

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 285**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2008 E 08797814 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2187967**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar cánceres**

30 Prioridad:

16.08.2007 US 956295 P

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

10.09.2013

73 Titular/es:

**IRM LLC (100.0%)
131 FRONT STREET P.O. BOX HM 2899
HAMILTON HM LX, BM**

72 Inventor/es:

**DIERKS, CHRISTINE y
WARMUTH, MARKUS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 422 285 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para tratar cánceres

Campo técnico

5 La presente invención se refiere en general a métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales y para tratar cáncer.

Técnica anterior

10 La ruta de señalización Hh se ha caracterizado bien en la técnica (véase, por ejemplo, Nybakken *et al*, Curr. Opin. Genet. Dev. 2002, 12: 503-511; y Lum *et al*, Science 2003, 299: 2039-2045). Dicho de manera breve, en ausencia de ligandos Hedgehog, el receptor transmembrana, Patched (Ptch), se une a Smoothened (Smo) y bloquea la función de Smo. Esta inhibición se mitiga en la presencia de ligandos, lo cual permite a Smo iniciar una cascada de señalización que da como resultado la liberación de los factores de transcripción Glis de proteínas citoplásmicas fusionadas (Fu) y del Suppressor of fused (SuFu). (Supresor de fusión). En la situación inactiva, SuFu impide que los Glis se transloquen al núcleo. En la situación activa, Fu inhibe a SuFu y se liberan los Glis. Las proteínas Gli se translocan al interior del núcleo y controlan la transcripción genética objetivo.

15 El oncogén BCR-ABL es el producto del cromosoma Filadelfia (Ph) 22q y codifica para una proteína BCR-ABL quimérica que tiene actividad tirosina cinasa de ABL activada de manera constitutiva. (Lugo *et al*, Science 1990, 247: 1079-1082). BCR-ABL es la causa subyacente de la leucemia mieloide crónica. Mientras que la proteína BCR-ABL de 210 kDa se expresa en pacientes LMC, una proteína BCR-ABL de 190 kDa resultante de un punto de ruptura alternativo en el gen de BCR se expresa en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para Ph (Ph⁺).
20 (Bartram *et al*, Nature 1983, 306: 277-280; Chan *et al*, Nature 1987, 325: 635-637).

25 Se ha demostrado que BCR-ABL induce la proliferación y la antiapoptosis a través de diversos mecanismos en progenitores mieloides o linfoides comprometidos ó fibroblastos 3T3. (Pendergast *et al*, Cell 1993, 75: 175-85; Ilaria *et al*, J. Biol. Chem. 1996, 271: 31704-10; Chai *et al*, J. Immunol. 1997, 159:4720-8; y Skorski *et al*, EMBO J. 1997, 16: 6151-61). Sin embargo, se sabe poco acerca del efecto de BCR-ABL sobre la población de células madre hematopoyéticas (CMH). Publicaciones recientes sugieren que rutas de desarrollo como la ruta de señalización Wnt o el gen Polcomb BMI1 podrían estar implicados en la regulación y la expansión de las células madre leucémicas (Mohty *et al*, Blood, 2007; Hosen *et al*, Stem Cells, 2007). BMI1 y beta-catenina están ambos regulados por incremento en la crisis blástica de la LMC y su expresión se correlaciona con el avance de la enfermedad. Los progenitores de granulocitos-macrófagos positivos para BCR-ABL que han adquirido expresión de β -catenina son
30 células madre leucémicas candidatas en la crisis blástica de la LMC. Las rutas de auto-renovación implicadas en la expansión de las células madre leucémicas positivas para BCR-ABL durante la fase crónica, que conducen a la expansión inicial del clon maligno, no se entienden bien actualmente. El documento WO 2006/102611 se refiere a compuestos que activan PP2A, Current. Med. Chem. 13(6), páginas 603-607 menciona a la ciclopamina como inhibidor de la señalización Hedgehog, pero ambas publicaciones no mencionan combinaciones con dos agentes
35 diferentes.

Descripción de la invención

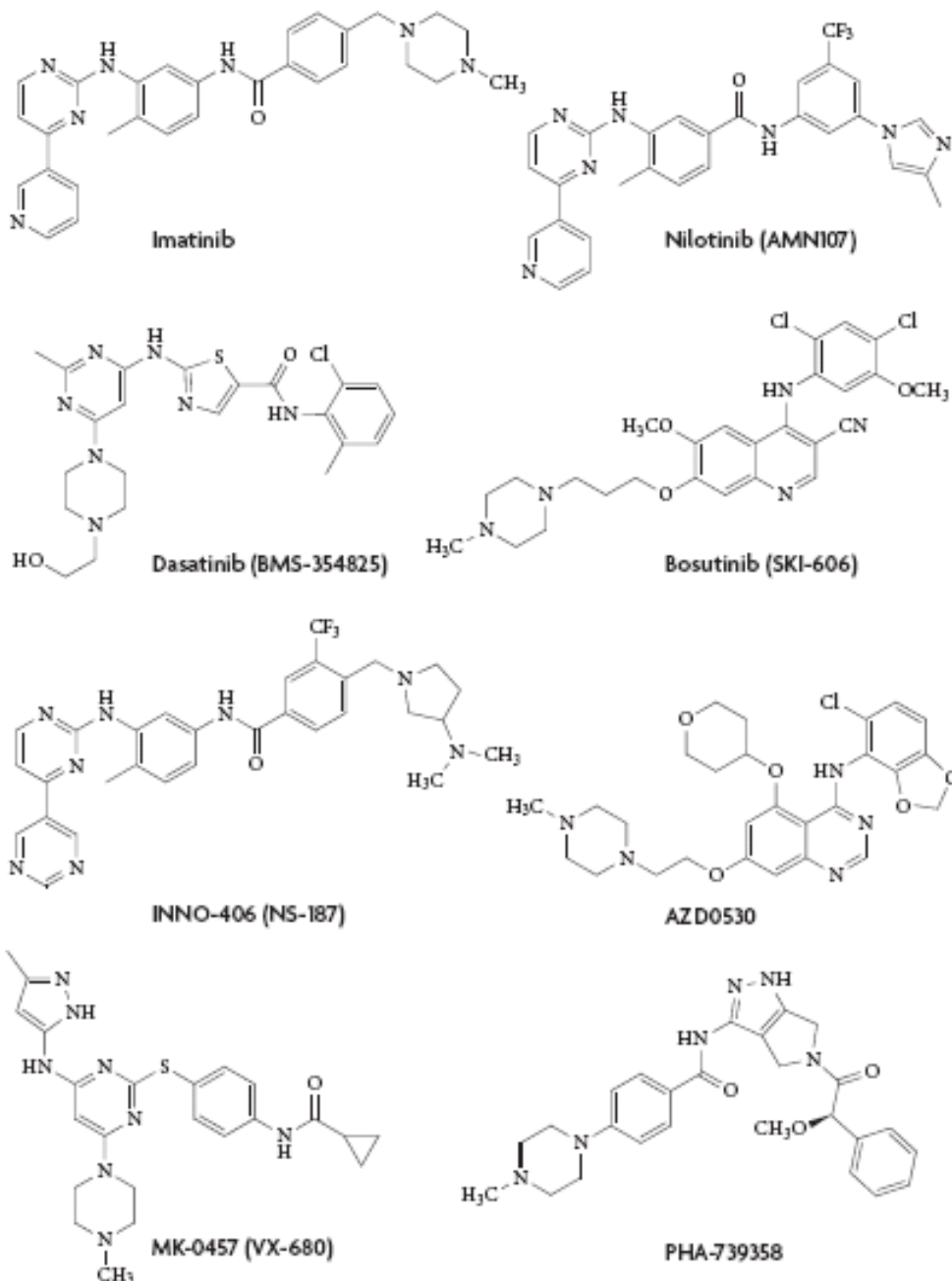
La invención proporciona composiciones y composiciones farmacéuticas de las mismas, que pueden ser útiles para inhibir el crecimiento de células tumorales y para tratar una variedad de cánceres.

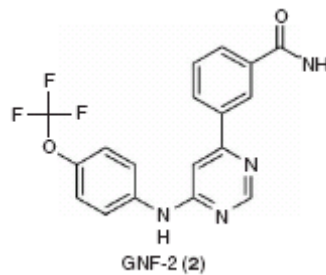
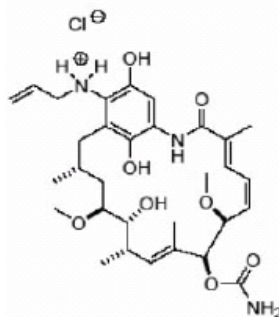
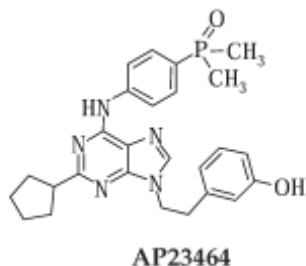
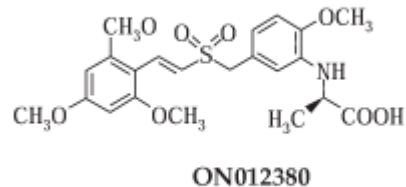
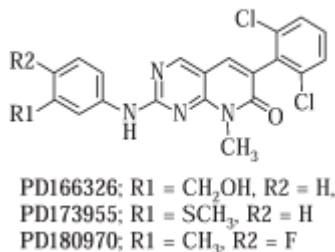
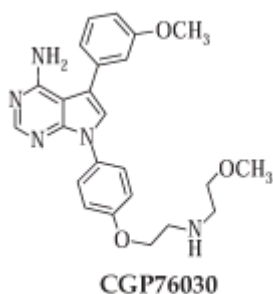
40 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición tal como se define en la reivindicación 2 y sus reivindicaciones dependientes que se incorporan todas ellas al presente documento como referencia, que comprende un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog y un segundo agente que inhibe BCR-ABL. En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog, un segundo agente que inhibe BCR-ABL y un portador farmacéuticamente aceptable, cada uno tal como se define en la reivindicación 2 y
45 sus reivindicaciones dependientes que se incorporan todas ellas al presente documento como referencia.

En otro aspecto, la invención proporciona una combinación de un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog y un segundo agente que inhibe BCR-ABL, cada uno tal como se define en la reivindicación 1 o sus reivindicaciones dependientes que se incorporan al presente documento como referencia. Una realización de la invención también se refiere a combinaciones o composiciones para su uso según las reivindicaciones 6 ó 7, que
50 también se incorporan al presente documento como referencia. La invención también proporciona métodos para tratar cánceres, en particular una leucemia positiva para BCR-ABL, que comprenden administrar a un sistema o a un sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog y un segundo agente que inhibe BCR-ABL, o composiciones farmacéuticas o sales

farmacéuticamente aceptables de la misma, tratando de esta manera dicha leucemia positiva para BCR-ABL. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden usarse para tratar leucemia mieloide crónica o leucemia linfocítica aguda.

- 5 Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog y un segundo agente que inhibe BCR-ABL, o composiciones farmacéuticas o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno proliferativo celular, en particular leucemia positiva para BCR-ABL, tal como se define en la reivindicación 5 y sus reivindicaciones dependientes que se incorporan todas ellas al presente documento como referencia.
- 10 En las composiciones y métodos anteriores para usar las composiciones de la invención, el primer agente en la composición inventiva puede unirse a Smo. El primer agente es ciclopamina o forskolina. El segundo agente en la composición o combinación inventiva se selecciona del grupo que consiste en:





5 En las composiciones y combinaciones anteriores de la invención, y métodos dados a conocer para usar las composiciones de la invención, la composición inventiva puede administrarse a un sistema que comprenda células o tejidos. En algunas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un sujeto humano o animal.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1A muestra los niveles de transcrito para Gli1 y Ptch1 en células CD34+ purificadas de pacientes sanos y de pacientes con LMC en fase crónica o en crisis blástica (valores normalizados para células CD34+). La figura 1B muestra la expresión de niveles de transcrito de Gli1 y Ptch1 en células madre o médula ósea completa positivas frente a negativas para BCR-ABL.

15 La figura 2A muestra el porcentaje de progenitores mieloides positivos para BCR-ABL (GFP) (Lin-, Kit+, Sca-) y CMH (Lin-, Kit+, Sca+) tras el tratamiento de cultivos mixtos de médula ósea con ciclopamina durante 72 horas. La figura 2B muestra la expresión de Gli1 tras el tratamiento de la médula ósea de ratones leucémicos con ciclopamina. La figura 2C muestra el número total de colonias contadas 10 días tras la siembra en placa de cultivos mixtos de médula ósea tratados con ciclopamina.

20 La figura 3A muestra el número de células positivas para Ly5.2 (embriones) en la sangre periférica tras el trasplante a ratones PepC-Ly5.1. La figura 3B muestra la distribución de tipos celulares en células positivas para Ly5.2 10 semanas tras el trasplante en la sangre periférica. La figura 3C muestra la regeneración de células positivas para Ly5.2 en la sangre periférica tras el tratamiento con 5-FU (150 mg/kg). La figura 3D muestra el porcentaje de células positivas para GFP en la sangre periférica de ratones con trasplante de médula ósea que contiene el 10% de células positivas para GFP, el 10% de células positivas para GFP de Smo o el 10% de células positivas para GFP de SMOW535E, durante un período de 60 semanas. La figura 3E muestra niveles de transcrito de GLI1 relativos de médula ósea, o bien infectada con un vector de control pMSCV o bien con el vector de GFP de Smo o GFP de SMOW535E.

30 La figura 4A muestra el número de células positivas para BCR-ABL en la sangre periférica de ratones con trasplante 20 días tras el trasplante (Tx). La figura 4B muestra el peso del bazo de ratones con trasplante 28 días tras el Tx. La figura 4C muestra la supervivencia de ratones con trasplante de células hepáticas fetales infectadas con BCR-ABL. La figura 4D muestra la supervivencia de ratones con nuevo trasplante de 2x10⁵ células de médula ósea positivas para BCR-ABL (GFP).

La figura 5A muestra la cantidad relativa de colonias de médula ósea positivas para GFP de un fémur en ratones BCR-ABL+ tratados con o bien AMN107 o bien una combinación de AMN107 y ciclopamina. La figura 5B muestra el peso del bazo y del hígado 8 días tras el final del tratamiento. La figura 5C muestra los días de supervivencia tras el final del tratamiento con o bien AMN107 solo o bien la combinación de AMN107 con ciclopamina.

5 Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos empleados en esta invención: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith *et al* (eds), Oxford University Press (edición revisada, 2000); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton *et al*, (eds), John Wiley & Sons (3ª ed., 2002); y A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin e Hine (eds), Oxford University Press (4ª ed., 2000). Además, se proporcionan las siguientes definiciones para ayudar al lector en la práctica de la invención.

El término “agente” o “agente de prueba” incluye cualquier sustancia, molécula, elemento, compuesto, entidad o una combinación de los mismos. Incluye, pero no se limita a, por ejemplo, proteína, polipéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido y similares. Puede ser un producto natural, un compuesto sintético, un compuesto químico o una combinación de dos o más sustancias. A menos que se especifiquen de otra manera, los términos “agente”, “sustancia” y “compuesto” pueden usarse de manera intercambiable.

El término “análogo” se usa en el presente documento para referirse a una molécula que se parece estructuralmente a una molécula de referencia, pero que se ha modificado de manera dirigida y controlada, mediante la sustitución de un sustituyente específico de la molécula de referencia con un sustituyente alternativo. En comparación con la molécula de referencia, un experto en la técnica esperaría que un análogo muestre una utilidad igual, similar o mejorada. La síntesis y el examen de análogos para identificar variantes de compuestos conocidos que tienen mejores rasgos (tales como una afinidad de unión superior por una molécula objetivo) es un enfoque bien conocido en la química farmacéutica.

Tal como se usa en el presente documento, “poner en contacto” tiene su significado normal y se refiere a combinar dos o más moléculas (por ejemplo, un compuesto orgánico de molécula pequeña y un polipéptido), o combinar moléculas y células (por ejemplo, un compuesto y una célula). La puesta en contacto puede producirse *in vitro*, por ejemplo, combinando dos o más agentes o combinando un compuesto y una célula o un lisado celular en un tubo de ensayo o en otro recipiente. La puesta en contacto también puede producirse en una célula o *in situ*, por ejemplo, poner en contacto dos polipéptidos en una célula mediante la coexpresión en la célula de polinucleótidos recombinantes que codifican para los dos polipéptidos, o en un lisado celular.

El término “Hedgehog” se usa para referirse genéricamente a cualquier miembro de la familia Hedgehog, incluyendo sonic, indian, desert y tiggly winkle. El término puede usarse para indicar una proteína o gen. El término también se usa para describir secuencias homólogas/ortólogas en diferentes especies de animales.

Los términos “ruta de señalización Hedgehog (Hh)” y “señalización Hedgehog (Hh)” se usan de manera intercambiable y se refieren a la cadena de acontecimientos normalmente mediados por diversos miembros de la cascada de señalización, tales como Hedgehog, Patched (Ptch), Smoothed (Smo) y Gli. La ruta Hedgehog puede activarse incluso en ausencia de una proteína Hedgehog, mediante la activación de un componente posterior. Por ejemplo, la sobreexpresión de Smo activará la ruta en ausencia Hedgehog.

Los componentes de señalización Hh o los miembros de la ruta de señalización Hh, se refieren a productos génicos que participan en la ruta de señalización Hh. Un componente de señalización Hh con frecuencia afecta a la transmisión de la señal de Hh en las células/ tejidos, dando como resultado normalmente cambios en el grado del nivel de expresión génica posterior y/o cambios fenotípicos. Los componentes de señalización Hh, dependiendo de su función biológica y de los efectos sobre el resultado final de la activación/expresión génica posterior, pueden dividirse en reguladores positivos y negativos. Un regulador positivo es un componente de señalización Hh que afecta positivamente la transmisión de la señal de Hh, es decir, estimula acontecimientos biológicos posteriores cuando está presente Hh. Los ejemplos incluyen Hedgehog, Smo y Gli. Un regulador negativo es un componente de señalización Hh que afecta negativamente a la transmisión de la señal de Hh, es decir, inhibe acontecimientos biológicos posteriores cuando está presente Hh. Los ejemplos incluyen (pero no se limitan a) Ptch y SuFu.

Los antagonistas de la señalización Hedgehog, los antagonistas de la señalización Hh o los inhibidores de la ruta de señalización Hh, se refieren a agentes que inhiben la bioactividad de un componente de señalización Hh positivo (tal como Hedgehog, Ptch o Gli) o que regulan por disminución la expresión del componente de señalización Hh. También incluyen los agentes que regulan por incremento un regulador negativo del componente de señalización Hh. Puede dirigirse un antagonista de la señalización Hedgehog hacia una proteína codificada por cualquiera de los

genes en la ruta Hedgehog, incluyendo (pero sin limitarse a) *sonic*, *indian*, o *desert Hedgehog*, *Smoothed*, *ptch-1*, *ptch-2*, *gli-1*, *gli-2*, *gli-3*, etc.

Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", tal como se usa en el presente documento, es uno que se origina a partir de una fuente extraña a la célula huésped particular, o, si se origina a partir de la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. Por consiguiente, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que, aunque sea endógeno para la célula huésped particular, se ha modificado. La modificación de la secuencia heteróloga puede producirse, por ejemplo, mediante el tratamiento del ADN con una enzima de restricción para generar un fragmento de ADN que puede unirse al promotor. Técnicas tales como la mutagénesis dirigida al sitio también son útiles para modificar un ácido nucleico heterólogo.

El término "homólogo", cuando se hace referencia a proteínas y/o a secuencias de proteínas, indica que se derivan, natural o artificialmente, de una proteína o secuencia de proteína ancestral común. De manera similar, los ácidos nucleicos y/o las secuencias de ácidos nucleicos son homólogas cuando se derivan, natural o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. La homología se infiere en general a partir de la similitud de secuencias entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de los mismos). El porcentaje preciso de similitud entre las secuencias que es útil para establecer la homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión, pero de manera rutinaria se usa tan solo una similitud de secuencias del 25% para establecer homología. También pueden usarse niveles superiores de similitud de secuencias, por ejemplo, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% o más, para establecer homología.

Una "célula huésped" se refiere a una célula procariota o eucariota en la que puede introducirse un polinucleótido heterólogo. El polinucleótido puede introducirse al interior de la célula mediante cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral y/o similares.

El término "inhibir" o "inhibición", en el contexto del crecimiento tumoral o del crecimiento de células tumorales, se refiere a la aparición retardada de tumores primarios o secundarios, al desarrollo más lento de tumores primarios o secundarios, a la aparición disminuida de tumores primarios o secundarios, a la gravedad ralentizada o reducida de los efectos secundarios de la enfermedad, o al crecimiento tumoral detenido y la regresión de tumores. El término "prevenir" o "prevención" se refiere a una inhibición completa del desarrollo de tumores primarios o secundarios, o de cualquier efecto secundario de la enfermedad. En el contexto de la modulación de las actividades enzimáticas, la inhibición se refiere a la supresión o reducción reversible de una actividad enzimática, incluyendo inhibición competitiva, acompetitiva y no competitiva. Esto puede distinguirse experimentalmente por los efectos del inhibidor sobre la cinética de reacción de la enzima, que puede analizarse en lo que se refiere a la ecuación de velocidad básica de Michaelis-Menten. La inhibición competitiva se produce cuando el inhibidor puede combinarse con la enzima libre de tal manera que compite con el sustrato normal para unirse al sitio activo. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima-inhibidor [EI], análogo al complejo enzima-sustrato.

El término "identidad de secuencias", en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos, se refiere a los residuos de las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de un intervalo de comparación especificado. Un "intervalo de comparación" se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, usualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más usualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez que las dos secuencias están alineadas óptimamente. Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 1981, 2: 482; mediante el algoritmo de alineación de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 1970, 48: 443; mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 1988, 85: 2444; o mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (incluyendo, pero sin limitarse a, CLUSTAL en el programa PC/Gene por Intelligentics, Mountain View, CA; y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA o TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., EE.UU.). El programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp, *Gene* 1988, 73: 237-244; Higgins y Sharp, *CABIOS* 1989, 5: 151-153; Corpet *et al*, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16: 10881-10890; Huang *et al*, *Computer Applications in the Biosciences* 1992, 8: 155-165; y Pearson *et al*, *Methods in Molecular Biology* 1994, 24: 307-331. La alineación también se lleva a cabo con frecuencia mediante inspección y alineación manual. En una clase de realizaciones, los polipéptidos son idénticos en al menos el 70%, generalmente en al menos el 75%, opcionalmente en al menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99% o más a un polipéptido de referencia (por ejemplo, una molécula Hedgehog, por ejemplo, tal como se mide mediante BLASTP o CLUSTAL, o mediante cualquier otro software de alineación disponible, utilizando parámetros por defecto). De manera similar, los ácidos nucleicos también pueden describirse con referencia a un ácido nucleico de partida, por ejemplo, pueden ser idénticos en el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más a un ácido nucleico de referencia (por ejemplo, tal como se mide mediante BLASTN o CLUSTAL, o mediante cualquier otro software de alineación disponible utilizando parámetros por defecto).

Una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos “sustancialmente idéntica” se refiere a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con una secuencia de referencia, usando los programas descritos anteriormente (preferiblemente BLAST), usando parámetros convencionales. La identidad de secuencia puede ser de al menos el 95%, más particularmente de al menos el 98%, y en algunos ejemplos, es de al menos el 99%. Por ejemplo, el programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU: 1989, 89: 10915). El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de un intervalo de comparación, en la que la parte de la secuencia de polinucleótido en el intervalo de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos), en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando del número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido o base de ácido nucleico idéntico en ambas secuencias, para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en el intervalo de comparación, y multiplicando el resultado por 100, para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Puede existir identidad sustancial a lo largo de una región de las secuencias que sea de al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, más particularmente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 residuos. En algunos ejemplos, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de al menos aproximadamente 150 residuos, o las secuencias pueden ser sustancialmente idénticas a lo largo de toda la longitud de las regiones codificantes.

El término “modular”, con respecto a una actividad biológica de una proteína de referencia (por ejemplo, un miembro de la ruta Hedgehog) o su fragmento, se refiere a un cambio en el nivel de expresión u otras actividades biológicas de la proteína. Por ejemplo, la modulación puede provocar un aumento o una disminución en el nivel de expresión de la proteína de referencia, una modificación enzimática (por ejemplo, fosforilación) de la proteína, características de unión (por ejemplo, unión con otra molécula) o cualquier otra propiedad biológica (por ejemplo, enzimática), funcional o inmunológica de la proteína de referencia. El cambio en la actividad puede surgir, por ejemplo, a partir de un aumento o una disminución en la expresión de uno o más genes que codifican para la proteína de referencia, en la estabilidad de un ARNm que codifica para la proteína, en la eficacia de la traducción, o a partir de un cambio en otras actividades biológicas de la proteína de referencia. El cambio también puede deberse a la actividad de otra molécula que modula la proteína de referencia (por ejemplo, una cinasa que fosforila la proteína de referencia).

La modulación de una proteína de referencia puede ser una regulación por incremento (es decir, activación o estimulación) o una regulación por disminución (es decir, inhibición o supresión). El modo de acción de un modulador de la proteína de referencia puede ser directo, por ejemplo, a través de la unión con la proteína o con genes que codifican para la proteína, o indirecto, por ejemplo, a través de la unión con y/o la modificación de (por ejemplo, enzimáticamente) otra molécula que modula de otra manera la proteína de referencia.

El término “sujeto” incluye mamíferos, en especial seres humanos. También abarca otros animales no humanos, tales como vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos.

El término “tratar” o “tratamiento” se refiere al crecimiento tumoral detenido y a la regresión parcial o completa de los tumores. El término “tratar” incluye la administración de compuestos o agentes para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad (por ejemplo, leucemia), aliviar los síntomas, o detener o inhibir el desarrollo adicional de la enfermedad, estado o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma), o el alivio o supresión terapéutico de los síntomas tras la manifestación de la enfermedad.

Una “variante” de una molécula de referencia se refiere a una molécula sustancialmente similar en su estructura y actividad biológica, a o bien la molécula de referencia entera, o bien a un fragmento de la misma. Por consiguiente, siempre que dos moléculas posean una actividad similar, se consideran variantes tal como se usa este término en el presente documento, aunque la composición o la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una de las moléculas no sea idéntica a la encontrada en la otra, o aunque la secuencia de residuos de aminoácidos no sea idéntica.

Modos de llevar a cabo la invención

La invención proporciona composiciones y composiciones farmacéuticas de las mismas, que pueden ser útiles para inhibir el crecimiento de células tumorales y para tratar una variedad de cánceres.

De manera más particular, la invención proporciona una composición que comprende un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog y un segundo agente que inhibe BCR-ABL, cada uno tal como se definió anteriormente. La composición puede usarse para inhibir el crecimiento y la proliferación de tumores

hematopoyéticos de origen linfoide y mieloide, y para tratar cánceres que se sabe que están asociados con proteínas tirosina cinasas, tales como, por ejemplo, Src, BCR-ABL y c-kit. En realizaciones particulares, la composición puede usarse para tratar leucemia mieloide crónica (LMC) positiva para BCR-ABL y leucemia linfocítica aguda (LLA).

5 La leucemia mieloide crónica se caracteriza por la expansión de un clon de células madre leucémicas que porta una translocación del cromosoma Filadelfia, que supera a las células madre hematopoyéticas no malignas. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que BCR-ABL potencia directamente la auto-renovación de células madre hematopoyéticas y progenitoras, mediante la activación de la ruta de señalización Hedgehog a través de la regulación por incremento de Smo. BCR-ABL regula por incremento la expresión de Smo y activa la ruta de señalización Hedgehog en CMH de ratón y humanas.

15 La inhibición farmacológica de la actividad de Smo en cultivos de médula ósea positivos para BCR-ABL inhibe la capacidad de formación de colonias de células autorrenovables positivas para BCR-ABL *in vitro*. El tratamiento combinado de ratones leucémicos con AMN107 (inhibidor de Abl) y ciclopamina (inhibidor de Smo) condujo a una reducción de las células autorrenovables positivas para BCR-ABL *in vivo*, y mejoró el tiempo hasta la recivida más de 3 veces, en comparación con los ratones tratados con AMN107 solo. Por consiguiente, BCR-ABL mejora la autorrenovación de las células madre leucémicas a través de la activación intrínseca de la señalización Hedgehog mediante la regulación por incremento de Smo. Por consiguiente, la inhibición de la ruta de Hh sola o en combinación con inhibidores de Abl, podría servir como una estrategia terapéutica eficaz para reducir el conjunto de células madre malignas en las leucemias positivas para BCR-ABL.

20 Los métodos terapéuticos emplean un agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog en combinación con un agente que inhibe BCR-ABL, para inhibir el crecimiento y la proliferación de células de cáncer, en particular de cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático, tales como leucemia y mielomas. Estos métodos implican poner en contacto esta célula tumoral (*in vitro* o *in vivo*) con una composición que comprende un inhibidor de la ruta de señalización Hh y un inhibidor de BCR-ABL.

25 A. Agentes que inhiben la señalización Hedgehog

Pueden usarse diversos agentes que inhiben la ruta de señalización Hedgehog conocidos en la técnica, para poner en práctica el contenido dado a conocer o las realizaciones de la invención. Estos incluyen compuestos orgánicos que modulan directa o indirectamente una actividad biológica (por ejemplo, una actividad enzimática) de un miembro de la ruta de señalización Hedgehog. También incluyen agentes que se dirigen específicamente a un gen o un ARNm que codifica para un miembro de la ruta de señalización Hedgehog. También pueden emplearse otros antagonistas de la ruta de señalización Hedgehog para poner en práctica los métodos, incluyendo anticuerpos u otros agentes de unión que se dirijan a un miembro de la ruta de señalización Hedgehog (por ejemplo, un receptor transmembrana).

35 La ruta de señalización Hh es una ruta de desarrollo que se demuestra que desempeña un papel en células madre hematopoyéticas (CMH) fetales y adultas. (Trowbridge *et al*, Proc Natl Acad Sci EE.UU: 2006, 103: 14134-9). Los ligandos Hedgehog (Shh, Ihh y Dhh) producidos por las células estromales se unen al receptor con siete dominios transmembrana Ptch. La unión del ligando con Ptch libera la unión de Ptch con Smo, un segundo receptor de siete dominios transmembrana. Esto da como resultado un cambio conformacional de Smo y la siguiente activación de la ruta de señalización posterior con la inducción de los factores de transcripción Gli (Gli1, Gli2, Gli3) y la transcripción de genes objetivo como Gli1, Ptch1, ciclina D1 y Bcl2 (Duman-Scheel *et al*, Nature 2002, 417: 299-304). Durante la embriogénesis temprana, la secreción del Hedgehog indiano por el endodermo visceral induce la formación de células hematopoyéticas primitivas en el saco vitelino de embriones murinos. Embriones de pez cebra con mutaciones defectuosas en Smo o tratados con el inhibidor de la señalización Hh ciclopamina, muestran defectos en la formación de CMH adultas (Gering *et al*, Dev. Cell. 2005, 8: 389-400). Publicaciones recientes indican un papel de la señalización Hedgehog en la regulación del ciclo celular de CMH adultas (Trowbridge *et al*, citado anteriormente).

45 Para poner en práctica los métodos terapéuticos de la descripción, pueden modularse varios de los componentes de la ruta de señalización Hh. Estos incluyen reguladores positivos de la señalización Hh, que pueden ser reguladores antagonizados y negativos de la señalización Hh, que pueden agonizarse. Hedgehog (Hh) (incluyendo, por ejemplo, Ihh, Shh, y Dhh), Smoothed (Smo) y Gli son ejemplos de reguladores positivos, mientras que Patched (Ptch) y Suppressor of Fused (Fu) son reguladores negativos. Todos los genes de la ruta de señalización Hh en diversas especies, pueden clonarse fácilmente basándose en secuencias fácilmente disponibles en bases de datos públicas y privadas, tales como GenBank, EMBL o FlyBase.

55 En la técnica se conocen muchos inhibidores de la ruta de señalización Hedgehog y pueden emplearse fácilmente en la práctica de la ruta de señalización Hedgehog. Algunos antagonistas de la señalización Hh son compuestos de molécula pequeña que se dirigen a un miembro clave de la ruta Hh, tal como Smo, por ejemplo, ciclopamina, SANT1 y Cur61414 (Katoh *et al*, Maycer Biol Ther. 2005, 4: 1050-4; y Williams *et al*, Proc Natl Acad Sci EE.UU.: 2003, 100: 4616-21). Por ejemplo, en una realización de la invención, la ciclopamina inhibe la ruta de señalización Hedgehog

mediante la unión directamente con Smo. Otros antagonistas de la señalización Hh inhiben indirectamente la ruta Hh mediante la acción sobre otra molécula, que a su vez afecta a la señalización Hh. Por ejemplo, en otra realización de la invención, la forskolina activa la proteína cinasa A, que a su vez bloquea la señalización Hh posterior de Smo (véase, por ejemplo, Yao *et al*, Dev Biol. 2002, 246: 356-65). Se han descrito inhibidores de compuestos orgánicos adicionales de la señalización Hh, por ejemplo, en las solicitudes de patente estadounidenses n.^{os} US20060063779 (Gunzner *et al*, 2006), US20050222087 (Beachy, 2005) y US20010034337 (Dudek *et al*, 2001). Puede emplearse cualquiera de estos antagonistas de la señalización Hh para llevar a cabo los métodos terapéuticos de la presente descripción. Algunos de los compuestos pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, ciclopamina o SANT-1). Otros pueden sintetizarse fácilmente empleando los métodos puestos en práctica de manera rutinaria en la técnica de la química orgánica.

En algunas realizaciones de la descripción, el antagonista empleado de la señalización Hh es un agente de unión que inhibe específicamente la activación de la ruta de señalización Hh. Por ejemplo, cuando no se une mediante su ligando, el receptor transmembrana Ptch se une a Smo y bloquea su función. Por consiguiente, puede usarse un agente de unión que pueda inhibir o bloquear la unión de Hedgehog con Ptch, para antagonizar la señalización Hh. Son útiles anticuerpos antagonistas u homólogos de anticuerpos, así como otras moléculas, tales como formas solubles de las proteínas de unión naturales para Hedgehog. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales, tales como un homólogo de anticuerpo anti-Hedgehog o anti-Patched, para poner en práctica los métodos dados a conocer en el presente documento. Estos anticuerpos deben poder bloquear la unión de Hedgehog con Ptch, pero no activan la señalización Hh.

En algunos métodos, puede usarse un anticuerpo que se una específicamente a un polipéptido tipo Hedgehog. El uso de anticuerpos neutralizantes frente a Hedgehog para inhibir la señalización Hh es bien conocido y se pone en práctica de manera rutinaria en la técnica. Véase, por ejemplo, Ahlgren *et al*, Curr Biol. 1999, 9: 1304-14; Cobourne *et al*, J Dent Res. 2001, 80: 1974-9; Hall *et al*, Dev Biol. 2003, 255: 263-77; y Berman *et al*, Nature 2003, 425: 846-51. Un ejemplo de estos anticuerpos neutralizantes frente a Hedgehog es el clon de anticuerpo monoclonal 5E1. Este anticuerpo puede obtenerse en Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa.

En algunas otras realizaciones de la descripción, pueden usarse formas solubles de agentes de unión derivados de Ptch. Estos incluyen los péptidos tipo Ptch solubles, proteínas de fusión de Ptch o proteínas de fusión bifuncionales Ptch/Ig. Algunos de estos agentes solubles contienen un fragmento de polipéptido con una secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a la de un fragmento de Ptch que alberga su sitio de unión a ligando. Por ejemplo, puede emplearse una forma soluble de Ptch o un fragmento del mismo que se una a Hedgehog para competir con Ptch en las células para unirse a Hedgehog, bloqueando de esta manera la activación de la señalización Hh. Además, en la práctica de la descripción, también pueden usarse mutantes de Hedgehog solubles que se unan a Ptch pero que no provoquen la señalización dependiente Hedgehog.

Algunas aplicaciones terapéuticas dirigidas a sujetos humanos emplean antagonistas de anticuerpos de la ruta de Hh que son de origen humano. Estos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v), así como monómeros o dímeros de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos, o mezclas de los mismos. Un anticuerpo quimérico es un homólogo de anticuerpo en el que todas o parte de las regiones bisagra y constantes de una cadena ligera, una cadena pesada, o ambas, de inmunoglobulina se han sustituido con las regiones correspondientes a partir de una cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina. Un anticuerpo humanizado es un homólogo de anticuerpo que, además a tener secuencias de regiones constantes humanas, también tiene algunos o todos sus residuos de aminoácidos que no son CDR en las regiones variables sustituidos con los aminoácidos correspondientes de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos son homólogos de anticuerpos en los que todos los aminoácidos de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina se derivan de una fuente humana.

Los homólogos de anticuerpos incluyen anticuerpos intactos que consisten en cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina unidas por medio de puentes disulfuro. También abarcan una proteína que comprende uno o más polipéptidos seleccionados de cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, y fragmentos de unión al antígeno de las mismas, que pueden unirse a uno o más antígenos (es decir, Hedgehog o Patched). Los polipéptidos componentes de un homólogo de anticuerpo compuesto de más de un polipéptido, pueden estar opcionalmente unidos con disulfuro o pueden estar reticulados covalentemente de otra manera. Los homólogos de anticuerpos también incluyen partes de anticuerpos intactos que conservan la especificidad de unión a antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(v), monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera, y similares. Por consiguiente, fragmentos de unión a antígeno, así como polipéptidos dimericos o triméricos de longitud completa derivados de los anticuerpos descritos anteriormente también son útiles en la práctica de la presente descripción.

Pueden producirse homólogos de anticuerpos anti-Hedgehog y anti-Patched usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, Monoclonales Antibodies--Production, Engineering And Clinical Applications, Ritter *et al*, Eds, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1995; y Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Press, 3^a ed., 2000. Pueden prepararse homólogos de anticuerpos monoclonales humanos frente a Hedgehog o Patched utilizando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, tal como se describe por Boemer *et al*, J. Immunol. 1991, 147: 86-95. Alternativamente, pueden prepararse mediante los métodos descritos, por ejemplo, en Persson *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU: 1991, 88: 2432-2436; Huang y Stollar, J. Immunol. Methods 1991, 141: 227-236; Solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/778.726 (publicación n.º 20050008625); y las patentes estadounidenses n.ºs 5.798.230 y 5.789.650. Pueden generarse homólogos de anticuerpos recombinantes humanizados que tengan capacidad para unirse a una proteína Hedgehog o Patched, empleando los métodos descritos, por ejemplo, en Riechmann *et al*, Nature 1988, 332: 323-327; Verhoeyen *et al*, Science 1988, 239: 1534-1536; Queen *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU: 1989, 86: 10029; y Orlandi *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU: 1989, 86: 3833.

Algunos métodos terapéuticos de la presente descripción emplean agentes de ácidos nucleicos que antagonizan la ruta de señalización Hedgehog. Normalmente, estos agentes regulan por disminución la expresión de uno o más genes que codifican para componentes de la señalización Hh positivos, tales como Hedgehog, Smo o Gli. Estos incluyen ARN bicatenarios, tales como el ARN de interferencia corto (ANRiC) y el ARN de horquilla corto (ANRhc), microARN (miARN), ácido nucleico antisentido y ADN complementario (ADNc). Se ha demostrado la interferencia con la función y expresión de genes endógenos mediante ARN bicatenarios en diversos microorganismos, tales como *C. elegans*, tal como se describe, por ejemplo, en Fire *et al*, Nature 1998, 391: 806-811; *Drosophilla*, tal como se describe, por ejemplo, en Kennerdell *et al*, Cell 1998, 95: 1017-1026; y embriones de ratón, tal como se describen, por ejemplo, en Wianni *et al*, Nat. Cell Biol. 2000, 2: 70-75. Este ARN bicatenario puede sintetizarse mediante la transcripción *in vitro* de ARN monocatenario leído desde ambas direcciones de un molde y la hibridación *in vitro* de cadenas sentido y antisentido de ARN. El ARN bicatenario también puede sintetizarse a partir de un constructo de vector de ADNc, en el que se clona un gen objetivo en orientaciones opuestas separadas por una repetición invertida. Tras la transfección celular, se transcribe el ARN y se vuelven a hibridar las cadenas complementarias. Con objeto de antagonizar la señalización Hh en la presente descripción, puede introducirse ARN bicatenario con que tiene como objetivo un regulador positivo de la ruta de señalización Hh, en una célula (por ejemplo, una célula de linfoma) mediante la transfección de un constructo apropiado,

En algunas realizaciones, pueden emplearse antagonistas de ANRiC de la señalización Hh en la práctica de la descripción. Los antagonistas de ANRiC pueden modular la señalización Hedgehog en cualquier punto en la ruta de señalización Hedgehog. Por ejemplo, pueden regular la señalización Hh mediante la antagonización del propio Hedgehog, o cualquier otro componente de señalización Hh positivo, tal como Smo o Gli. Los ANRiC tienen normalmente alrededor de 19 a 30 nucleótidos de longitud, y preferiblemente 21-23 nucleótidos de longitud. Son bicatenarios y pueden incluir salientes cortos en cada extremo. Los ANRiC pueden sintetizarse químicamente o pueden producirse de manera recombinante, usando métodos conocidos en la técnica. La producción recombinante de ANRiC en general implica la transcripción de ARN de horquilla cortos (ANRhc), que se procesan eficazmente para formar ANRiC dentro de las células. Véanse, por ejemplo, Paddison *et al*, Proc Natl Acad Sci EE.UU: 2002, 99: 1443-1448; Paddison *et al*, Genes & Dev. 2002, 16: 948-958; Sui *et al*, Proc Natl Acad Sci EE.UU: 2002, 8: 5515-5520; Brummelkamp *et al*, Science 2002, 296: 550-553; Caplen *et al*, Proc Natl Acad Sci EE.UU: 2001, 98: 9742-9747; y Elbashir *et al*, EMBO J. 2001, 20: 6877-88.

En algunas realizaciones de la descripción, los antagonistas de ácidos nucleicos de la señalización Hh pueden ser ARN de horquilla bicatenarios. Los ARN de horquilla pueden sintetizarse exógenamente o pueden formarse mediante la transcripción a partir de promotores de ARN polimerasa III *in vivo*. Ejemplos de elaboración y uso de estos ARN de horquilla para el silenciamiento génico en células de mamífero se describen, por ejemplo, en Paddison *et al*, Genes Dev. 2002, 16: 948-58; McCaffrey *et al*, Nature 2002, 418: 38-9; McManus *et al*, RNA 2002, 8: 842-50; y Yu *et al*, Proc Natl Acad Sci EE.UU: 2002, 99: 6047-52. Preferiblemente, tales ARN de horquilla se modifican por ingeniería genética en las células o en un animal para garantizar la supresión continua y estable de un gen deseado. Se conoce en la técnica que pueden producirse ANRiC mediante el procesamiento de un ARN de horquilla en la célula.

B. Agentes que Inhiben BCR-ABL

Para la práctica de la descripción, pueden usarse diversos inhibidores de BCR-ABL conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, inhibidores de ABL, inhibidores tanto de ABL como de cinasas de la familia Src, inhibidores de la cinasa Aurora e inhibidores de BCR-ABL no competitivos con ATP.

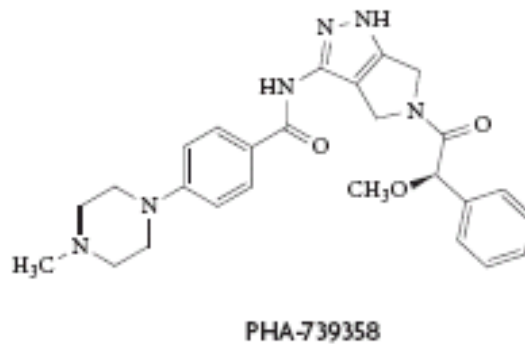
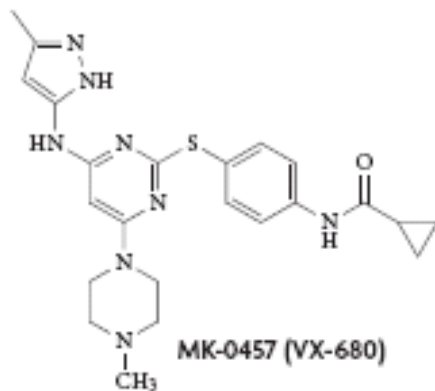
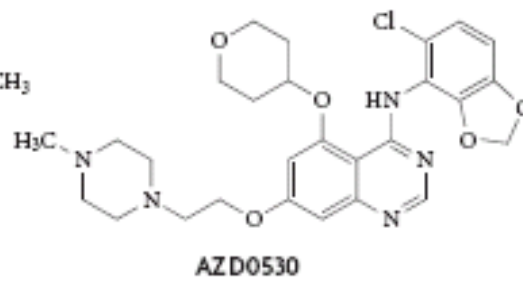
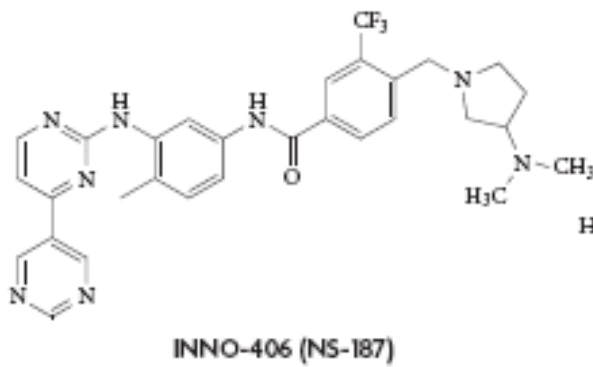
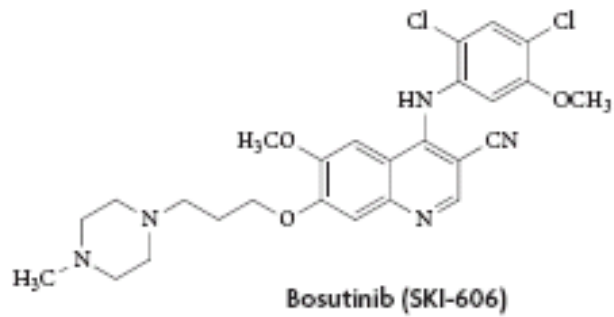
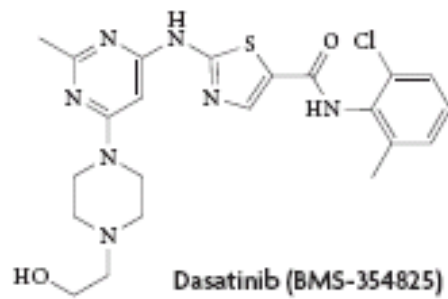
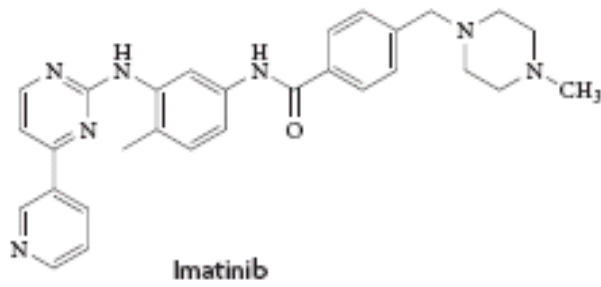
La familia Src de tirosina cinasas modula múltiples rutas de transducción de señales intracelulares implicadas en el crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia celulares, muchas de las cuales están implicadas en oncogénesis, metástasis tumoral y angiogénesis. (Weisberg *et al*, Nat. Rev. Cancer 2007, 7: 345-356). Muchas cinasas de la familia Src se expresan en células hematopoyéticas (Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, c-Src y Yes). Además, se ha demostrado que BCR-ABL puede activar las cinasas Src, tanto a través de fosforilación como meramente mediante la unión de las proteínas Src. Adicionalmente, se ha encontrado que lisados celulares procedentes de pacientes resistentes a imatinib, sobreexpresan la cinasa Lyn, y la proliferación de las células de LMC K562 humanas seleccionadas por su resistencia a imatinib, que también sobreexpresan Lyn, se inhibe por el

inhibidor de Abl/Src, PD180970, en una realización de la invención. Puesto que las cinasas de la familia Src regulan los elementos posteriores de la cascada de señalización de BCR-ABL, la inhibición de estas enzimas podría proporcionar por tanto sinergia con la inhibición de BCR-ABL, y podría contrarrestar potencialmente la disponibilidad de rutas de supervivencia alternativas que podrían utilizar las células de LMC frente a la inhibición de BCR-ABL. La terapia con inhibidores combinados de BCR-ABL y de cinasa de la familia Src también podría contrarrestar por tanto el potencial oncogénico de formas mutantes de BCR-ABL resistentes a fármacos en LMC y/o en LLA. (Manley *et al*, Biochim. Biophys. Acta 2005, 1754: 3-13). Dasatinib (BMS-354825), bosutinib (SKI-606), INNO-404 (NS-187) y AZD05030 son ejemplos de inhibidores dobles de ABL-Src útiles según las realizaciones de la invención.

La familia Aurora de serina/treonina cinasas es importante para la progresión mitótica. Se ha notificado que Aurora-A se sobreexpresa en diversos cánceres humanos, y su sobreexpresión induce aneuploidía, amplificación del centrosoma y transformación tumorigénica en células humanas y de roedores en cultivo. (Zhang *et al*, Oncogene 2004, 23: 8720-30). En las realizaciones de la invención, MK-0457 (Merck; originalmente desarrollado por Vertex Pharmaceuticals como VX-680), un potente inhibidor de las tres cinasas Aurora y FLT3 en el intervalo nanomolar, es un inhibidor de moderado a fuerte de ABL y JAK2, que son objetivos relevantes para una diversidad de trastornos mieloproliferativos. MK-0457 también inhibe la autofosforilación del mutante T315I de BCR-ABL en células Ba/F3 transformadas, con una CI_{50} de aproximadamente 5 μ M, aunque inhibe la proliferación celular a concentraciones submicromolares.

Un posible enfoque alternativo para la inhibición competitiva de BCR-ABL con el ATP es usar moléculas que inhiben la actividad cinasa, o bien mediante un mecanismo alostérico no competitivo con el ATP, o bien impidiendo la unión de sustratos a la cinasa. Esta estrategia tiene la ventaja de que los mutantes resistentes a imatinib tienen pocas probabilidades de ser resistentes a tales inhibidores, debido a los diferentes sitios de unión. El examen de alto rendimiento para buscar inhibidores de la proliferación celular dependiente de BCR-ABL dio como resultado la identificación de 3-[6-[[4-(trifluorometoxi)fenil]amino]-4-pirimidinil]-benzamida (GNF-2) como inhibidor prototipo en las realizaciones de la invención, que se une al sitio de unión de miristoilo de BCR-ABL, dando como resultado la inhibición alostérica de la actividad tirosina cinasa de ABL. GNF-2 inhibe la proliferación de células Ba/F3 transfectadas con BCR-ABL no mutada con p210, así como con las formas mutantes E255V y M351T de la enzima. (Weisberg *et al*, Nat. Rev. Cancer 2007, citado anteriormente).

La tabla 1 muestra los inhibidores de BCR-ABL, que pueden usarse para poner en práctica la invención, incluyendo nilotinib (AMN107), imatinib (STI571), análogo de purina 2,6,9-trisustituida AP23464), AZD-0530, bosutinib, CPG070603, compuestos de pirido-[2,3-d]-pirimidina) dasatinib, PD166326, PD173955, PD180970, ON012380, derivado de benzamida 3-sustituida Inn-406), MK-0457, PHA-739358 y GNF-2. (Véanse, por ejemplo, Weisberg *et al*, Nat. Rev. Cancer 2007, citado anteriormente; Tauchi *et al*, Int. J. Hematology 2006, 83: 294-300; Manley *et al*, Biochim. Biophys. Acta 2005, citado anteriormente; Ge *et al*, J. Med. Chem. 2006, 49: 4606-4615; Adrian *et al*, Nat. Chem. Biol. 2006, 2: 95-102; Asaki *et al*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16: 1421-1425.



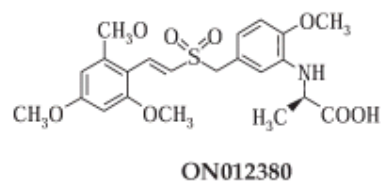
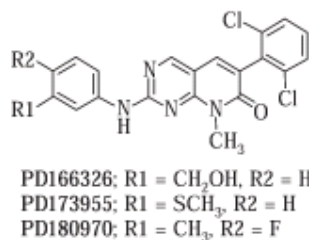
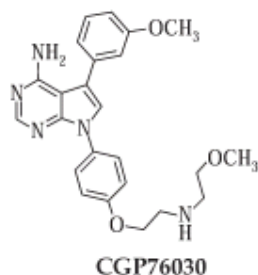
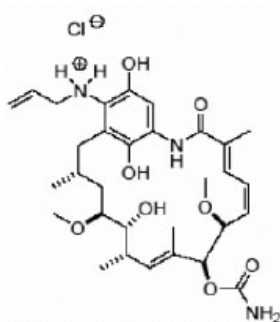
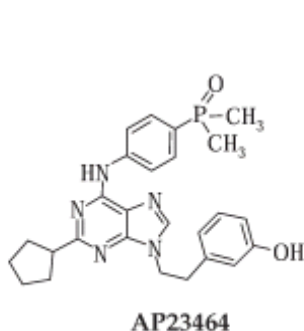


Tabla 1



5

Tabla 1

C. Enfermedades y estados que van a tratarse

La combinación de la presente invención puede usarse para tratar una variedad de cánceres. En una realización, la invención proporciona un agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog tal como se definió anteriormente, en combinación con un agente que inhibe BCR-ABL tal como se definió anteriormente, para inhibir el crecimiento y la proliferación de tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkitts; y tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas crónicas (LMC) y agudas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielóide y leucemia promielocítica.

La combinación de la presente invención también es útil para tratar cánceres que se sabe que están asociados con proteína tirosina cinasas, tales como, por ejemplo, Src, BCR-ABL y c-kit. En realizaciones particulares, la combinación de la presente invención es útil para tratar cánceres que son sensibles y resistentes a agentes quimioterápicos que tienen como objetivo BCR-ABL y c-kit. En realizaciones particulares, la combinación de la presente invención puede usarse para tratar LMC) y (LLA positivas para BCR-ABL.

La leucemia mielógena crónica (LMC) es un cáncer de la médula ósea caracterizado por una proliferación clonal aumentada y no regulada de células predominantemente mieloides de la médula ósea. Su incidencia anual es de 1 a 2 por 100.000 personas, afectando ligeramente más a los hombres que a las mujeres. La LMC representa aproximadamente el 15-20% de todos los casos de leucemia de adultos en poblaciones occidentales, aproximadamente 4.500 nuevos casos por año en los

La LMC es una enfermedad clonal que se origina a partir de una sola célula madre hematopoyética (CMH) o de una célula progenitora multipotente (MPP) de transformación, que alberga la translocación del cromosoma Filadelfia t(9/22). La expresión del producto génico de esta translocación, el oncogén de fusión BCR-ABL, induce cambios moleculares que dan como resultado la expansión de hematopoyesis malignas, incluyendo el conjunto de células madre leucémicas (CML) y superación y supresión de hematopoyesis no malignas (Stam *et al*, Mol Cell Biol. 1987, 7: 1955-60). Las células mieloides (granulocitos, monocitos, megacariocitos, eritrocitos), pero también las células B y T, expresan BCR-ABL, lo que indica a la MPP o la CMH como el punto de partida de la enfermedad. (Fialkow *et al*,

30

J. Clin. Invest. 1978, 62: 815-23; Takahashi *et al*, Blood 1998, 92: 4758-63). A diferencia de los oncogenes que provocan la LMA, como MOZ-TIF2 o MLL-ENL, BCR-ABL no confiere propiedades de auto-renovación a las células progenitoras comprometidas, sino que más bien utiliza y potencia las propiedades de auto-renovación de las células auto-renovables existentes, como las CMH o las MPP. Durante el transcurso de la enfermedad, se expande el conjunto de células madre leucémicas y, en el estadio final, la crisis blástica, casi todas las células CD34+CD38- portan la translocación del cromosoma Filadelfia.

El mesilato de imatinib (STI571, GLEEVEC®) se está convirtiendo en la terapia de referencia para la LMC, con tasas de respuesta de más del 96%, y funciona mediante la inhibición de la actividad de BCR-ABL. Sin embargo, a pesar del éxito inicial, los pacientes finalmente desarrollan resistencia a mesilato de imatinib debido a la adquisición de mutaciones puntuales en BCR-ABL. En vista de las limitaciones del mesilato de imatinib, existe la necesidad de métodos mejorados para tratar la LMC.

Además, se contempla que la combinación de la presente invención puede usarse para tratar carcinoma, incluyendo el de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), de mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo adenocarcinoma de pulmón y cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que las combinaciones de la presente invención pueden usarse para tratar mastocitosis, tumores de células germinales, sarcomas pediátricos y otros cánceres.

Los métodos terapéuticos descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con otras terapias contra el cáncer. Por ejemplo, pueden administrarse antagonistas de Hh en combinación con inhibidores de BCR-ABL de manera conjunta con cualquiera de las modalidades de tratamiento, tales como quimioterapia, radiación y/o cirugía. Por ejemplo, pueden usarse en combinación con uno o más agentes quimioterápicos o inmunoterápicos; y pueden usarse una vez que se concluyen otro(s) régimen/regímenes de tratamiento. Los ejemplos de los agentes quimioterápicos que pueden usarse en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, antraciclinas, agentes alquilantes (por ejemplo, mitomicina C), alquilsulfonatos, aziridinas, etileniminas, metilmelaminas, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, antibióticos, antimetabolitos, análogos de ácido fólico (por ejemplo, los inhibidores de dihidrofolato reductasa, tales como metotrexato), análogos de purina, análogos de pirimidina, enzimas, podofilotoxinas, agentes que contienen platino, interferones e interleucinas.

Los ejemplos particulares de agentes quimioterápicos conocidos que pueden usarse en las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, busulfano, improsulfano, pipsulfano, benzodepa, carbocouona, meturedapa, uredepa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trimetilolmelamina, clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, aclacinomicinas, actinomicina F(1), antramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carubicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, daunomicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, plicamicina, porfiromicina, puromicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina, denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercapto-purina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina, fluorouracilo, tegafur, L-asparaginasa, pulmozima, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, amsacrina, bestrabucil, bisantreno, carboplatino, cisplatino, defofamida, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, etoglucida, etopósido, flutamida, nitrato de galio, hidroxiourea, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, interleucina-2, lentinano, lonidamina, prednisona, dexametasona, leucovorina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidamol, nitracrina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, ácido podofilínico, 2-etil-hidrazida, procarbazona, razoxano, sizofirano, espirogermanio, paclitaxel, tamoxifeno, tenipósido, ácido tenuazónico, triazicuona, 2,2',2"-trichlorotrietilamina, uretano, vinblastina, vincristina y vindesina.

Los presentes métodos pueden usarse para tratar formas de cáncer primario, con recidiva, transformado o que no responde al tratamiento. Con frecuencia, los pacientes con cánceres con recidiva se han sometido a uno o más tratamientos, incluyendo quimioterapia, radioterapia, trasplantes de médula ósea, terapia hormonal, cirugía y similares. De los pacientes que responden a tales tratamientos, pueden mostrar enfermedad estable, una respuesta parcial (es decir, el tumor o el nivel de un marcador del cáncer disminuye en al menos el 50%) o una respuesta completa (es decir, el tumor así como los marcadores llegan a ser indetectables). En cualquiera de estos escenarios, el cáncer puede reaparecer posteriormente, significando una recidiva del cáncer.

D. Composiciones farmacéuticas y administración

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse solas en condiciones estériles a un sujeto que necesite tratamiento. En realizaciones particulares, se administran como principio activo de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una cantidad eficaz de un agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog en combinación con un agente que inhibe BCR-ABL, cada uno tal como se definió anteriormente, junto con uno o más portadores aceptables de los mismos. Las composiciones también pueden contener un tercer agente terapéutico mencionado anteriormente, por ejemplo, un agente quimioterápico u otro agente contra el cáncer.

Los portadores farmacéuticos potencian o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables están determinados en parte por la composición particular que se esté administrando (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, u otro tipo de compuestos), así como por el método particular empleado para administrar la composición. También deben ser tanto farmacéutica como fisiológicamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes y no perjudiciales para el sujeto. Pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral, sublingual, rectal, nasal o parenteral. Por ejemplo, un compuesto antitumoral puede estar en la forma de un complejo con proteínas portadoras, tales como ovoalbúmina o albúmina de suero antes de su administración, con el objeto de mejorar la estabilidad o las propiedades farmacológicas.

Existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20^a ed., 2000). Sin limitación, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen jarabe, agua, solución salina isotónica, dextrosa al 5% en agua, o disolución tamponada de acetato de sodio o de amonio, aceites, glicerina, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes y aglutinantes, entre otros. El portador también puede incluir un material de liberación sostenida, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas, suspensiones, bálsamos, lociones y similares. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar desde aproximadamente el 0,1 hasta el 100% en peso. Las formulaciones terapéuticas se preparan mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Véanse, por ejemplo, Gilman *et al*, eds., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8^a ed., Pergamon Press, 1990; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20^a ed., 2000; Avis *et al*, eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, publicado por Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1993; Lieberman *et al*, eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, publicado por Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1990; y Lieberman *et al*, eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, publicado por Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1990.

Las formulaciones terapéuticas pueden suministrarse por cualquier medio efectivo que pueda utilizarse para el tratamiento. Dependiendo del agente antitumoral específico que vaya a administrarse, los medios adecuados incluyen administración oral, nasal, pulmonar o infusión parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica) al torrente sanguíneo. Para su administración parenteral, los agentes antitumorales de la presente invención pueden formularse en una variedad de formas. Las disoluciones acuosas de los moduladores pueden encapsularse en perlas poliméricas, liposomas, nanopartículas u otras formulaciones de depósito inyectables conocidas por los expertos en la técnica. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención también pueden administrarse encapsulados en liposomas. Las composiciones, dependiendo de su solubilidad, pueden estar presentes tanto en la capa acuosa como en la capa lipídica, o en lo que se denomina en general como una suspensión liposómica. La capa hidrofóbica, en términos generales pero no de manera exclusiva, comprende fosfolípidos tales como lecitina y esfingomielina, esteroides tales como colesterol, tensoactivos más o menos iónicos tales como fosfato de diacetilo, estearilamina o ácido fosfatídico, y/u otros materiales de naturaleza hidrófoba.

Las formulaciones terapéuticas pueden presentarse de manera conveniente en una forma farmacéutica unitaria, y pueden administrarse en una dosis terapéutica adecuada. Puede determinarse una dosis terapéutica adecuada mediante cualquier método bien conocido, tal como estudios clínicos en especies de mamífero, para determinar la máxima dosis tolerable, y en sujetos humanos normales para determinar la dosificación segura. Excepto en determinadas circunstancias, cuando pueden requerirse dosificaciones superiores, la dosificación de un agente antitumoral de la presente invención usualmente está dentro del intervalo de desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 1.000 mg, más usualmente de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 500 mg al día. La dosificación y el modo de administración de un agente antitumoral pueden variar para diferentes sujetos, dependiendo de factores que pueden revisarse individualmente por el médico que trate, tales como el estado o estados que vayan a tratarse, la elección de la composición que vaya a administrarse, incluyendo el agente antitumoral particular, la edad, el peso y la respuesta del sujeto individual, la gravedad de los síntomas del sujeto y la vía de administración seleccionada. Como regla general, la cantidad de agente antitumoral administrado es la dosificación más pequeña que prevenga o minimice de manera eficaz y fiable los estados de los sujetos. Por consiguiente, se pretende que los intervalos de dosificación anteriores proporcionen una guía general y apoyo para las enseñanzas en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención. Todos los experimentos con animales están según la Declaración de Cumplimiento con las Normas para el Cuidado Humano y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos.

5 Ejemplo 1

Materiales y métodos generales

Experimentos en ratones

Se mantienen y se genotipan ratones Ptch+/- (Jackson Laboratory), ratones Smo-/- (Deltagene), ratones C57BL/6 (Jackson Laboratory) y ratones B6-Pep3b-Ly5.1 (Pep) tal como se describe. Para los experimentos de trasplante de médula ósea, se inyecta a ratones C57BL/6 macho 5-FU (150 mg/kg) por vía intraperitoneal y se sacrifican cuatro días más tarde. Se lavan células mononucleares de médula ósea procedentes de los huesos de la pata, se lisan los glóbulos rojos con cloruro de amonio y se cultivan las células de médula ósea en DMEM que contiene FBS al 10%, SCF, IL-6 e IL-3. Se infectan las células con un retrovirus pMSCV/BCR-ABL/IRES/GFP, y se trasplantan 5×10^5 células mononucleares a ratones C57BL/6 letalmente irradiados. El tratamiento con 50 mg/kg de AMN107 dos veces al día (Novartis, Basilea) y 25 mg/kg de ciclopamina dos veces al día (Novartis, Cambridge) se inicia en el día 7 tras el trasplante durante 14 días.

Para los experimentos de trasplante con células hematopoyéticas de Ptch y Smo, se usan embriones de 14,5 días de período de gestación. Los embriones se enfrían en hielo y se decapitan. Se extrae el hígado embrionario y se filtran las células hepáticas a través de un filtro de células (BD Bioscience). Las células hepáticas embrionarias se trasplantan directamente en ratones B6-Pep3b-Ly5.1 (Pep) subletalmente irradiados para los experimentos de repoblación, o se cultivan en medios de estimulación y entonces se infectan con un retrovirus pMSCV/BCR-ABL/IRES/GFP. El número de células positivas para GFP se determina 24 horas tras la infección, mediante citometría de flujo, manteniéndose la tasa de infección entre el 4 y el 6% para evaluar la expansión de células positivas para BCR-ABL. Entonces se trasplantan células hepáticas fetales en receptores letalmente irradiados. Se monitoriza el desarrollo de la enfermedad mediante mediciones semanales del peso, recuentos quincenales de células sanguíneas y detección de las células positivas para GFP en la sangre periférica.

Experimentos de cultivo celular

Se cultivan células de médula ósea procedentes de ratones enfermos en medio DMEM que contiene FBS al 10% (Gibco), SCF (RDI), IL-3 e IL-6 (R&D Systems). Para los experimentos de tratamiento *in vitro*, se siembran 4×10^6 células de médula ósea o de bazo en 1 pocillo de una placa de 6 pocillos. Se disuelve la ciclopamina-KAAD (obtenida en Toronto Research Chemicals) como reserva $\times 1.000$ en DMSO. Tras 72 horas de tratamiento, se siembran en placa las células en medio de metilcelulosa que contiene SCF, IL-6, IL-3 e insulina procedentes de Stem Cell Technologies (M3434) según las instrucciones del fabricante. Se cuentan las colonias 5 días y 10 días tras la siembra en placa. Tras 12 días, se diluyen las células de las placas, se lavan en PBS y entonces se tiñen para el análisis de los diferentes tipos de células, o bien se vuelven a sembrar en placa en una segunda o tercera ronda de siembra en placa.

Inmunohistoquímica

Se fija tejido de ratón durante al menos 24 horas y se generan tejidos embebidos en parafina tras el procedimiento convencional. Se lleva a cabo la tinción con DAB-inmunoperoxidasa de un solo color sobre las secciones de parafina utilizando anticuerpos frente a Gli1 (N-16, Santa Cruz Biotechnology), Smo (H-300, Santa Cruz Biotechnology) y Hh (H-160, Santa Cruz Biotechnology) según las recomendaciones del fabricante.

RT-PCR y PCR cuantitativa

Se extrae el ARN de células CD34+ de pacientes con LMC en fase crónica o en crisis blástica de la enfermedad, a partir de médula ósea entera o a partir de células positivas para Lin-Kit+Sca+ clasificadas, utilizando un kit de extracción de ARN de Qiagen, según las recomendaciones del fabricante. Se evalúa la PCR cuantitativa mediante PCR Taqman. Los cebadores y las sondas se obtienen en Applied Biosystems.

Tinción y clasificación de células

Se realizan tinciones de citometría de flujo para el análisis de los tipos de células hematológicas usando los anticuerpos Sca-PE, Kit-APC, marcadores CD3 de Lin, Gr-1, CD11b, CD19, Ter119, todos positivos para PE-Cy7, CD4-PE, CD8-APC de BD Pharmingen según las instrucciones del fabricante. Para el análisis del ciclo celular de las

5 células madre, se trata a las células con ciclopamina durante 48 horas, entonces se tiñen con marcadores de Lin, Kit-APC y Sca-PE. Luego se fija la médula ósea teñida en formalina al 2%. Las células se permeabilizan con etanol helado al 70% durante al menos 1 hora y entonces se tratan con yoduro de propidio (5 mg/ml) durante al menos 30 minutos. Las células se analizan utilizando un citómetro de flujo de Coulter. Se realiza tinción con anexina tras la incubación de la médula ósea mezclada con ciclopamina durante 24, 48 y 72 horas. Las células se tiñen con el anticuerpo anti-anexina-PE y 7-AAD (BD Bioscience) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2

Activación de la ruta de señalización Hedgehog por BCR-ABL

10 Tal como se muestra en este ejemplo, BCR-ABL activa la ruta de señalización Hedgehog en células madre leucémicas por medio de regulación por incremento de Smo. Con el fin de evaluar el estado de activación de la ruta de señalización Hedgehog en CML positivas para BCR-ABL frente a CMH normales, se comparan los niveles de transcrito de dos genes objetivo de la ruta Hh, Gli1 y Ptch1, en células CD34+ humanas procedentes de donantes sanos a células CD34+ aisladas de los pacientes con LMC en fase crónica o en crisis blástica. En todos los casos de LMC se observa una inducción de más de 4 veces de los niveles de transcrito de Gli1 y Ptch1, lo que indica
15 activación de la ruta en LMC, independientemente de la fase de la enfermedad (figura 1A). Los niveles de transcrito de Gli1 y Ptch1 se elevan en pacientes con crisis blástica de LMC frente a la fase crónica de la enfermedad.

Con el objeto de evaluar adicionalmente el efecto de BCR-ABL sobre la activación de la ruta Hedgehog, se induce un síndrome similar a LMC en ratones. Se trasplanta médula ósea infectada con un virus pMSCV/BCR-ABL/GFP en ratones receptores irradiados. Las CML positivas para BCR-ABL (Lin-Kit+Sca+GFP+) obtenidas de ratones enfermos mostraron mejores niveles de transcrito de Gli1 y Ptch1, en comparación con las CMH normales de ratón (Lin-Kit+Sca+). La activación de la ruta Hedgehog en la médula ósea de ratón infectada con un retrovirus BCR-ABL (pMSCV) no se limita a la población de células madre, sino que está presente en todas las células que sobreexpresan BCR-ABL (figura 1B).

25 Se encuentra una regulación por incremento del receptor transmembrana Smo en todas las células de médula ósea positivas para BCR-ABL/GFP frente a niveles mucho más bajos de Smo en la población negativa para BCR-ABL en el mismo ratón. La regulación por incremento de Smo en la población positiva para BCR-ABL podría detectarse mediante citometría de flujo, así como mediante inmunohistoquímica. Las tinciones de IHC a partir de bazos y médula ósea de ratones enfermos con un anticuerpo específico frente a Smo mostraron una fuerte inducción de expresión de Smo en la población positiva para BCR-ABL. Las tinciones de IHC para Smo y Gli1 en los casos de LMC humana también revelaron regulación por incremento de ambos genes en regiones correspondientes de la médula ósea, en especial en la población de blastocitos (figura 1C). Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión retroviral de Smo en células de linfoma facilita el crecimiento de xenoinjertos de linfoma positivos para Eμ-Myc en órganos no linfoides como la piel y mejora los niveles de Gli1, incluso en ausencia de estimulación del ligando.

35 Ejemplo 3

Inhibición de la señalización Hedgehog *in vitro*

Este ejemplo muestra que la inhibición de la señalización Hedgehog *in vitro* induce apoptosis en células positivas para BCR-ABL y reduce el número de células madre leucémicas. Con el fin de investigar el papel de la ruta Hedgehog en células de médula ósea positivas para BCR-ABL y en células madre leucémicas *in vitro*, se inhibe la
40 señalización Hedgehog utilizando KAAD-ciclopamina, un alcaloide que bloquea Smo en su conformación inactiva. Se usa médula ósea de ratones con el síndrome similar a LMC que contenía aproximadamente el 50% de células positivas para GFP de BCR-ABL frente a 50% de células de médula ósea normales. El tratamiento con ciclopamina de cultivos mixtos de médula ósea durante tres días dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de la población positiva para GFP/BCR-ABL, en comparación con la población negativa para GFP. Las células positivas para GFP tras el tratamiento *in vitro* con ciclopamina (2 μM ó 5 μM) pueden detectarse mediante análisis de citometría de flujo.

La caracterización adicional de los diferentes subconjuntos de células mostró una reducción de células progenitoras mieloides positivas para BCR-ABL (Lin-Kit+Sca-) en más del 80%, y una reducción de la población de células madre leucémicas Lin-Kit+Sca+ en alrededor del 70% (figura 2A). El principal efecto de la inhibición con ciclopamina sobre células de médula ósea positivas para BCR-ABL es la inducción de apoptosis en el plazo de 24 horas, medida mediante tinción con anexina V. También se detectan alteraciones en el ciclo celular con un aumento relativo de la fase G1 en comparación con la fase S y la fase G2 en la médula ósea completa. El análisis del ciclo celular de la población de células madre leucémicas mostró una pérdida completa de la fase G2 en estas células tras la inhibición de la ruta de Hh. Los niveles de transcrito de Gli1 en la médula ósea se reducen tras el tratamiento con ciclopamina,
55 verificando la inhibición de la ruta de señalización Hedgehog en estas células mediante el compuesto (figura 2B). En

la figura 2B, los cultivos de médula ósea se tratan con o bien DMSO solo o bien con diferentes concentraciones de ciclopamina (2 μ M ó 5 μ M) durante seis horas. Se extrae el ARN de los cultivos tratados y se miden los niveles de transcrito de Gli1 mediante PCR Taqman y se normalizan para GAPDH. Los ensayos se realizan por triplicado.

5 Para validar adicionalmente el efecto de la inhibición de la ruta Hedgehog sobre la población de células progenitoras auto-renovables y de células madre leucémicas, se tratan cultivos mixtos de médula ósea y bazo con diferentes concentraciones de ciclopamina-KAAD (10, 5, 2,5, 1 y 0 μ M) durante 48 horas. Las células se siembran en placa entonces en placas de metilcelulosa sin citocinas complementarias, de tal manera que solamente pueden sobrevivir las células positivas para BCR-ABL. Las colonias se cuentan 10 días tras la siembra en placa. Los cultivos de
10 colonias positivas para BCR-ABL, lo que indica que la capacidad para formar colonias de las células positivas para BCR-ABL depende de la activación de la ruta Hedgehog (figura 2C).

Ejemplo 4

Activación de la ruta Hedgehog

15 La activación de la ruta Hedgehog mejora la capacidad para formar colonias y la regeneración potencial de las células madre y progenitoras hematopoyéticas. Con el fin de evaluar el papel de la señalización Hedgehog en la hematopoyesis normal, se aíslan CMH fetales del hígado de embriones en el día 14,5 del período de gestación. Se analizan las células hepáticas fetales de embriones Smo^{-/-}, Smo^{+/-}, Smo^{+/+}, Ptch^{+/+} y Ptch^{+/-} con respecto al número de CMH fetales, al número de tipos diferenciados de células hematopoyéticas, así como a la capacidad para formar colonias y al potencial de repoblación, en un experimento de trasplante. No se encuentran diferencias en el número
20 de CMH fetales entre los diferentes genotipos. Tampoco hay diferencias significativas en las células B (B220), en las células mieloides (CD11b) y en las células progenitoras eritroides (Ter119) y en las células T positivas para CD3.

25 La siembra en placa de las células en agar de metilcelulosa con citocinas complementarias (IL-3, IL-6, SCF) no dio como resultado diferencia alguna en el número de colonias, en los tipos de colonias o en el porcentaje de tipos diferentes de células, medido mediante citometría de flujo 10 días tras la siembra en placa. A diferencia de la primera ronda de siembra en placa, se observan grandes diferencias en los potenciales de formación de colonias en la segunda ronda de siembra en placa. La siembra en placa de nuevo de las células hematopoyéticas Ptch y Smo de tipo natural mostró solamente un potencial de formación de colonias muy limitado en la segunda ronda de siembra en placa, y las células hematopoyéticas Smo^{-/-} habían perdido completamente su potencial para formar colonias. En cambio, las células hematopoyéticas Ptch^{+/-} mantuvieron su capacidad para formar colonias durante más de 3
30 rondas de siembra en placa, lo que indica que la activación de la ruta Hedgehog aumenta la cantidad de células regeneradoras en la población hematopoyética Ptch^{+/-} (Tabla 2).

Tabla 2

| Números de colonias 10 días tras la siembra en placa de las células hepáticas fetales (rondas de siembra en placa P1 a P3) | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Genotipo | P1 | P2 | P3 |
| Smo -/- | 130 | 0 | 0 |
| Smo +/- | 142 | 0 | 0 |
| Smo +/+ | 121 | 2 | 0 |
| Ptch +/+ | 128 | 3 | 0 |
| Ptch +/- | 136 | 48 | 23 |

En un segundo experimento, las células hepáticas fetales $Smo^{-/-}$, $Smo^{+/-}$, $Smo^{+/+}$, $Ptch^{+/+}$ y $Ptch^{+/-}$ (positivas para Ly-5.2) se trasplantan a ratones C57BL/6-Ly5.1-Pep 3b (B6 Ly-5.1) subletalmente irradiados. La regeneración de hamatopoyesis positiva para Ly5.2 en la sangre periférica mostró una ventaja significativa para ratones con trasplante de las células hepáticas fetales $Ptch^{+/-}$, en comparación con los otros genotipos hepáticos fetales trasplantados. El número de células positivas para Ly5.2 en la sangre periférica se duplica aproximadamente, en comparación con el tipo natural y $Smo^{-/-}$ a lo largo de un período de más de 3 meses (figura 3A). La regeneración de médula ósea $Smo^{-/-}$ no es significativamente diferente del tipo natural, lo que indica que no hay grandes diferencias en la capacidad de regeneración de CMH $Smo^{-/-}$ frente a Smo de tipo natural. Un análisis adicional de los tipos de células en la sangre periférica mostró diferencias en la distribución de las células entre ratones con trasplante de células hepáticas fetales $Smo^{-/-}$ frente a Smo de tipo natural. $Smo^{-/-}$ mostró una disminución de más del 90% en las células T positivas para CD8, mientras que el número de células T CD4+ disminuyó solamente en el 30%. Estos resultados muestran que la señalización Hedgehog es importante para el desarrollo de células T, e indican que la generación de células T CD8+ depende de la señalización Hedgehog intacta (figura 3B).

Con el objeto de investigar adicionalmente el papel de la señalización Hedgehog en CMH, se investiga la capacidad de regeneración de la médula ósea de los ratones, con trasplante inicial de células hepáticas fetales, mediante la inyección a estos ratones con 5-fluorouracilo (5-FU). La capacidad de regeneración a corto plazo se reduce de manera significativa en la médula ósea que carece de Smo . Diez días tras la inyección del 5-FU, el número de células positivas para Ly5.2 en ratones con trasplante inicial de células hepáticas fetales $Smo^{-/-}$, es el 70% más bajo que en los otros genotipos, lo que indica un papel de la ruta de señalización Hedgehog en las células de repoblación a corto plazo (figura 3C). Estos resultados muestran que los ratones $Ptch^{+/-}$ muestran un potencial de regeneración más rápida en las células de repoblación a corto plazo, y tienen una reserva de células madre significativamente mejorada. Los resultados indican que las células de repoblación a largo plazo aprovechan la activación de la ruta Hedgehog, debido a que el número de células positivas para Ly5.2 en ratones $Ptch^{+/-}$ siguió siendo significativamente más alto que en los otros genotipos durante más de 3 meses. Los recuentos de células sanguíneas de ratones $Ptch^{+/-}$ de dos años de edad no muestran diferencia alguna en el número de células de sangre periférica, en comparación con los ratones $Ptch$ de tipo natural, lo que indica que no hay una falta significativa en la generación de células sanguíneas en estos ratones, inclusive tras un largo período de tiempo.

Con el objeto de validar adicionalmente el papel de la regulación por incremento de Smo en la hamatopoyesis, se sobreexpresan un vector de control de GFP, Smo de tipo natural y el mutante activado $SmoW535E$ en la médula ósea de ratones previamente tratados con 5-FU. Se trasplanta a ratones donantes irradiados un 10% de células de médula ósea positivas para GFP mezcladas con un 90% de células de médula ósea negativas para GFP. Se monitoriza la regeneración de hamatopoyesis mediante el recuentos de células sanguíneas y la evaluación de células positivas para GFP en la sangre periférica. Las células de médula ósea que sobreexpresaron Smo de tipo natural o $SmoW535E$ tuvieron niveles de $Gli1$ significativamente elevados, en comparación con las células de médula ósea control (figura 3D). El porcentaje de células positivas para GFP en ratones con trasplante de médula ósea que expresaba el vector de control de GFP permaneció entre el 10 y el 12%. En cambio, los ratones con trasplante de médula ósea infectada con Smo de tipo natural o $SmoW535E$, mostraron un aumento significativo en el número de células positivas para GFP durante un año hasta un máximo del 30%. No hay diferencias significativas en los tipos de células positivas para GFP (figura 3E). Estos datos indican que la activación de la señalización Hedgehog mediante la sobreexpresión de Smo puede expandir el conjunto de células madre y puede aumentar significativamente el número de células de repoblación a lo largo del tiempo.

Ejemplo 5

Inhibición de células madre leucémicas positivas para BCR-ABL mediante $Smo^{-/-}$ *in vivo*

Tal como se muestra en este ejemplo, $Smo^{-/-}$ inhibe la expansión de las células madre leucémicas positivas para BCR-ABL y anula la probabilidad de nueva capacidad de trasplante en la enfermedad. Con el objeto de investigar el papel de la ruta Hedgehog en el desarrollo de leucemias positivas para BCR-ABL *in vivo*, se sobreexpresa BCR-ABL en células hepáticas embrionarias $Smo^{-/-}$, $Smo^{+/-}$, $Smo^{+/+}$, $Ptch^{+/+}$ y $Ptch^{+/-}$ usando un vector retroviral pMSCV/BCR-ABL/IRES/GFP. La tasa de infección es de entre el 3 y el 4% en todas las células hematopoyéticas embrionarias sometidas a prueba. Se trasplantan células infectadas en ratones C57/Bl6 receptores irradiados. Se miden las células positivas para GFP y los recuentos de células sanguíneas 20 días tras el trasplante. Los ratones con trasplante de células hepáticas fetales $Ptch^{+/-}$ /BCR-ABL/GFP mostraron niveles de GFP 3 veces más altos que los ratones con trasplante de la médula ósea $Ptch$ de tipo natural o Smo de tipo natural infectada con pMSCV/BCR-ABL/GFP. Las células positivas para $Smo^{-/-}$ /BCR-ABL/GFP no se expandieron en este intervalo de tiempo e incluso mostraron números por debajo de la tasa de infección original (figura 4A). En el día 28 tras el trasplante, se toman tres ratones de cada grupo de trasplante y se comparan los pesos del bazo entre los diferentes grupos.

Todos los ratones con trasplante de las células hepáticas fetales $Ptch^{+/-}$, $Ptch$ de tipo natural, Smo de tipo natural o $Smo^{+/-}$ /BCR-ABL/GFP, tuvieron un aumento de más del 40% en el peso del bazo, como signo de desarrollo inicial de LMC, mientras que todos los ratones con trasplante de las células hepáticas embrionarias $Smo^{-/-}$ tuvieron un tamaño normal del bazo, lo que indica que Smo es importante para la expansión de células positivas para BCR-ABL

(figura 4B). Todos los ratones con trasplante de células hepáticas embrionarias $Ptch^{+/-}$ desarrollaron una enfermedad leucémica letal en el plazo de 38 días tras el trasplante, seguidos por los ratones con trasplante de células hepáticas fetales $Ptch$ de tipo natural, Smo de tipo natural o $Smo^{+/-}$ (figura 4C). Los ratones con trasplante de células hepáticas fetales $Ptch^{+/-}$ tienen más probabilidades de desarrollar ALL positivas para BCR-ABL (80%) que CML (20%), mientras que los ratones con trasplante de células hepáticas fetales $Smo^{+/-}$ tienen más probabilidades de desarrollar CML que ALL. Solamente el 60% de ratones con trasplante de células hepáticas fetales $Smo^{-/-}$ positivas para BCR-ABL desarrollaron una enfermedad letal más de 3 meses tras el trasplante, que se caracteriza por un mayor peso del bazo, pero ninguno de los ratones mostró mayores recuentos de glóbulos blancos en la sangre periférica. El cuarenta por ciento de los ratones $Smo^{-/-}$ /BCR-ABL/GFP con trasplante no mostraron signos de la enfermedad, incluso 12 meses tras el trasplante.

Con el fin de investigar adicionalmente el estado de activación de la ruta de señalización Hedgehog en la población de células madre leucémicas, se recogen células de médula ósea y bazo de ratones enfermos a partir de la primera ronda de infección, y las células 2E5 positivas para GFP se trasplantan a receptores secundarios irradiados. Todos los receptores secundarios a partir de ratones con trasplante de médula ósea $Ptch^{+/-}$, $Ptch$ de tipo natural, Smo de tipo natural y $Smo^{+/-}$ positiva para BCR-ABL desarrollaron leucemias en el plazo de 2 meses tras el trasplante, mientras que ninguno de ratones con trasplante de médula ósea $Smo^{-/-}$ de BCR-ABL de tipo natural, desarrolló ningún signo de la enfermedad, inclusive 4 meses tras el trasplante (figura 4D). Estos resultados indican que la expansión de las células madre leucémicas positivas para BCR-ABL depende de la activación de la ruta Hedgehog, y que Smo puede ser un objetivo para células madre leucémicas en la LMC.

Ejemplo 6

Combinación de inhibición de Abl e inhibición de Smo *in vivo*

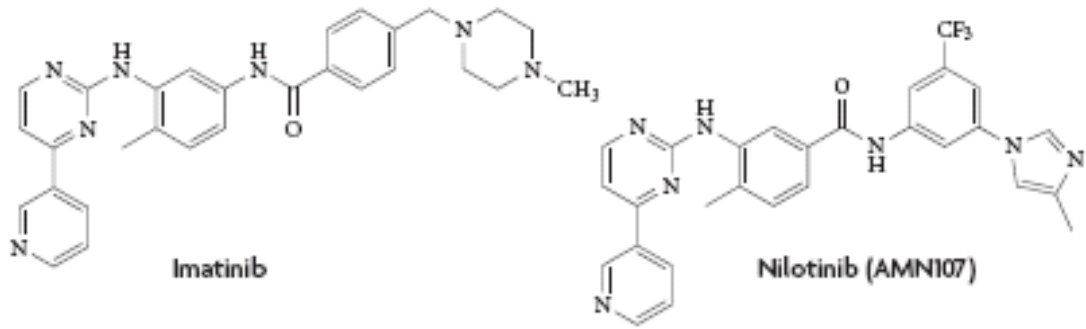
Tal como se muestra en este ejemplo, la combinación de inhibición de Abl (por ejemplo, AMN107) e inhibición de Smo (por ejemplo, ciclopamina) en ratones con la enfermedad similar a LMC, reduce la cantidad de unidades formadoras de colonias y aumenta el tiempo hasta la recivida, lo que indica que la combinación de AMN107 y ciclopamina puede ser beneficiosa en el tratamiento de LMC.

Se trata a ratones con trasplante de médula ósea positiva para BCR-ABL con o bien una dosis subóptima del inhibidor de ABL, AMN107, o bien con una combinación de AMN107 (50 mg/ kg cada día), y el antagonista de Smo , ciclopamina (25 mg/kg dos veces al día). El tratamiento se inicia siete días tras el trasplante y se continúa durante catorce días en total. Al final del tratamiento, se sacrifican tres ratones de cada grupo y se siembra en placa médula ósea procedente de 1 fémur en los ensayos de colonias de metilcelulosa, sin la adición de citocinas, para detectar solamente las colonias positivas para BCR-ABL. El número promedio de colonias detectadas en los ratones tratados con la combinación de AMN107 y ciclopamina, se reduce en más del 40%, en comparación con el grupo de tratamiento solamente con AMN107, lo que indica que el tratamiento de combinación puede reducir el número de unidades formadoras de colonias positivas para BCR-ABL (figura 5A). Los recuentos de glóbulos de sangre periférica, y los pesos de bazo e hígado, son normales en ese punto del tiempo, y el número de células positivas para GFP está por debajo del 5%.

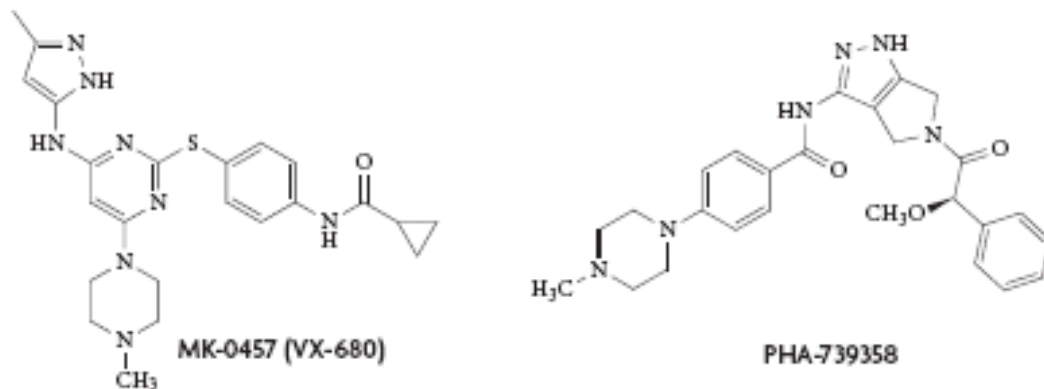
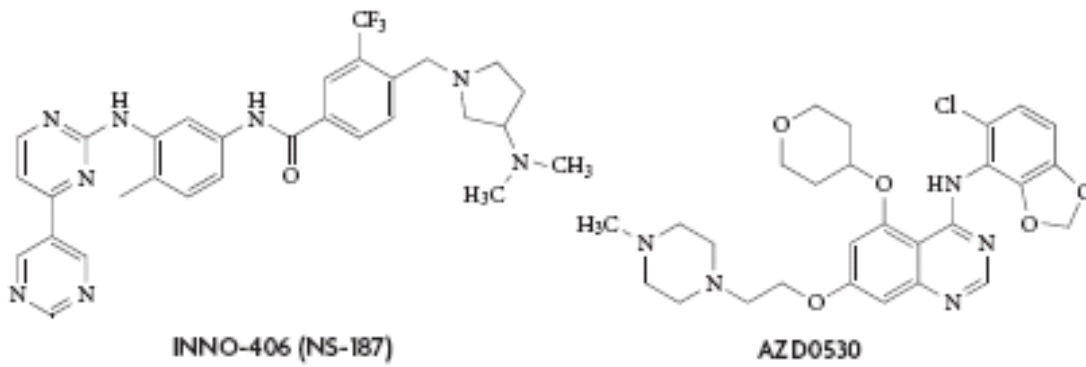
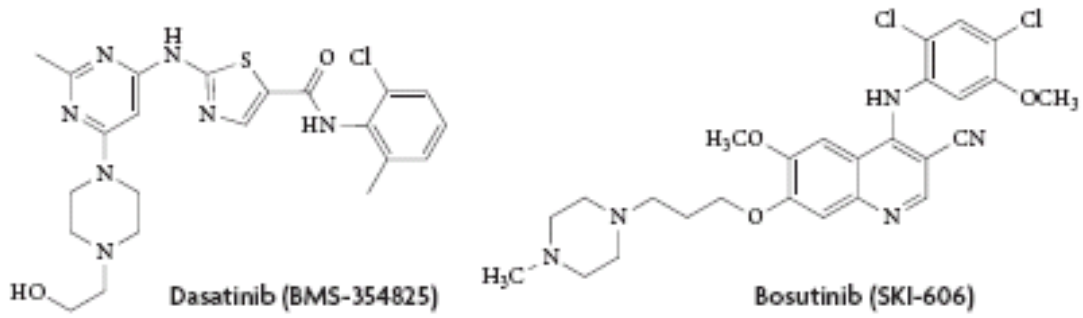
Ocho días tras el final del tratamiento, se sacrifican otros tres ratones por grupo y se examinan para determinar signos de recivida, mediante la comparación de los pesos de hígado y bazo. En todos los ratones se encuentran mejores pesos de hígado y bazo en comparación con los ratones normales, pero los ratones tratados con AMN107 solo tuvieron un tamaño promedio del bazo de aproximadamente el doble y un peso del hígado mucho más alto que los ratones tratados con la combinación de AMN107 y ciclopamina (figura 4B). Se monitorizan los cinco ratones restantes de cada grupo para determinar signos de enfermedad y se sacrifican cuando están moribundos. La supervivencia promedio tras el final del tratamiento en el grupo de AMN107 solo es de ocho días frente a 24 días en el grupo de tratamiento con AMN107 y ciclopamina (figura 5C).

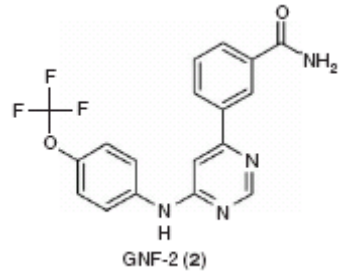
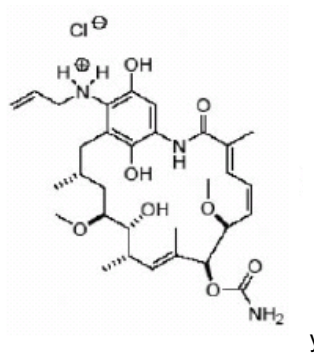
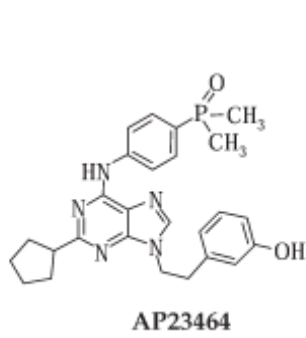
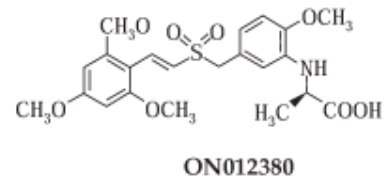
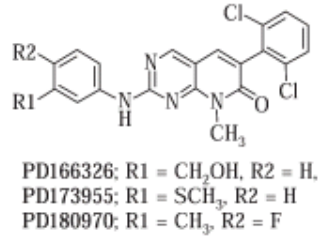
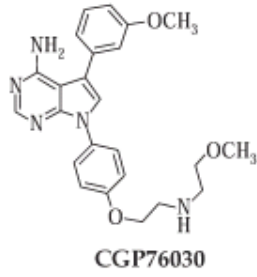
REIVINDICACIONES

1. Combinación de un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog, siendo dicho primer agente ciclopamina o forskolina, y un segundo agente que inhibe BCR-ABL, seleccionándose dicho segundo agente del grupo que consiste en

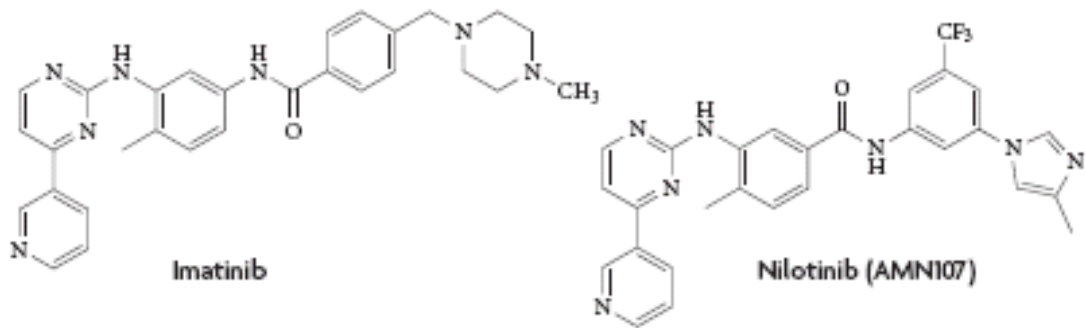


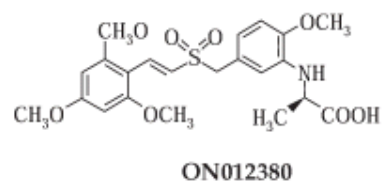
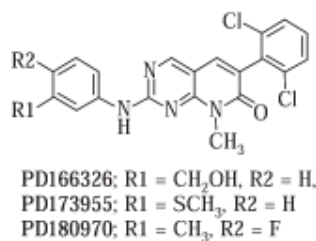
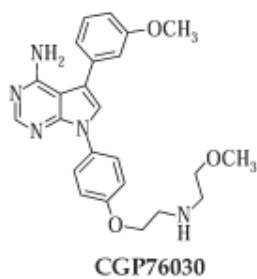
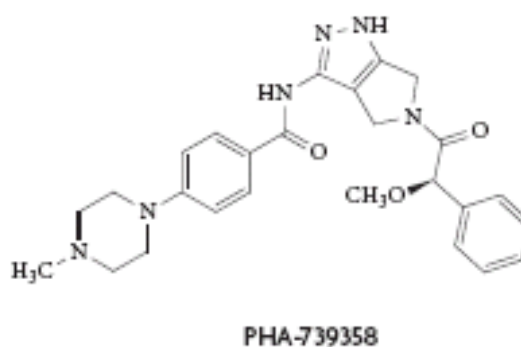
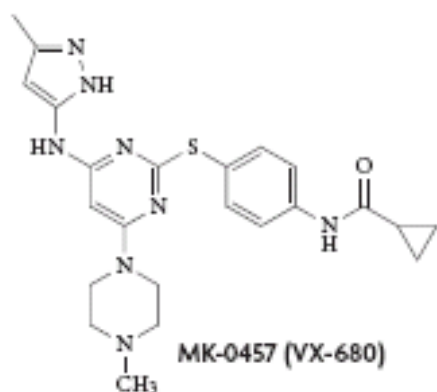
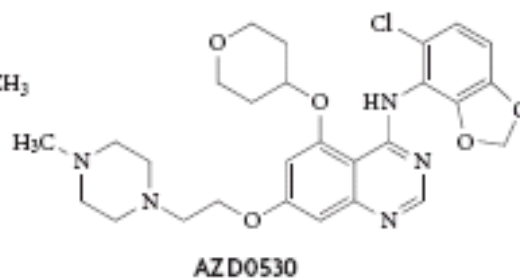
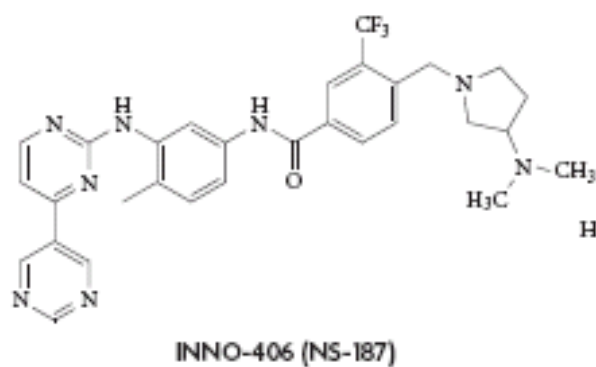
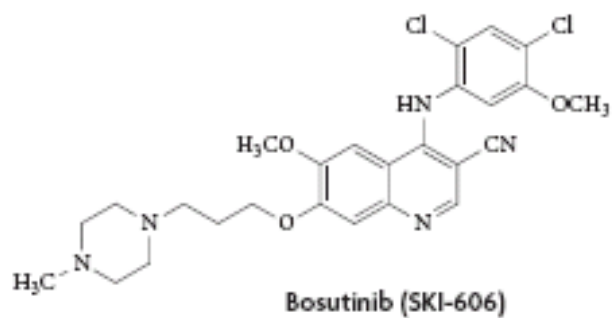
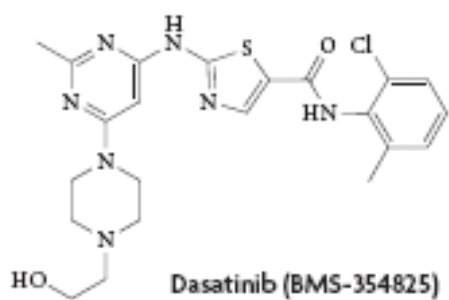
5

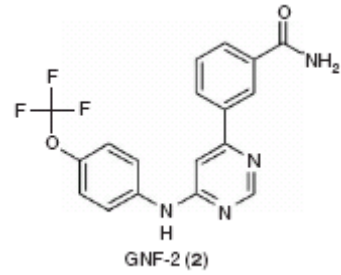
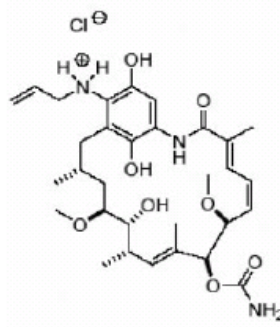
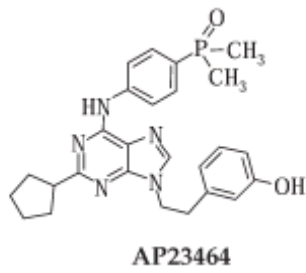




2. Composición que comprende un primer agente que inhibe la ruta de señalización Hedgehog, siendo dicho primer agente ciclopamina o forskolina, y un segundo agente que inhibe BCR-ABL, seleccionándose dicho segundo agente del grupo que consiste en







y

3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho primer agente se une a Smo.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, para la fabricación de un medicamento para tratar leucemia positiva para BCR-ABL.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicha leucemia positiva para BCR-ABL es leucemia mieloide crónica o leucemia linfocítica aguda.
7. Combinación según la reivindicación 1 o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, para su uso en el tratamiento de leucemia positiva para BCR-ABL.
8. Combinación o composición según la reivindicación 7, en la que dicha leucemia positiva para BCR-ABL es leucemia mieloide crónica o leucemia linfocítica aguda.

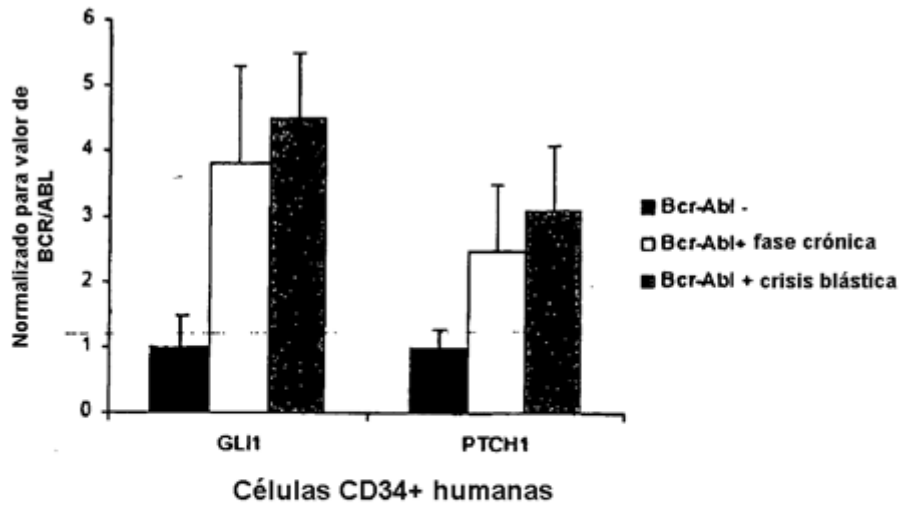


FIGURA 1A

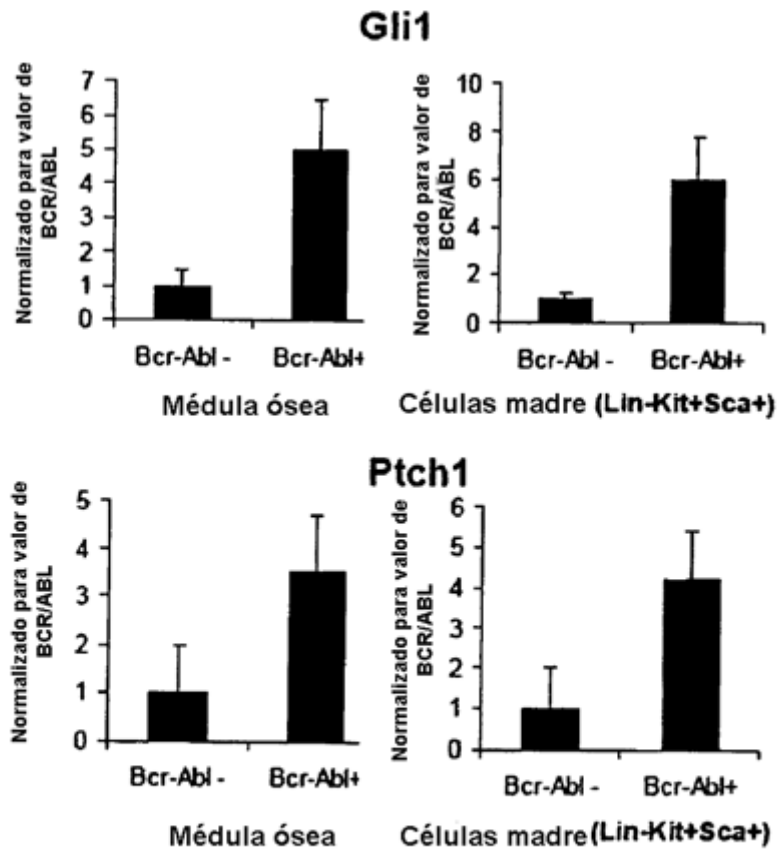
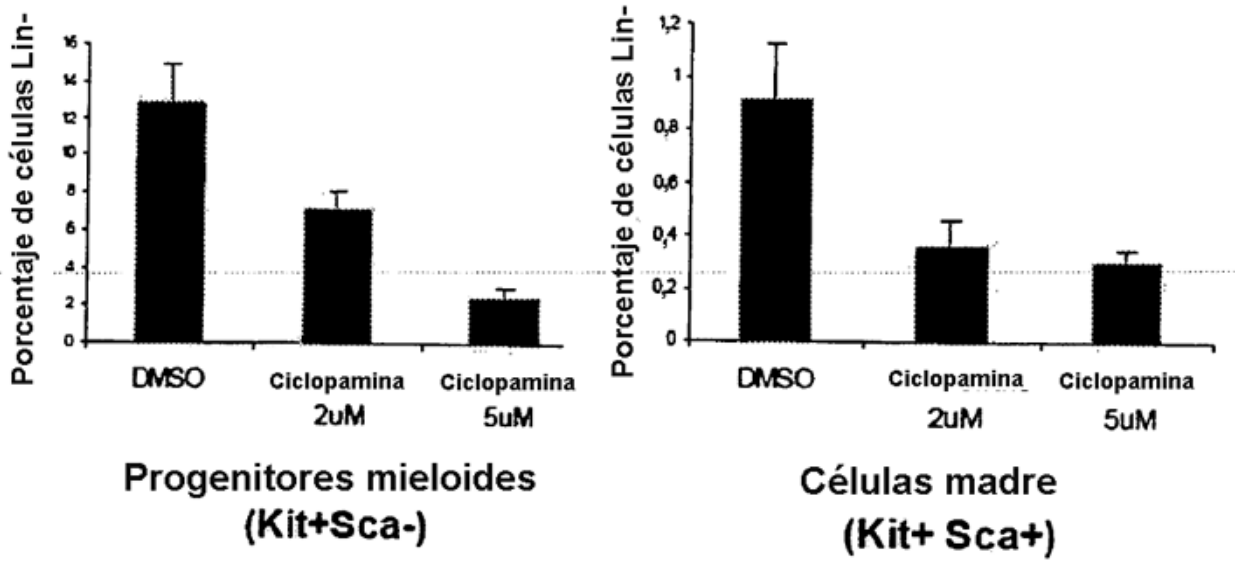


FIGURA 1B



Progenitores mieloides (Kit+Sca-)

Células madre (Kit+ Sca+)

FIGURA 2A

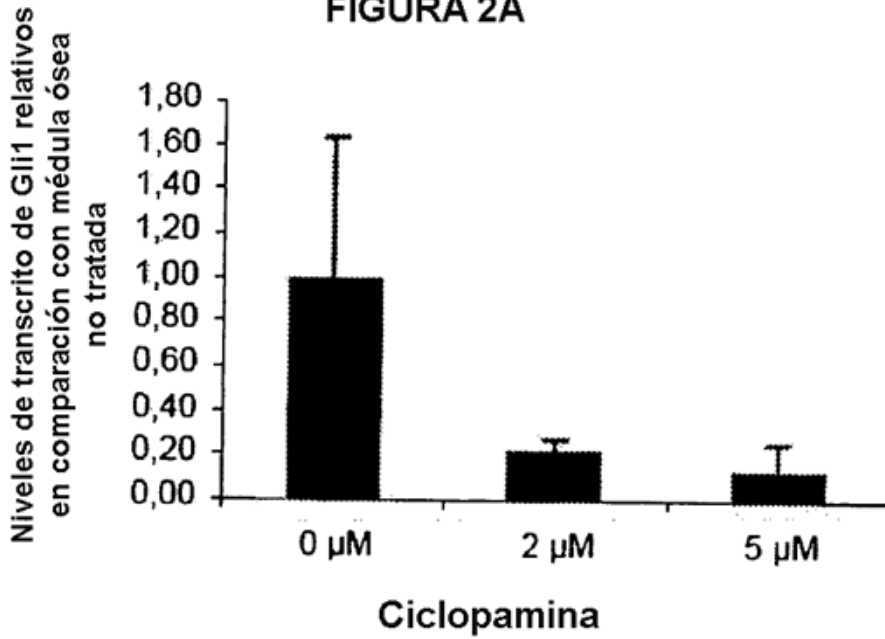


FIGURA 2B

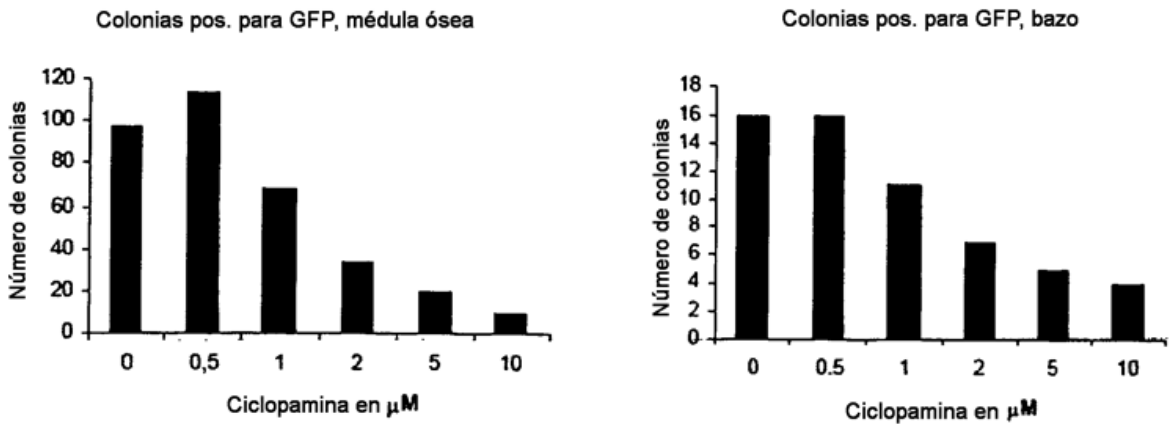


FIGURA 2C

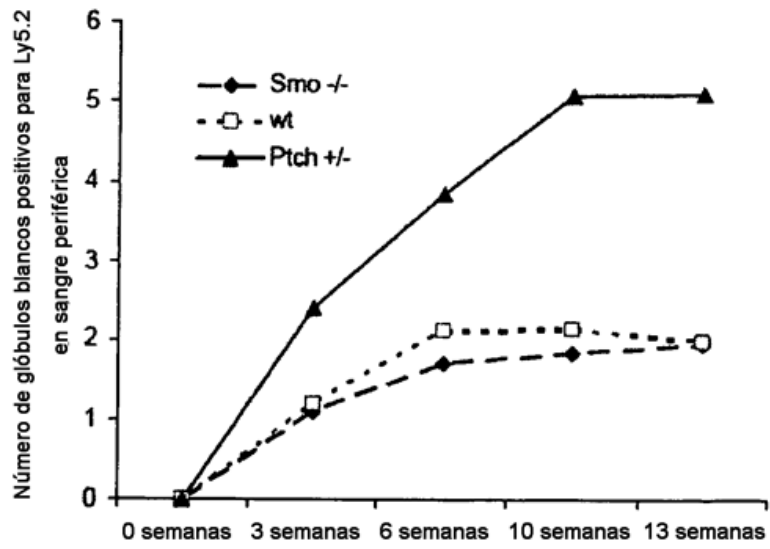


FIGURA 3A

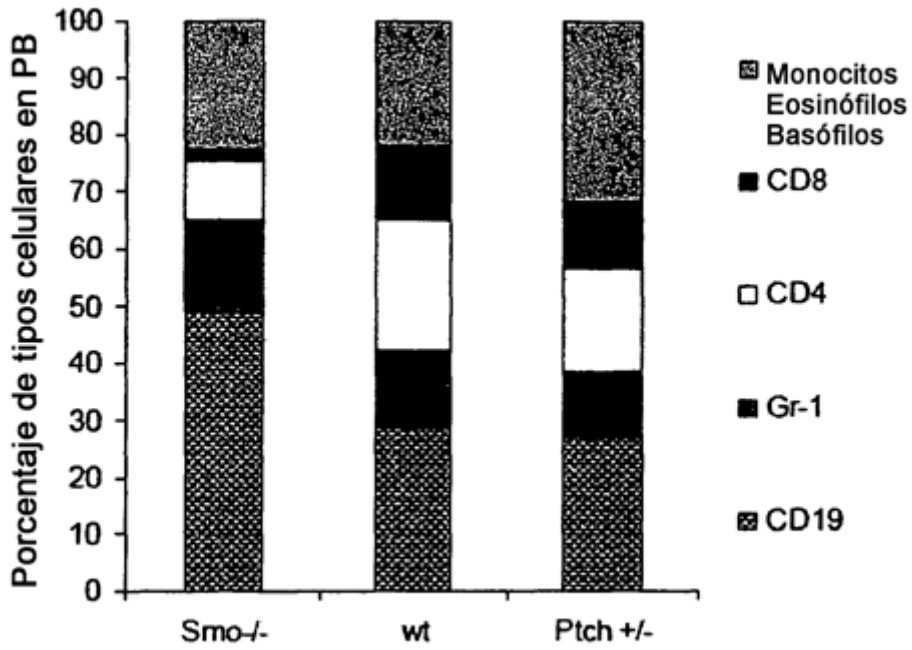
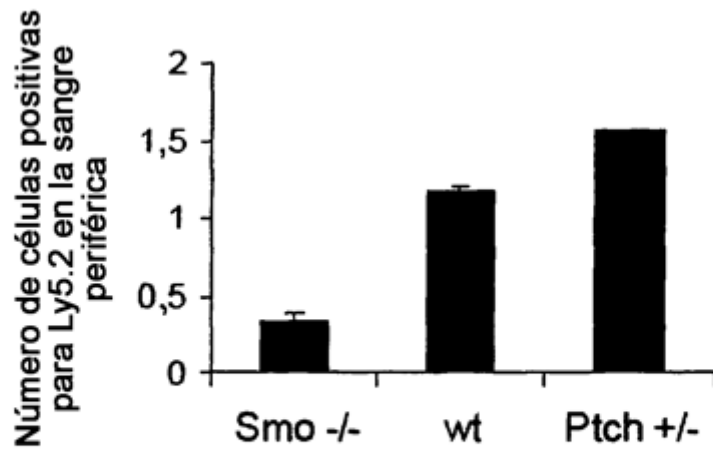


FIGURA 3B

Tratamiento con 5-FU



Regeneración 10 días tras el tratamiento

FIGURA 3C

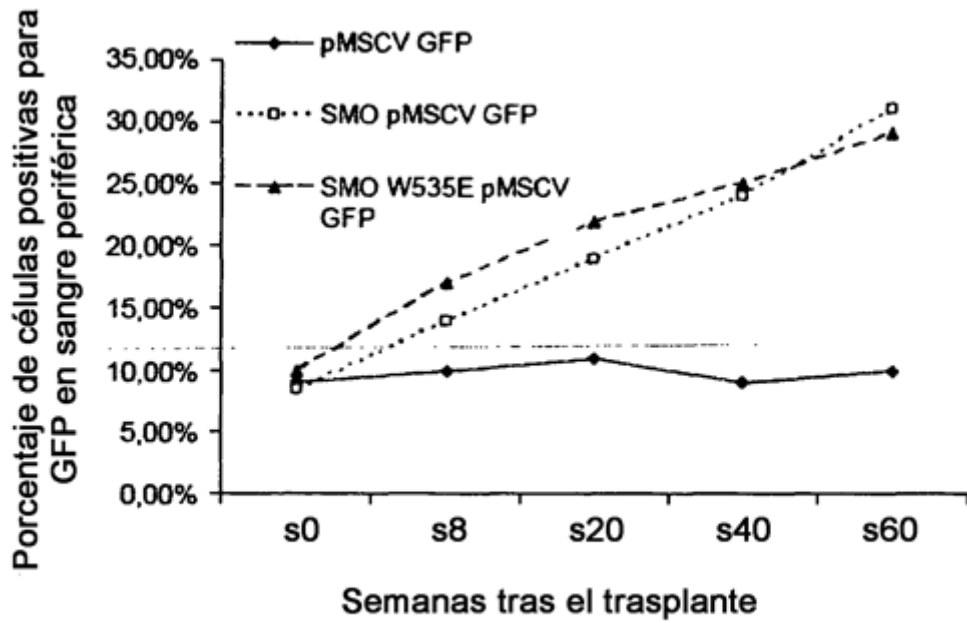


FIGURA 3D

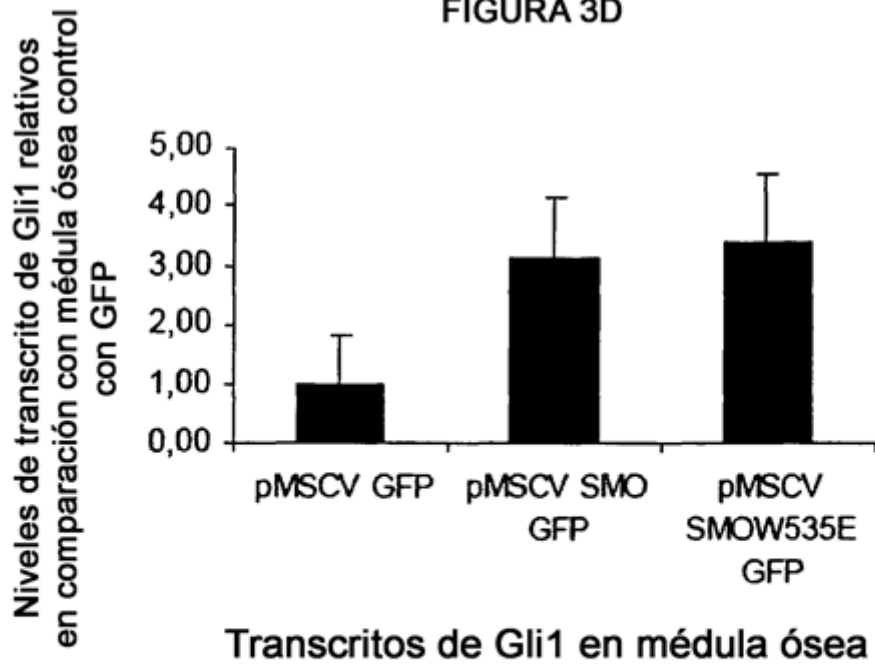


FIGURA 3E

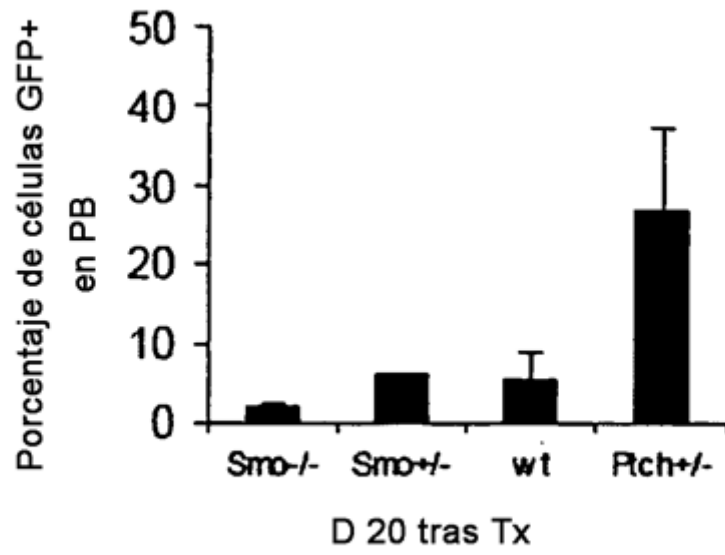


FIGURA 4A

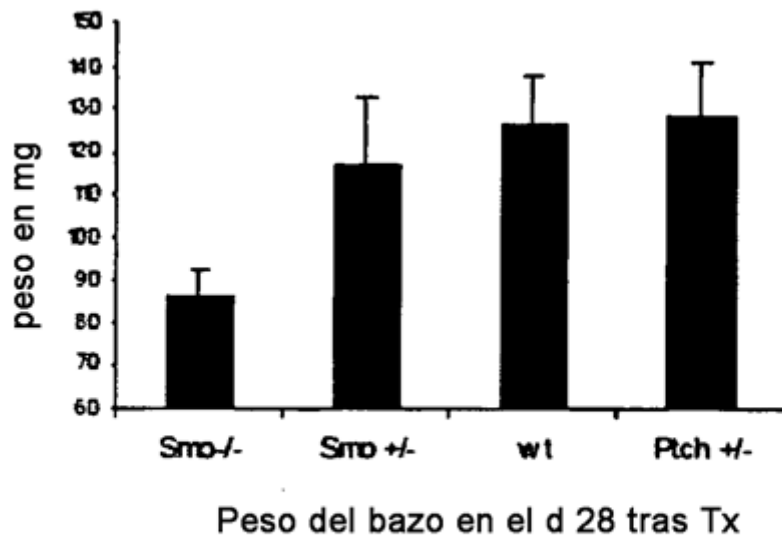


FIGURA 4B

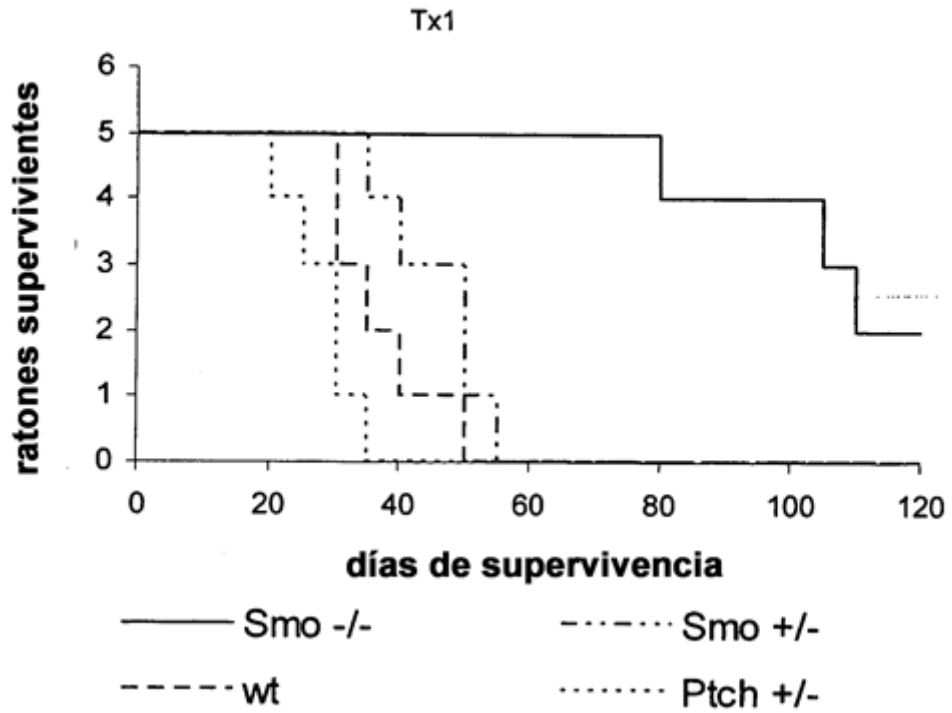


Figura 4C

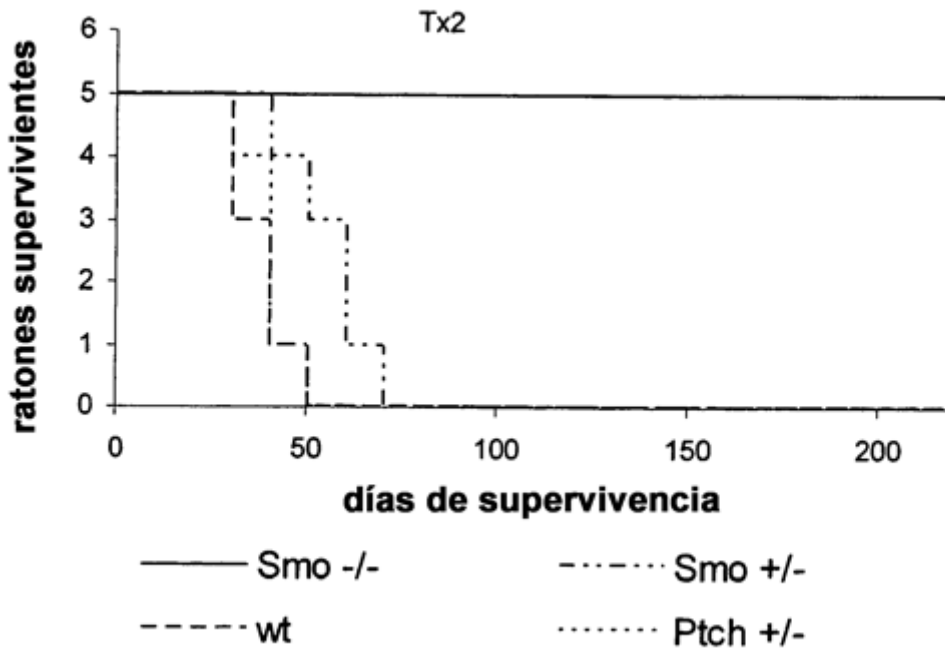


Figura 4D

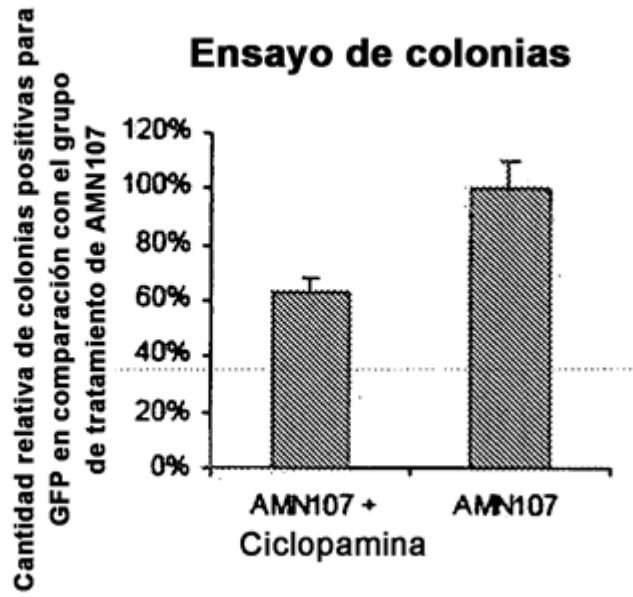


FIGURA 5A

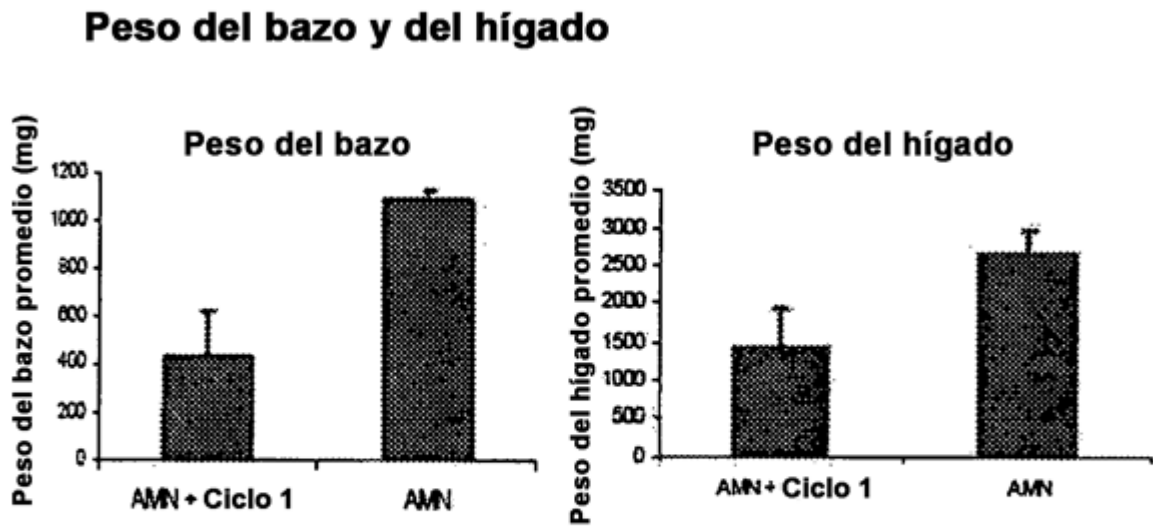


FIGURA 5B

tiempo hasta la recidiva

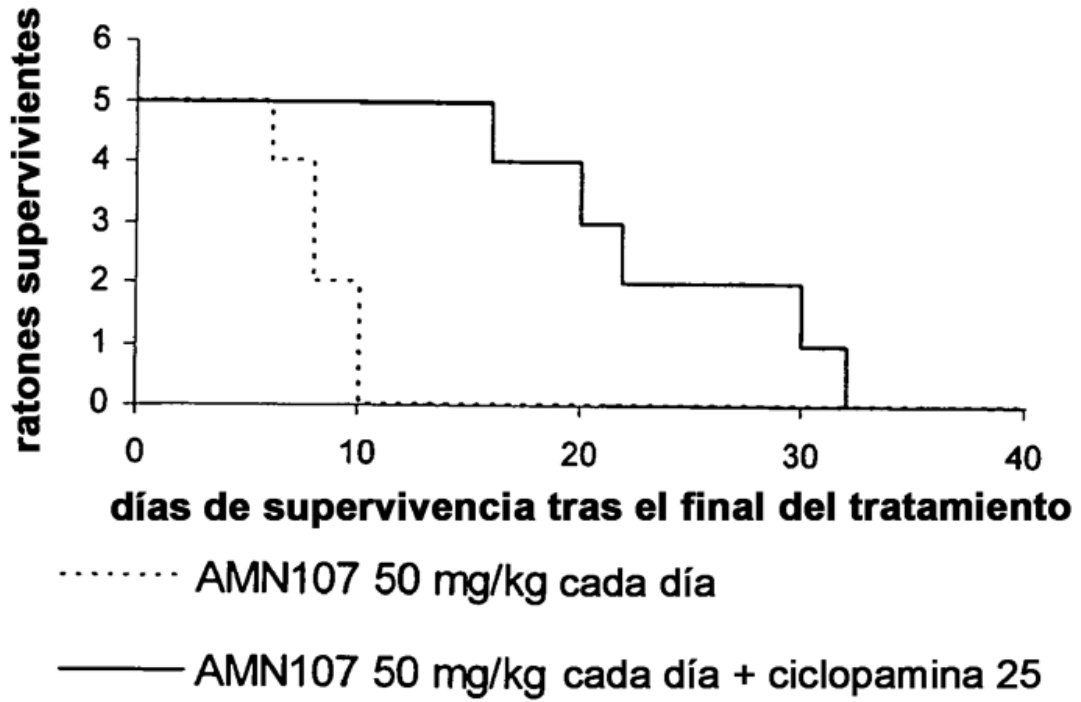


Figura 5C