos) respalda además un mecanismo de isquemia. En el caso del Compuesto 1, la exposición (AUC_{0-t}) también aumentó de manera dependiente de la dosis desde 100 hasta 1000 mg/kg, y la exposición en el día 7 fue aproximadamente 2 a 6 veces mayor que en el día 1. El día 7, las AUC a 100, 300 y 1000 mg/kg fueron 143, 514 y 1220 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, respectivamente. No hubo observaciones clínicas relacionadas con el artículo de prueba. Se observaron disminuciones mínimas en el aumento de peso corporal a ≥ 300 mg/kg. Sorprendentemente, a diferencia del Compuesto A, no se observaron efectos sobre el estómago ni el corazón en ratas a las que se les dosifica el Compuesto 1, en consonancia con las actividades reducidas sobre los receptores adrenérgico α_1 y dopamínico D_2 observadas por Eurofins Cerep, descritas anteriormente.

Evaluación in vitro del Compuesto 2 y del Compuesto B como un inhibidor de las enzimas del citocromo p450 humano. El objetivo fue evaluar el potencial del Compuesto B y del Compuesto 2 para actuar como inhibidores directos o dependientes del tiempo de las actividades del citocromo P450 (CYP) en microsomas hepáticos humanos reunidos. En este estudio, se investigó la inhibición de nueve enzimas del citocromo P450 humano, a saber, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4/5 (usando dos sustratos).

Métodos. Para examinar el potencial de los compuestos para actuar como un inhibidor directo de las enzimas CYP, se incubaron microsomas hepáticos humanos reunidos con sustratos de sonda, a concentraciones aproximadamente iguales a su K_m aparente, en ausencia o presencia del Compuesto B (0,03 a 30 μM) o el Compuesto 2 (0,03 a 30 μM) y NADPH (1 mM). Además, se evaluó el potencial de los compuestos para actuar como inhibidores dependientes del tiempo a las mismas concentraciones mencionadas anteriormente. Al evaluar la inhibición dependiente del tiempo, los compuestos se preincubaron con microsomas hepáticos humanos y NADPH (1 mM) durante 30 minutos antes de la adición de un sustrato de sonda. Además de los controles de vehículo apropiados, se incluyeron como controles positivos inhibidores directos conocidos e inhibidores dependientes del tiempo de las isoformas de CYP. Tras la incubación, las concentraciones de metabolitos del sustrato de sonda se cuantificaron usando métodos de LC/MS/MS reconocidos. El grado de inhibición se expresó como porcentaje de actividad del control.

Resultados. Compuesto B. En las condiciones experimentales usadas para examinar la inhibición directa, el Compuesto B (hasta 30 μM) tuvo poco (≤ 30 %) o ningún efecto inhibitor sobre CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4/5 (midazolam). A 30 μM , el Compuesto B inhibió la actividad de CYP2B6, CYP2C9 y CYP2C19 en un 59, 38 y 45 %, respectivamente. El Compuesto B inhibió CYP3A4/5 (testosterona) con un valor de CI_{50} de 2,92 μM . En las condiciones usadas para probar la inhibición dependiente del tiempo, el Compuesto B (hasta 30 μM) mostró poca o ninguna inhibición dependiente del tiempo de CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP2E1 después de una preincubación de 30 minutos con o sin NADPH. El Compuesto B inhibió CYP3A4/5 de manera dependiente del tiempo. El valor de CI_{50} desplazado (con NADPH) fue 2,23 y 1,93 μM para midazolam y testosterona como sustratos, respectivamente.

Compuesto 2. En las condiciones experimentales usadas para examinar la inhibición directa, el Compuesto 2 (hasta 30 μM) tuvo poco (≤ 30 %) o ningún efecto inhibitor sobre CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4/5 (midazolam). A 30 μM , el Compuesto 2 inhibió la actividad de CYP2C19 y CYP3A4/5 (testosterona) en un 41 y 46 %, respectivamente. En las condiciones usadas para probar la inhibición dependiente del tiempo, el Compuesto 2 (hasta 30 μM) mostró poca o ninguna inhibición dependiente del tiempo de CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4/5 (midazolam) después de una preincubación de 30 minutos con o sin NADPH. El Compuesto 2 (a 30 μM) inhibió la actividad de

CYP3A4/5 (testosterona) en un 59 % (con NADPH) y un 23% (sin NADPH), lo que indicó que el Compuesto 2 era un inhibidor débil dependiente del tiempo de CYP3A4/5.

Conclusión. En resumen, el Compuesto B (hasta 30 μ M) tuvo poco (≤ 30 %) o ningún efecto inhibitor directo sobre CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4/5 (midazolam). El Compuesto B inhibió CYP3A4/5 (testosterona) con un valor de Cl_{50} de 2,92 μ M. El Compuesto B inhibió la actividad de CYP2B6, CYP2C9 y CYP2C19 en un 59, 38 y 45 %, respectivamente a 30 μ M. El Compuesto B (hasta 30 μ M) no es un inhibidor dependiente del tiempo de CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP2E1, pero es un inhibidor dependiente del tiempo de CYP3A4/5.

Sorprendentemente, en contraste, el Compuesto 2 (hasta 30 μ M) tuvo poco (≤ 30 %) o ningún efecto inhibitor sobre ninguna de las enzimas CYP analizadas, y a 30 μ M, el Compuesto 2 inhibió la actividad de CYP2C19 y CYP3A4/5 (testosterona) sólo en un 41 y 46 % (es decir, $Cl_{50} > 30$ μ M), respectivamente. El Compuesto 2 (hasta 30 μ M) también es sólo un inhibidor débil dependiente del tiempo de CYP3A4/5. La actividad inhibitora reducida de CYP2C19 y CYP3A4/5 da como resultado un efecto reducido sobre el metabolismo, incluso de otros fármacos, y por lo tanto un potencial reducido de interacciones farmacológicas adversas.

Sumario: La combinación de la potente actividad anti-mieloma múltiple que respeta las células normales, los niveles significativamente mayores de apoptosis, y la respuesta de combinación más potente y eficaz con dexametasona, indican que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 serán útiles en el tratamiento del mieloma múltiple. Además, los hallazgos sorprendentemente mejorados in vitro e in vivo de los perfiles de CYP y fuera de la diana, en combinación con el potencial de usar dosis más bajas de dexametasona, indican que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 deberían tener perfiles de seguridad mejorados con respecto a los compuestos dados a conocer previamente.

Ejemplo 8: Apoptosis inducida por el Compuesto 2 en líneas celulares de mieloma múltiple, caracterizada por impulsores oncogénicos, translocaciones cromosómicas y mutaciones de p53.

Métodos. El efecto de los compuestos sobre la proliferación y la inducción de la apoptosis de líneas celulares de MM representativas que poseen mutaciones oncogénicas y translocaciones cromosómicas comunes, incluidas aquellas consideradas translocaciones o mutaciones de alto riesgo encontradas en pacientes con MM, se evaluó usando un ensayo de citometría de flujo en placa de 96 pocillos después de 120 h de incubación con los compuestos. Veinte líneas celulares de MM (Tablas 7 y 8) (incluidas las líneas celulares de leucemia de células plasmáticas (PCL) L363, JJN-3, ARH-77 y SKMM-2) se trataron por duplicado con concentraciones crecientes de Compuesto 2 o pomalidomida, que oscilaron de 0,015 a 100 nM. Usando lotes de 5 mM, los compuestos se colocaron previamente en los pocillos apropiados de placas de 96 pocillos usando un dispensador digital Hewlett-Packard D300. Las células se añadieron a placas de 96 pocillos usando un dispensador de reactivos Multidrop Combi. Después de 5 días de tratamiento, el análisis citométrico de flujo se usó para determinar el número de células vivas, muertas, o apoptóticas. Después de 5 días de tratamiento, las células se incubaron con anexina V para teñir la fosfatidilserina expuesta, un marcador de superficie celular apoptótico, y el colorante vital 7-AAD, que se excluye de las células con membranas celulares intactas, y se analizaron mediante citometría de flujo (Attune®, Thermo Fisher). Después se realizó un análisis para determinar el número de células vivas (células con tinción doble negativa para anexina V y 7-AAD), y se calculó el porcentaje de células apoptóticas (células positivas para anexina V) para cada condición, con respecto al control de DMSO tratado. Todos los valores descritos se normalizaron a células tratadas sólo con DMSO. Todas las curvas de inducción de proliferación y apoptosis se procesaron y representaron como porcentaje del control usando XlFit (IDBS, Alameda, CA) y GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA). El recuento de células vivas para cada concentración se normalizó al control de DMSO (considerado como 100 %) en Microsoft Excel, para generar las curvas de proliferación. Entonces se calcularon los valores de Cl_{50} (concentración del compuesto que logra una inhibición del 50 %) realizando un análisis de pendiente variable de $\log(\text{inhibidor})$ vs. respuesta normalizada, y los valores del área bajo la curva (AUC) se calcularon realizando un análisis del área bajo la curva en GraphPad Prism 7.03. De manera similar, para el análisis de apoptosis, se calculó el porcentaje de apoptosis inducida por fármacos para todas las dosis combinando los valores de apoptosis "temprana" (anexina V positiva y 7-AAD negativa) y "tardía" (anexina V y 7-AAD positiva) y restando los valores de fondo (célula tratada con control de vehículo DMSO). Los valores de AUC para las curvas de apoptosis se calcularon realizando un análisis del área bajo la curva en GraphPad Prism 7.03. Se calculó el área bajo la curva de respuesta a la dosis (AUC), ya que integra la potencia y la eficacia de los fármacos para representar la apoptosis en un único parámetro. Los valores de Cl_{50} para el Compuesto 2 y pomalidomida en los ensayos de citometría de flujo se presentan en la Tabla 9. La Tabla 10 muestra el área bajo la curva de respuesta a la dosis (AUC), que compara la actividad del Compuesto 2 y pomalidomida usando el ensayo citométrico de flujo en el panel de líneas celulares de MM.

Tabla 7: Líneas celulares de mieloma múltiple

Línea celular MM	Proveedor/Fuente	Número de catálogo	Condiciones de cultivo
ANBL-6	Jelinek, Ahmann et al. Cancer Res (1993) 53(21): 5320-5327	NA	RPML-1640, FBS al 10%, IL-6
ARH-77	ATCC (Manassas, VA)	CRL-1621	RPML-1640, FBS al 10%
CAG	Borset, et al. Blood (2000) 96(7): 2528-2536	NA	RPML-1640, FBS al 10%
DF15	Shaughnessy, et al., documento US20070027175	NA	RPML-1640, FBS al 10%
EJM	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-560	RPML-1640, FBS al 10%
NCI-H929	ATCC (Manassas, VA)	CRL-9068	RPML-1640, FBS al 10%
H929-1051	Desarrollado internamente, resistente a 10 µM de lenalidomida		RPML-1640, FBS al 10%
IM-9	ATCC (Manassas, VA)	CCL-159	RPML-1640, FBS al 10%, IL-6
JJN-3	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-541	RPML-1640, FBS al 10%
KMS-11	Colección Japonesa de Bancos de Células de Recursos Biológicos de Investigación (Osaka, Japón)	JRCB-1179	RPML-1640, FBS al 10%
KMS-12-PE	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-606	RPML-1640, FBS al 10%
KMS-34	Colección Japonesa de Bancos de Células de Recursos Biológicos de Investigación (Osaka, Japón)	JRCB-1195	RPML-1640, FBS al 10%
L363	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-49	RPML-1640, FBS al 10%
LP-1	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-41	RPML-1640, FBS al 10%
MM.1S	ATCC (Manassas, VA)	CRL-2174	RPML-1640, FBS al 10%
OPM2	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-50	RPML-1640, FBS al 10%
OPM2-P10	Desarrollado internamente, resistente a 10 µM de pomalidomida		RPML-1640, FBS al 10%
RPML-8226	ATCC (Manassas, VA)	CCL-155	RPML-1640, FBS al 10%
SKMM-2	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	ACC-430	RPML-1640, FBS al 10%
U266	ATCC (Manassas, VA)	TIB-196	RPML-1640, FBS al 10%

ATCC = Colección Americana de Tejidos Tipo; DSMZ = Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares; FBS = suero fetal bovino; IL-6 = interleucina 6; JCRB = Colección Japonesa de Bancos de Células de Recursos Biológicos de Investigación; MM = mieloma múltiple; N/A = no aplicable.

Tabla 8: Impulsores oncogénicos, translocaciones cromosómicas, y mutaciones de p53 encontrados en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple

Línea celular MM	Estado de p53	Impulsores oncogénicos	Translocaciones
ANBL-6	mut (Q331) ^a	C-MAF	t(14;16)
ARH-77	mut (R273H)	-	-
CAG	wt HD	C-MAF	t(14;16)
DF15	wt	-	-

Línea celular MM	Estado de p53	Impulsores oncogénicos	Translocaciones
EJM	mut (K132N)	MAFB	t(14;20)
NCI-H929	wt	FGFR3 y MMset	t(4;14)
H929-1051	wt	FGFR3 y MMset	t(4;14)
IM-9	wt	-	-
JJN-3	wt	C-MAF	t(14;16)
KMS-11	wt, HD	FGFR3/MMSET, C-MAF	t(4;14),t(14;16)
KMS-12-PE	wt HD/mut (R337L) ^b	Ciclina D1	t(11;14)
KMS-34	mut (W146 ^a)	FGFR3 y MMset	t(4;14)
L363	mut (S261T)	MAFB	t(6;20), t(20;22)
LP-1	mut (E286K)	FGFR3 y MMset	t(4;14)
MM.1S	wt	C-MAF	t(14;16)
OPM2	mut (R175H)	FGFR3 y MMset	t(4;14)
OPM2-P10	mut (R175H)	FGFR3 y MMset	t(4;14)
RPMI-8226	mut (E258K)	C-MAF	t(14;16), t(16;22)
SKMM-2	wt	MAFB, Ciclina D1	t(14;20), t(11;14)
U266	mut (A161T)	Ciclina D	t(11;14)

HD = delección homocigótica; mut = mutación; wt = tipo salvaje; - = no disponible. ^a = mutación sin sentido. ^b = informes contradictorios en la bibliografía sobre si se trata de p53 wt con sólo 1 copia o una mutación.

Fuentes: Bergsagel, et al. Oncogene (2001);20:5611-5622; Berglind, et al. Cancer Biology Therapeutics (2008);5:699-708; Keats, J. Common Genetics of Myeloma Cell Lines [Internet]. Jonathan Keats Laboratory. Translational Genomics Research Institute (TGen) - Integrated Cancer Genomics Division. 2012 - [citado 05 ene 2017].

Resultados. La actividad antiproliferativa del Compuesto 2 se evaluó en un panel de líneas celulares de MM representativas que poseen mutaciones oncogénicas y translocaciones cromosómicas (Tabla 8), incluyendo las consideradas como translocaciones de alto riesgo o mutaciones encontradas en pacientes con MM (Johnson, et al. Int J Hematol. (2011);94:321-333; Zhou, et al. Leukemia (2009);23:1941-1956; Terpos, et al. Leuk Lymphoma (2006);47:803-814; Tonon, Hematol Oncol Clin North Am. (2007);21:985-1006). Las curvas de respuesta frente a la concentración se obtuvieron usando citometría de flujo para medir el número de células vivas para demostrar la actividad antiproliferativa del Compuesto 2 en comparación con pomalidomida. Los valores de CI_{50} para el Compuesto 2 y pomalidomida se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Actividad antiproliferativa del Compuesto 2 en líneas celulares de mieloma múltiple

Línea Celular	Actividad antiproliferativa (citometría de flujo) CI_{50} (nM)	
	Compuesto 2	Pomalidomida
MM1-S	0,04	33,74
DF15	0,05	40,98
OPM2	0,05	69,68
ANBL-6	0,06	60,61
NCI-H929	0,05	63,10
KMS-12-PE	0,09	83,79
LP-1	0,14	175,77
JJN-3	0,10	365,84
CAG	0,12	1084,88
U266	0,19	380,67
EJM	0,43	2843,08
NCI-H929-1051	0,45	1949,67
KMS34	0,45	> 10000

	Actividad antiproliferativa (citometría de flujo) CI_{50} (nM)	
Línea Celular	Compuesto 2	Pomalidomida
KMS-11	1,41	5290,11
RPMI-8226	0,75	> 10000
OPM2-P10	1,81	> 10000
SK-MM-2	0,82	> 10000
L363	0,16	> 10000
ARH-77	>10000	> 10000
IM-9	5569,43	> 10000

El efecto de inducción de apoptosis del Compuesto 2 se evaluó mediante citometría de flujo después de 120 h de tratamiento, y se comparó con el tratamiento con pomalidomida. El porcentaje de control se calculó normalizando el control de DMSO (100 % del control) para generar las curvas de respuesta a la dosis y calcular el área bajo esas curvas (AUC). El valor de AUC informado corresponde al área bajo la curva de respuesta a la dosis en la que los valores de 10000 corresponden a una inducción completa de apoptosis en todas las dosis y los valores de 0 corresponden a una inducción nula de apoptosis. Cada punto de dato representa 2 experimentos independientes con al menos dos muestras en cada experimento. (Tabla 10).

Tabla 10: Apoptosis inducida por el Compuesto 2 en líneas celulares de mieloma múltiple

	AUC	
Líneas celulares	Compuesto 2	Pomalidomida
CAG	5804	1561
DF15	6002	3707
NCI-H929	6089	2115
SKMM-2	3204	1033
OPM2	5620	3298
MM1.S	5701	3525
RPMI-8226	3245	1369
ANBL-6	4751	2580
H929-1051	3968	423
EJM	2591	900
KMS-12-PE	2017	1069
KMS-11	1270	234,4
JJN-3 (DSMZ)	1125	199,1
KMS-34	1614	429,7
IM-9	323,9	25,4
U266	927,8	373
OPM2-P10	1768	108,7
ARH-77	709	28,16
LP-1	630,7	174
L363	347	293

Conclusión. El Compuesto 2 fue ampliamente activo en la mayoría de las líneas celulares de MM, y se diferenció de la pomalidomida al mostrar una fuerte actividad en líneas celulares que tienen una sensibilidad intermedia a la pomalidomida y en líneas celulares que son resistentes a la pomalidomida. El Compuesto 2 fue ampliamente activo en esta gama de líneas celulares de MM con diferentes estados de p53, impulsores oncogénicos, o translocaciones cromosómicas. Por ejemplo, las células OPM2, LP-1, EJM, U266 y RPMI-8226 tienen p53 mutada, y fueron sensibles al Compuesto 2. Además, las líneas celulares NCI-H929, KMS-11, KMS 34, OPM2 y LP-1 contienen la translocación cromosómica de MM de "alto riesgo" t(4;14), y fueron sensibles al Compuesto 2. Las células SK-MM-2 y EJM también fueron sensibles al Compuesto 2, y contienen otra translocación cromosómica de MM de "alto

riesgo", t(14;20). (Figura 5) La capacidad del Compuesto 2 para inducir la apoptosis después de exposiciones breves y definidas puede permitir que se logre el control de la enfermedad usando programas intensivos e intermitentes. Estos programas también pueden mejorar el índice terapéutico al reducir el potencial del Compuesto 2 para inducir las citopenias que se observan con dosis más continuas de los compuestos contra MM actuales.

Ejemplo 9: El Compuesto 2 tiene actividad en líneas celulares de mieloma múltiple que han adquirido resistencia a lenalidomida o pomalidomida

La actividad del Compuesto 2 se probó en células que adquirieron resistencia a lenalidomida o pomalidomida debido a la exposición continua a cualquiera de los compuestos y, en el proceso, adquirieron niveles disminuidos de cereblon (Tabla 11). Las células se trataron durante 5 días, y después se evaluaron mediante un ensayo de determinación de ATP (CellTiter-Glo). El porcentaje de control se calculó restando el fondo y normalizando al control de DMSO (100 % de control). El porcentaje relativo de cereblon en líneas celulares con resistencia adquirida a lenalidomida o pomalidomida se determinó mediante transferencia Western, y se presenta con la cantidad en líneas celulares parentales designada como 100 %.

Resultados. La Figura 6 muestra las CI_{50} de las curvas de respuesta frente a la concentración, que comparan la actividad del Compuesto 2 y la pomalidomida, para medir la proliferación en líneas parentales (DF15, NCI-H929 y OPM2), una línea celular resistente a lenalidomida (NCI-H929-1051), o cinco líneas celulares resistentes a la pomalidomida (NCI-H929-P01, OPM2-P01, OPM2-P1, OPM2-P10 y DF15R).

Tabla 11: Compuesto y concentración del compuesto usado para desarrollar resistencia a fármacos en líneas celulares de mieloma múltiple y adquirir cambios en la expresión de la proteína cereblon

Línea Celular	Resistencia	Cereblon (%) (normalizado según la línea parental)
DF15	N/A	100
DF15R	Pom 100 μ M	14*
NCI-H929	N/A	100
NCI-H929-1051	Len 10 μ M	50
NCI-H929-P01	Pom 100 nM	35
OPM2	N/A	100
OPM2-P01	Pom 100 nM	61
OPM2-P1	Pom 1 μ M	33
OPM2-P10	Pom 10 μ M	31

N/A = no aplicable; Pom = pomalidomida; * nivel de fondo, no CRBN real, que está ausente en esta línea celular

Conclusión: El efecto más sorprendente del Compuesto 2 fue la amplia y potente actividad antiproliferativa en todas las líneas celulares de MM, pero no en las células no tumorigénicas. El Compuesto 2 tiene una potente actividad antiproliferativa en líneas celulares de MM que contienen translocaciones de alto riesgo, tales como t(4;14), t(14;16) y otras. En comparación con la lenalidomida y la pomalidomida, el Compuesto 2 es significativamente más potente para exterminar la mayoría de las líneas celulares de MM. Además, el Compuesto 2 indujo apoptosis, medida mediante la inducción de la actividad de la caspasa-3, en líneas celulares de MM que adquirieron resistencia a lenalidomida y pomalidomida.

Ejemplo 10: Efecto ex vivo del Compuesto 2 sobre la maduración de los progenitores mieloides hasta convertirse en neutrófilos adultos

Métodos: Se usaron cultivos ex vivo de células CD34⁺ de médula ósea (BM) de donantes sanos (HD) para investigar la maduración ex vivo específica de los neutrófilos. La diferenciación in vitro de los progenitores de neutrófilos se indujo añadiendo factor de células madre (SCF), ligando de tirosina cinasa 3 similar a fms (Flt3-L), y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a los medios de cultivo. La diferenciación celular se evaluó mediante citometría de flujo como el porcentaje de células en 5 subpoblaciones: células madre hematopoyéticas (HSC, CD34⁺/CD33⁻/CD11b⁻) y Etapa I (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁻), Etapa II (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁻), Etapa III (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁺), y Etapa IV (CD34⁺/CD33⁻/CD11b⁺) (de inmaduras a maduras), como se muestra en la Figura 7. Se evaluaron los efectos del Compuesto 2 sobre la maduración de los progenitores de neutrófilos, y se evaluaron diferentes programas de dosificación para obtener información sobre la dependencia del programa de estos eventos.

Resultados. Exposiciones diarias cortas al Compuesto 2. Los efectos de diferentes períodos de exposición (2, 4 y 6 h) a 1, 10 y 100 nM del Compuesto 2 durante hasta 3 días consecutivos sobre la maduración de los progenitores de neutrófilos se evaluaron en puntos de tiempo preespecificados usando citometría de flujo. Los

resultados mostraron que la maduración de etapa tardía de los progenitores de neutrófilos fue bloqueada por el Compuesto 2, y las células maduras se redujeron significativamente en número a las concentraciones más altas después de uno o más días de exposición. La detención de la maduración parece ocurrir principalmente en el desarrollo de los progenitores de neutrófilos de Etapa III, como lo demuestra una acumulación de células con inmunofenotipo de superficie celular de Etapa III y una reducción en la población de células con inmunofenotipo de superficie celular de Etapa IV (neutrófilos maduros). Como se muestra en la Figura 8, en un ejemplo de incubación de 6 horas, este efecto de maduración dependía de la concentración y aumentaba con el número de días de exposición, pero no se alteraba con la duración (2, 4 o 6 h) de las exposiciones individuales. Es importante destacar que la viabilidad de los progenitores de neutrófilos y los neutrófilos maduros expuestos al Compuesto 2 no se vio afectada, como lo demuestra la ausencia de cualquier aumento detectable en la proporción de células positivas para Anexina V o 7-aminoactinomicina D, que se acumula en las células muertas.

También se evaluó la recuperación de neutrófilos maduros después de la exposición al Compuesto 2 en el sistema. La recuperación de los niveles de neutrófilos maduros hasta al menos el 50 % del nivel de control no tratado en el sistema de ensayo utilizado en el presente estudio se correlaciona con la ausencia de inducción o recuperación de neutropenia clínicamente significativa. De hecho, después de un período de una semana sin Compuesto 2, la proporción de células de Etapa IV se recuperó en al menos un 50 % desde su nadir (Figura 8, paneles inferiores), con una tendencia hacia una recuperación más rápida y completa a concentraciones más bajas.

Conclusión: Los resultados indican que la gestión exitosa de la neutropenia en pacientes con MM tratados con el Compuesto 2 puede ser posible con el uso de programas de dosificación adecuados.

Exposiciones diarias más prolongadas al Compuesto 2. Para caracterizar aún más los posibles impactos de diferentes programas en la detención de la maduración de los progenitores de neutrófilos y la recuperación posterior, se evaluaron los cambios en las proporciones relativas de cada una de las etapas antes mencionadas de la maduración de los progenitores mieloides hasta los neutrófilos adultos mediante citometría de flujo después de 3 o 5 días consecutivos de exposición a 1, 10 o 100 nM del Compuesto 2 durante 6 o 24 h cada día. Las células de BM CD34⁺ derivadas de donantes sanos se expusieron al Compuesto 2 durante 3 o 5 días consecutivos a partir del día 10 durante 6 h (donantes n.º 1 y 2) o durante 24 h (donantes n.º 3 y 4) cada día. Una vez completada la exposición final, las células se lavaron y se volvieron a incubar en ausencia del Compuesto 2 hasta el día 22. Tanto la exposición de 6 como de 24 horas al Compuesto 2 durante 3 o 5 días consecutivos dio como resultado una acumulación de la población de neutrófilos de Etapa III con una disminución correspondiente en la población de Etapa IV, en consonancia con un bloqueo en la maduración desde la Etapa III a la Etapa IV. Como se muestra en la Figura 9 y la Figura 10, en los ejemplos para exposiciones de 6 horas durante 3 y 5 días, respectivamente, el ritmo de recuperación de la detención madurativa dependió de la concentración y estuvo influido por el número de exposiciones diarias, siendo más prolongado a concentraciones más altas del Compuesto 2 y después de 5 frente a 3 días de exposición, pero un cambio en la duración (6 frente a 24 h) de las exposiciones diarias tuvo poco impacto en el ritmo aparente de recuperación.

Después de la exposición al Compuesto 2 durante 3 días consecutivos, se observó una recuperación del 50 % o más de la maduración normal tras un descanso farmacológico de 8 a 10 días, en todas las condiciones evaluadas (Figura 10, panel derecho). Por el contrario, después de la exposición al Compuesto 2 durante 5 días consecutivos, se observó una recuperación del 50 % o más de la maduración normal tras un descanso farmacológico de 8 a 10 días solo para las concentraciones de 1 y 10 nM. Con la concentración más alta del Compuesto 2 (100 nM), puede ser necesario un período sin fármaco más prolongado para recuperar la maduración de los progenitores de neutrófilos. Sin embargo, a pesar de esta recuperación incompleta de la maduración, no se observó pérdida de viabilidad en ninguna de las condiciones probadas, incluidas exposiciones continuas (24 horas) de hasta 5 días. Esta observación contrasta con la inducción de apoptosis en células de mieloma, que se optimizó mediante la exposición continua al Compuesto 2 durante más de 6 horas.

Durante los 6 a 8 días posteriores a la última exposición en el programa de 5 días, se observaron etapas iniciales de recuperación de Etapa IV (neutrófilos maduros) tras la exposición al Compuesto 2 a la concentración de 10 nM solamente, mientras que no se observó recuperación dentro de este período de tiempo en cultivos expuestos a 100 nM del Compuesto 2 durante 5 días. Estos datos sugieren que la exposición a concentraciones más altas del Compuesto 2 durante un número creciente de días consecutivos presagia una detención madurativa más prolongada de los precursores de neutrófilos (y neutropenia) y que el ritmo de recuperación es independiente de la duración (6 frente a 24 h) de las exposiciones diarias.

Conclusión: En conjunto, los datos sugieren que la inducción y la recuperación de la neutropenia en los pacientes pueden no verse afectadas negativamente por una dosificación más intensiva del Compuesto 2 (múltiples dosis por día) en comparación con una dosificación una vez al día.

Ejemplo 11: Efecto de la dexametasona sobre la maduración in vitro de los progenitores de neutrófilos como un agente único y en combinación con el Compuesto 2

Métodos. Para comprender los efectos de la dexametasona sobre la neutropenia, se usaron cultivos in vitro de células CD34⁺ de médula ósea (BM) de donantes sanos para evaluar los eventos neutropénicos mediados por la dexametasona como agente único y en combinación con el Compuesto 2. Para definir los efectos de la monoterapia con dexametasona en este modelo, se mantuvo la exposición a 1, 10 o 100 nM de dexametasona durante 30 h comparando 7 programas de dosificación diferentes (Figura 11). Para los estudios de combinación, se mantuvo una exposición única al Compuesto 2 (1, 10 o 100 nM) y a la dexametasona durante 6 y 30 h, respectivamente, a partir del día 13 del cultivo.

Resultados. Los resultados mostraron que la maduración de los progenitores de neutrófilos no se vio afectada por la exposición al agente único dexametasona bajo ningún programa probado, mientras que la maduración de los precursores de neutrófilos en etapa tardía fue bloqueada por el Compuesto 2 (Figura 12), reduciéndose el número de células maduras en todas las concentraciones probadas después de una exposición. Esta detención de la maduración también se observó cuando el Compuesto 2 se combinó con dexametasona. El bloqueo de la maduración dependió de la concentración del Compuesto 2, pero no se alteró al variar la concentración de dexametasona. La viabilidad de los neutrófilos inmaduros y maduros no se vio afectada por la dexametasona o el Compuesto 2, solos o en combinación. Después del reposo farmacológico, se observó una recuperación completa de la maduración normal en todas las condiciones analizadas después de una pausa de una semana con el fármaco.

Conclusión. Estos datos indican que la neutropenia causada por el Compuesto 2 se puede gestionar modificando los programas de dosificación, pero no se prevé que se alivie ni se agrave con el tratamiento concurrente con dexametasona.

Ejemplo 12: Efecto del Compuesto 2 solo y en combinación con dexametasona sobre mieloma múltiple resistente a lenalidomida.

Métodos: Se evaluó la capacidad de la dexametasona para inducir apoptosis como agente único o en combinación con el Compuesto 2, pomalidomida, o lenalidomida. La inducción de apoptosis se midió usando Caspase-Glo en células de mieloma múltiple resistentes a lenalidomida (H929-1051). La dexametasona se dispensó en 20 concentraciones, usando un dispensador acústico. Los artículos de prueba se añadieron como concentraciones únicas en los pocillos de dexametasona con un dispensador digital Hewlett-Packard D300. Las concentraciones finales de los compuestos para el ensayo fueron: dexametasona (0,8 μ M a 0,00002 μ M), lenalidomida (1 μ M), pomalidomida (0,1 μ M), y Compuesto 2 (0,001, 0,01 o 0,1 μ M). Las células se dispensaron en las placas de ensayo con un dispensador Multidrop, y se obtuvieron placas duplicadas para el ensayo. La lectura de apoptosis se tomó 72 h después del tratamiento con el compuesto usando ensayos Caspase-Glo 3/7 y CellTiter-Glo. La luminiscencia de Caspase-Glo 3/7 se normalizó a la luminiscencia de CellTiter-Glo, para tener en cuenta las diferencias en el número de células. El número de veces de cambio de la muestra tratada se calculó de la siguiente manera: caspasa normalizada de la muestra tratada/promedio del control de DMSO normalizado.

Resultados: La actividad de apoptosis de la dexametasona sola o en combinación con lenalidomida, pomalidomida o Compuesto 2 se midió mediante la inducción de caspasa-3. El Compuesto 2 actuó en sinergia con la dexametasona para reducir la viabilidad celular, y potenció la capacidad apoptótica de la dexametasona de manera dependiente de la concentración. El inicio de la actividad de la dexametasona se desplazó 1 log en presencia del Compuesto 2.

Conclusión: El Compuesto 2 potencia la actividad apoptótica de la dexametasona, lo que indica el potencial de reducir la dosis de dexametasona cuando se usa en combinación con el Compuesto 2 en la clínica.

Como se muestra en la Figura 13, se observa una sinergia bidireccional drástica después del tratamiento con el Compuesto 2 en combinación con dexametasona. Tan sólo 10 nM de dexametasona mejora la capacidad de destrucción celular del Compuesto 2, y concentraciones bajas a subnanomolares del Compuesto 2 potencian los efectos apoptóticos de la dexametasona.

Ejemplo 13: El Compuesto 2 mejora la actividad antitumoral de las células inmunes de donantes humanos sanos

Experimentos de cocultivo con células mononucleares de sangre periférica y células K562. Métodos: Preparación de célula mononuclear de sangre periférica humana (PBMC): Las PBMC aisladas de donantes sanos se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10 % de FBS a una densidad de 1×10^6 células/ml.

Cultivo celular: Las células K562 se mantuvieron en fase logarítmica, y la densidad celular y la viabilidad se monitorizaron mediante exclusión con azul tripán usando el analizador de viabilidad celular Vi-CELL® XR (Beckman Coulter, Brea, CA).

Procedimientos de ensayo: Las PBMC humanas recién aisladas se cultivaron con IL-2 recombinante a una concentración de 20 unidades/ml durante 72 h. Después, las células mononucleares de sangre periférica se

centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI completo recién preparado, a 2×10^6 células/ml. Las células se trataron entonces con DMSO o compuestos a las concentraciones indicadas, y se incubaron durante 72 horas adicionales. Las PBMC se lavaron dos veces en medio RPMI completo reciente antes del cocultivo. Las células K562 se resuspendieron a una densidad celular de 1×10^6 /ml, y se tiñeron con $1 \mu\text{M}$ CellTrace CFSE según las instrucciones del fabricante. Las células K562 marcadas se sembraron entonces en una placa de fondo redondo de 96 pocillos, a razón de 1×10^5 células/pocillo. Las células mononucleares de sangre periférica se transfirieron entonces a la misma placa de 96 pocillos en una relación de 1:15, por triplicado, y se incubaron a 37°C durante 4 h. La lisis de células diana específica por parte de las células PBMC se midió usando anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (PI) según las instrucciones del fabricante, y las muestras se analizaron en el escáner FACS Array. En cada ensayo se incluyeron, como controles, células K562 no marcadas, células K562 marcadas con CellTrace CFSE, y células K562 no tratadas marcadas con Anexina V-FITC y PI.

Ensayos de cocultivo con células mononucleares de sangre periférica humanas tratadas con compuestos y líneas celulares de mieloma no tratadas. Métodos: Cultivo celular. Todas las líneas de células de mieloma se mantuvieron en fase logarítmica, y la densidad celular y la viabilidad se monitorizaron mediante exclusión con azul tripán usando el analizador de viabilidad celular Vi-CELL XR.

Procedimiento de ensayo de tratamiento de PBMC. Placas de noventa y seis pocillos se recubrieron previamente con anticuerpo anti-CD3 (OKT3, $3 \mu\text{g}/\text{ml}$), y se incubaron a 4°C durante la noche antes del inicio del experimento. Las PBMC de donantes congeladas se descongelaron a 37°C durante 2 minutos en medio RPMI con 10 % de FBS, y los recuentos y viabilidad celulares se midieron en Vi-CELL® (Beckman Coulter). Las células mononucleares de sangre periférica se lavaron y diluyeron a 1×10^6 células/ml, y se dispensaron en las placas tratadas con compuestos en un volumen total de $200 \mu\text{l}$. Las células se incubaron con compuestos durante 2 h antes de transferirlas a placas recubiertas con anticuerpo anti-CD3, y se incubaron durante 72 h adicionales a 37°C . Después de 72 h, las PBMC se centrifugaron, y las células se lavaron dos veces en medio RPMI + 10 % FBS. Las líneas celulares de MM no tratadas (H929 y H929-1051) se marcaron con CellTrace CFSE según las instrucciones del fabricante, y se resuspendieron a una concentración total de $0,1 \times 10^6$ células/ml en una placa de 96 pocillos con fondo en U en un volumen total de $100 \mu\text{l}$. Las células mononucleares de sangre periférica se contaron y se añadieron a las células de MM en una relación diana:efectora (T:E) de 1:5. Después de 24 horas de cocultivo, la lisis de células diana específica se midió por PBMC usando Anexina V-AF647 y 7-AAD según las instrucciones del fabricante, y las muestras se procesaron en el citómetro Attune NxT (Thermo Fisher).

Procedimiento de ensayo de tratamiento de células PBMC y MM. Placas de noventa y seis pocillos se recubrieron previamente con anticuerpo anti-CD3 (OKT3, $3 \mu\text{g}/\text{ml}$), y se incubaron a 4°C durante la noche antes del inicio del experimento. Las PBMC de donantes congeladas se descongelaron a 37°C durante 2 minutos en medio RPMI con 10 % de FBS, y los recuentos y viabilidad celulares se midieron en el analizador Vi-CELL. Las células mononucleares de sangre periférica se lavaron y diluyeron a 1×10^6 células/ml, y se dispensaron en las placas tratadas con compuestos en un volumen total de $200 \mu\text{l}$. Las células se incubaron con compuestos durante 2 h antes de transferirlas a placas recubiertas con anti-CD3, y se incubaron durante 72 h adicionales. Al mismo tiempo, las líneas celulares de MM (NCI-H929, H929-1051, OPM2, OPM2-P10) se diluyeron hasta una concentración final de $0,1 \times 10^6$ células/ml y se marcaron con CellTrace CFSE según las instrucciones del fabricante. Después, las líneas celulares de mieloma múltiple se dispensaron en placas tratadas con el compuestos en un volumen total de $200 \mu\text{l}$, y se incubaron durante 72 h. Después de 72 h, las células PBMC y de MM se contaron y se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo en U en una relación T:E final de 1:5. Después de 24 h de cocultivo, la lisis de células diana específica se midió por células PBMC usando Anexina V-AF647 y 7-AAD según las instrucciones del fabricante, y las muestras se procesaron en el citómetro Attune NxT.

Resultados. Se usó el modelo de cocultivo para determinar los efectos directos del Compuesto 2 sobre la actividad antitumoral de las PBMC tomadas de donantes sanos. El tratamiento con el Compuesto 2 de las PBMC activadas por IL-2 indujo la muerte de células K562 no tratadas de una manera dependiente de la concentración (Figura 14, panel derecho). Las PBMC tratadas con el Compuesto 2 ($\text{CI}_{50} = 5,9 \text{ pM}$) fueron ~600 veces más potentes que las tratadas con pomalidomida (POM; $\text{CI}_{50} = 0,004 \mu\text{M}$) y ~2600 veces más potentes que las tratadas con lenalidomida (LEN; $\text{CI}_{50} = 0,02 \mu\text{M}$) para lograr una eliminación directa del 50 % de células K562. Aunque el Compuesto 2 fue más potente que lenalidomida y pomalidomida, la magnitud de la respuesta fue similar entre los compuestos (Figura 14, panel derecho).

Se examinaron más a fondo los efectos del Compuesto 2 sobre la actividad celular anti-MM de las PBMC incubadas con el Compuesto 2 en líneas celulares que mostraban el fenotipo de resistencia, a fin de compararlas con la respuesta en células sensibles. En un modelo de co-cultivo diferente, las células PBMC donantes se pretrataron con Compuesto 2, lenalidomida o pomalidomida durante 2 h antes de ser cultivadas en placas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 durante 72 h. Las PBMC activadas con anticuerpo anti-CD3 tratadas con Compuesto 2 demostraron un aumento dependiente de la concentración en la lisis de células tumorales de líneas celulares de MM sensibles a lenalidomida no tratadas (NCI-H929; $\text{CI}_{50} = 0,005 \mu\text{M}$) y resistentes a lenalidomida (H929-1051; $\text{CI}_{50} = 0,0002 \mu\text{M}$) en un grado similar (Figura 15). El Compuesto 2 fue más potente que lenalidomida y pomalidomida con respecto a la reducción del porcentaje de células de MM viables. Se observó un nivel similar de eliminación de células tumorales por parte de las PBMC frente a las células tumorales cocultivadas sensibles y

resistentes a lenalidomida, lo que demuestra que las PBMC estaban preparadas para destruir células tumorales independientemente de su fenotipo de resistencia.

Debido a que la preincubación de células inmunes con el Compuesto 2 mejoró la dianización y lisis de las células de MM, también se exploró el efecto de la preincubación de células de MM con el Compuesto 2 sobre su susceptibilidad a la muerte inmunomediada (Figura 16, Tabla 12). Cuatro líneas celulares de MM y las PBMC activadas con anticuerpo anti-CD3 se preincubaron por separado con el Compuesto 2, lenalidomida o pomalidomida durante 72 h. Cuando las PBMC activadas con anticuerpo anti-CD3 y las líneas de MM se pretrataron con el Compuesto 2, lenalidomida o pomalidomida, seguido de un cocultivo, los efectos sobre la lisis de células de MM inducida por PBMC se potenciaron tanto en la potencia como en la magnitud de la respuesta de muerte. Al comparar los valores de CI_{50} de cultivos de células de MM sencillos con los cocultivos de células inmunes y tumorales, el Compuesto 2 mejoró la eliminación de las células NCI-H929 en -7000 veces, y mejoró la eliminación de las células H929-1051 en -6000 veces. En el caso de la línea celular OPM2-P10 resistente a pomalidomida, el tratamiento de las células de MM con el Compuesto 2 mejoró la muerte inmunomediada en -3000 veces (Tabla 12).

Tabla 12: Muerte celular inmunomediada en líneas celulares de mieloma múltiple en cultivos individuales frente a cocultivos

Línea celular de mieloma múltiple	Condiciones de cultivo	Muerte celular inmunomediada CI_{50} (μ M)		
		Lenalidomida	Pomalidomida	Compuesto 2
NCI-H929	Sencillo	> 10	> 10	0,5810
	Co-cultivo	0,3173	0,0444	8,702e-005
H929-1051	Sencillo	> 10	> 10	0,5753
	Co-cultivo	0,8782	0,0713	0,0001
OPM2	Sencillo	> 10	0,6273	0,0003
	Co-cultivo	1,722	0,1685	9,361e-005
OPM2-P10	Sencillo	> 10	> 10	> 10
	Co-cultivo	8,094	1,181	0,0031
RPMI-8226	Sencillo	> 10	> 10	0,0134
	Co-cultivo	0,1245	0,0676	8,387e-005

CI_{50} = concentración que da como resultado la muerte del 50 % de células.

Conclusión: Las PBMC tratadas con el Compuesto 2 indujeron la lisis tumoral de las líneas celulares K562 y MM no tratadas en la misma medida que la observada con lenalidomida y pomalidomida, aunque con mucha mayor potencia. Además, la eliminación de células tumorales mejoró considerablemente si tanto las PBMC como las líneas celulares de MM se trataron previamente con el Compuesto 2, lo que indica que además de sus potentes efectos autónomos sobre las células, el Compuesto 2 también puede mejorar la inmunogenicidad de las líneas celulares de MM. La combinación de los potentes efectos inmunogénicos y autónomos sobre las células en células de MM, además de sus propiedades inmunomoduladoras, hacen del Compuesto 2 un candidato potencial para la clínica.

Ejemplo 14: Efecto del Compuesto 2 en combinación con daratumumab sobre el mieloma múltiple

Daratumumab, un anticuerpo anti-CD38 aprobado para el tratamiento del mieloma múltiple, ejerce su actividad antimieloma a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Se evaluó el efecto del Compuesto 2 o pomalidomida en combinación con daratumumab en líneas celulares de MM.

Ensayo de ADCC: El efecto del Compuesto 2 o pomalidomida sobre la ADCC mediada por daratumumab se evaluó in vitro mediante citometría de flujo en un panel de líneas celulares de MM. Las células NK se cultivaron durante la noche en un medio de cultivo NK que contenía 10 U/ml de IL-2 humana recombinante antes del inicio del ensayo. Las células NK se lavaron y se resuspendieron nuevamente en medio de cultivo de células NK a $3,75 \times 10^6$ células/ml. Las células de MM se trataron previamente con concentraciones subletales de Compuesto 2 o pomalidomida durante 72 h antes de su uso en el ensayo de ADCC. Las células de MM se lavaron y marcaron con el colorante de proliferación y seguimiento celular Tag-it Violet™ según las instrucciones del fabricante, seguido de una resuspensión en medio de cultivo NK a una concentración de $0,75 \times 10^6$ células/ml. El ensayo de ADCC se realizó por triplicado con una relación efector a tumor de 10:1 en una placa de 96 pocillos. Las células de MM (10 μ l) se mezclaron con 10 μ l de concentración 2x de daratumumab en los pocillos antes de añadir 20 μ l de células NK. Los co-cultivos se incubaron a 37 °C durante 3 h, seguido de la adición de 50 μ l de disolución de 7-AAD a temperatura ambiente durante 15 minutos. El análisis se realizó en un citómetro de flujo BD Celesta.

Ensayo de ADCP: El efecto del Compuesto 2 o pomalidomida sobre la ADCP mediada por daratumumab se determinó en un panel de líneas celulares de MM. Los monocitos se sembraron en una placa de 96 pocillos a 40.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl de medio AIM-V completo que contenía 50 ng/ml de M-CSF. Las células se dejaron sedimentar en la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de colocarlas en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 9 días, para permitir la diferenciación en macrófagos. El medio de cultivo se reponía con medio completo reciente cada 3-4 días. En la mañana del ensayo de ADCP, los macrófagos se privaron de suero durante 2-4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ antes de cocultivarlos con las células de MM. Las células de MM se trataron previamente con concentraciones subletales del Compuesto 2 o pomalidomida durante 72 h. El día del ensayo, las células de MM se lavaron con PBS y se marcaron con CFSE durante 15 minutos. La reacción se detuvo con un volumen igual de 20% de FBS. Las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio AIM-V a $1,6 \times 10^6$ células/ml. Después, se mezclaron 50 µl de células de MM con 50 µl de daratumumab 2 µg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de añadirlos a los macrófagos privados de suero. Cada condición se analizó por triplicado. El volumen final del ensayo fue 200 µl, que contenía 10 % de suero humano con una relación efector-diana de 2:1. La placa se centrifugó a 500 rpm durante 1 minuto, y después se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 3 h. Al final de la incubación, la placa se lavó con 100 µl de PBS, y las células restantes se tiñeron con anti-CD14 y anti-CD138 para identificar los macrófagos y las células de MM, respectivamente. La placa se lavó, y los pocillos se llenaron con 100 µl de PBS. Los macrófagos se desprendieron del fondo de los pocillos con la adición de 50 µl de tripsina al 0,25 %. Las muestras se neutralizaron con la adición de 50 µl de medio AIM-V completo. Las muestras se analizaron en citómetro de flujo. El porcentaje de fagocitosis se determinó dividiendo las células doblemente positivas para CFSE/CD14 entre el número total de células CD14+, multiplicado por 100.

Resultados: El tratamiento de células de MM con el Compuesto 2 y pomalidomida dio como resultado un aumento de la expresión de CD38 dependiente de la dosis (Figura 17). El grado de expresión de CD38 fue mayor con el Compuesto 2, y se produjo a concentraciones más bajas en comparación con pomalidomida. Células de MM +/- pretratamiento con Compuesto 2 o pomalidomida se evaluaron en ensayos de ADCC con daratumumab. Las células de MM tratadas con el Compuesto 2 demostraron un mayor grado de lisis tumoral con daratumumab en comparación con las células no tratadas (Figura 18). Las células tratadas con el Compuesto 2 también fueron más sensibles a la ADCC mediada por daratumumab en comparación con las células tratadas con pomalidomida. También se evaluó la capacidad del Compuesto 2 y la pomalidomida para modular la ADCP mediada por daratumumab. Las células de MM tratadas con el Compuesto 2 fueron más sensibles a la ADCP mediada por daratumumab en comparación con las células no tratadas y las tratadas con pomalidomida (Figura 19). Sólo una línea celular analizada, ARH-77, no mostró una mejora de ADCP ni con el Compuesto 2 ni con la pomalidomida, pero demostró una mejora de ADCC con el Compuesto 2.

Conclusión: El Compuesto 2 aumenta la expresión de CD38 en células de MM, lo que da como resultado un aumento de ADCC y ADCP mediadas por daratumumab en comparación con pomalidomida o células no tratadas. Estos datos sugieren que la combinación de daratumumab con el Compuesto 2 puede ser más eficaz en el tratamiento del MM en comparación con la combinación con pomalidomida o daratumumab solo.

Ejemplo 15: Efecto del Compuesto 2 en combinación con inhibidores del proteasoma sobre el mieloma múltiple

Veinticuatro horas antes del tratamiento con un inhibidor del proteasoma y un compuesto de prueba, se dividió una cantidad adecuada de células a una concentración de $0,2 \times 10^6$ /ml en medio reciente, para permitir el crecimiento exponencial. El día del tratamiento, los compuestos se solvataron recientemente en DMSO. Los inhibidores del proteasoma bortezomib o carfilzomib se diluyeron y se añadieron a medios de cultivo precalentados a las concentraciones de trabajo finales de 150 nM o 300 nM para bortezomib y 300 nM o 550 nM para carfilzomib. Las concentraciones del inhibidor del proteasoma se determinaron en función de las concentraciones clínicas de C_{max}, así como de estudios previos en cada línea celular que determinaron la duración y la concentración de PI necesarias para inhibir una cantidad específica de actividad del proteasoma β5. Se contaron las células, y se colocó una cantidad apropiada en un medio que contenía inhibidor del proteasoma, y se mezcló completamente. Después de la incubación durante 1 hora a 37 °C, 5 % de CO₂, las células se lavaron dos veces con 40 ml de medio completo, para eliminar el inhibidor del proteasoma. Se analizaron alícuotas de cada tratamiento de proteasoma para confirmar el grado de inhibición de las subunidades β5, β2 y β1. Las células se resuspendieron a $0,1 \times 10^6$ /ml, y se sembraron a 100 µl/pocillo en un recipiente de cultivo nuevo que contenía titulaciones triplicadas del Compuesto 2 o pomalidomida. Las células sembradas se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂, durante el resto del experimento, hasta 72 h. Cada 24 h, se monitorizó la inhibición del proteasoma mediante el ensayo Cell-Based Proteasome-Glo. La proliferación y la apoptosis se midieron a las 72 h mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con APC Anexina-V y 7-AAD, para enumerar el número de células viables que quedaban en el cultivo.

Resultados. Se estableció un ensayo celular in vitro para imitar la farmacocinética (PK) y la farmacodinámica (PD) clínicas de la exposición a los inhibidores del proteasoma bortezomib y carfilzomib. El modelo emplea exposiciones cortas al inhibidor del proteasoma, seguido de una eliminación completa del compuesto para dosificar las células con concentraciones clínicamente relevantes del inhibidor del proteasoma, logrando al mismo tiempo el rápido

aclareamiento observado in vivo. Además, se puede lograr un nivel comparable de inhibición del proteasoma $\beta 5$ en todas las líneas celulares. Este modelo se usó para evaluar los efectos de la combinación del Compuesto 2 en combinación con bortezomib o carfilzomib en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple y de leucemia de células plasmáticas (OPM2.P10 resistente a pomalidomida, RPMI.8226, y líneas de leucemia de células plasmáticas L363 y JJN-3).

Bortezomib y el Compuesto 2 demostraron un efecto combinado en ambas líneas de MM analizadas, OPM2.P10 y RPMI.8226, así como en una de las líneas celulares de leucemia de células plasmáticas, JJN-3. No se pudieron evaluar los efectos de la combinación en la línea celular L363, ya que bortezomib no tuvo actividad de agente único sobre la viabilidad celular en las condiciones de este ensayo in vitro (Figura 20 y Figura 21A).

Aunque los tratamientos con carfilzomib entre experimentos fueron variables en el porcentaje de muerte celular que lograron en el transcurso de los tratamientos de 1 hora, se demostraron efectos de combinación con el Compuesto 2 en las 4 líneas celulares (Figura 21B).

Conclusión: Sorprendentemente, el Compuesto 2 mantiene su capacidad de exterminar células a niveles clínicamente relevantes de inhibición del proteasoma. La combinación del Compuesto 2 con bortezomib o carfilzomib demostró un aumento de la apoptosis y la actividad antiproliferativa contra las células de MM.

Ejemplo 16: Efecto del Compuesto 2 en combinación con inhibidores de la histona desacetilasa, agentes de quimioterapia, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de Mcl-1, inhibidores de BET, o inhibidores de LSD-1.

El efecto de combinar el tratamiento con el Compuesto 2 e inhibidores de moléculas pequeñas con diversos mecanismos se evaluó en un panel de líneas celulares MM. Se seleccionaron trece inhibidores de tipo molécula pequeña para estudios de combinación con el Compuesto 2 en función de su actividad preclínica y/o contra el MM. Las líneas celulares H929-1051, KMS11, KMS-12PE, L363, OPM-P10 y RPMI8226 se seleccionaron para este estudio para representar los diferentes grupos de agrupamiento genético a lo largo de líneas celulares MM. Las concentraciones de compuesto para los tratamientos combinados se seleccionaron en el intervalo de 1 log por encima y 2 log por debajo de la CL_{50} del agente único. Los agentes de combinación se dosificaron en una curva de dosis-respuesta (DRC) de 6 puntos a una dilución 1:3, el Compuesto 2 se dosificó en una DRC de 10 puntos, también a una dilución 1:3. Los experimentos de combinación se realizaron dos veces, cada vez con datos replicados en placas separadas. Los compuestos se dispusieron previamente en los pocillos apropiados de placas de 384 pocillos usando un dispensador acústico. Todas las líneas celulares de MM se cultivaron en una incubadora a 37 °C con 5% de CO_2 usando el medio de cultivo celular indicado que contenía 1x penicilina-estreptomicina. Las células se añadieron a las placas de 384 pocillos que contenían los compuestos usando un dispensador de reactivos Multidrop Combi, y se dejaron incubar durante 3 días a 37 °C con 5 % de CO_2 . Después de 3 días, se evaluó el nivel de contenido de ATP en las células mediante Cell Titer-Glo medido en un detector de luminiscencia (PerkinElmer Envision).

Se usó el procedimiento del agente único más alto (HAS) para detectar sinergia en los datos de la curva de respuesta a la dosis. Las combinaciones se analizaron desde una perspectiva de la superficie de respuesta. Un marco estadístico (Van Der Borgh, K., et al., BGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe null model for prediction of the expected combined effect compatible with partial agonism and antagonism; Scientific Reports, 7 (1), 17935-1-17935-9 (2017) se incorporó al análisis en la parte superior del modelo nulo HAS con dos ensayos estadísticos: 1) la superficie de respuesta completa difiere del modelo nulo, 2) un único pocillo difiere del modelo nulo.

Resultados: El efecto del tratamiento con el Compuesto 2 en combinación con inhibidores de moléculas pequeñas se evaluó en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple. Se seleccionó el compuesto 2 en combinación con 14 compuestos, y se calculó la sinergia en todos los pocillos para 6 líneas celulares. La dexametasona y el etopósido mostraron una sinergia significativa en combinación con el Compuesto 2 en cinco de las seis líneas celulares analizadas (Figura 22). La combinación del Compuesto 2 con inhibidores de BET (4-[2-(ciclopropilmetoxi)-5-(metanosulfonil)fenil]-2-metilisoquinolin-1(2H)-ona (Compuesto D), birabresib y GSK525762A) también demostró actividad sinérgica en las células de MM, con diferentes grados de sinergia entre los tres inhibidores. La combinación del Compuesto 2 con AMG176 (inhibidor de MCL-1) mostró actividad sinérgica en tres líneas celulares (KMS11, KMS12-PE, L363), mientras que la combinación del Compuesto 2 con ACY241 y panobinostat (inhibidores de la histona desacetilasa) fue sinérgica en L363/OPM2-P10 y L363/H929-1051, respectivamente. El Compuesto 2 en combinación con 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo (Compuesto E) fue sinérgico en las células L363 y KMS12-PE. MIK665, un inhibidor de MCL-1, fue el único compuesto que no mostró una sinergia significativa en las 6 líneas celulares de MM analizadas.

Conclusiones El tratamiento con el Compuesto 2 en combinación con 12 de las 14 moléculas pequeñas demostró actividad sinérgica en al menos una o más de las líneas celulares de MM analizadas. La combinación con seis de los compuestos mostró sinergia en al menos 3 líneas celulares de MM analizadas (Figura 22). Estos datos sugieren que el tratamiento de combinación con el Compuesto 2 con los inhibidores de molécula pequeña ensayados representa un paradigma de tratamiento potencial para MM, incluidos algunos con actividad sinérgica.

Ejemplo 17: Actividad antitumoral in vivo del Compuesto 2 solo y en combinación con dexametasona.

Métodos: El estudio de xenoinjerto se realizó con ratones SCID hembra portadores de tumores de mieloma múltiple/plasmocitoma NCI-H929 (H929-1051) resistentes a lenalidomida. Se inocularon a ratones SCID hembra por vía subcutánea con células H929-1051 en la región del flanco por encima de la pata trasera derecha. Después de la inoculación de los animales, se dejó que los tumores crecieran hasta aproximadamente 100 mm³ antes de la aleatorización. El día 13 después de la inoculación de células tumorales, los ratones con tumores H929-1051 de entre 79 y 157 mm³ se agruparon y se asignaron aleatoriamente a diversos grupos de tratamiento. El Compuesto 2 se formuló en 2 % de HPMC en agua (como suspensión). La dexametasona se formuló en 0,5 % de CMC/0,25 % de Tween 80 en agua desionizada. El Compuesto 2 (0,1 mg/kg) y la dexametasona (0,5 mg/kg) se administraron por vía oral una vez al día durante todo el estudio a partir del día 13 después de la inoculación de las células tumorales. En el grupo de combinación, los animales recibieron el Compuesto 2 (0,1 mg/kg/día) y dexametasona (0,5 mg/kg/día) simultáneamente durante todo el estudio a partir del día 13 después de la inoculación de las células tumorales. Los tumores se midieron dos veces por semana usando calibradores, y los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula $W^2 \times L / 2$. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o bidireccional. Los cálculos de sinergia se realizaron usando el método de producto fraccionado.

Resultados: El tratamiento con el agente único Compuesto 2 inhibió significativamente ($p < 0,01$) (-34%) el crecimiento tumoral de mieloma múltiple H929-1051. El tratamiento con dexametasona como agente único inhibió marginalmente (-20%) el crecimiento tumoral del xenoinjerto H929-1051. El tratamiento con el Compuesto 2 a 0,1 mg/kg, administrado en combinación con dexametasona a 0,5 mg/kg, produjo una disminución significativa ($p < 0,0001$) del volumen tumoral en comparación con el control del vehículo, mostrando una reducción del volumen tumoral de 84 %. En un ANOVA bidireccional con prueba posterior de Bonferroni, esta actividad antitumoral combinada fue significativamente mejor que el Compuesto 2 solo (84 % frente a 34 % TVR; $p < 0,0001$) o la dexametasona sola (84 % frente a 20 % TVR; $p < 0,0001$). Usando el método del producto fraccionado, se determinó que la actividad antitumoral combinada del Compuesto 2 a 0,1 mg/kg y dexametasona a 0,5 mg/kg era sinérgica para disminuir el volumen tumoral. (Figura 23)

Conclusión: El Compuesto 2 en combinación con dexametasona exhibió sinergia en la reducción del volumen tumoral en el modelo de tumor de mieloma múltiple/plasmocitoma NCI-H929, lo que indica que el tratamiento combinado del Compuesto 2 y dexametasona mostró actividad antitumoral sinérgica en un modelo de MM resistente a lenalidomida. El Compuesto 2 potencia la actividad apoptótica de la dexametasona, lo que indica el potencial de reducir la dosis de dexametasona cuando se usa en combinación con el Compuesto 2 en la clínica.

Ejemplo 18: Actividad antitumoral in vivo del Compuesto 2 solo y en combinación con bortezomib.

Métodos: El estudio de xenoinjerto se realizó con ratones SCID hembra portadores de tumores de mieloma múltiple/plasmocitoma NCI-H929 (H929-1051) resistentes a lenalidomida. Se inocularon a ratones SCID hembra por vía subcutánea con células H929-1051 en la región del flanco por encima de la pata trasera derecha. Después de la inoculación de los animales, se dejó que los tumores crecieran hasta aproximadamente 500 mm³ antes de la aleatorización. El día 31 después de la inoculación de células tumorales, los ratones con tumores H929-1051 de entre 366 y 535 mm³ se agruparon y se asignaron aleatoriamente a diversos grupos de tratamiento. El Compuesto 2 se formuló en 2 % de HPMC en agua (como suspensión). Bortezomib se formuló en DMSO al 1 % en disolución salina (como disolución). El Compuesto 2 (1 mg/kg) se administró por vía oral una vez al día durante 3 días consecutivos a partir del día 31 después de la inoculación de las células tumorales. Bortezomib (1 mg/kg) se administró en dosis única por vía intravenosa el día 31 después de la inoculación de las células tumorales. En el grupo de combinación, los animales recibieron el Compuesto 2 (1 mg/kg/día) por vía oral los días 31-33, y se administró bortezomib por vía intravenosa como dosis única el día 31. El día 31 se administró bortezomib 1 h antes de la primera dosis del Compuesto 2. Los tumores se midieron dos veces por semana usando calibradores, y los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula $W^2 \times L / 2$. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó el punto final predeterminado de aproximadamente 2000 mm³. El análisis estadístico se realizó hasta el día 50 mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o bidireccional. Los cálculos de sinergia se realizaron usando el método de producto fraccionado.

Resultados: El tratamiento con el agente único Compuesto 2, cuando se administró una vez al día durante 3 días consecutivos (qdx3) los días 31-33 después de la inoculación de células tumorales, inhibió significativamente ($p < 0,0001$) (-44 %) el crecimiento del tumor de mieloma múltiple H929-1051 el día 50. Con el tiempo, los tumores animales tratados con el Compuesto 2 (1 mg/kg) crecieron y alcanzaron aproximadamente 2000 mm³ el día 58. El tratamiento con bortezomib como agente único, administrado en una dosis única el día 31, inhibió significativamente ($p < 0,0001$) (-60 %) el crecimiento del tumor del xenoinjerto H929-1051 el día 50. Con el tiempo, los tumores animales tratados con bortezomib (1 mg/kg) crecieron y alcanzaron aproximadamente 2000 mm³ el día 66. El tratamiento con el Compuesto 2 a 1 mg/kg (qdx3) cuando se administró en combinación con bortezomib a 1 mg/kg (dosis única) produjo una disminución significativa ($p < 0,0001$) en el volumen tumoral en comparación con el control del vehículo, mostrando una reducción del volumen tumoral del 98 % el día 50. En un ANOVA bidireccional con prueba posterior de Bonferroni, esta actividad antitumoral combinada fue significativamente mejor

que el Compuesto 2 solo (98 % frente a 44 % TVR; $p < 0,0001$) o bortezomib solo (98 % frente a 60 % TVR; $p < 0,0001$). Usando el método del producto fraccionado, se determinó que la actividad antitumoral combinada del Compuesto 2 a 1 mg/kg y dexametasona a 1 mg/kg era sinérgica para disminuir el volumen tumoral. Sorprendentemente, el día 53 de la inoculación de células tumorales, 7 de los 9 animales tratados con la combinación del Compuesto 2 y bortezomib quedaron libres de tumores y permanecieron libres de tumores. (Figura 24)

Conclusión: El Compuesto 2 en combinación con bortezomib mostró sinergia en la reducción del volumen tumoral en el modelo de tumor de plasmocitoma NCI-H929 resistente a lenalidomida, y sorprendentemente produjo animales libres de tumores.

Ejemplo 19: Estudio clínico de fase 1 - mieloma múltiple recidivante y refractario

Se lleva a cabo un estudio multicéntrico, abierto, de fase 1, para evaluar la seguridad, la farmacocinética y la eficacia preliminar del Compuesto 2 en combinación con dexametasona en sujetos con mieloma múltiple recidivante y refractario (MMRR).

Objetivos: El objetivo principal del estudio es evaluar la farmacocinética (PK), la seguridad/tolerabilidad y definir la dosis máxima tolerada (MTD)/dosis recomendada de la Parte 2 (RP2D) del Compuesto 2 en combinación con dexametasona junto con un mínimo de dos programas de dosificación del Compuesto 2. El objetivo secundario es evaluar la eficacia preliminar del Compuesto 2 en combinación con dexametasona.

Diseño del estudio: Se trata de un estudio internacional, multicéntrico y abierto, de fase 1, para evaluar la seguridad, la farmacocinética/farmacodinámica y la eficacia preliminar del Compuesto 2 en combinación con dexametasona en sujetos con RRMM. Todos los sujetos elegibles deben haber fracasado, ser intolerantes o no ser de otro modo candidatos a las terapias disponibles que se sabe que confieren beneficios clínicos en RRMM.

Este estudio se lleva a cabo en dos partes: La Parte 1 evalúa la farmacocinética/farmacodinámica y la seguridad de dosis crecientes del Compuesto 2 con dexametasona en dosis estándar concurrente, y determina la MTD/RP2D para la combinación cuando se administra según un mínimo de dos programas de dosificación diferentes. La Parte 2 consiste en una cohorte o cohortes de expansión de un solo brazo del Compuesto 2 en la RP2D más dexametasona para ambos programas de dosificación. Además de las evaluaciones de seguridad, farmacocinética y farmacodinámica, todos los sujetos se someten a evaluaciones de respuesta mensuales según los Criterios de Respuesta Uniformes del Grupo de Trabajo Internacional Sobre Mieloma (IMWG) (Rajkumar et al., Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Blood, 2011, 117(18):4691-5; Kumar et al., International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma, Lancet Oncology, 2016, 17:e328-46), y puede continuar el tratamiento del estudio hasta la progresión de la enfermedad, toxicidad intolerable, o decisión del médico o del sujeto de interrumpir el tratamiento del estudio.

El estudio se lleva a cabo de conformidad con los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano/Buenas Prácticas Clínicas (BPC) del Consejo Internacional de Armonización (ICH) y los requisitos reglamentarios aplicables.

Parte 1 (Aumento de la dosis): Cohortes de sujetos con RRMM reciben dosis crecientes del Compuesto 2 más una dosis fija de dexametasona (40 mg/dosis; 20 mg/dosis en sujetos ≥ 75 años) para evaluar su seguridad, MTD/RP2D y los perfiles de PK/PD. En la Parte 1 se evalúan al menos dos programas de dosificación diferentes, el primero consiste en 10 días consecutivos de dosificación una vez al día (QD), seguido de 4 días sin tratamiento $\times 2$ cada ciclo de 28 días (denominado programa 20/28). El segundo programa consiste en una dosificación dos veces al día (BID) durante 3 días consecutivos, seguido de 11 días sin tratamiento del estudio $\times 2$ cada ciclo (denominado programa 6/28). Las cohortes de dosis iniciales reciben 0,1 mg/día del Compuesto 2 una vez al día (QD) en el programa 20/28 y 0,2 mg dos veces al día (BID) en el programa 6/28. La asignación de sujetos es realizada por el Patrocinador en función de la disponibilidad de espacios para sujetos para uno o ambos programas. No se permite cambiar entre programas de dosificación. Se pueden explorar programas de dosificación adicionales (por ejemplo, 5 días de dosificación del Compuesto 2, seguido de 9 días sin tratamiento $\times 2$, o 7 días de dosificación, seguido de 7 días sin tratamiento $\times 2$ por ciclo de 28 días) según los términos de una enmienda del protocolo a la espera del resultado de la seguridad inicial y de los resultados de PK/PD en asociación con los programas 20/28 y 6/28.

Para todos los programas de dosificación, el Ciclo 1, Días 1-28, constituye el período de evaluación de toxicidad limitante de la dosis (DLT), a los efectos de la determinación de MTD. Los sujetos son evaluables para DLT si reciben la dosis prescrita del Compuesto 2 en al menos 16 de los 20 días de dosis del programa 20/28 y al menos 5 de los 6 días de dosis (10 dosis) del programa 6/28 en el Ciclo 1, o experimentan una DLT. Se reemplazan los sujetos no evaluables mediante DLT.

En cada programa, cohortes de tres o más sujetos reciben el Compuesto 2 a dosis que aumentan en incrementos del 100 % en cohortes sucesivas hasta la aparición de dos eventos adversos de Grado 2 emergentes del tratamiento que no se pueden atribuir de manera clara e incontrovertible a causas externas. Posteriormente, se producen incrementos de dosis que no deben superar el 50 % hasta que se produce una primera DLT. Se utiliza una metodología de aumento de dosis bayesiana mediante regresión logística después de la aparición de una primera DLT en cualquiera de los programas de dosificación, con la dosis asignada del Compuesto 2, la cantidad de dosis por día (QD frente a BID) y la cantidad de días de dosis consecutivos para cada programa (3 frente a 10) como covariables. La tasa de toxicidad diana para la combinación del Compuesto 2 más dexametasona es 20 % para todos los programas.

No se permite el aumento de dosis intrasujeto durante el período de evaluación de DLT; sin embargo, en el Ciclo 2 y posteriores, los sujetos sin signos de progresión de la enfermedad que toleren su dosis asignada del Compuesto 2 pueden (a discreción del investigador y en consulta con el monitor médico del estudio) aumentar al nivel de dosis más alto que se demuestre que es adecuadamente tolerado por al menos una cohorte de sujetos dentro del programa de dosificación asignado.

Parte 2 (Expansión de la cohorte): Una vez finalizada la Parte 1, se lleva a cabo un estudio de expansión de un solo brazo del Compuesto 2 más dexametasona en 20 sujetos por programa de dosificación, para evaluar más a fondo su seguridad, PD y eficacia en la RP2D y el programa.

Tras la determinación de la RP2D para el Compuesto 2 más dexametasona, también se puede iniciar en paralelo como parte de este protocolo una evaluación de la seguridad/tolerabilidad, la farmacocinética y la eficacia preliminar del Compuesto 2/dexametasona en combinación con otros agentes antimieloma de interés, por ejemplo anti-CD38, en una o más cohortes de sujetos con diferentes historias de tratamiento previo y/o características pronósticas.

Población de estudio: Se pueden inscribir sujetos ≥ 18 años de edad con MM que sean refractarios a su última línea de tratamiento, hayan fracasado, o sean intolerantes o no sean de otro modo candidatos a las terapias disponibles que se sabe que confieren beneficios clínicos a sujetos con enfermedad recidivante y refractaria, tengan un estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG PS) de 0-2, enfermedad medible y función adecuada de la médula ósea, renal y cardíaca. Se excluyen los sujetos con antecedentes de trasplante alogénico, MM no secretor u oligosecretor, leucemia de células plasmáticas o MM refractario primario (es decir, sin antecedentes de al menos una respuesta menor a un régimen de tratamiento previo).

Criterios de inclusión: Los sujetos deben cumplir los siguientes criterios para ser inscritos en el estudio:

1. El sujeto tiene ≥ 18 años de edad al momento de firmar el formulario de autorización (FCI).
2. El sujeto debe comprender y firmar voluntariamente un FCI antes de que se realice cualquier evaluación o procedimiento relacionado con el estudio.
3. El sujeto está dispuesto y es capaz de cumplir con el programa de visitas del estudio y otros requisitos del protocolo.
4. Puntuación del estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0, 1 o 2.
5. Los sujetos deben tener un diagnóstico documentado de MM y una enfermedad medible en el momento de la inscripción. La enfermedad medible se define como:
 - a. Cantidades de proteína M $\geq 0,5$ g/dl por sPEP, o
 - b. ≥ 200 mg/24 h de recolección de orina mediante uPEP, o
 - c. Niveles séricos de FLC > 100 mg/l (miligramos/litro) de cadena ligera involucrada y una relación kappa/lambda (κ/λ) anormal en sujetos sin proteína M sérica o de orina detectable, o
 - d. en el caso de sujetos con inmunoglobulina clase A (IgA), mieloma cuya enfermedad sólo se puede medir de forma fiable por medida cuantitativa de inmunoglobulina, un nivel sérico de IgA $\geq 0,50$ g/dl.
6. Todos los sujetos deben:
 - a. haber documentado progresión de la enfermedad en el día o dentro de los 60 días a partir de la última dosis de su último tratamiento para el mieloma, y

- b. han fracasado en el tratamiento con, son intolerantes a, o no son de otro modo candidatos a las terapias disponibles que se sabe que confieren beneficios clínicos a los sujetos con RRMM.

Nota: Las líneas de terapia previas deben incluir (como mínimo) un inhibidor del proteasoma y un agente modulador de cereblon, administrados individualmente (en cualquier orden) o juntos.

7. Los sujetos deben tener los siguientes valores de laboratorio:

- o Recuento absoluto de neutrófilos (RAN) $\geq 1,25 \times 10^9/l$ sin soporte de factor de crecimiento durante ≥ 7 días (≥ 14 días para pegfilgrastim).
- o Hemoglobina (Hgb) ≥ 8 g/dl.
- o Plaquetas (plt) $\geq 75 \times 10^9/l$ sin transfusión durante ≥ 7 días ($\geq 50 \times 10^9/l$ para sujetos con > 50 % de células plasmáticas en médula ósea).
- o Calcio sérico corregido $\leq 13,5$ mg/dl ($\leq 3,4$ mmol/l).
- o Aclaramiento de creatinina (CrCl) de 24 horas ≥ 45 ml/min.
- o AST/SGOT y ALT/SGPT $\leq 3,0 \times$ límite superior normal (LSN).
- o Bilirrubina sérica $\leq 1,5 \times$ LSN.
- o Ácido úrico $\leq 7,5$ mg/dl ($446 \mu\text{mol/l}$).
- o PT/INR $< 1,5 \times$ LSN, y tiempo de tromboplastina parcial (TTP) $< 1,5 \times$ LSN (para sujetos que no reciben anticoagulación terapéutica).

Nota: Los sujetos que reciben terapia para un evento tromboembólico que ocurrió >3 meses antes de la inscripción son elegibles siempre que estén en un régimen estable de anticoagulación con warfarina, heparina de bajo peso molecular u otro régimen terapéutico de anticoagulación aprobado.

8. Las mujeres en edad fértil (FCBP) deben:

- a. Tener dos pruebas de embarazo negativas verificadas por el investigador antes de comenzar la terapia del estudio. Debe aceptar continuar con las pruebas de embarazo durante el transcurso del estudio y después de suspender el Compuesto 2. Esto se aplica incluso si el sujeto practica abstinencia verdadera* del contacto heterosexual.
- b. Comprometerse a una abstinencia verdadera* del contacto heterosexual (que se debe revisar mensualmente y documentar en su origen) o aceptar usar, y poder cumplir con, dos formas fiables de anticoncepción sin interrupción, 28 días antes de comenzar el Compuesto 2, durante la terapia del estudio (incluso durante las interrupciones de la dosis), y durante 28 días después de la interrupción de la terapia del estudio.

Nota: Una mujer en edad fértil (FCBP) es una mujer que: 1) ha alcanzado la menarquia en algún momento, y 2) no se ha sometido a una histerectomía o una ooforectomía bilateral, o 3) no ha sido naturalmente posmenopáusica (la amenorrea después de la terapia contra el cáncer no descarta el potencial de concebir) durante al menos 24 meses consecutivos (es decir, ha tenido la menstruación en cualquier momento en los 24 meses consecutivos anteriores).

9. Los sujetos masculinos deben:

- a. Practicar abstinencia verdadera* (que se debe revisar mensualmente) o aceptar el uso de un preservativo durante el contacto sexual con una mujer embarazada o una mujer en edad fértil mientras participe en el estudio (incluso durante las interrupciones de la dosis) y durante al menos 3 meses después de la interrupción del Compuesto 2, incluso si se ha sometido a una vasectomía exitosa.

*La abstinencia verdadera es aceptable cuando ésta está en consonancia con el estilo de vida preferido y habitual del sujeto. La abstinencia periódica (por ejemplo, métodos de calendario, de ovulación, sintotérmicos, y posovulación) y el coitus interruptus (coito interrumpido) no son métodos anticonceptivos aceptables.

10. Los hombres deben aceptar abstenerse de donar esperma mientras tomen el Compuesto 2 y durante 90 días después de suspenderlo.

11. Todos los sujetos deben aceptar abstenerse de donar sangre mientras tomen el Compuesto 2 y durante 28 días después de suspenderlo.

Criterios de exclusión: La presencia de cualquiera de los siguientes factores excluye a un sujeto de la inscripción:

1. El sujeto tiene una condición médica significativa, una anomalía de laboratorio, o una enfermedad psiquiátrica que le impediría participar en el estudio.

2. El sujeto tiene alguna afección, incluida la presencia de anomalías de laboratorio, que coloca al sujeto en un riesgo inaceptable si participara en el estudio.

3. El sujeto tiene alguna afección que confunde la capacidad de interpretar los datos del estudio.

4. El sujeto tiene mieloma múltiple no secretor u oligosecretor.

5. El sujeto tiene leucemia de células plasmáticas o mielomatosis leptomeníngea activa.

6. El sujeto tiene amiloidosis sistémica de cadenas ligeras documentada o síndrome de polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y cambios en la piel (POEMS).

7. El sujeto tiene mieloma de inmunoglobulina clase M (IgM).

8. El sujeto tiene antecedentes de trasplante alogénico de médula ósea.

9. El sujeto está sometido a diálisis.

10. Sujetos con neuropatía periférica \geq Grado 2.

11. Sujetos con enfermedad gastrointestinal que pueda alterar significativamente la absorción del Compuesto 2.

12. El sujeto tiene una función cardíaca deteriorada o una enfermedad cardíaca clínicamente significativa, incluida cualquiera de las siguientes:

o FEVI < 45 % según lo determinado por ecocardiograma o exploración MUGA en la selección.

o Bloqueo completo de rama izquierda, bifascicular u otro hallazgo electrocardiográfico (ECG) anormal clínicamente significativo en la selección.

o Una prolongación del intervalo QT en el ECG de la selección, definida por la demostración repetida de un intervalo QTc > 480 milisegundos (ms) usando la fórmula de corrección de QT de Fredericia; antecedentes o factores de riesgo actuales de taquicardia ventricular polimorfa (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, hipocalcemia, o antecedentes familiares de síndrome de QT largo); y administración concurrente de medicación que prolongan el intervalo QT/QTc.

o Insuficiencia cardíaca congestiva (clase III o IV de la New York Heart Association).

o Infarto de miocardio ≤ 6 meses antes de comenzar el Compuesto 2.

o Angina de pecho inestable o mal controlada, incluida la variante Prinzmetal de la angina de pecho.

13. Administración concomitante de moduladores potentes del CYP3A.

14. El sujeto había recibido tratamiento previo para mieloma sistémico (aprobado o en investigación) ≤ 5 vidas medias o 4 semanas antes de comenzar el Compuesto 2, lo que sea más corto.

15. El sujeto se había sometido a una cirugía mayor ≤ 2 semanas antes de comenzar el Compuesto 2. **Nota:** Los sujetos deben haberse recuperado de cualquier efecto clínicamente significativo de una cirugía reciente.

16. El sujeto es una mujer embarazada o lactante o tiene intención de quedar embarazada durante su participación en el estudio.

17. El sujeto tiene una infección conocida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
18. El sujeto tiene una infección activa conocida crónica por el virus de la hepatitis B o C (VHB/VHC).
19. El sujeto tiene antecedentes de un segundo cáncer concurrente que requiere tratamiento sistémico continuo.
20. Los sujetos tienen antecedentes de neoplasias malignas previas distintas del MM, a menos que el sujeto haya estado libre de enfermedad durante ≥ 3 años, excepto las siguientes neoplasias malignas no invasivas tratadas con intención curativa:
 - o Carcinoma basocelular o escamocelular de la piel.
 - o Carcinoma in situ de cuello uterino o de mama.
 - o Cáncer de vejiga en estadio 1.
 - o Hallazgos histológicos casuales de cáncer de próstata localizado, tal como estadio tumoral 1a o 1b (T1a o T1b) utilizando la clasificación de Tumor/Nódulo/Metástasis (TNM) de tumores malignos, o cáncer de próstata que se ha tratado con intención curativa.
21. El sujeto tiene antecedentes de anafilaxia a talidomida, lenalidomida, pomalidomida o dexametasona.
22. El sujeto tiene hipersensibilidad conocida o sospechada a los excipientes contenidos en la formulación del Compuesto 2 o dexametasona.
23. El sujeto se ha sometido a cualquiera de los siguientes dentro de los 14 días posteriores al inicio del Compuesto 2:
 - o Plasmaféresis.
 - o Radioterapia distinta a la terapia local para el alivio sintomático de las lesiones óseas asociadas al MM.
24. El sujeto ha recibido medicación inmunosupresora dentro de los 14 días anteriores a la primera dosis del Compuesto 2. Son excepciones a este criterio las siguientes:
 - o Inyecciones intranasales, inhaladas, tópicas o locales de corticosteroides (por ejemplo, inyección intraarticular).
 - o Corticosteroides sistémicos en dosis que no excedan de 10 mg/día de prednisona o equivalente.
 - o Esteroides como premedicación para reacciones de hipersensibilidad (por ejemplo, premedicación para tomografía computarizada (TC)).
25. El sujeto no puede o no desea someterse a la profilaxis de tromboembolia venosa (TEV) requerida por el protocolo.

Duración del estudio: Se espera que la duración promedio de participación en el estudio por sujeto sea aproximadamente 6 meses. Se espera que la inscripción completa tome aproximadamente 21 meses para completarse (18 meses para la Parte 1 y 3 meses para la Parte 2). Se espera que la finalización del tratamiento activo y el seguimiento posterior al tratamiento tomen entre 6 y 12 meses adicionales. Se espera que el estudio completo continúe durante aproximadamente 33 meses.

El final del ensayo se define como la fecha de la última visita del último sujeto para completar el seguimiento posterior al tratamiento, o la fecha de recepción del último punto de datos del último sujeto que se requiere para el análisis primario, secundario y/o exploratorio, según lo especificado previamente en el protocolo, cualquiera que sea la fecha más reciente.

Tratamientos del estudio: El Compuesto 2 se administra por vía oral una vez al día para los sujetos inscritos en el programa 20/28, o dos veces al día para los sujetos inscritos en el programa 6/28. Para los sujetos inscritos en el programa de dosificación 20/28, el Compuesto 2 se administra por la mañana con al menos 240 ml de agua después de un ayuno nocturno de al menos 6 h. Los sujetos deben abstenerse de ingerir alimentos o de tomar otra medicación durante al menos 2 h después de cada dosis matutina. Los sujetos inscritos en el programa 6/28 siguen las instrucciones antes mencionadas, tal como se describe para el programa 20/28, para la primera dosis de cada día de dosis. La segunda dosis se administra 12 ± 2 h después de la dosis de la mañana, al menos 4 h

después y 2 h antes de la ingesta de alimentos. A modo de ejemplo, los sujetos inscritos en el programa de dosificación 6/28 podrían recibir posiblemente su dosis inicial del Compuesto 2 a las 7:00 a. m., seguido del desayuno a las 9:00 a. m., el almuerzo al mediodía, su segunda dosis del Compuesto 2 tan pronto como a las 5:00 p. m., y la cena 2 horas más tarde (es decir, no antes de las 7:00 p. m.). Tenga en cuenta que sólo en el Ciclo 1, el Compuesto 2 se administra los días 1 a 3 (mañana y tarde), el día 14 (sólo por la tarde), los días 15 y 16 (mañana y tarde) y el día 17 (sólo por la mañana).

Para ambos programas de dosificación, la dexametasona se administra con el Compuesto 2 en ayunas o al menos 2 h después del Compuesto 2 con alimentos (excepto en los días de evaluación de la farmacocinética, cuando ambos deben administrarse al mismo tiempo). La dexametasona administrada los días 1, 8 (día 10 sólo en el Ciclo 1), 15 y 22, o los días 1, 3, 15 (día 14 sólo en el Ciclo 1) y 17 de cada ciclo en los programas de dosificación 20/28 o 6/28 respectivamente, se puede administrar en ayunas simultáneamente con el Compuesto 2. Alternativamente (en sujetos con antecedentes de irritación gástrica inducida por dexametasona), se puede administrar con alimentos al menos 2 horas después del Compuesto 2, excepto en los días de evaluación de la farmacocinética, cuando ambos deben administrarse simultáneamente a todos los sujetos. Para todos los sujetos, cada dosis de dexametasona es 40 mg para sujetos < 75 años de edad y 20 mg para aquellos ≥ 75 años de edad.

Descripción general de las evaluaciones de eficacia clave: La variable de eficacia principal es la mejor tasa de respuesta general (ORR), definida como el porcentaje de sujetos cuya mejor respuesta es ≥ PR, según lo determinado por los Criterios de Respuesta Uniformes IMWG (Rajkumar et al Blood 2011; 117(18):4691-5). Los sujetos se someten mensualmente a evaluaciones de respuesta. La respuesta del mieloma es determinada por el investigador del sitio del estudio basándose en investigaciones de laboratorio (electroforesis de proteínas séricas [sPEP], electroforesis de proteínas en orina [uPEP], electroforesis de inmunofijación [IFE], niveles de cadena ligera libre sérica [sFLC], inmunoglobulina A cuantitativa [IgA], médula ósea para cuantificación de células plasmáticas, según corresponda), evaluadas en un laboratorio de referencia central y/o localmente (es decir, calcio sérico corregido, tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada [PET/CT] o formación de imágenes por resonancia magnética [MRI] para evaluación de plasmocitoma y/o TC o estudio esquelético para evaluación de lesiones óseas). Las variables de eficacia adicionales incluyen el tiempo hasta la respuesta (tiempo desde la 1.^a dosis del Compuesto 2 hasta la primera documentación de respuesta ≥ PR), la duración de la respuesta (tiempo desde la primera documentación de respuesta (≥ PR) hasta la primera documentación de PD o muerte), y la supervivencia libre de progresión (tiempo desde la 1.^a dosis del Compuesto 2 hasta la primera aparición de progresión de la enfermedad o muerte por cualquier causa).

En los análisis de eficacia se incluyen todos los sujetos de seguridad con una línea base válida y al menos una evaluación de respuesta posterior a la línea base. Si el tratamiento se interrumpe por razones distintas a la progresión de la enfermedad, se solicita a los sujetos que continúen las evaluaciones de respuesta según el programa de evaluación especificado hasta la progresión, la retirada del consentimiento, la muerte o el inicio de una nueva terapia sistémica contra el mieloma, lo que ocurra primero.

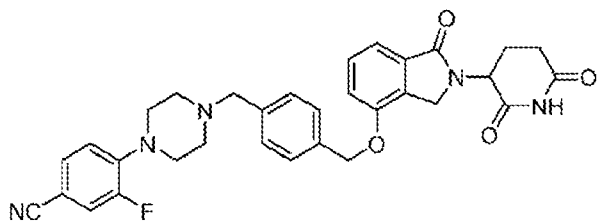
Descripción general de las evaluaciones de seguridad clave: Las variables de seguridad para este estudio incluyen eventos adversos emergentes del tratamiento (EAET) y cambios desde el inicio en los hallazgos físicos/signos vitales, analitos de laboratorio seleccionados, y electrocardiogramas (ECG) de 12 derivaciones. Las métricas de seguridad adicionales incluyen el grado de exposición al tratamiento del estudio (tanto el Compuesto 2 como la dexametasona), evaluaciones del uso concomitante de medicación, y pruebas de embarazo para mujeres en edad fértil (FCBP).

Resumen de las evaluaciones farmacocinéticas: Los perfiles farmacocinéticos (dosis inicial y estado estacionario) se evalúan para el Compuesto 2, su enantiómero R (Compuesto 3) y dexametasona. Se pueden realizar análisis de respuesta a la exposición, según corresponda, para ayudar a identificar el Compuesto 2 RP2D.

Las realizaciones descritas anteriormente tienen como objetivo ser meramente ejemplares, y los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando únicamente experimentación habitual, numerosos equivalentes de compuestos, materiales y procedimientos específicos.

REIVINDICACIONES

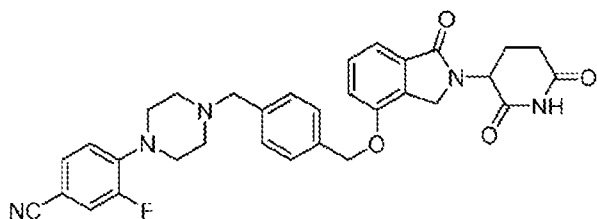
1. Un compuesto, en el que el compuesto es el Compuesto 1 de fórmula



1,

o un enantiómero, mezcla de enantiómeros, tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

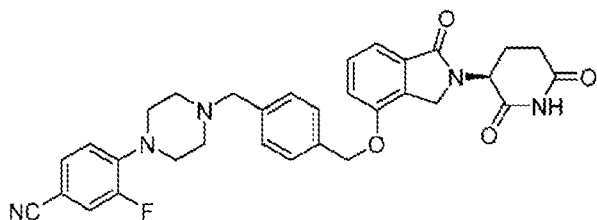
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es el Compuesto 1 de fórmula



1.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1.

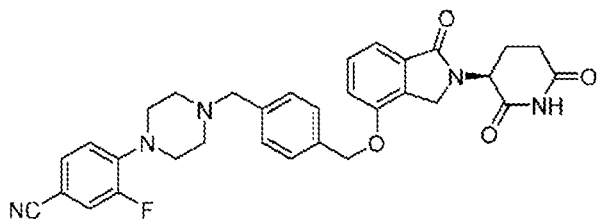
4. Un compuesto, en el que el compuesto es el Compuesto 2 de fórmula



2,

o un tautómero, isotópologo, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto es el Compuesto 2 de fórmula



2.

6. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 2.

7. Una composición farmacéutica, que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7, para uso en un método de tratamiento del mieloma múltiple, en el que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto a un paciente que lo necesita.

5 9. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 8, en el que el mieloma múltiple es recidivante, refractario, o resistente.

10. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 8 o 9, en el que el mieloma múltiple es:

- 10 (i) refractario o resistente a lenalidomida o pomalidomida; o
 (ii) un mieloma múltiple de alto riesgo que ha recaído o es refractario a uno, dos o tres tratamientos previos; o
 (iii) resistente a una, dos o tres terapias contra el mieloma múltiple, en el que las terapias se seleccionan entre un anticuerpo monoclonal anti-CD38, un inhibidor del proteasoma, y un compuesto inmunomodulador; o
 15 (iv) se caracteriza por una mutación de p53, por la delección homocigótica de p53, por la activación de uno o más impulsores oncogénicos, o por una o más translocaciones cromosómicas.

11. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 10(iv), en el que la mutación de p53 es una mutación Q331, R273H, K132N, R337L, W146, S261T, E286K, R175H, E258K, o A161T; o
 20 en el que los uno o más impulsores oncogénicos se seleccionan del grupo que consiste en C-MAF, MAFB, FGFR3, MMset, Ciclina D1, y Ciclina D; o
 en el que la translocación cromosómica es t(14; 16), t(14;20), t(4; 14), t(11;14), t(6;20), t(20;22), o t(16;22).

12. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 8, en el que el mieloma múltiple es un mieloma múltiple recién diagnosticado.

25 13. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12, en el que el mieloma múltiple recién diagnosticado es un mieloma múltiple recién diagnosticado y elegible para trasplante.

14. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que el compuesto se administra:

- 30 (i) como terapia de inducción, terapia de consolidación, o terapia de mantenimiento;
 (ii) en una cantidad de alrededor de 0,1 a alrededor de 2 mg por día; o
 (iii) los días 1 a 10 y los días 15 a 24 de un ciclo de 28 días, los días 1 a 3 y los días 15 a 18 de un ciclo de 28 días, los días 1 a 7 y los días 15 a 21 de un ciclo de 28 días, los días 1 a 14 de un ciclo de 21 días, o los días 1 a 21 de
 35 un ciclo de 28 días.

15. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 14(ii), en el que el compuesto se administra en una cantidad de alrededor de 1 mg por día.

40 16. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en el que el método comprende además administrar un segundo agente activo.

17. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 16, en el que el segundo agente activo es dexametasona, daratumumab, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de la histona desacetilasa, un
 45 agente de quimioterapia, un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de Mcl-1, un inhibidor de BET, o un inhibidor de LSD-1, o una combinación de los mismos; o
 en el que el segundo agente activo es ACY241, AMG176, OTX015, 4-[2-(ciclopropilmetoxi)-5-(metanosulfonil)fenil]-2-metilisoquinolin-1(2H)-ona, 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo, ciclofosfamida, dexametasona, doxorubicina, etopósido, GSK525762A,
 50 MIK665, panobinostat, venetoclax, o vincristina.

18. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 16, en el que el segundo agente activo es dexametasona, bortezomib, carfilzomib, daratumumab, una combinación de dexametasona y bortezomib, una combinación de dexametasona y daratumumab, o una combinación de dexametasona y carfilzomib.

55 19. El compuesto o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 16, en el que el segundo agente activo se selecciona de uno o más de dexametasona, bortezomib, carfilzomib y daratumumab.

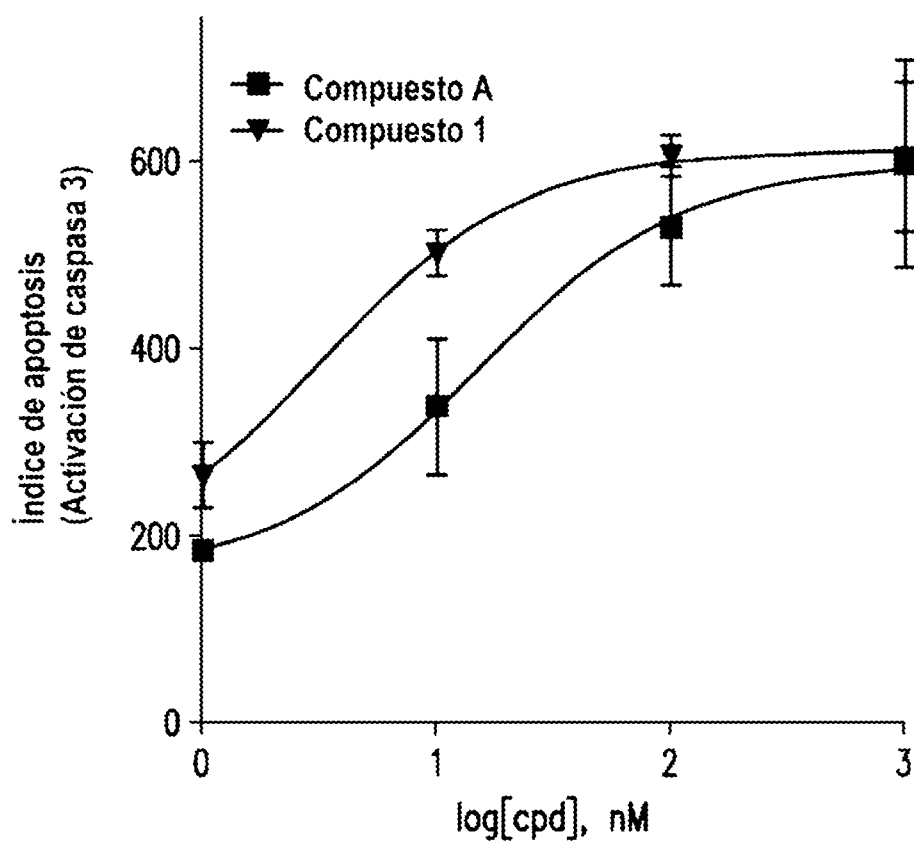
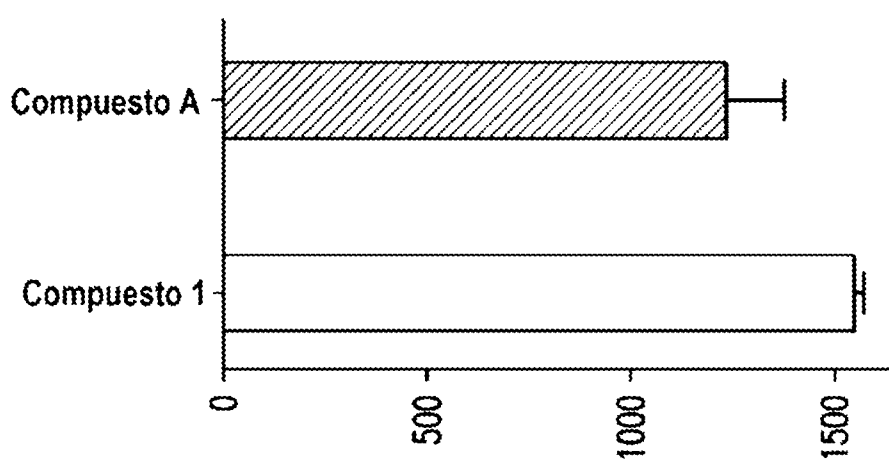


Figura 1A



Comp n.º	AUC Total
Comp A	1232
Comp 1	1547.5

Figura 1B

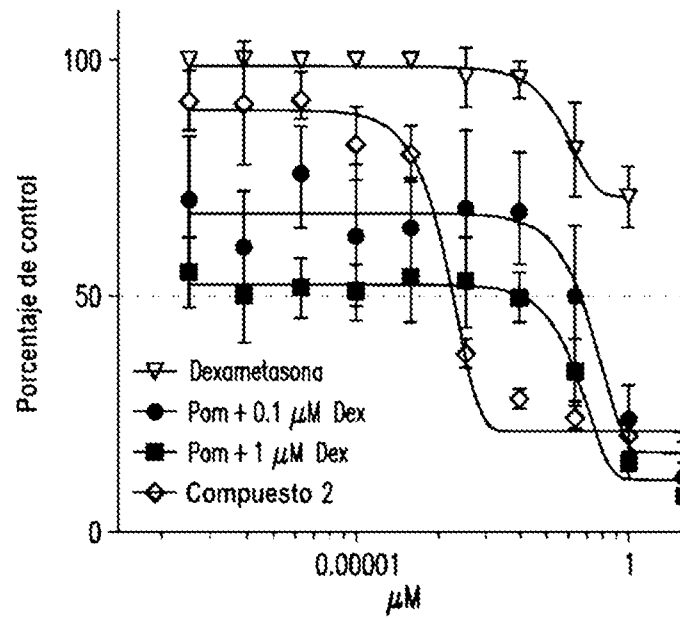


Figura 2A

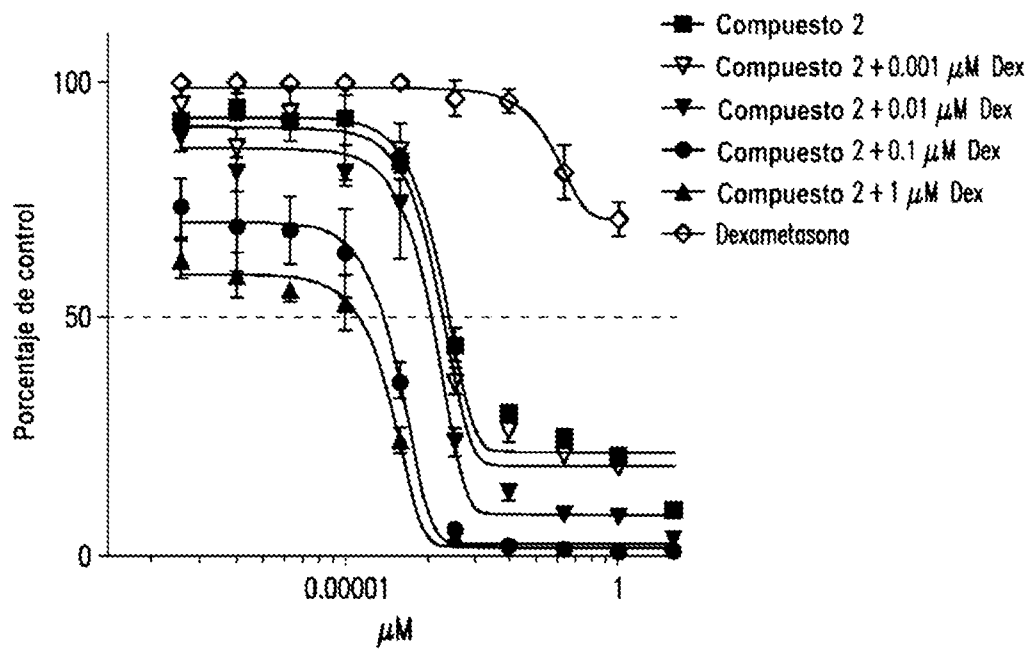


Figura 2B

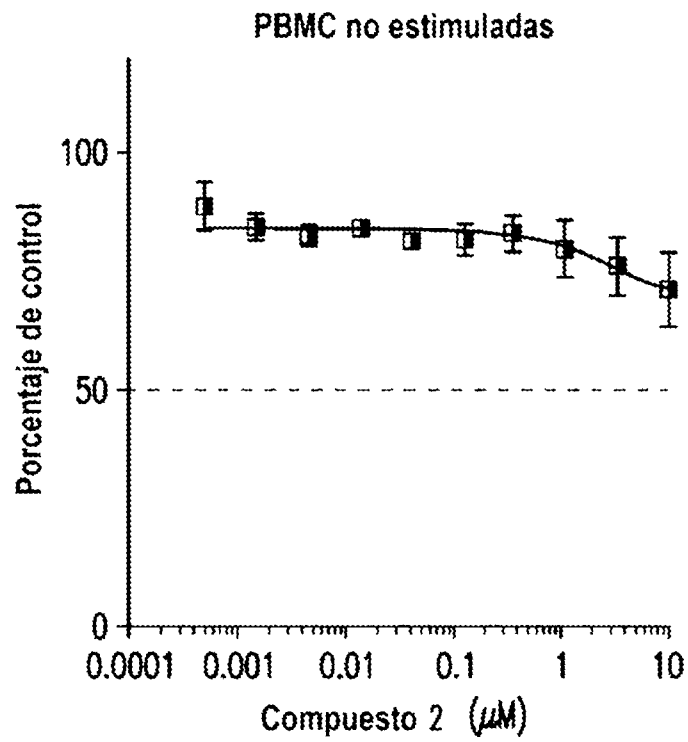


Figura 3A

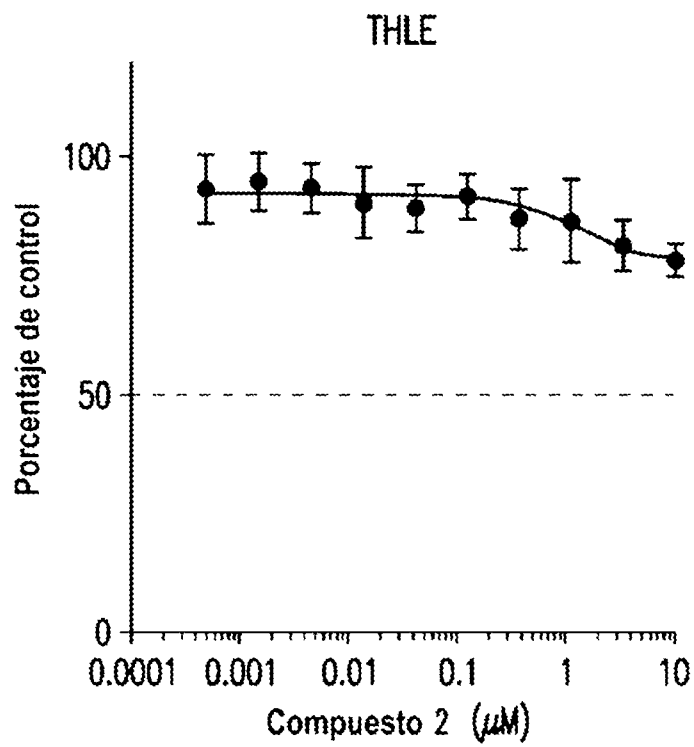


Figura 3B

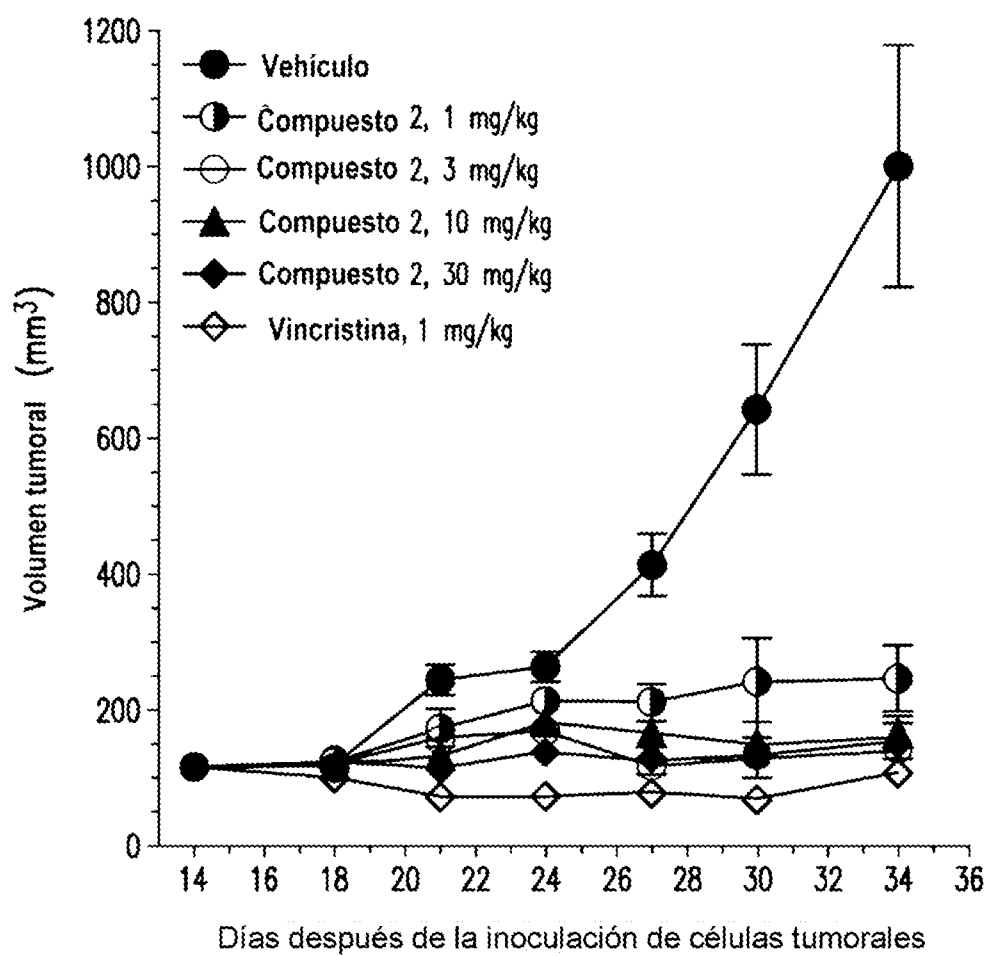


Figura 4

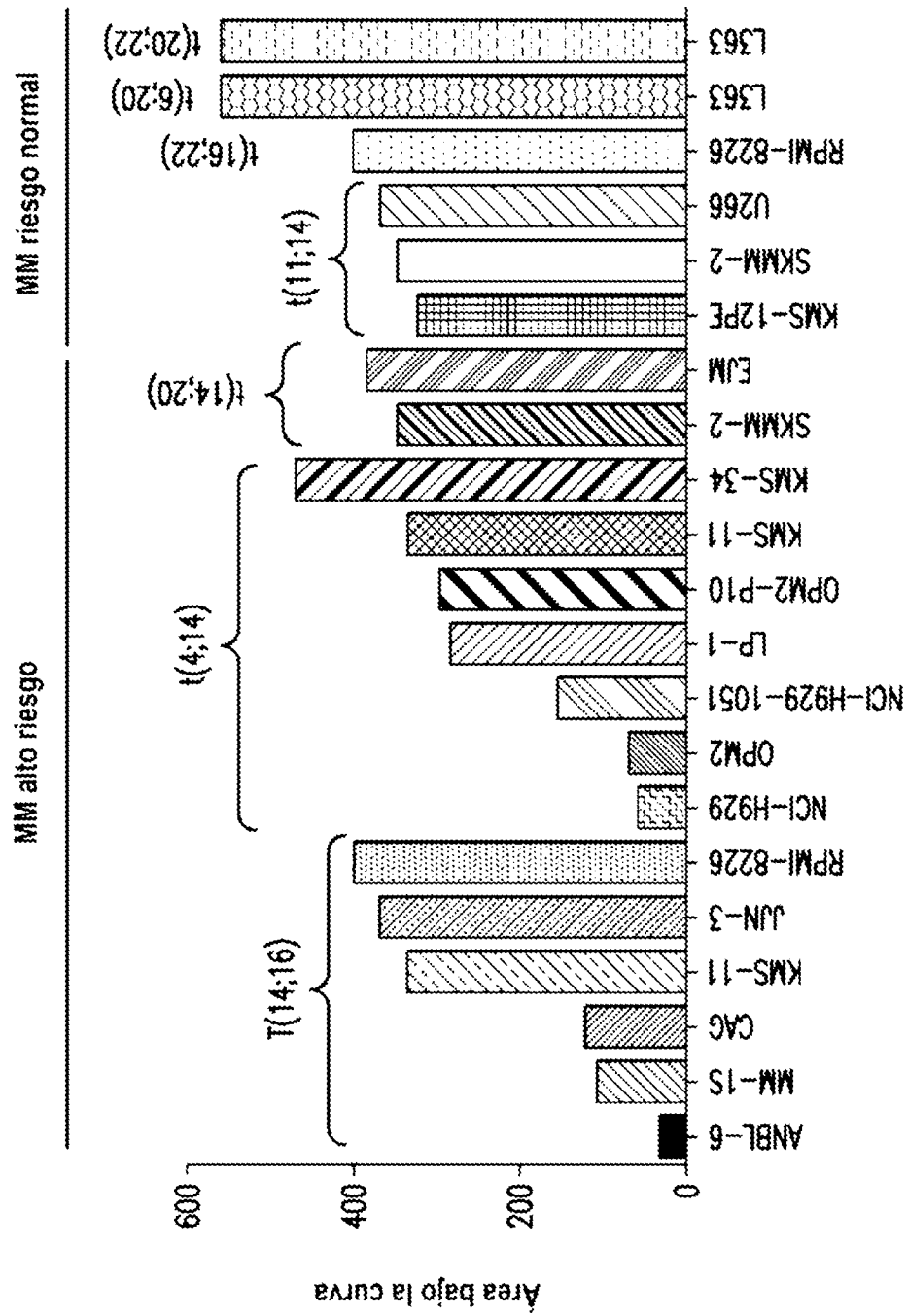


Figura 5

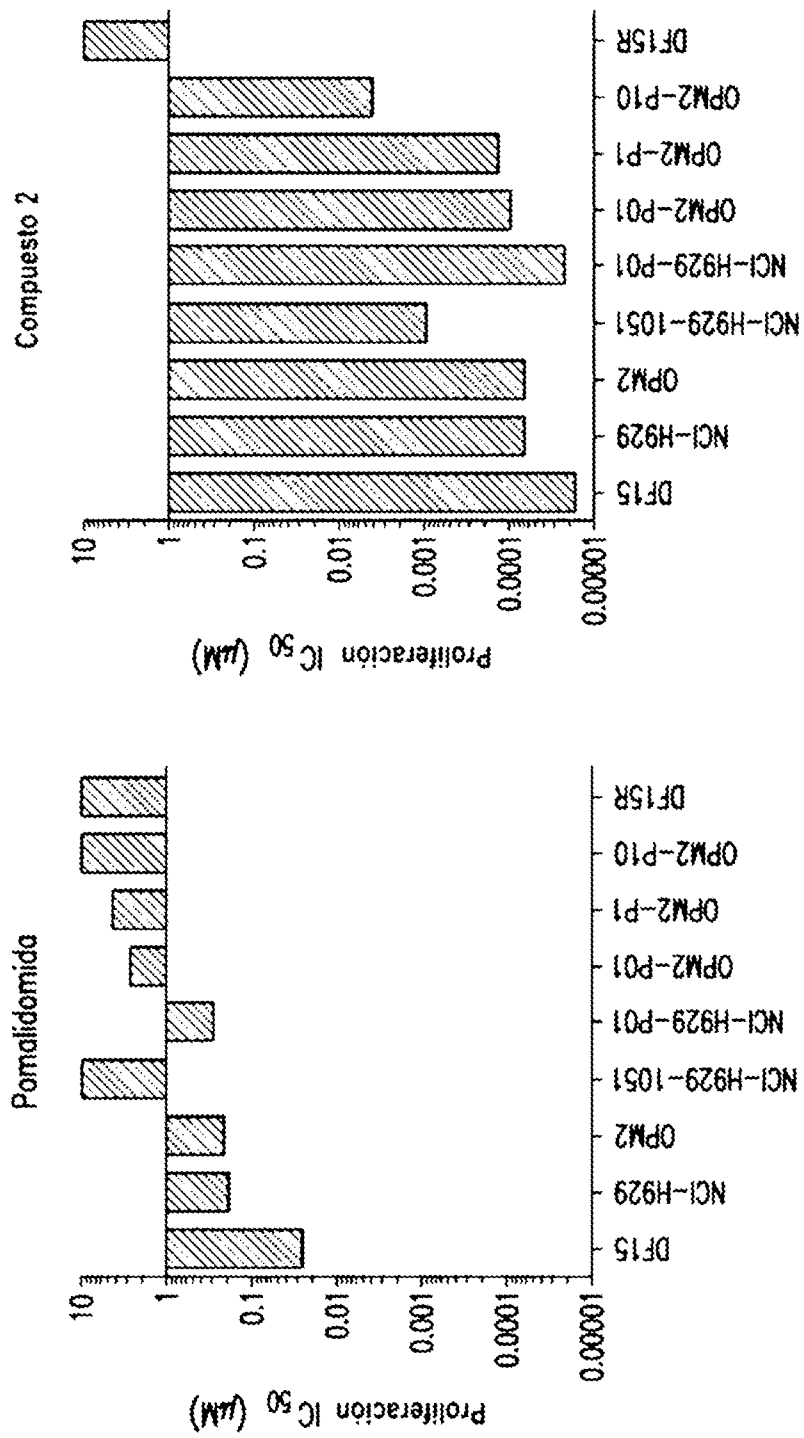


Figura 6

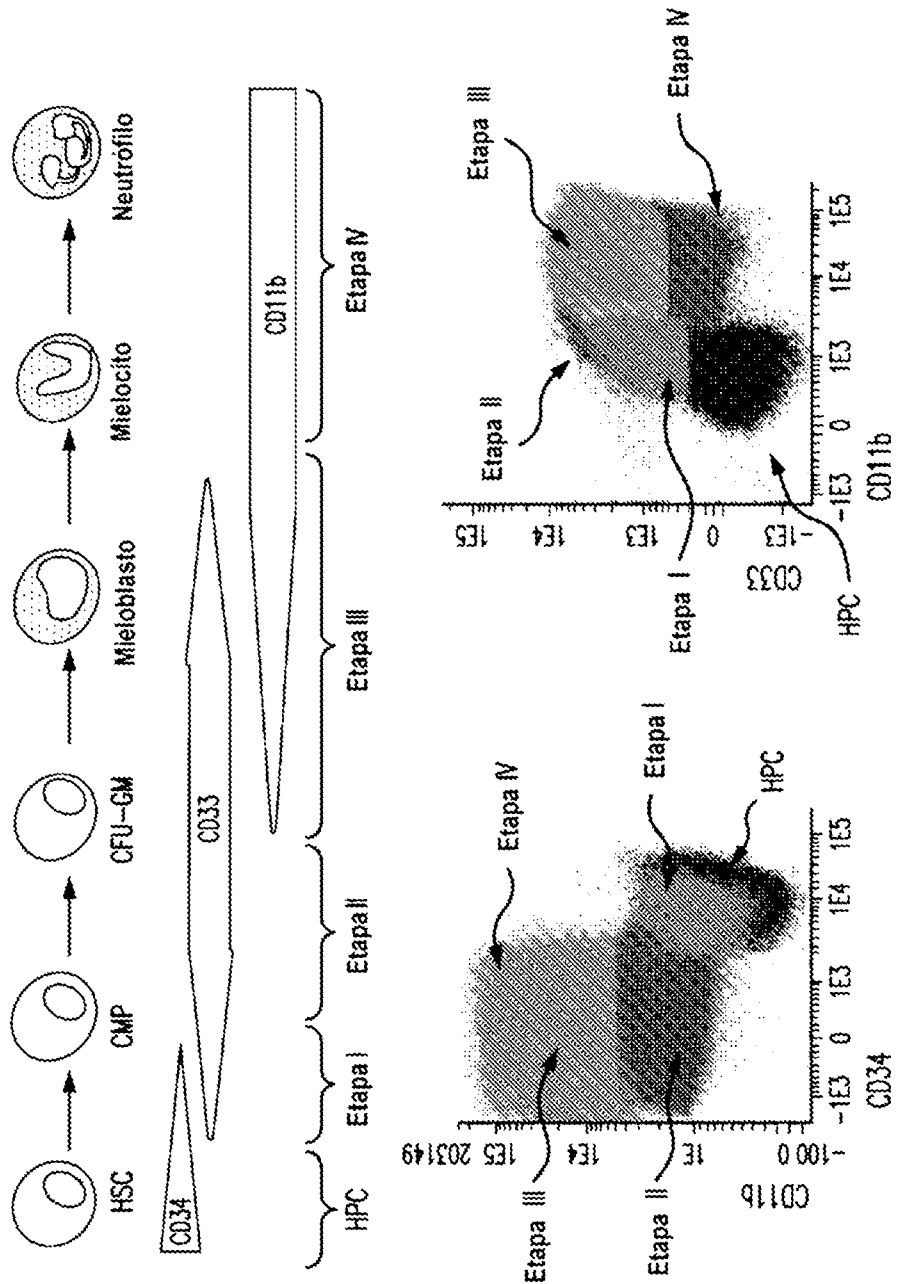


Figura 7

CFU-GM= unidad formadora de colonias—granulocito/monocito; CMP= progenitor mielocito común ;
HPC = células progenitoras hematopoyéticas; HSC = células madre hematopoyéticas.

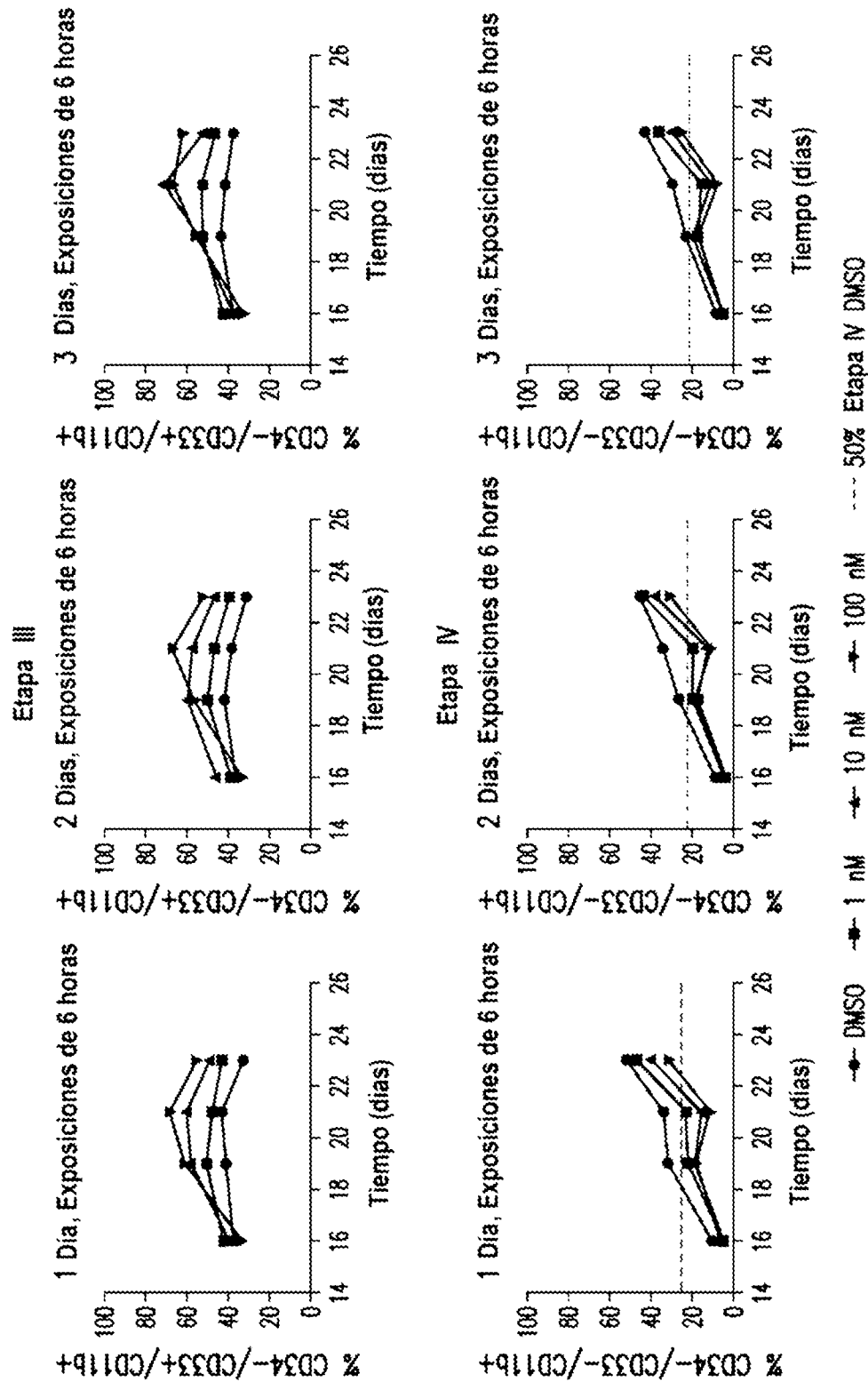


Figura 8

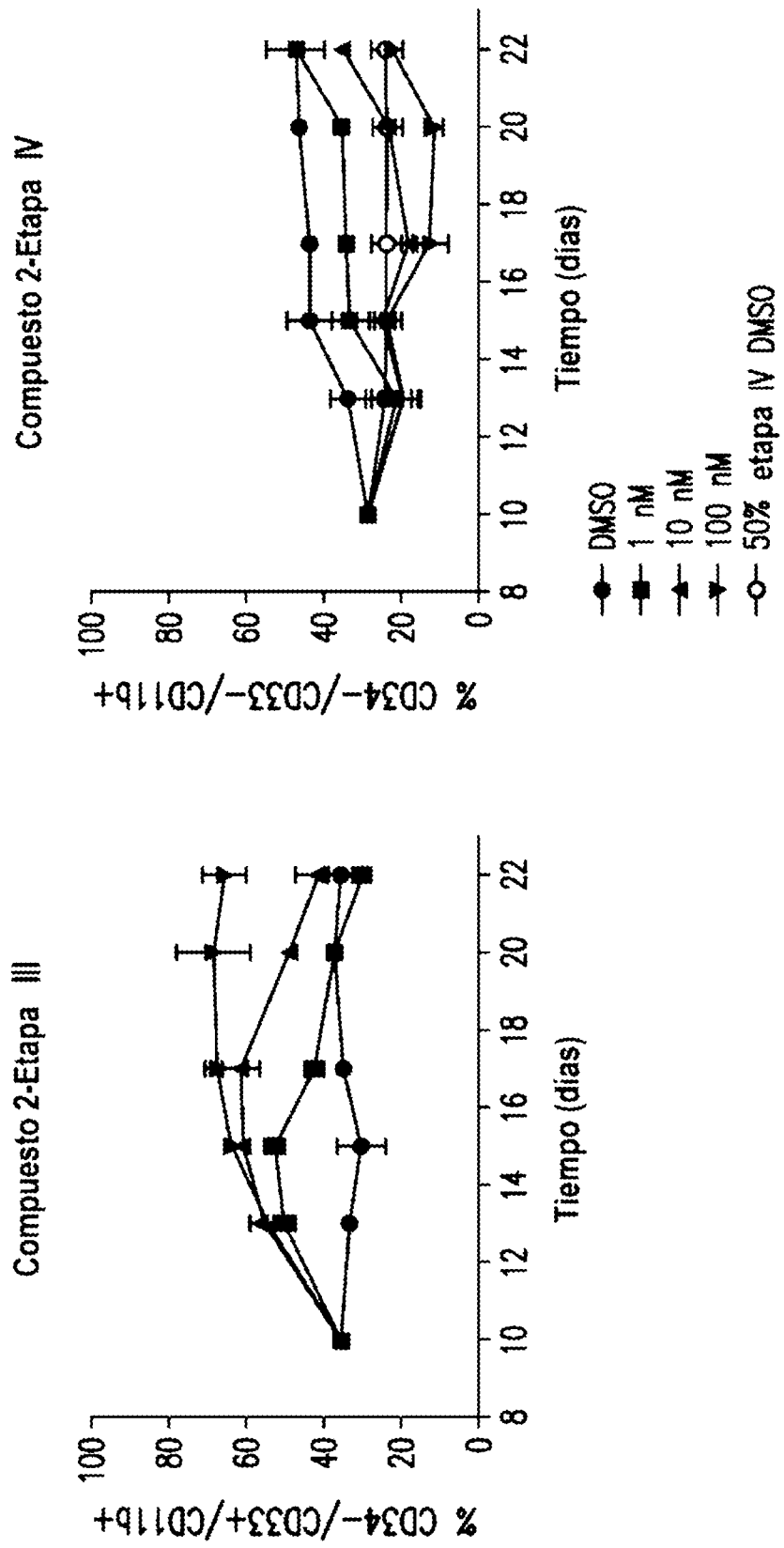


Figura 9

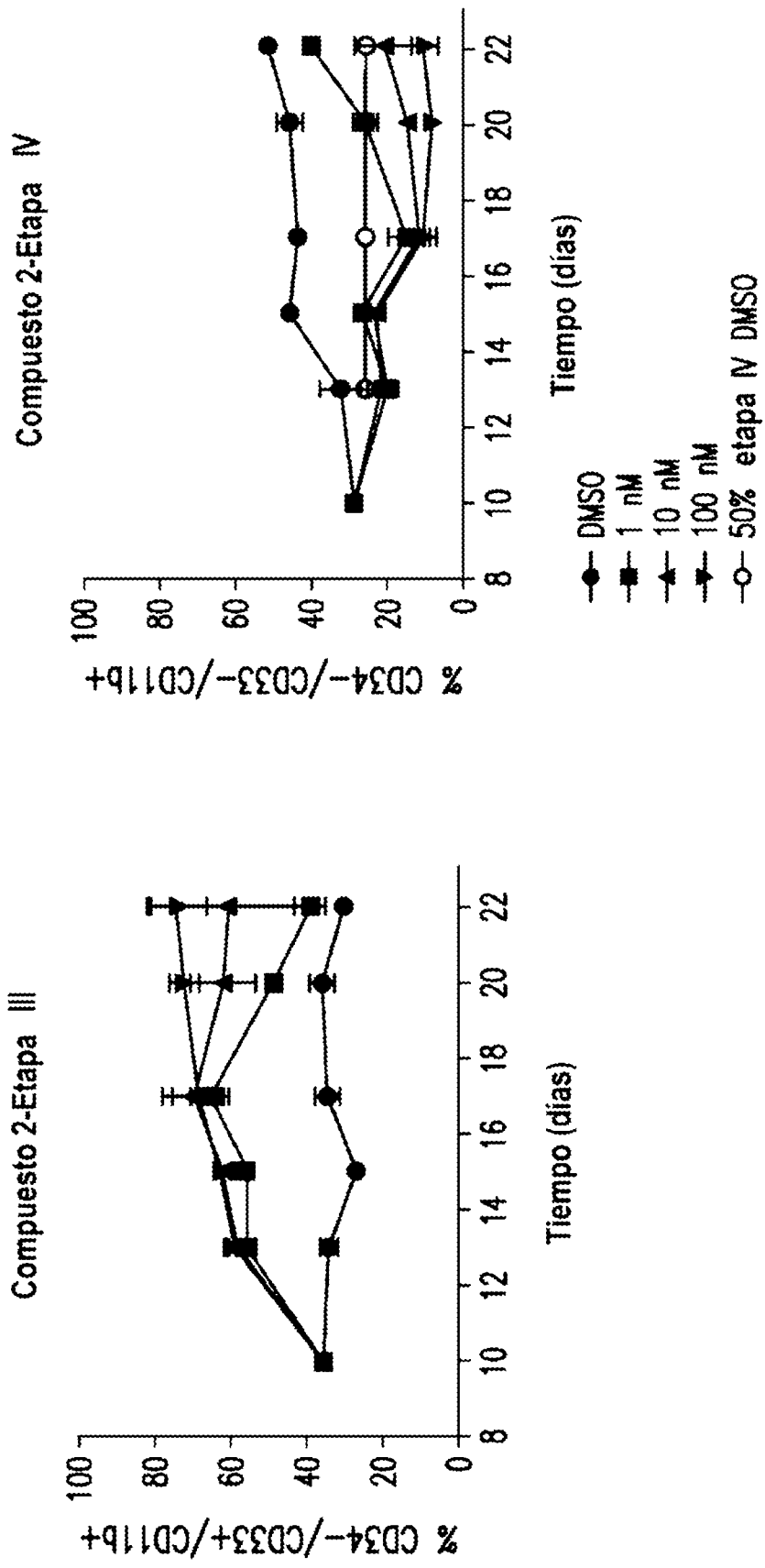


Figura 10

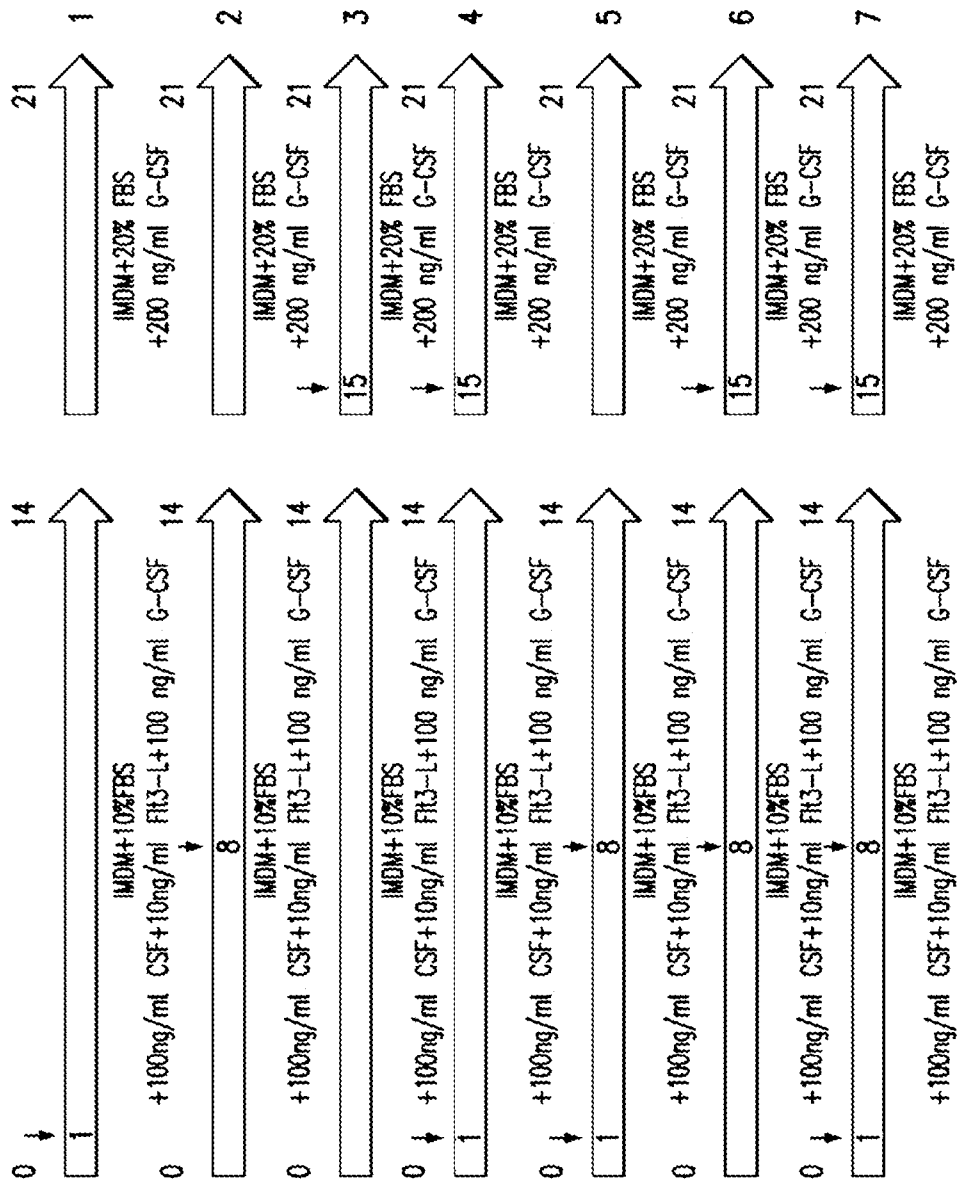


Figura 11

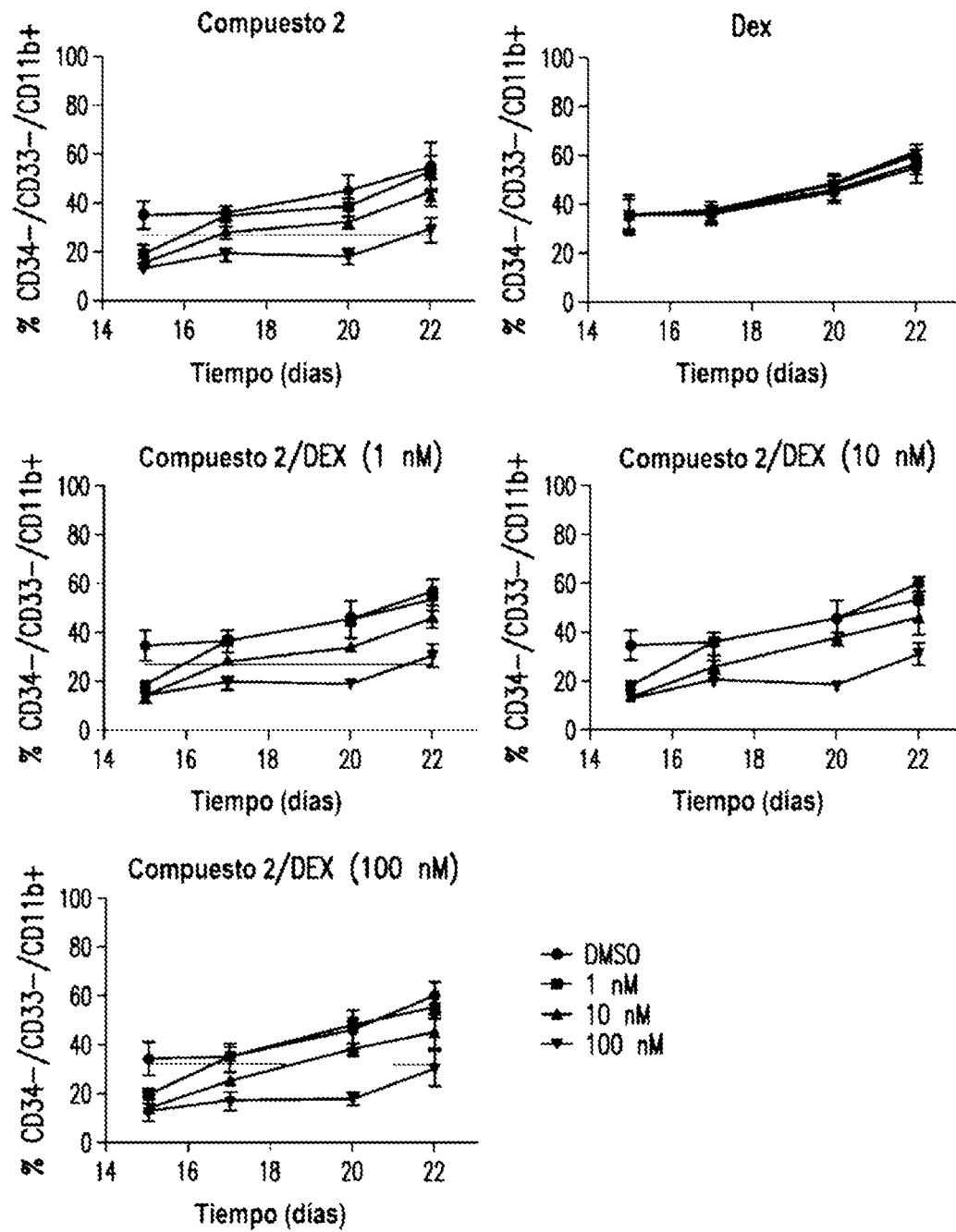


Figura 12

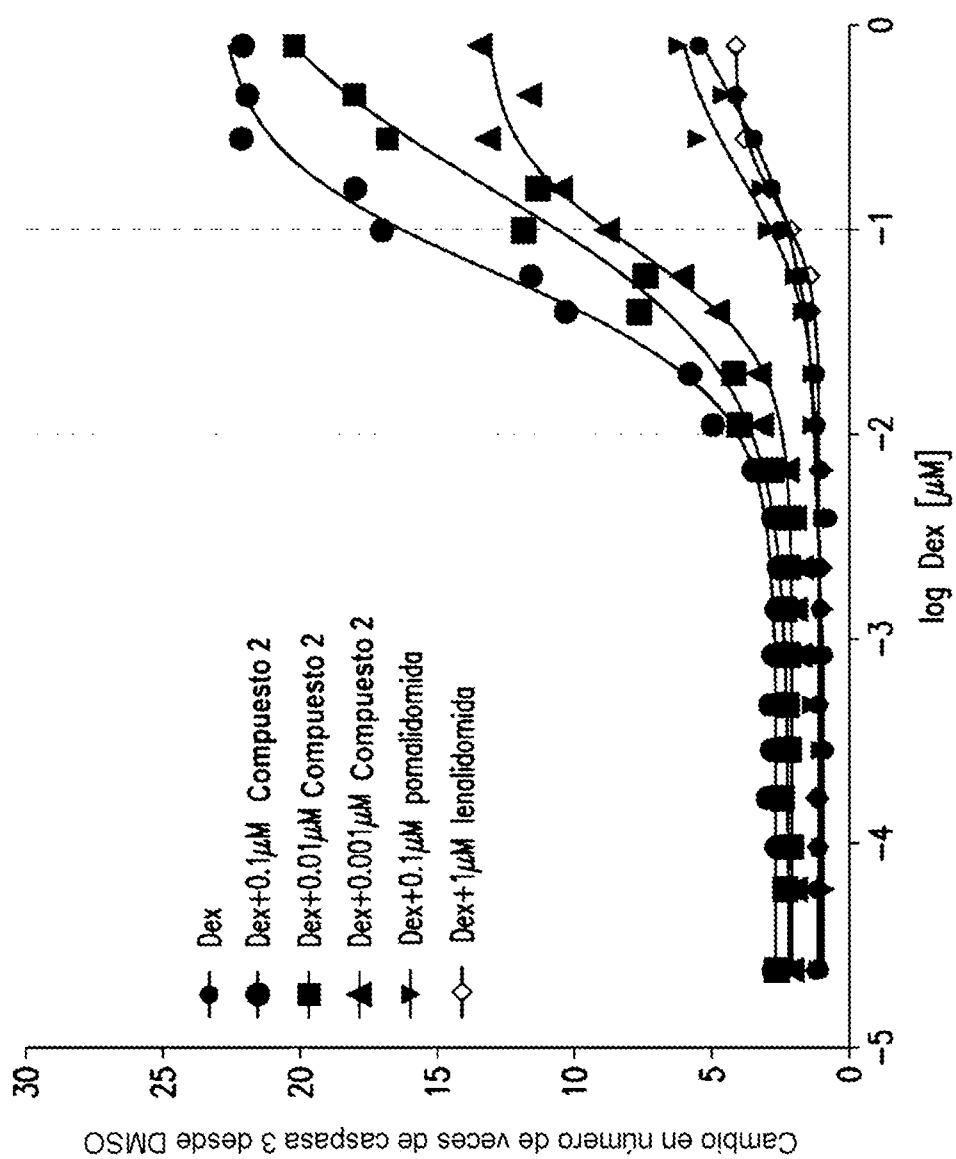


Figura 13

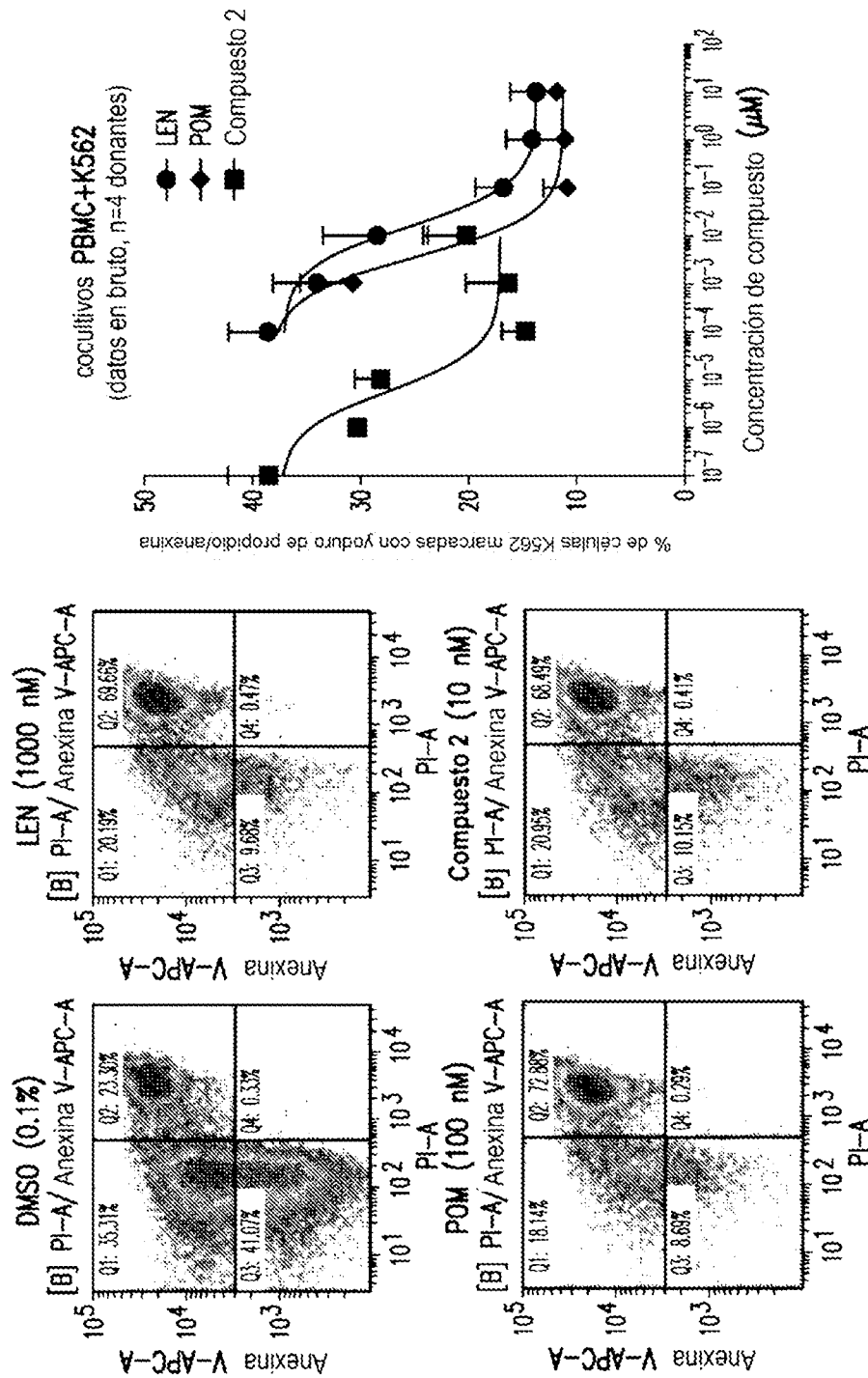
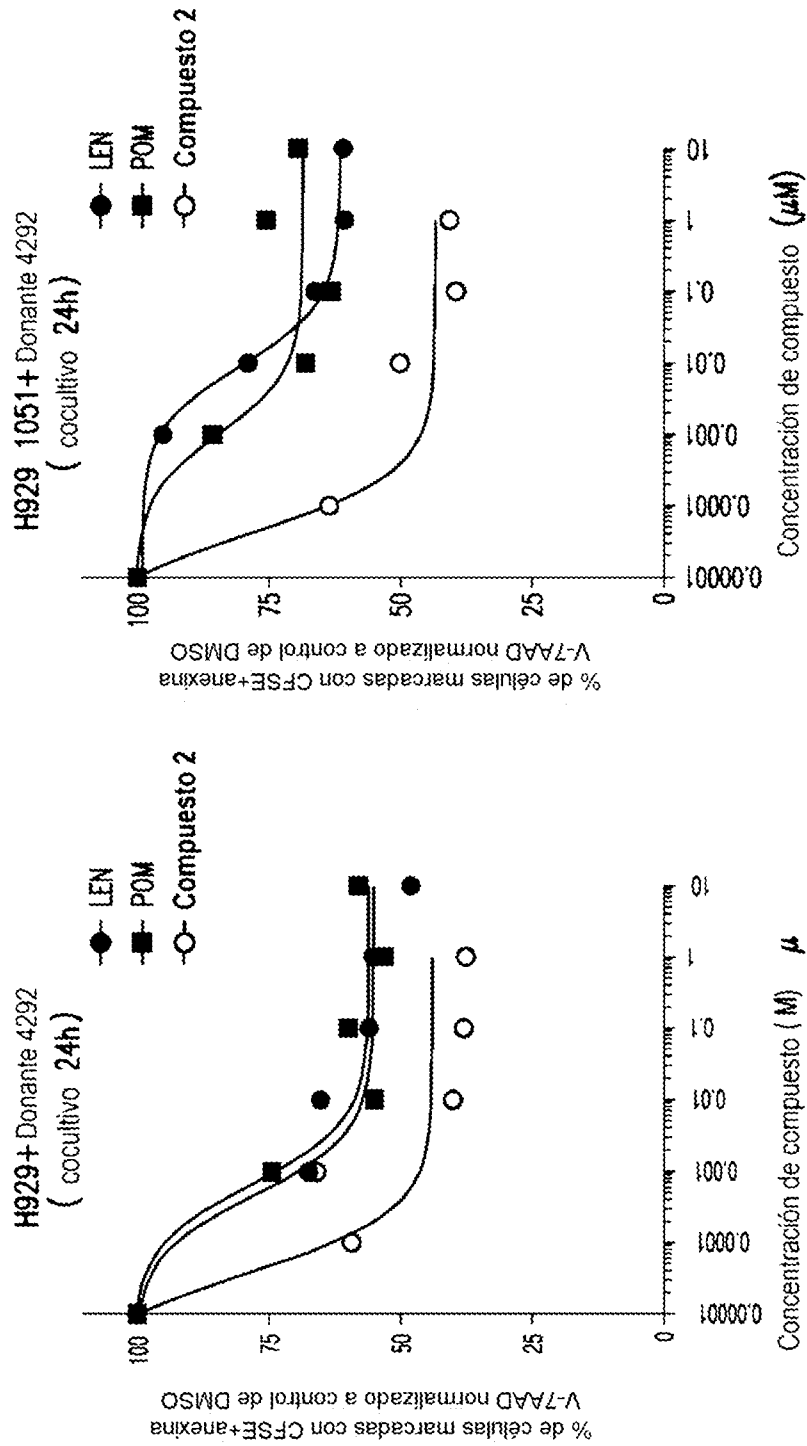


Figura 14

APC = alofococianina; CM = modulador de cerebro; DMSO = dimetil sulfoxido; IL-2 = interleucina-2;
 LEN = lenilidomido; PBMC = célula mononuclear de sangre periférica; PI = yoduro de propidio; POM = pomalidomido;
 Q = cuadrante; I:E = relación diana:efector; U = unidades.



7-AAD = 7-aminoactinomicina D; CFSE = Éster carboxifluoresceinsuccinimidilico; DMSO = dimetil sulfoxido;
 LEN = lenolidomida; POM = célula mononuclear de sangre periférica; POM = pomalidomida;

Figura 15

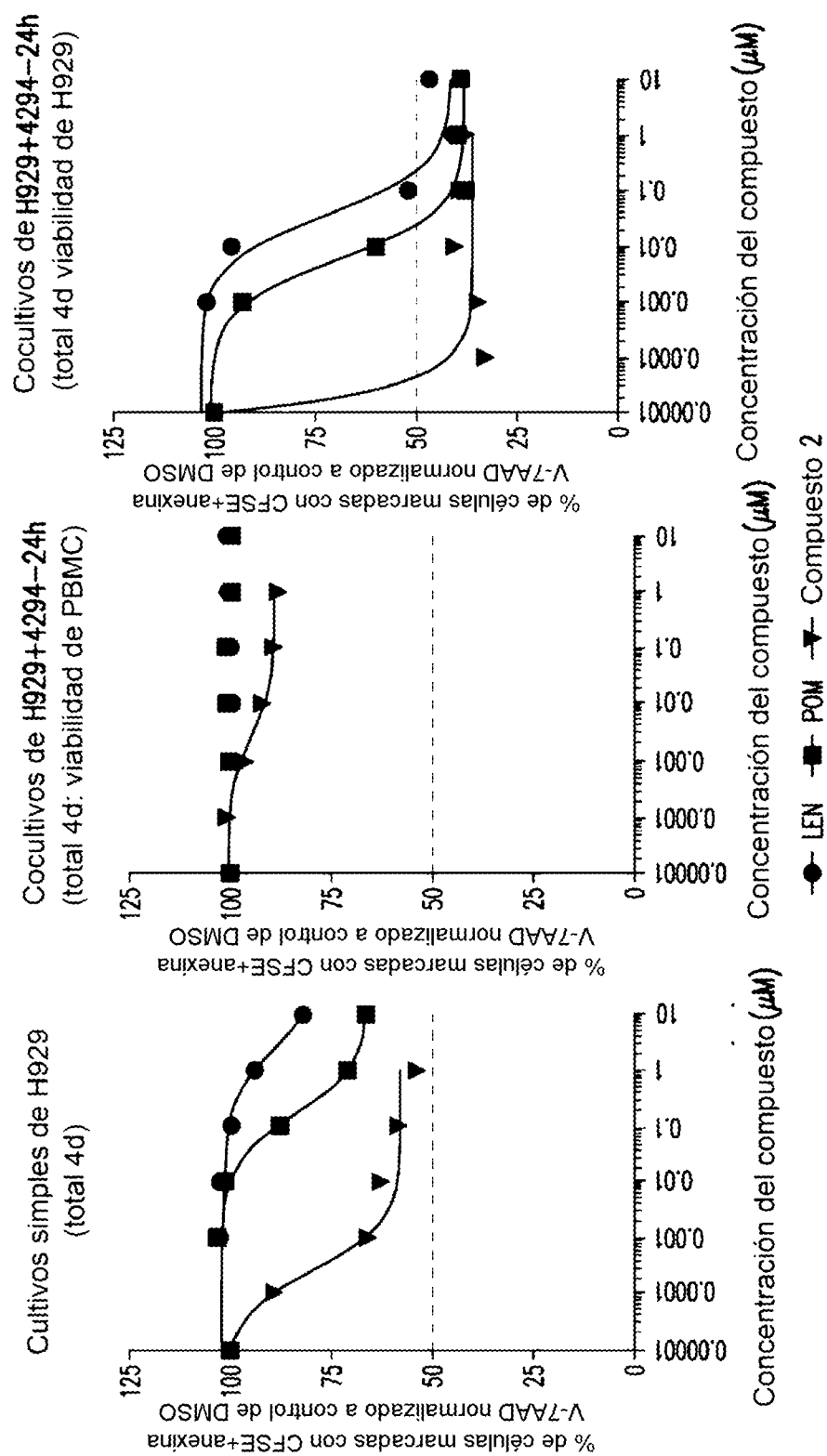


Figura 16A

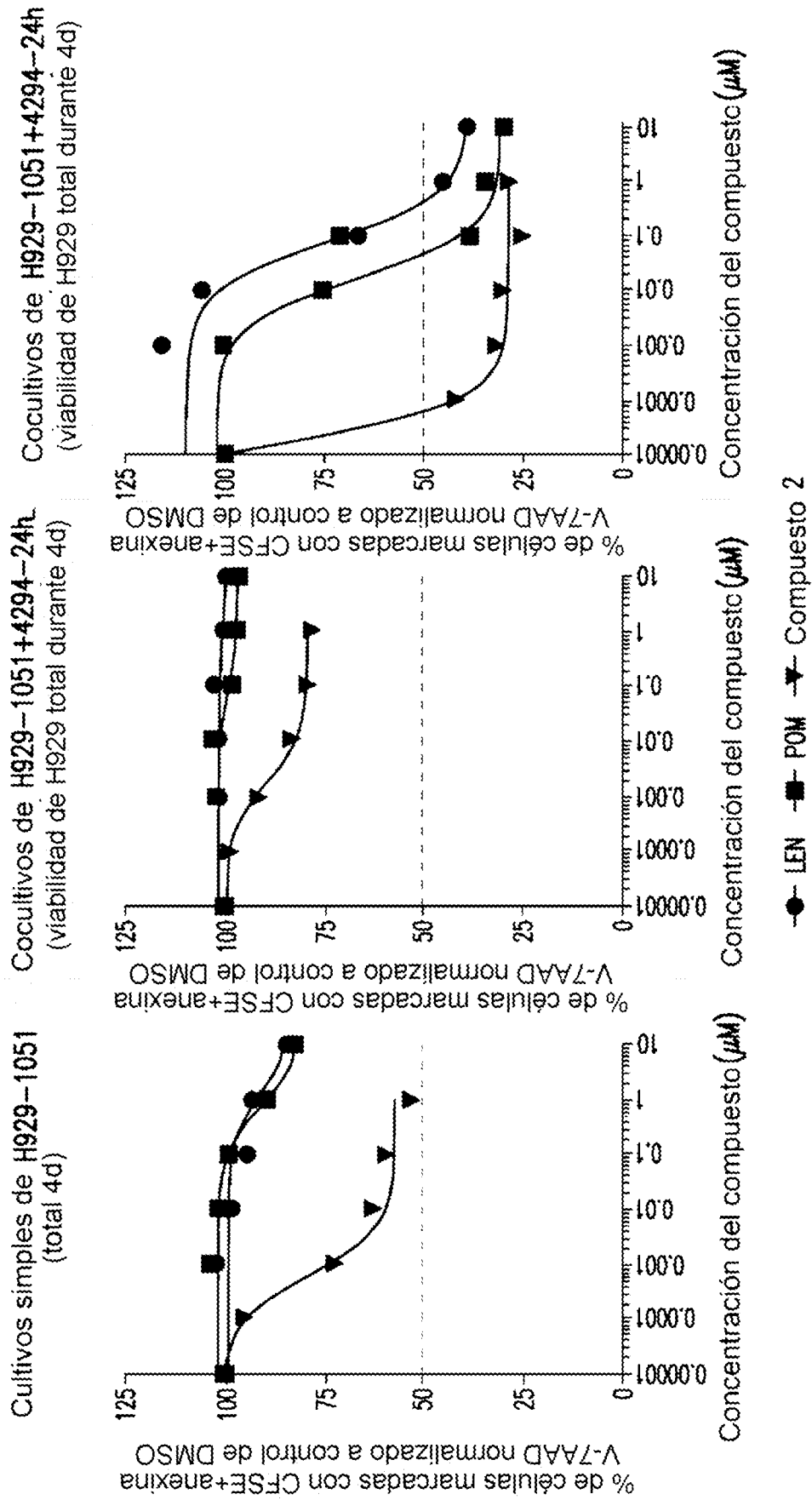


Figura 16B

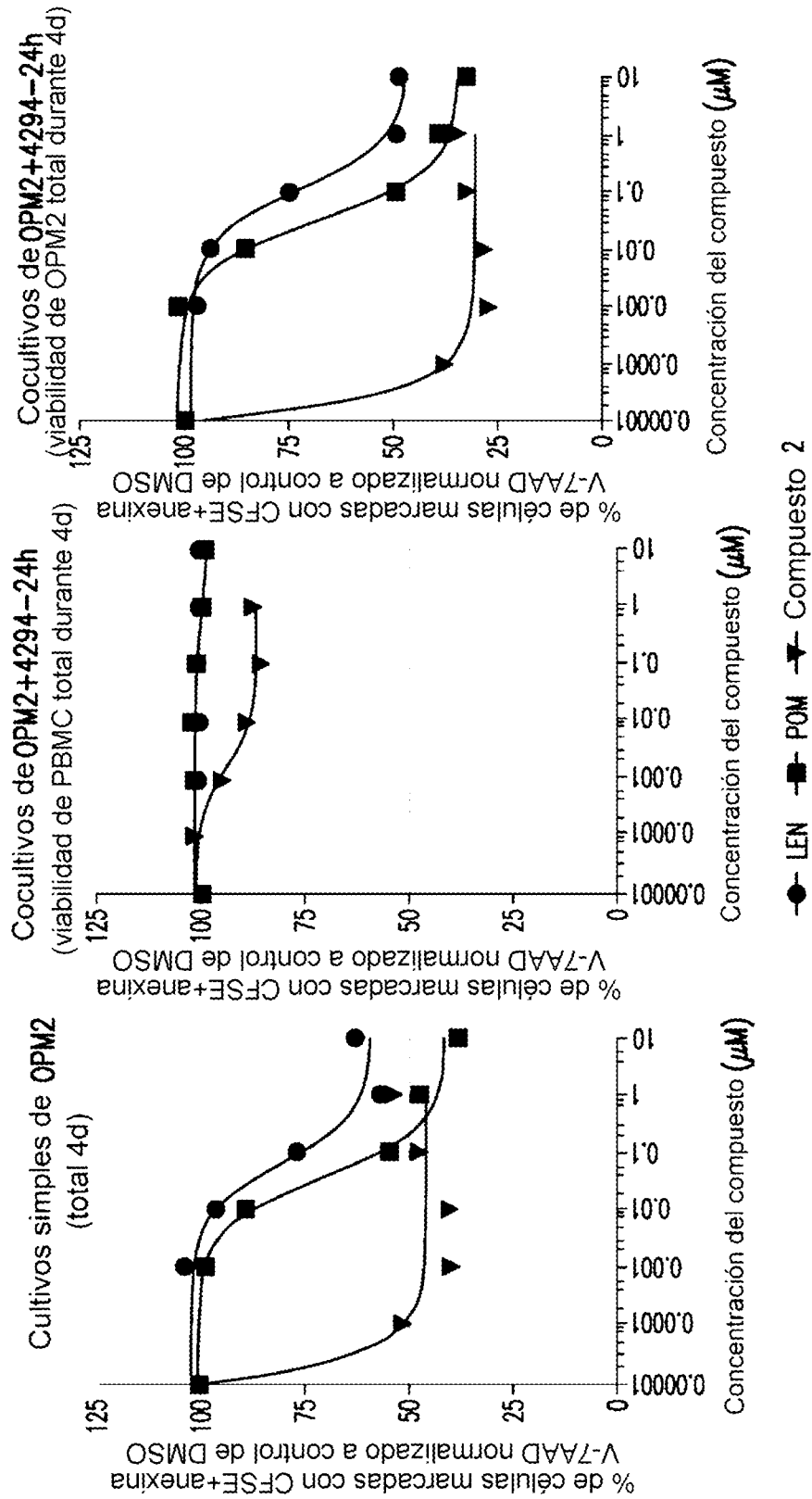


Figura 16C

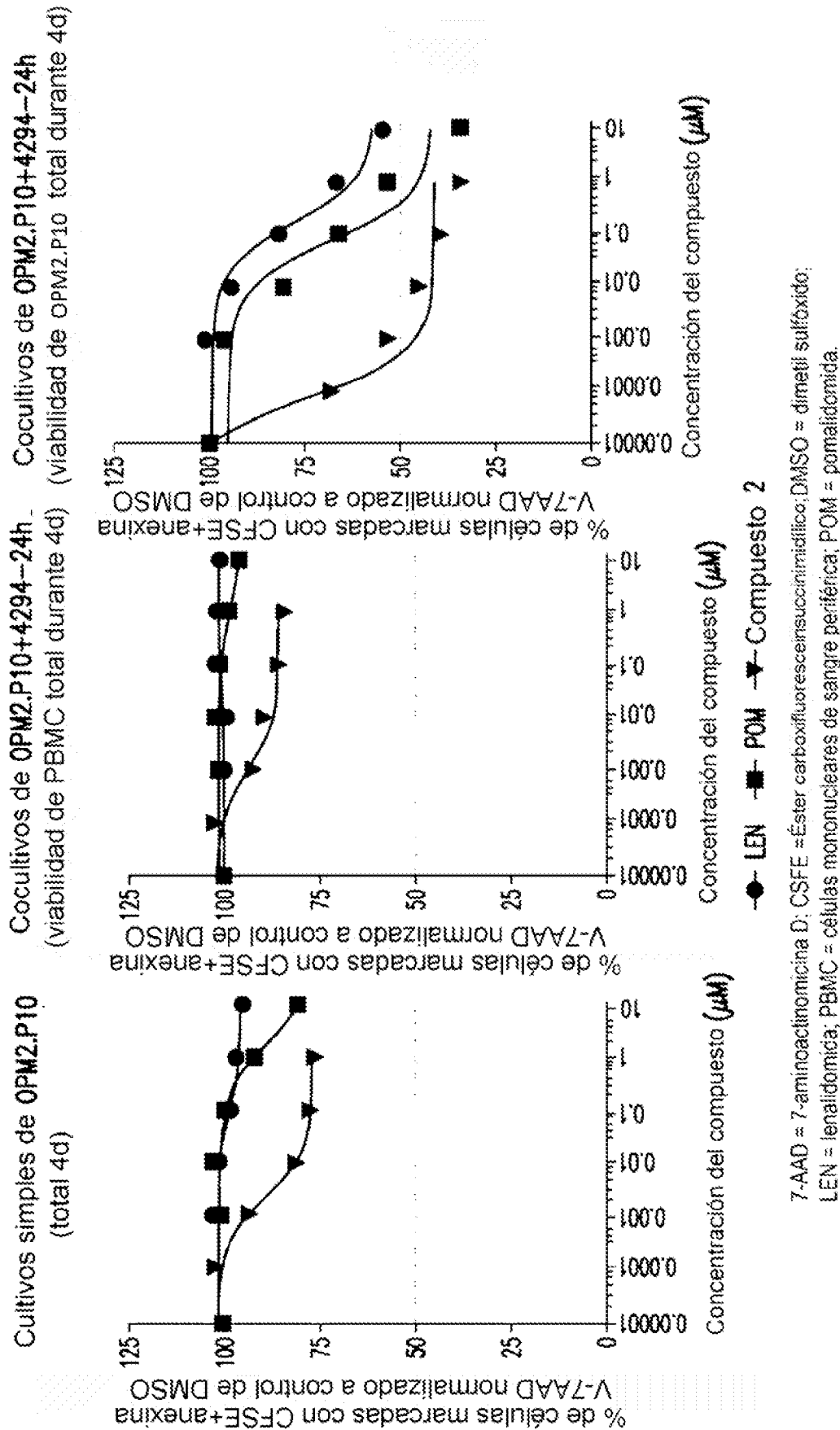


Figura 16D

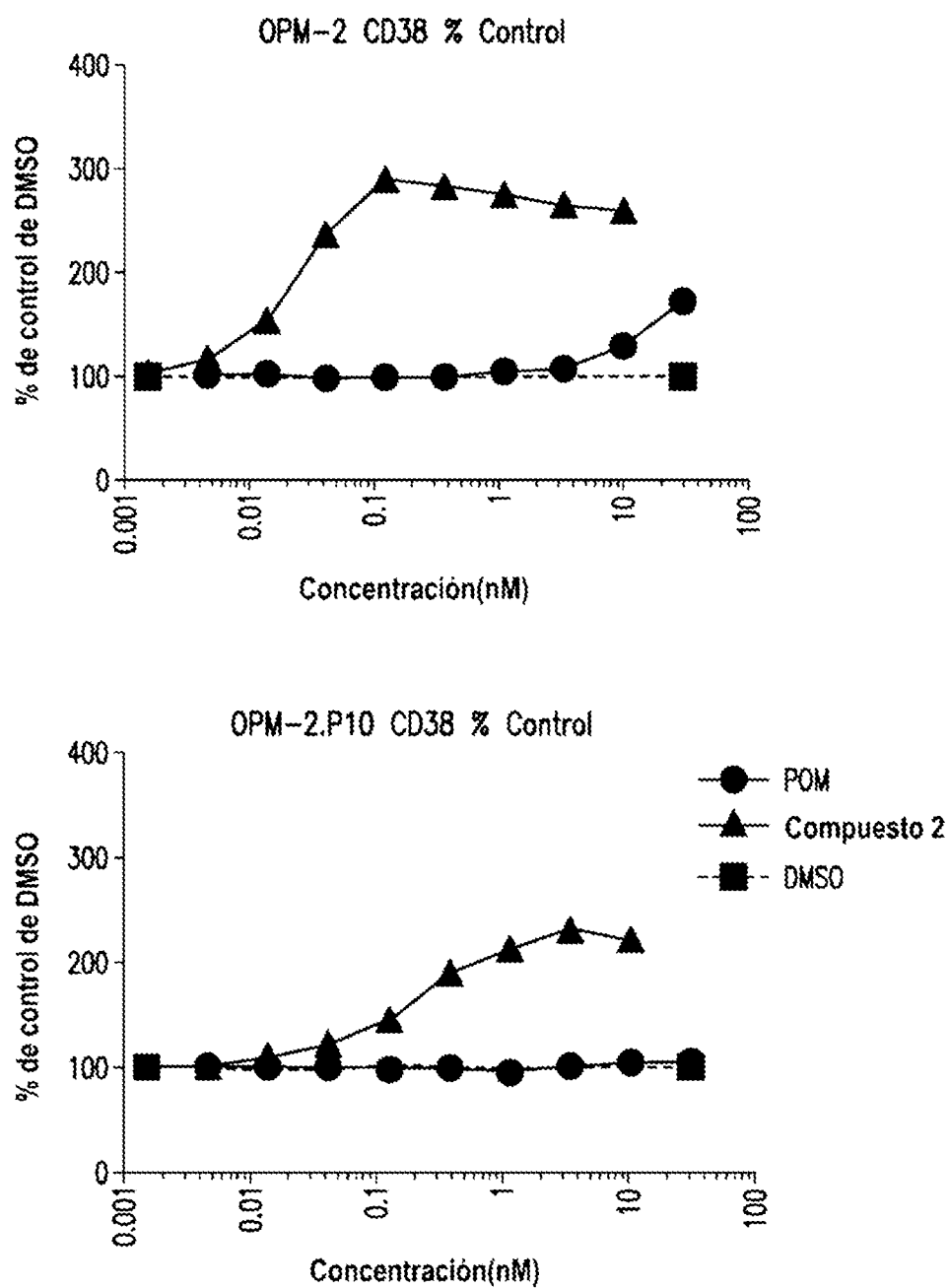


Figura 17

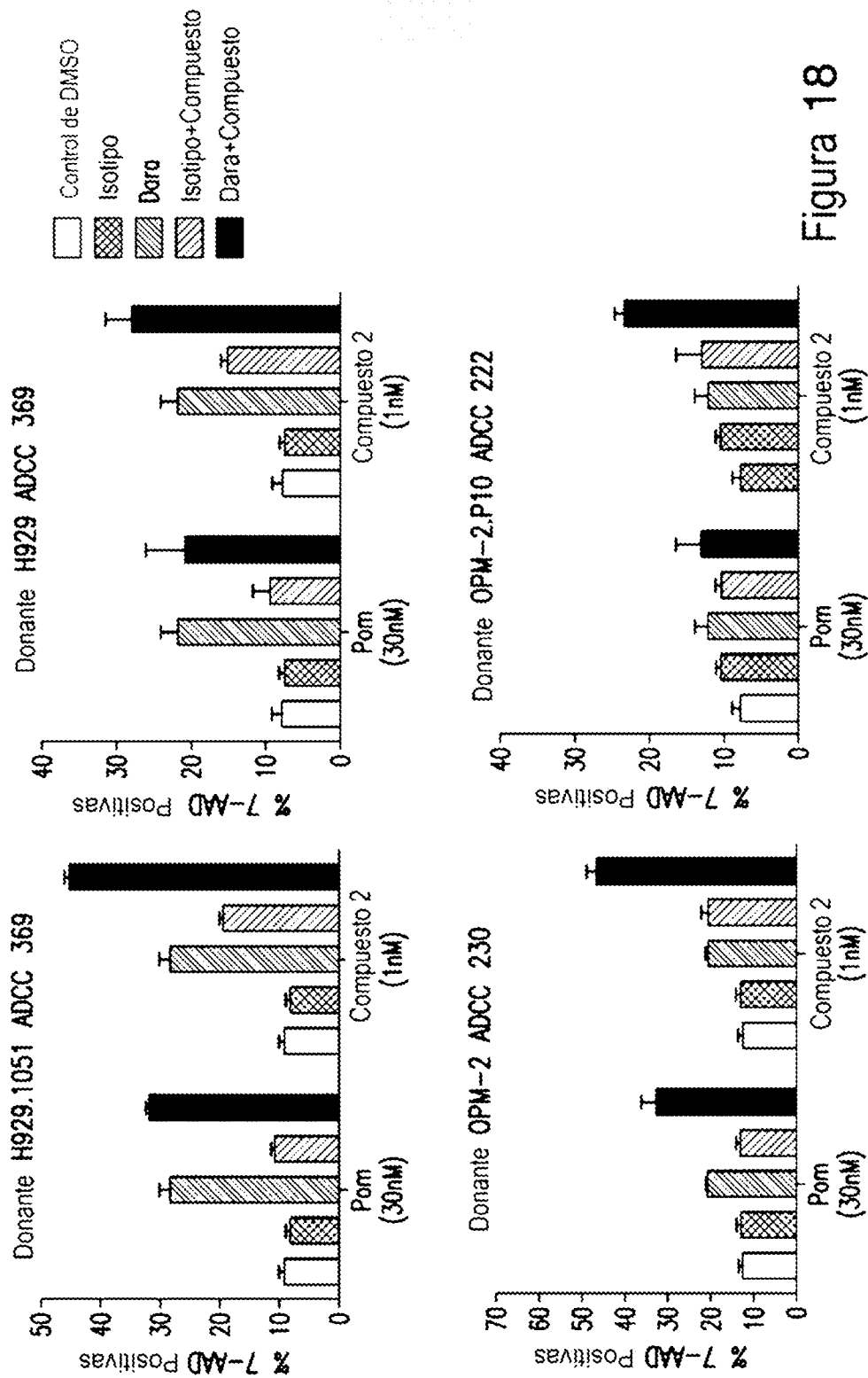


Figura 18

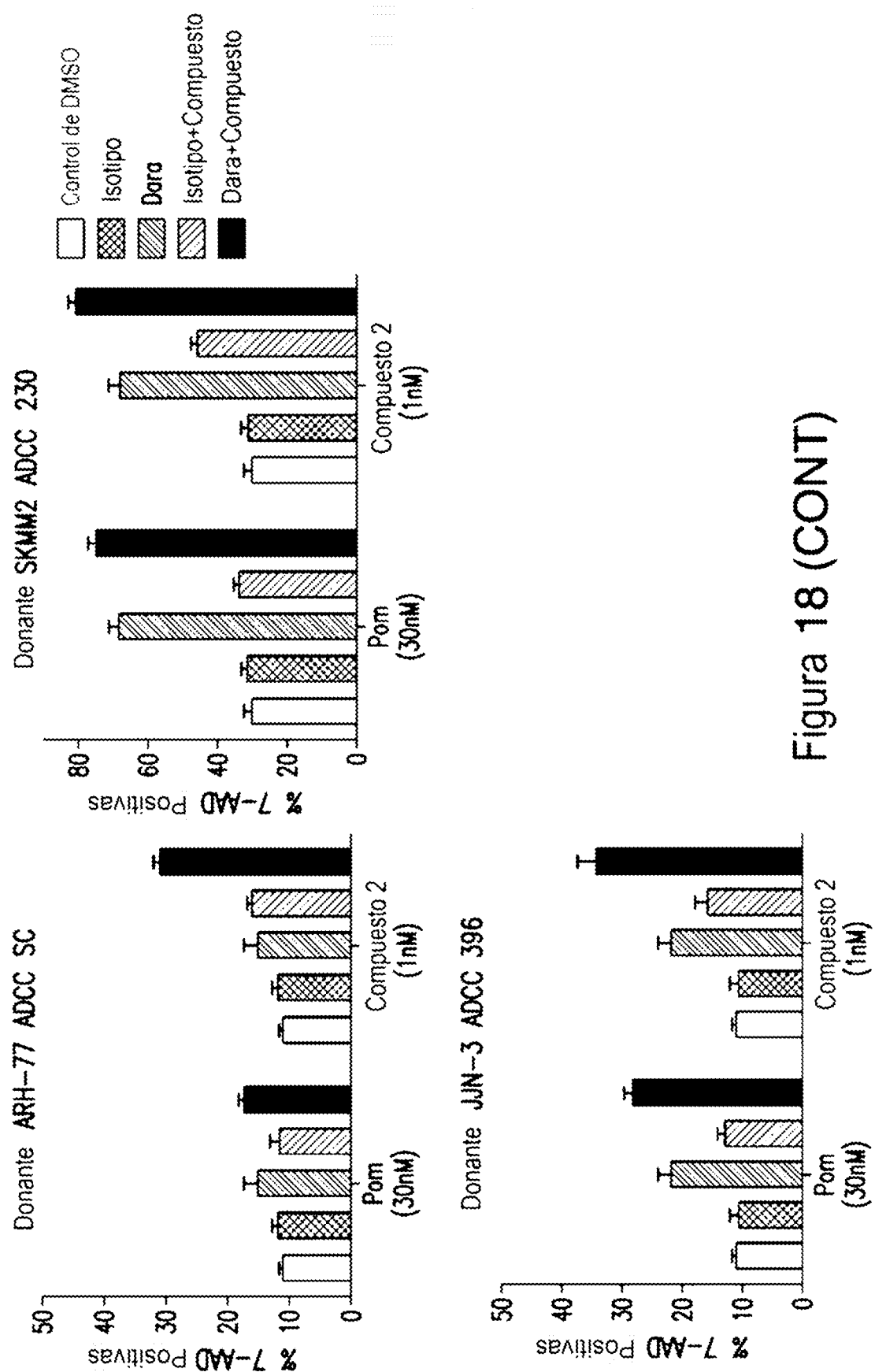


Figura 18 (CONT)

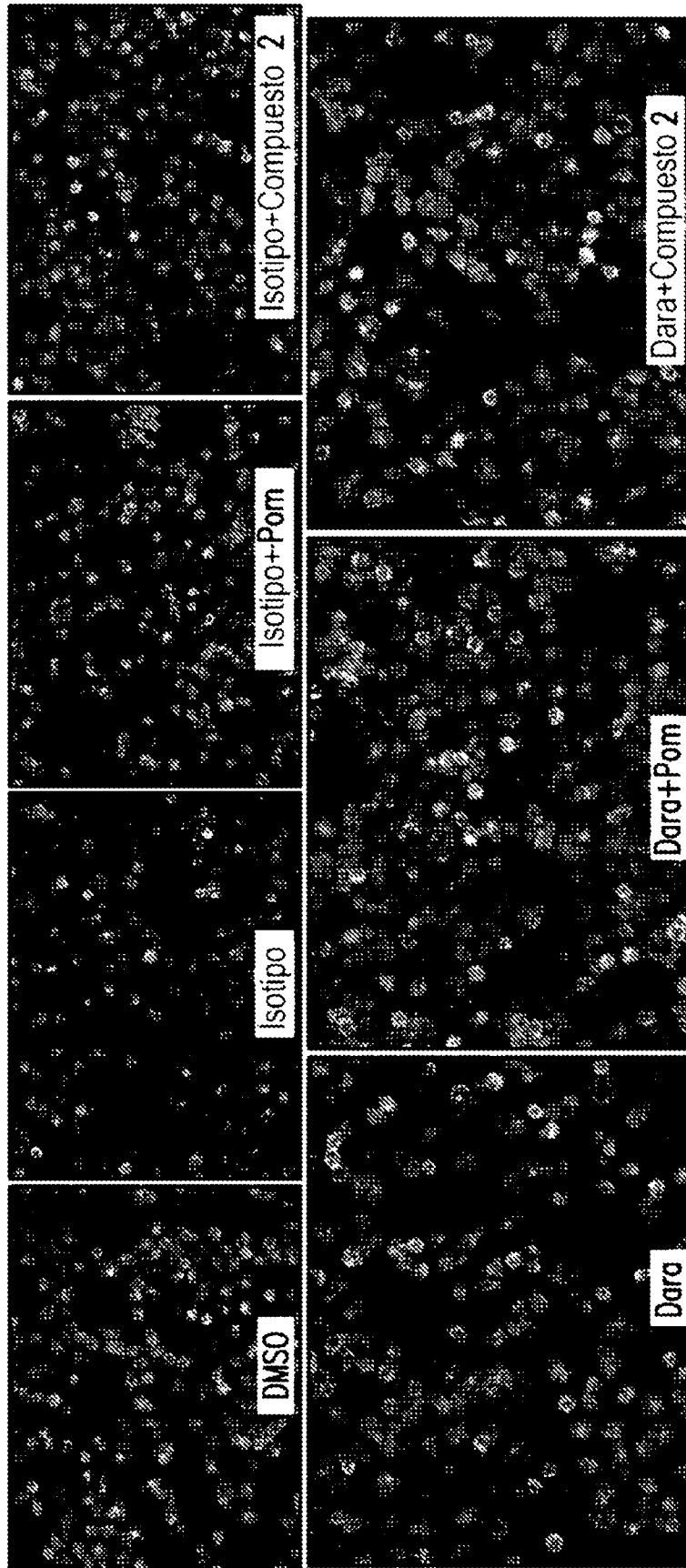


Figura 19A

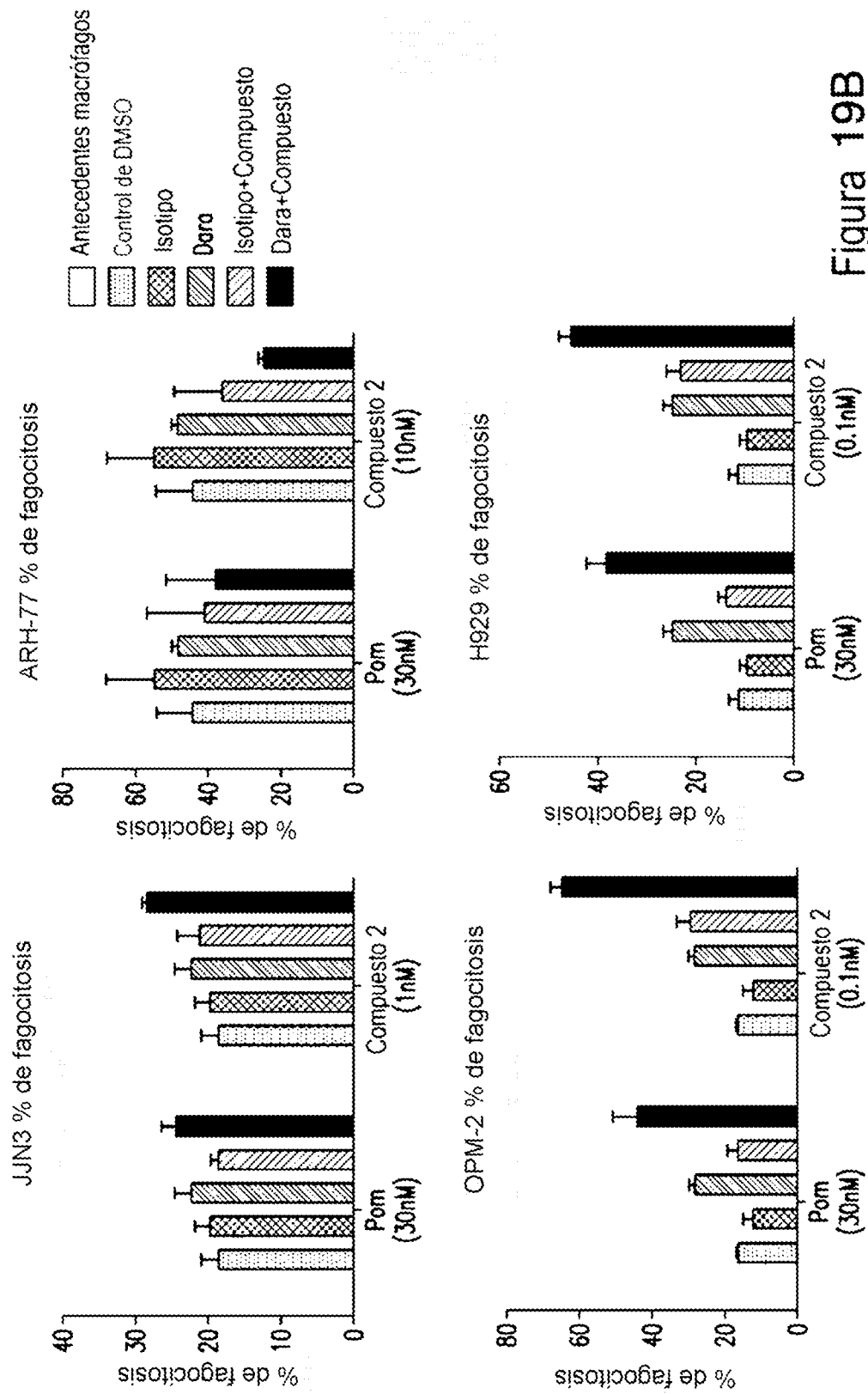


Figura 19B

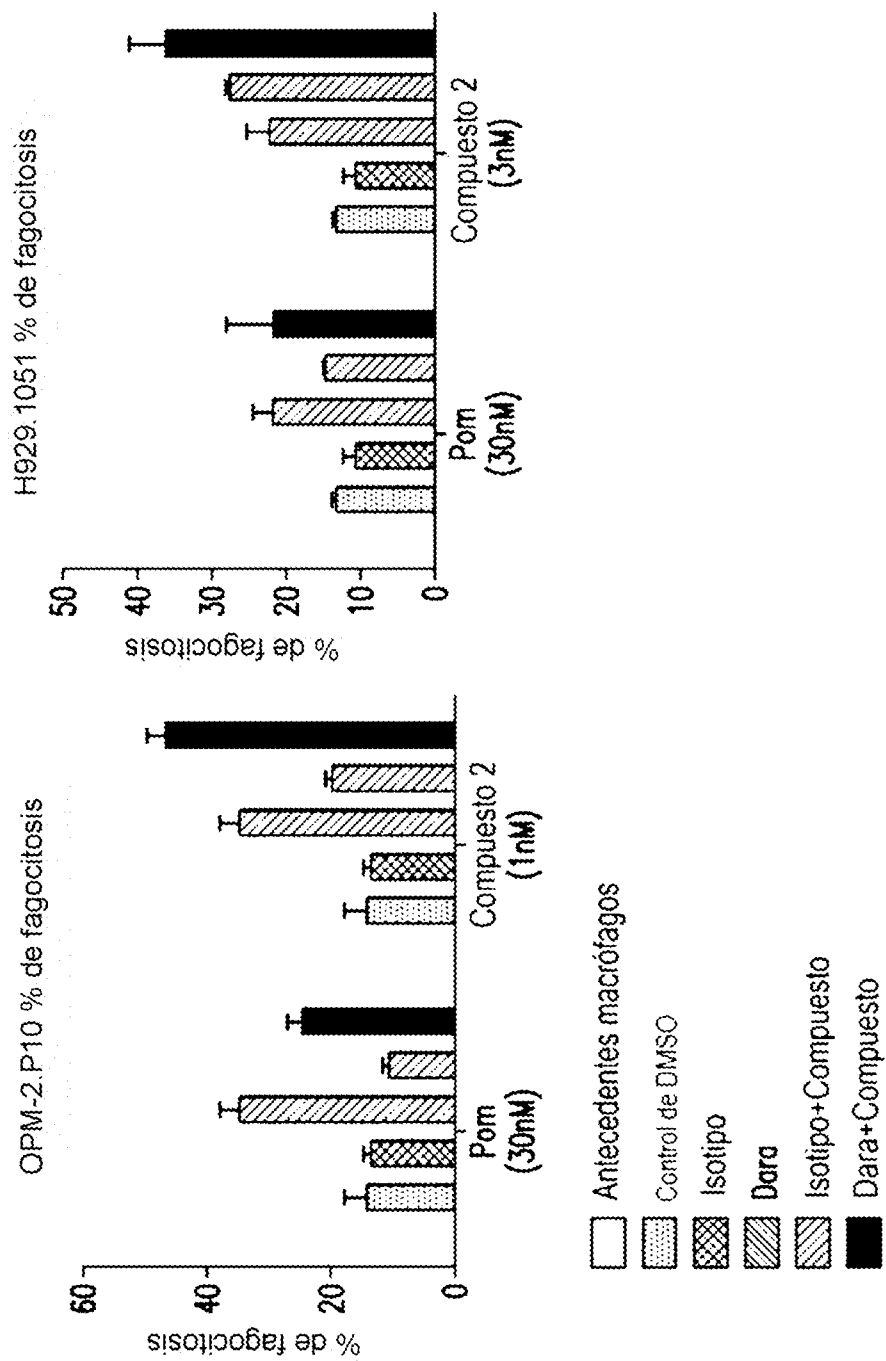


Figura 19B (CONT)

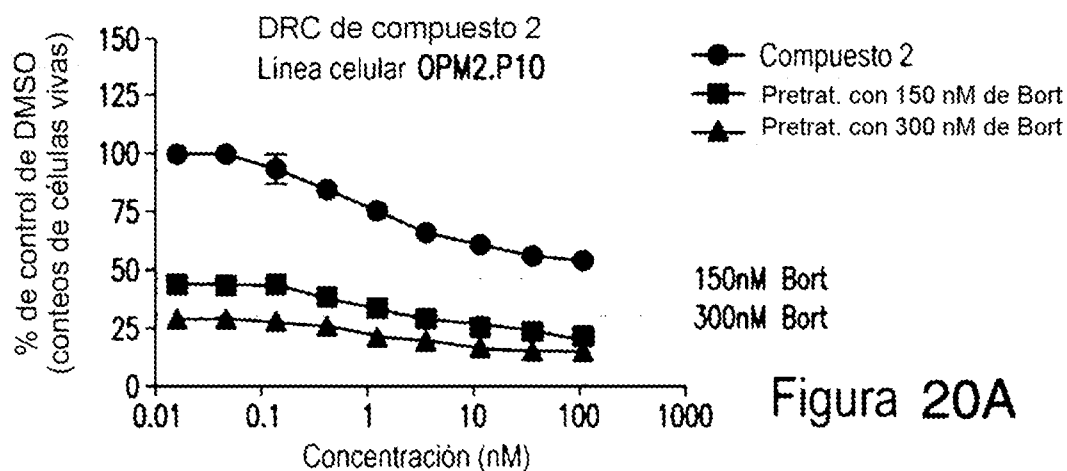


Figura 20A

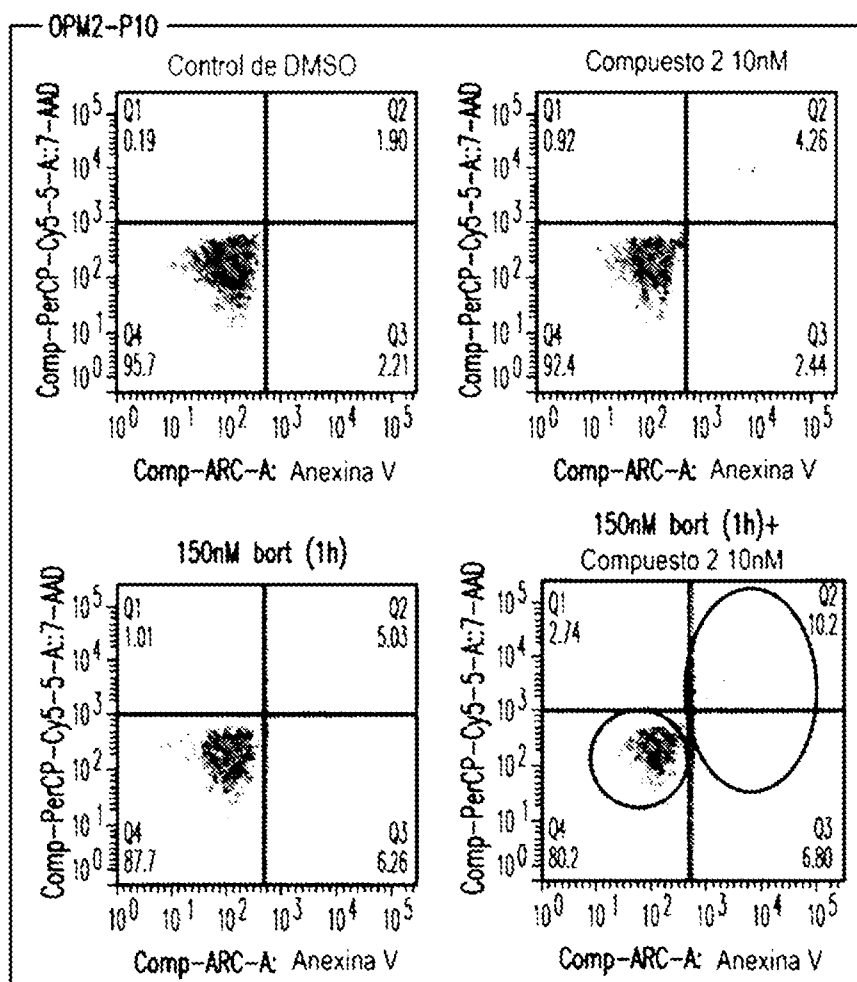


Figura 20B

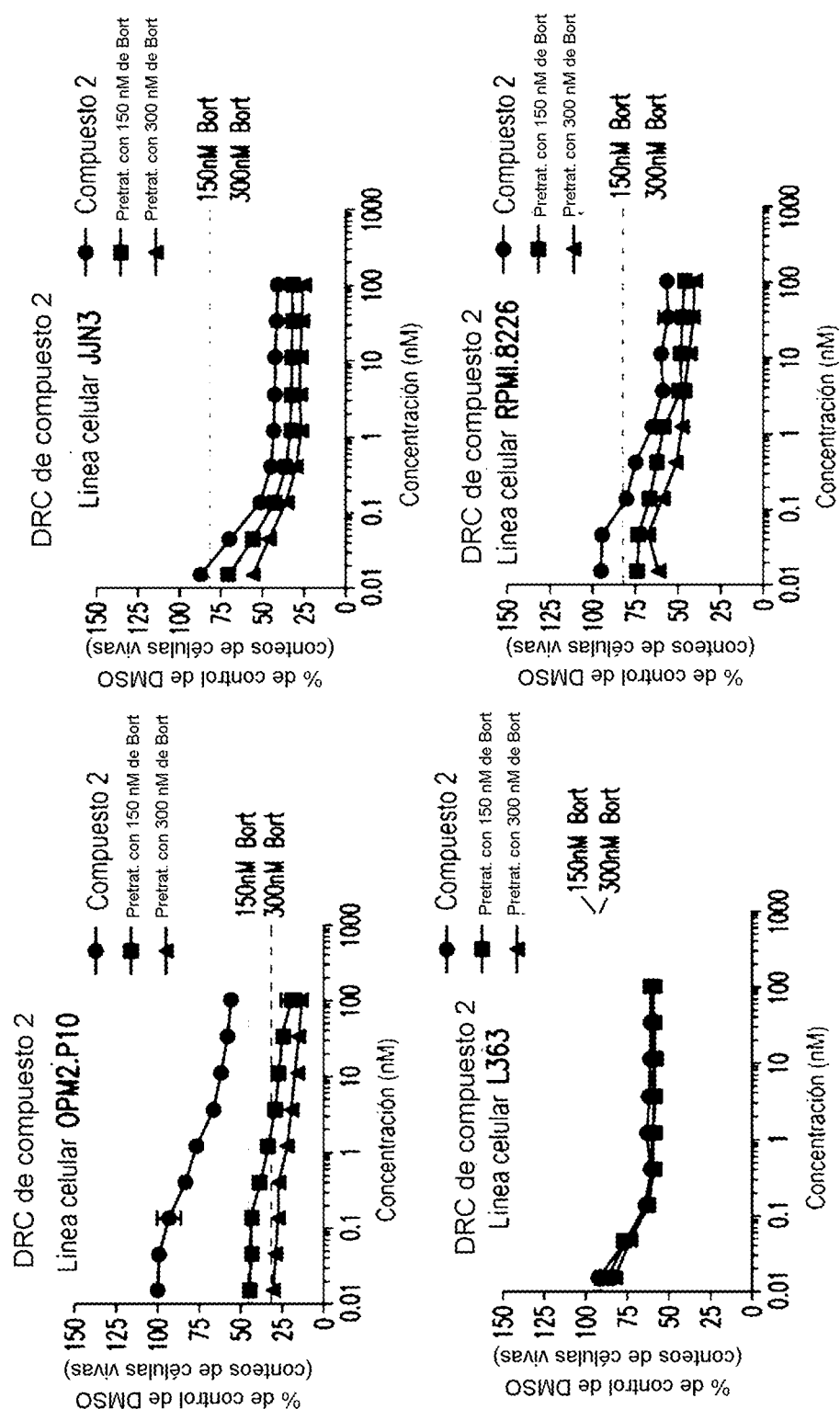


Figura 21A

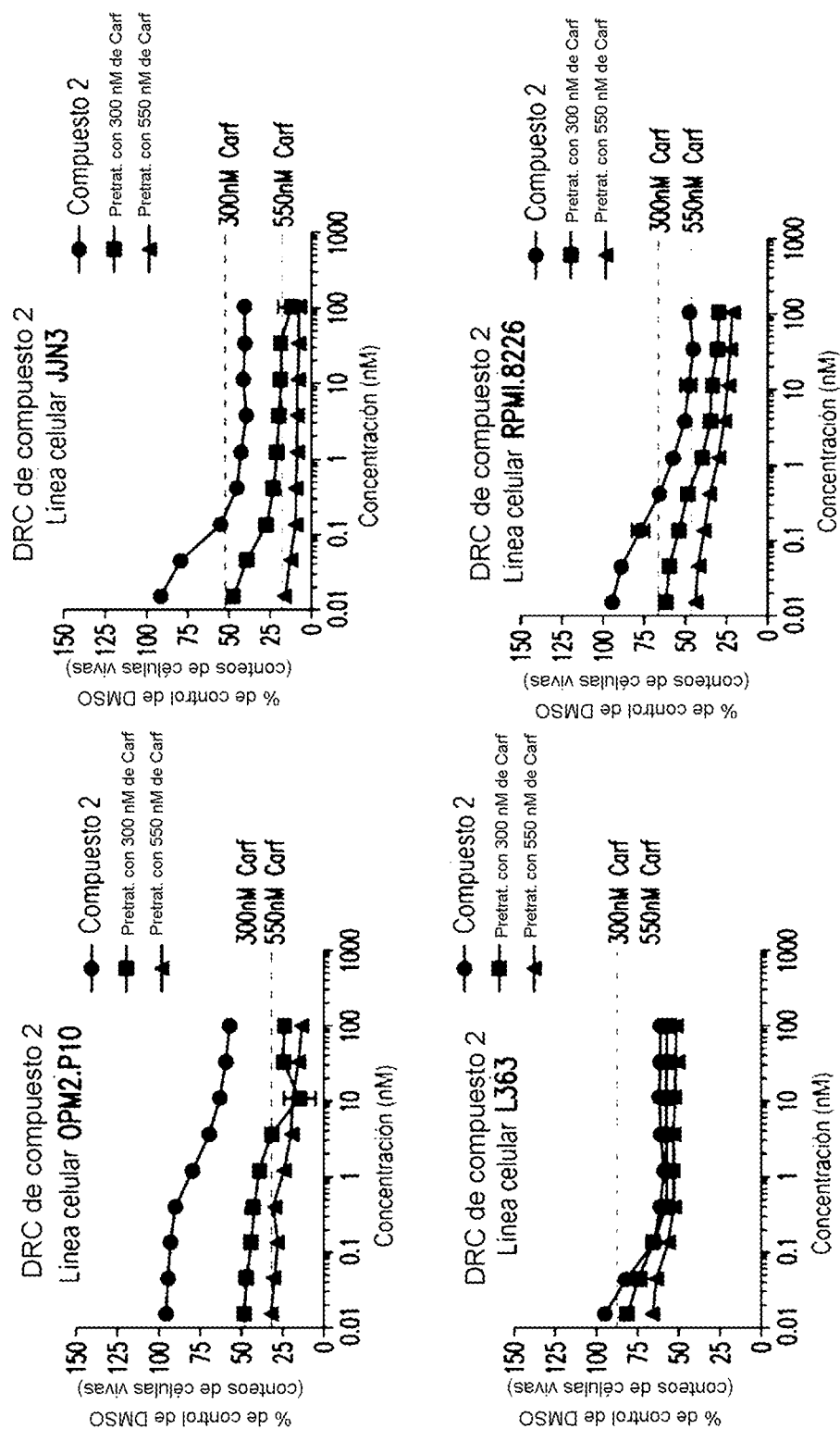


Figura 21B

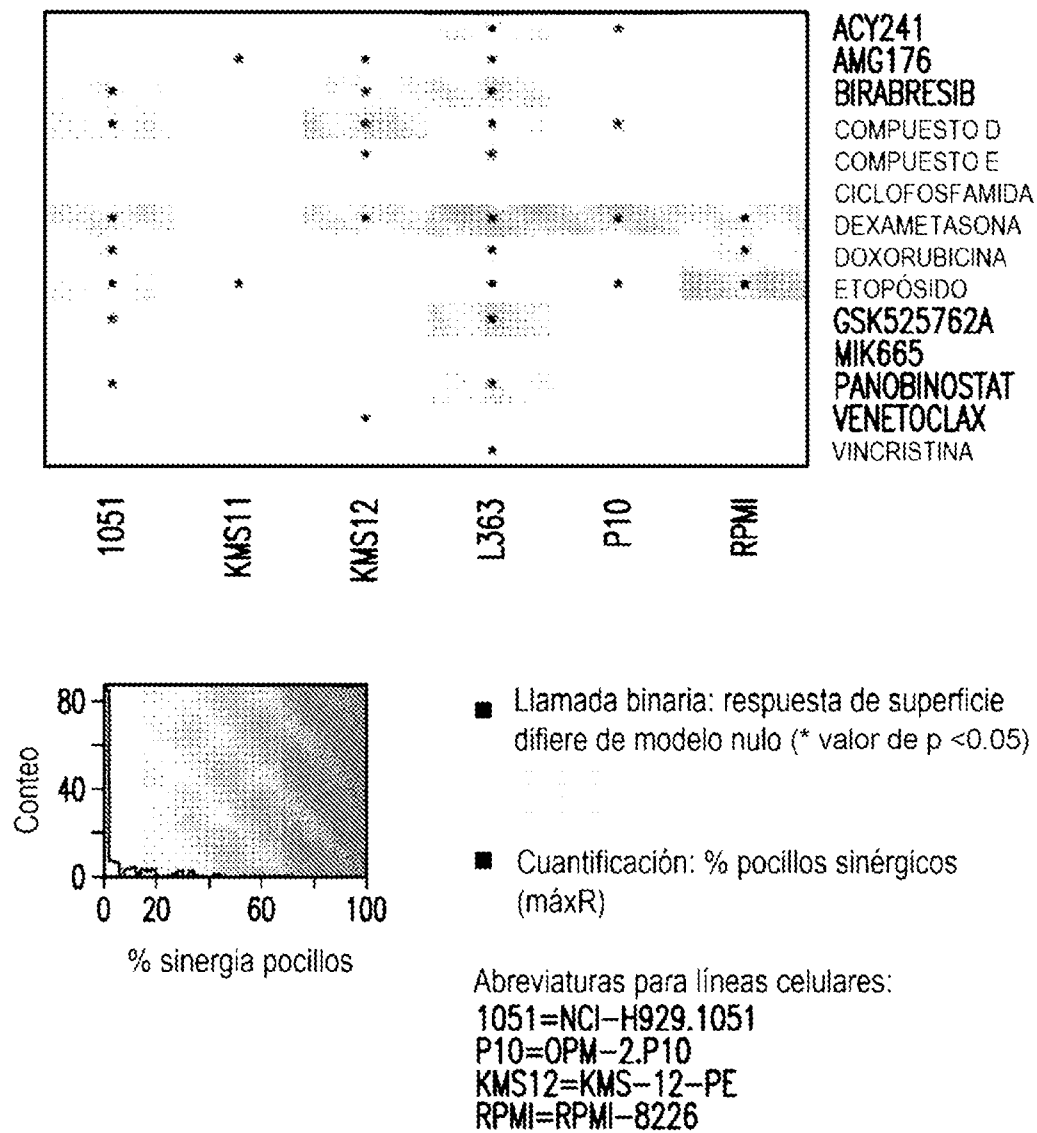


Figura 22

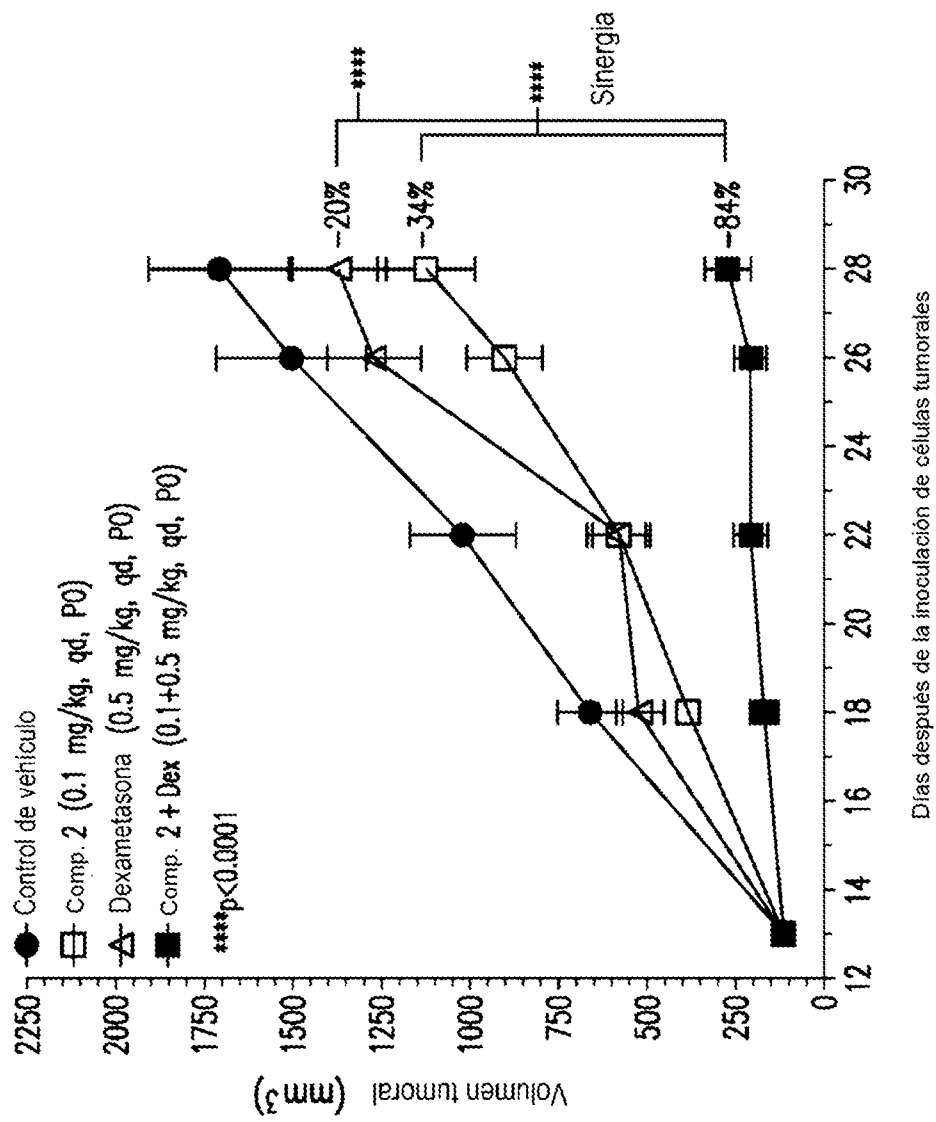


Figura 23

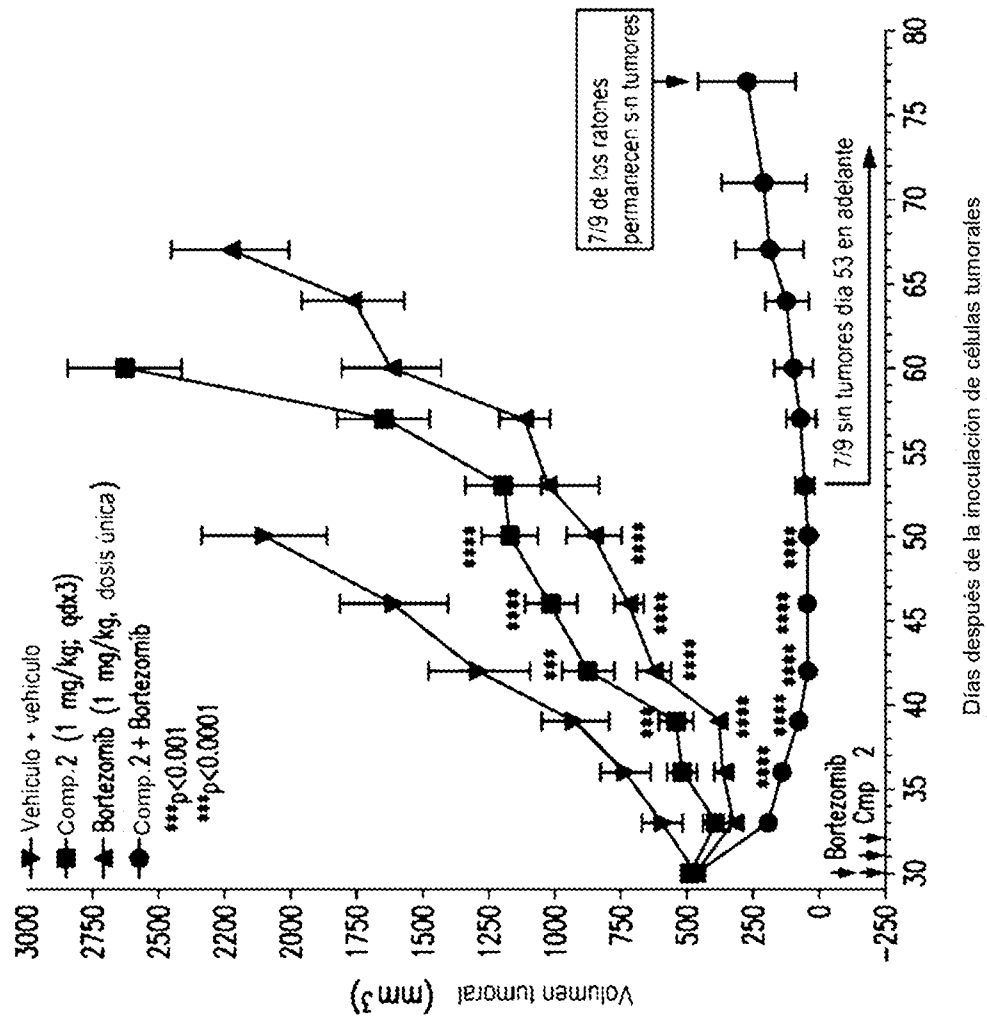


Figura 24