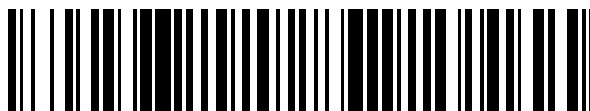


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 098**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4196** (2006.01)

**A61K 31/4402** (2006.01)

**A61K 31/59** (2006.01)

**A61K 31/593** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2009 E 09787298 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2453892**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR y**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE CNRS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CRUZ MOURA, IVAN;**

**HERMINE, OLIVIER;**

**COULON, SÉVERINE y**

**CALLENS, CELINE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 426 098 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

Composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento del cáncer.

5 **[0001]** La presente invención se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas adecuados para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, en particular para el uso en el tratamiento o la prevención de la leucemia mieloide aguda (LMA).

**Antecedentes de la invención**

10 **[0002]** La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad neoplásica heterogénea que se origina a partir de mutaciones en las células progenitoras que producen una proliferación incontrolada de blastos mieloides indiferenciados. La LMA es la leucemia aguda más común que afecta a adultos y su incidencia aumenta con la edad. Aunque la LMA es una enfermedad relativamente rara, que representa aproximadamente el 1,2 % de las muertes por cáncer en los Estados Unidos (Jemal y col. (2002) CA Cancer J Clin 52(1):23-47), se espera que aumente su incidencia a medida que aumenta la edad de la población.

15 **[0003]** En los pacientes de LMA, la médula ósea suele estar muy infiltrada por hemocitoblastos, dando como resultado una disminución de los glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos normales. Los síntomas de la LMA incluyen fatiga, insuficiencia respiratoria, tendencia a la formación de hematomas y sangrado, y un riesgo creciente de infección. Aunque se han identificado algunos factores de riesgo de la LMA, la causa específica de la LMA sigue siendo poco clara. La LMA progresa rápidamente y es normalmente fatal en semanas o meses si se deja sin tratar. La leucemogénesis de la LMA se produce en forma de acontecimientos multietapa (Gilliland y col. (2004) Hematology Am Soc Hematol Educ Program 80-97). Estos acontecimientos se clasifican en dos grupos. El primer grupo implica alteraciones génicas que confieren una ventaja proliferativa y/o de supervivencia a los progenitores hematopoyéticos (por ejemplo, mutaciones RAS, FLT3 o c-KIT). El segundo implica alteraciones en los factores de transcripción (o en los activadores simultáneos de la transcripción), inducidos de manera más frecuente por translocaciones cromosómicas pero también por mutaciones puntuales (por ejemplo, CEBP $\alpha$ , NPM1), que afectan la diferenciación hematopoyética.

20 **[0004]** El tratamiento de la LMA consiste principalmente en quimioterapia convencional y, si bien se consigue la remisión en la mayoría de los pacientes tras la inducción terapéutica inicial, la mayoría de ellos recaen. Los tratamientos posteriores a la remisión, diseñados para asegurar la supervivencia exenta de enfermedad a largo plazo incluyen dosis elevadas de quimioterapia con rescate de citoblastos autólogos, o trasplante alogénico de médula ósea (BMT, por sus siglas en inglés). Los pacientes ancianos, que constituyen la mayoría de pacientes de LMA, no son candidatos para el BMT. A pesar de la terapia agresiva, solo un 20%-30% de pacientes disfrutan de una supervivencia exenta de enfermedad a largo plazo. De esta manera, se necesitan otros tratamientos.

25 **[0005]** Se requiere hierro como cofactor de numerosas enzimas celulares críticas implicadas en el metabolismo de energía y en la proliferación celular, y de esta manera es esencial para todas las células vivas. Diferentes estudios han demostrado que las células tumorales expresan con fuerza el receptor de la transferrina (TfR1/CD71) y son más sensibles a la privación del hierro que las células no tumorales (Faulk y col., (1980) Lancet 2(1): 390-92).

30 **[0006]** Los inventores han caracterizado anteriormente un anticuerpo monoclonal (A24) que se une con fuerza a TfR1 cuando este receptor se expresa ampliamente sobre la superficie celular. La unión de A24 induce la internalización de los receptores en los compartimentos lisosómicos cuando se degradan y también la apoptosis celular debida a la privación del hierro (Moura y col. (2004) Blood 103(5): 1838-45, Lepelletier y col. (2007) Cancer Res 67(3): 1145-54). A24 ha mostrado reducir específicamente la proliferación de células tumorales y no de las células normales. Algunos estudios han mostrado la eficacia de A24 para erradicar las células de leucemia/linfoma en la leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos (LTA) y en el linfoma de células de Mantle (LCM) (Moura y col. (2004) Blood 103(5): 1838-45, Lepelletier y col. (2007) Cancer Res 67(3): 1145-54).

35 **[0007]** Otros estudios han demostrado recientemente que los agentes quelantes del hierro poseen también propiedades antiproliferativas *in vitro* e *in vivo*. Se ha mostrado la eficacia de diferentes agentes quelantes del hierro en xenoinjertos humanos en ratones lampiños (Whitnall y col. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(40): 14901-6).

40 **[0008]** Se han demostrado los efectos antiproliferativos, diferenciadores y proapoptóticos de la vitamina D3 (VD) en tejidos epiteliales normales o patológicos. VD pertenece a la superfamilia de los esteroides. VD se asocia con su receptor análogo (VDR) para formar un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR). Este complejo se une a continuación con el elemento sensible a VD (VDRE), induciendo por tanto cambios en la transcripción génica. VD activa también las rutas de la MAP cinasa (MAPK) para modular la transcripción de los genes implicados en la diferenciación celular.

45 **[0009]** VD *in vitro* promueve la expresión de los genes asociados a células originalmente diferenciadas, en un linaje celular derivado de cáncer de cabeza, cuello, próstata o colon (Akutsu y col (2001) Mol Endocrinol 15(7) :

1127-39, Palmer y col. (2003) Cancer Res 63(22): 7799-806).

**[0010]** *In vitro*, el calcitriol (la forma activa de la vitamina D3) presenta actividad antiproliferativa en el carcinoma espinocelular y en el adenocarcinoma prostático y potencia la actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos clásicos (Hershberger y col. (2001) Clin Cancer Res 7(4): 1043-51).

**[0011]** En un estudio aleatorizado prospectivo comparativo con respecto al uso de un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado (docetaxel) asociado o no con una elevada dosis de calcitriol en el cáncer de próstata, se ha encontrado que la supervivencia de los pacientes está aumentada en el brazo VD/Docetaxel (Beer y col. (2007) J Clin Oncol 25(6): 669-74). Sin embargo, la respuesta a la vitamina D3 disminuye rápidamente tras el tratamiento repetido y, por tanto, su efecto es limitado en el tiempo.

**[0012]** Finalmente, algunos autores han mostrado la eficacia *in vitro* de la vitamina D3 como un agente diferenciador, y se ha propuesto su uso en el tratamiento de la LMA (Makashima y col. (1998) Br J Cancer 77(1): 33-9). La asociación de quimioterapia (aracitina o 6-tioguanina) y agentes diferenciadores (vitamina D y ácido retinoico) se ha evaluado una vez en 26 pacientes posibilitando un 50% de remisiones (27% completas y 23% parciales) (Ferrero y col. (2004) Haematologica 89(5): 619-20).

**[0013]** Para concluir, se han ensayado la privación de hierro y VD como tratamiento antitumoral, pero ninguno de los anteriores agentes ha demostrado ser fiable para tratar de forma completa a los individuos que padecían cáncer, tales como LMA. De esta manera, existe una necesidad de nuevas alternativas terapéuticas podría proporcionar nuevas perspectivas, en particular en el tratamiento de la LMA.

### **Resumen de la invención**

**[0014]** La presente invención surge del inesperado hallazgo de los inventores de que los agentes quelantes del hierro actúan de forma sinérgica con la vitamina D3. En particular mediante la activación de la ruta de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). La asociación ha demostrado ser eficaz en blastos de LMA *in vitro* y en tumores xenoinjertados de LMA *in vivo* en ratones. Los inventores han mostrado también que el tratamiento asociado ha mejorado también el estado de un paciente de LMA refractario a la quimioterapia e indujo la diferenciación celular de los blastos del paciente.

**[0015]** De esta manera, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- a) al menos un inhibidor de la captación del hierro tal como se describe en la reivindicación 1,
- b) al menos un compuesto capaz de inducir la activación de las rutas de MAPK, que es al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D,

y opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, en particular, para uso en la prevención o el tratamiento del cáncer.

**[0016]** La presente invención se refiere también a los productos que contienen:

- a) al menos un inhibidor de la captación del hierro tal como se define en la reivindicación 1
- b) al menos un compuesto capaz de inducir la activación de las rutas de MAPK, que es al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D,

como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención o el tratamiento del cáncer.

**[0017]** La presente invención se refiere también al uso de al menos un inhibidor de la captación del hierro y al menos un compuesto capaz de inducir la activación de las rutas de MAPK, que es al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D para la fabricación de un medicamento previsto para la prevención del tratamiento del cáncer.

**[0018]** La presente patente describe también un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de la captación del hierro y al menos un compuesto capaz de inducir la activación de las rutas de MAPK, en particular, al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D (VDRM).

### **Descripción detallada de la invención**

**[0019]** Tal como se define en el presente documento "inhibidor de la captación del hierro" se refiere a un compuesto que es activo para reducir o evitar la captación del hierro por las células

**[0020]** Preferiblemente, el inhibidor de la captación del hierro se selecciona entre el grupo que consiste en un agente quelante del hierro y un inhibidor del receptor de la transferrina.

**[0021]** Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “agente quelante del hierro” o “compuesto quelante del hierro” se usan de manera indistinta y se refieren a un compuesto que se une al hierro. Un compuesto quelante del hierro que se une o forma complejo con el hierro se denomina en el presente documento como un quelato de hierro. Preferiblemente, el compuesto quelante del hierro puede ser un compuesto bidentado, un compuesto tridentado, un compuesto tetradentado, o un compuesto multidentado superior. Un compuesto quelante del hierro bidentado, tridentado, tetradentado o compuesto multidentado superior se refiere a compuestos que se unen al hierro utilizando dos, tres, cuatro o más sitios de unión separados, respectivamente. Los compuestos quelantes del hierro de la invención incluyen compuestos de quelación que se pueden unir a todos los estados de oxidación del hierro incluyendo, por ejemplo, el estado hierro (-II), el estado hierro (-I), el estado hierro (0), el estado hierro (I), el estado hierro (II), el estado hierro (III) (férrico), el estado hierro (IV) (ferril) y/o el estado hierro (V).

**[0022]** Los ejemplos de agentes quelantes del hierro bidentados específicos comprenden 1,2-dimetil-3-hidroxipiridin-4-ona (Deferiprona, DFP o Ferriprox) y 2-desoxi-2-(N-carbamoilmetil-[N'-2'-metil-3'-hidroxipiridin-4'-ona])-D-glucopiranososa (Feralex-G). Los ejemplos de agentes quelantes del hierro tridentados específicos comprenden piridoxal isonicotinilo hidrazona (PIH), ácido 4,5-dihidro-2-(2,4-dihidroxifenil)-4-metiltiazol-4-carboxílico (GT56-252), ácido 4,5-dihidro-2-(3'-hidroxipiridin-2'-il)-4-metiltiazol-4-carboxílico (desferritiocina o DFT) y ácido 4-[3,5-bis(2-hidroxifenil)-[1,2,4]triazol-1-il]benzoico (ICL-670, Deferasirox). El agente quelante del hierro puede también sustituir 3,5-difenil-1,2,4-triazoles en la forma de ácido libre, sus sales y sus formas cristalinas (tal como se describe en el documento WO 97/49395). Los ejemplos de agentes quelantes del hierro hexadentados específicos comprenden N,N'-bis (o-hidroxibencil) etilendiamina-N,N'-diacetilácido (HBED), ácido N-(5-C3-L(5-aminopentil)hidroxicarbamoil)-propionamido)pentil)-3(5-(N-hidroxiacetamido)-pentil)carbamoil)-propionhidroxámico (deferoxamina, desferrioxamina o DFO) y deferoxamina unida a hidroximetil-almidón (S-DFO). Los derivados adicionales de DFO incluyen análogos alifáticos, aromáticos, succínicos, y metilsulfónicos de DFO y específicamente, sulfonamida-deferoxamina, acetamida-deferoxamina, propilamida deferoxamina, butilamida-deferoxamina, benzoilamida-deferoxamina, succinamida-deferoxamina, y metilsulfonamida-deferoxamina.

**[0023]** Un agente quelante del hierro de acuerdo con la invención puede ser también un sideróforo o un xenosideróforo. Los ejemplos de sideróforos o xenosideróforos comprenden hidroxamatos y policarboxilatos. Los hidroxamatos contienen un resto de N-[delta]-hidroxiornitina y se clasifican por lo general en cuatro familias ilustrativas. Una clase incluye el ácido rodotorúlico, que es la dicetopiperazina de la N-[delta]-acetil-L-N [delta]-hidroxiornitina. Están incluidos en esta categoría derivados tales como el dihidroxamato denominado ácido dimérico. Una segunda clase incluye los coprógenos, que contienen un resto de N-[delta]-acil-N-[delta]-hidroxi-L-ornitina. Los coprógenos se pueden considerar también derivados de trihidroxamato del ácido rodotorúlico con una estructura lineal. Una tercera clase incluye los ferricromos, que consisten en péptidos cíclicos que contienen un tripéptido de la N-[delta]-acil-N-[delta]-hidroxiornitina y combinaciones de glicina, serina o alanina. La cuarta clase ilustrativa incluye las fusarininas, denominadas también fusígenos, que pueden ser hidroxamatos tanto lineales como cíclicos. La fusarinina es un compuesto caracterizado por la N acilación de la N-hidroxiornitina por el ácido anhidromevalónico. Los policarboxilatos consisten en un policarboxilato que contiene ácido cítrico denominado rizoferina. La molécula contiene dos unidades de ácido cítrico unidas a diaminobutano. Otras clases de sideróforos útiles como agentes quelantes del hierro en las composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, las clase fenolato-catecolato de los sideróforos, la hemina, y las [beta]-cetoaldehído fitotoxinas.

**[0024]** El agente quelante del hierro de acuerdo con la invención puede ser también una tiosemicarbazona, triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona, 3AP) que es una carboxaldehído tiosemicarbazona heterocíclica sintética con potencial actividad antineoplásica, análogos de la piridoxal isonicotinilo hidrazona del tipo di-2-piridilcetona tiosemicarbazona (DpT), análogos de la di-2-piridilcetona isonicotinilo hidrazona (PKIH) y di-2-piridilcetona-4,4,-dimetil-3-tiosemicarbazona (Dp44mT).

**[0025]** Preferiblemente, el agente quelante del hierro de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en deferoxamina, deferasirox, deferiprona, Triaprina y Dp44mT.

**[0026]** La expresión “inhibidor del receptor de la transferrina” se refiere a cualquier compuesto que se une al receptor de la transferrina y evita o inhibe la fijación de la transferrina o inhibe o evita la internalización del receptor de la transferrina/complejo de transferrina en las células.

**[0027]** La transferrina es la principal proteína plasmática de la sangre implicada en el transporte del hierro. La transferrina cargada con hierro se une a su receptor celular (TfR) y el complejo Fe-Tf/TfR se internaliza en una vesícula. El pH de la vesícula se acidifica, lo que induce a la liberación del hierro por la transferrina. El receptor a continuación se recicla a la superficie celular (Irie y col. (1987) Am J Med Sci 293: 103-11).

**[0028]** El inhibidor del receptor de la transferrina de acuerdo con la invención puede por ejemplo seleccionarse a partir del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el receptor de la transferrina, secuencia de péptidos sintéticos o naturales y antagonistas de moléculas pequeñas y aptámeros que se unen al receptor de la transferrina.

**[0029]** Preferiblemente, el inhibidor del receptor de la transferrina de acuerdo con la invención es un anticuerpo dirigido contra el receptor de la transferrina, de forma más preferible, un anticuerpo monoclonal. De manera más preferible, este anticuerpo es A24 (depositado en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, Paris) el 10 de mayo de 2001, con el número I-2665) descrito de forma notable en el documento WO 2005/111082 (Moura y col. (2001) J Exp Med 194(4): 417-25), Moura y col. (2004) Blood 103 (5): 1838-45, Lepelletier y col. (2007) Cancer Res 67(3): 1145-54.

**[0030]** Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre de forma específica anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y también fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>.

**[0031]** La ruta de MAPK está relacionada con cualquier ruta biológica que implica proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que son proteína cinasas específicas de serina/treonina que responden a estímulos extracelulares y regulan diversas actividades celulares, tales como la expresión génica, la mitosis, la diferenciación, y la supervivencia/apoptosis celular. Las rutas de MAPK son bien conocidas por las personas expertas en la técnica y se describen de forma notable en Brown y col. ((2008) Handb Exp Pharmacol 1186: 205-35) o Raman y col. ((2007) Oncogene 26(22): 3100-12). Un ejemplo de MAPK puede ser la cinasa Jun, p38 y las cinasas reguladas por señales extracelulares. Tal como se prevé en el presente documento, los agonistas de la ruta de MAPK son capaces de inducir las rutas de la cinasa MAP. Un ejemplo de agonista de la ruta de MAPK de acuerdo con la invención puede ser el agente quelante del hierro y la vitamina D, uno de sus análogos y el modulador del receptor de la vitamina D.

**[0032]** Tal como se usa en el presente documento, el término "vitamina D" comprende todas las formas de la vitamina D, como por ejemplo, la vitamina D1, la vitamina D2 (ergocalciferol), la vitamina D3 (colecalciferol), la vitamina D4 (22-dihidroergocalciferol) y la vitamina D5 (sitocalciferol). Preferiblemente, la "al menos una vitamina D" de acuerdo con la invención es la vitamina D3, de forma más preferible la vitamina D3 en su forma activa 1 $\alpha$ ,25-dihidroxicolecalciferol D3 (1,25-(OH)<sub>2</sub>D3 o calcitriol).

**[0033]** Tal como se pretende en el presente documento, un "análogo de la vitamina D" o un "modulador del receptor de la vitamina D" son capaces de unirse al receptor de la vitamina D (VDR) y son preferiblemente capaces de inducir la diferenciación celular tras la unión.

**[0034]** Los ensayos para determinar la capacidad de un análogo de la vitamina D o de un modulador del receptor de la vitamina D para unirse al receptor de la vitamina D son bien conocidos por la persona experta en la técnica. Preferiblemente, esta capacidad puede evaluarse estimándose la unión específica del análogo o del modulador del receptor de la vitamina D sobre un extracto celular. Por ejemplo, en un experimento de unión típico, el extracto celular soluble, obtenido mediante sonicación se incubó con una concentración creciente de análogo de la vitamina D o de modulador del receptor de la vitamina D. Las uniones y los análogos libres se pueden separar mediante el procedimiento del hidroxilapatito. Se puede calcular la unión específica sustrayendo la unión no específica obtenida en presencia de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D3 en exceso a partir de la unión total medida en ausencia de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D3 (Skowronski y col. (1995) Endocrinology 136(1): 20-26).

**[0035]** Se puede medir la capacidad de un análogo de la vitamina D o de un modulador del receptor de la vitamina D para inducir la diferenciación celular mediante diversos procedimientos bien conocidos por la persona experta en la técnica. Se puede estimar, por ejemplo, esta capacidad mediante la medida de la inducción de PSA (un marcador de la diferenciación celular) en una línea de células LNCaP tras la incubación con el análogo o con el modulador del receptor de la vitamina D, tal como se describe en in Skowronski y col. (en el trabajo citado).

**[0036]** Son bien conocidos en el estado de la técnica muchos análogos de la vitamina D. La expresión "análogo de la vitamina D" abarca de forma notable metabolitos de la vitamina D, derivados de la vitamina D y precursores de la vitamina D, preferiblemente abarca metabolitos de la vitamina D3, derivados de la vitamina D3 y precursores de la vitamina D3.

**[0037]** Los análogos de la vitamina D de acuerdo con la invención pueden retener la estructura secoesteroide con las estructuras de la cadena secundaria modificadas alrededor de la posición C-24. Por ejemplo, los análogos de la vitamina D pueden ser paracalcitol (19-nor-1 $\alpha$ (OH)2D2), ILX23-7553 (16-eno-23-ino-1  $\alpha$ ,25(OH)2D3), OCT (Maxacalcitol, 22-oxa-1 $\alpha$ ,25(OH)2D3) y EB1089 (Seocalcitol, 1 $\alpha$ -dihidroxi-22,24-dieno-24,26,27-trihomo-vitamina D3) o colecalciferol.

**[0038]** De forma más preferible, el análogo de la vitamina D de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo que consiste en paracalcitol, OCT, EB1089 y colecalciferol. De forma más preferible, el análogo de la vitamina D es colecalciferol.

**[0039]** Los moduladores del receptor de la vitamina D (VDRM) de acuerdo con la invención son preferiblemente

compuestos no secoesteroides que han mostrado que son menos hipocalcémicos que los análogos de VD, como por ejemplo, los compuestos mencionados en el documento US 2008/0200552. De forma más preferible, el al menos un modulador del receptor de la vitamina D (VDRM) se selecciona entre el grupo que consiste en LY2108491, LY2109866 y LG190119 (Ma y col. (2006) J Clin Invest 116(4): 892-904, Polek y col (2001) Prostate 49(3): 224-33).

**[0040]** La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar o de cualquier tipo no tóxica.

**[0041]** La forma de las composiciones farmacéuticas, la ruta de administración, la dosificación y el régimen de acuerdo con la invención depende de la dolencia que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso, y el sexo del paciente, etc.

**[0042]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse de forma notable para la administración oral (preferiblemente para la administración de VD y de los agentes quelantes del hierro), intravenosa (preferiblemente para la administración de VD, del inhibidor del receptor de la transferrina y de los agentes quelantes del hierro), subcutánea (preferiblemente para la administración de los agentes quelantes del hierro) o intramuscular (preferiblemente para la administración de VD).

**[0043]** Preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende vitamina D3 y el anticuerpo monoclonal A24. También, preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende vitamina D3 y deferoxamina y/o Deferasirox.

**[0044]** A modo de ejemplo, el al menos un inhibidor de la captación del hierro de acuerdo con la invención se puede administrar a una concentración de aproximadamente 0,1 a 1000 mg/kg de peso corporal/día o preferiblemente de aproximadamente 1 a 100 mg/kg de peso corporal/día. Preferiblemente, defasirox se puede administrar a una concentración de aproximadamente 1 a 50 mg/kg de peso corporal y de forma más preferible a una concentración de aproximadamente 10-30 mg/kg de peso corporal/día. Preferiblemente, se puede administrar deferoxamina a una concentración de aproximadamente 10 a 100 mg/kg de peso corporal/día y, de forma más preferible a una concentración de aproximadamente 60-80 mg/kg de peso corporal/día.

**[0045]** A modo de ejemplo, la al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D (VDRM) de acuerdo con la invención se puede administrar a una concentración de aproximadamente 0,001 a 100 g/kg de peso corporal/día o aproximadamente 0,01 a 50 g/kg de peso corporal/día o aproximadamente 0,1 a 5 g/kg de peso corporal/día, de forma más preferible aproximadamente 0,5 g/kg de peso corporal/día.

**[0046]** El al menos un inhibidor de la captación del hierro se puede administrar antes de, de forma simultánea con, o de manera posterior a la administración de la al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D (VDRM) a un individuo que tenía, tiene, o es susceptible de desarrollar un cáncer, tal como se ha definido anteriormente. El al menos un inhibidor de la captación del hierro y la al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D (VDRM) se pueden administrar a un individuo en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de tal manera que la primera molécula de unión puede actuar junto con la segunda molécula de unión para proporcionar un beneficio creciente que si se administrara de otra forma. Preferiblemente, el al menos un inhibidor de la captación del hierro y la al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D (VDRM) se administran de forma conjunta.

**[0047]** La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede utilizar en la prevención o el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el cáncer es una neoplasia hematopoyética.

**[0048]** En el contexto de la invención, el término “tratamiento o prevención” significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la dolencia a la cual se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o dolencia. En particular, el tratamiento del trastorno puede consistir en reducir el número de células neoplásicas. Lo más preferible, dicho tratamiento conduce a la eliminación completa de las células neoplásicas.

**[0049]** Preferiblemente, el individuo que se va a tratar es un mamífero humano o no humano (tal como un roedor (ratón, rata), un felino, un canino, o un primate) afectado o que probablemente va a verse afectado con un cáncer. Preferiblemente, el individuo es un ser humano.

**[0050]** Los términos “cáncer” y “neoplasia” se refieren a o describen la patología en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. De forma más precisa, en el uso de la invención, es más probable que las enfermedades, concretamente los tumores, que expresan el receptor de la vitamina D respondan a moduladores de la vitamina D. Además, los inventores han teorizado que la privación del hierro utilizando un

inhibidor de la captación del hierro restaura la sensibilidad en la vitamina D por sobreexpresión de su receptor en la superficie celular. En particular, el cáncer puede estar asociado con un tumor sólido o un crecimiento no regulado o indiferenciado de las células hematopoyéticas de la médula ósea (hemocitoblastos). Los ejemplos de cánceres que están asociados con la formación de tumores sólidos incluyen el cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de útero/cuello de útero, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de estómago.

**[0051]** Preferiblemente, el cáncer o neoplasia de acuerdo con la invención se debe a un crecimiento no regulado de las células hematopoyéticas indiferenciadas de la médula ósea (hemocitoblastos).

**[0052]** Tal como se pretende en el presente documento, el término “hemocitoblasto (HSC, por sus siglas en inglés)” se refiere a hemocitoblastos multipotentes en adultos que pueden dar lugar a todos los tipos celulares, incluyendo, por ejemplo, linajes mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos), eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, y linajes linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células N-K).

**[0053]** La expresión “neoplasia de hemocitoblastos” o “neoplasia hematopoyética” de acuerdo con la invención comprende leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica, linfoma y síndrome mielodisplásico (tal como se define en la clasificación de la OMS de 2001). Preferiblemente, el cáncer de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo que consiste en síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda.

#### **Breve descripción de los dibujos**

**[0054]** La **FIG. 1** representa gráficamente la relación entre las unidades formadoras de colonias de macrófagos (UFC-MG) obtenida a partir de cultivos semisólidos de células sanguíneas CD34<sup>+</sup> del cordón umbilical tratadas mediante A24 (A24), deferoxamina (DFO) o Deferasirox (DFX) en comparación con células no tratadas (Control)

La **FIG. 2** representa gráficamente la expresión de CD11B en blastos de pacientes de LMA tratados con A24 y DFO durante 72 h. Los valores obtenidos se normalizaron calculando el aumento del MFI con respecto a las células del control. Los subtipos de LMA se distinguen: los símbolos rellenos representan los subtipos de LMA MO/M1/M2 mientras que los símbolos vacíos representan los subtipos M4/M5. Se representan los valores promedios obtenidos de ocho pacientes.

La **FIG. 3** representa gráficamente la expresión de CD14 en los blastos de pacientes de LMA tratados con A24 y DFO durante 72 horas. Los valores obtenidos se normalizaron calculando el aumento del MFI con respecto a las células del control. Los subtipos de LMA se distinguen: los símbolos rellenos representan los subtipos de LMA MO/M1/M2 mientras que los símbolos vacíos representan los subtipos M4/M5. Se representan los valores promedio obtenidos de ocho pacientes.

La **FIG. 4** representa gráficamente el cambio en la expresión de c-Jun tras el tratamiento de células HL60 con vitamina D3 (VD, 250 nM), A24 (A24, 10 µg/ml), deferoxamina (DFO, 5 µM) o Deferasirox (DFX, 3 µM).

La **FIG. 5** representa gráficamente los niveles del ARNm de c-Fos y c-Jun (evaluados mediante RT-PCR cuantitativa y normalizados a niveles de ARNm de GAPDH) en células HL60 tratadas durante 48 h con A24 (A24, 10 µg/ml); deferoxamina (DFO, 5 µM); o deferasirox (DFX, 3 µM) (promedio ± SEM, n = 3).

La **FIG. 6** representa gráficamente la apoptosis/necrosis temprana y tardía evaluada mediante citometría de flujo usando el marcado de una anexina V-FITC (negro) y anexina V-FITC/PI (gris). Se cultivaron células HL60 en presencia o en ausencia de A24 (10 µg/ml) o deferoxamina (DFO, 5 µM) en un medio suplementado o no con el inhibidor de JNK SP600125 (SP) a 2 µM y 6 µM (promedio ± SEM, n = 3).

La **FIG. 7** representa gráficamente la apoptosis/necrosis temprana y tardía evaluada mediante citometría de flujo utilizando una anexina V-FITC (negro) y anexina V-FITC/PI (gris). Se cultivaron células HL60 en presencia o en ausencia de A24 (A24, 10 µg/ml) o deferoxamina (DFO, 5 µM) en un medio suplementado o no con el inhibidor de p38 SB203580 (SB) a 0,5 µM y 1 µM (promedio ± SEM, n = 3).

La **FIG. 8** representa gráficamente el análisis de citometría de flujo de la expresión de CD14 y CD11b en células HL60 tratadas durante 72 h con A24 (10 µg/ml) (línea fina continua), con VD (250 nM) (línea fina discontinua) o con la asociación de VD y agentes quelantes del hierro (línea negrita continua). Los histogramas rellenos representan el marcado de isotipos del control.

La **FIG. 9** representa gráficamente el análisis de citometría de flujo de la expresión de CD14 y CD11b en células HL60 tratadas durante 72 h con DFO (5 µM) (línea fina continua), con VD (250 nM) (línea fina discontinua) o con la asociación de VD y agentes quelantes del hierro (línea negrita continua). Los histogramas rellenos representan el marcado de isotipos del control.

La **FIG. 10** representa gráficamente el nivel del transcrito de VDR (evaluado mediante la RT-PCR cuantitativa y normalizado para los niveles de ARNm de GAPDH), en células HL60 tratadas durante 6 h con A24 (A24/10 µg/ml, deferoxamina (DFO/ 5 µM), o vitamina D3 (VD/250 nM), A24 y deferoxamina (A24+DFO/ 10 µg/ml y 5 µM) de deferoxamina y vitamina D3 (VD+DFO/ 250 nM y 5 µM).

La **FIG. 11** representa gráficamente el nivel del transcrito de catelicidina (evaluado mediante la RT-PCR cuantitativa y normalizado para el nivel de ARNm de GAPDH) en células HL60 tratadas durante 6 h con A24 (A24/ 10 µg/ml, deferoxamina (DFO/ 5 µM), o vitamina D3 (VD/ 250 nM), A24 y deferoxamina (A24+DFO/ 10 µg/ml y 5 µM), deferoxamina y vitamina D3 (VD+DFO/250 nM y 5 µM).

La **FIG. 12** representa gráficamente el nivel del transcrito de CYP24A (evaluado mediante la RT-PCR cuantitativa y normalizado para el nivel del ARNm de GAPDH) en células HL60 tratadas durante 16 h con A24 (A24/ 10 µg/ml); deferoxamina (DFO/ 5 µM), o vitamina D3 (VD/ 250 nM), A24 y deferoxamina (A24+DFO/ 10 µg/ml y 5 µM), deferoxamina y vitamina D3 (VD+DFO/ 250 nm y 5 µM).

La **FIG. 13** representa gráficamente el nivel del transcrito de c-Jun (evaluado mediante la RT-PCR cuantitativa y normalizado para el nivel del ARNm de GAPDH) en células HL60 tratadas durante 16 h con A24 (A24/ 10 µg/ml), deferoxamina (DFO/ 5 µM), o vitamina D3 (VD/ 250 nM), A24 y deferoxamina (A24+DFO/ 10 µg/ml y 5 µM), deferoxamina y vitamina D3 (VD+DFO/ 250 nM y 5 µM).

La **FIG. 14** representa gráficamente el nivel del transcrito de C-Foc (evaluado mediante la RT-PCR cuantitativa y normalizado para el nivel del ARNm de GAPDH) en células HL60 tratadas durante 16 h con A24 (A24/ 10 µg/ml); deferoxamina (DFO/ 5 µM), o vitamina D3 (VD / 250 nM), A24 y deferoxamina (A24+DFO/ 10 µg/ml y 5 µM), deferoxamina y vitamina D3 (VD+DFO /250 nM y 5 µM).

La **FIG. 15** representa gráficamente los tamaños de los tumores medidos en el día 25 en ratones xenoinjertados inyectados con deferoxamina (DFO, n = 14) (DFO a 20 mg/día, 5-7 veces/semana), deferoxamina y vitamina D3 (VD a 1 µg, dos veces por semana y DFO a 20 mg/día, 5-7 veces/semana) (DFO+VD, n=13) en comparación con los ratones inyectados con vehículo (control, n = 12), se representaron gráficamente los tumores individuales.

**EJEMPLOS**

**PROCEDIMIENTOS**

**Muestras clínicas y líneas celulares**

**[0055]** Se analizaron células de sangre periférica procedentes de pacientes de LMA y donantes sanos tras obtener su consentimiento informado por escrito (esto se refiere a la tabla complementaria 2 para la información adicional). Se recogió sangre periférica en el diagnóstico inicial con anterioridad a la administración del tratamiento. Se separaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-hypaque (laboratorios PAA) y se volvieron a suspender en medio IMDM (Invitrogen) suplementado con suero de ternera fetal al 15% (FCS) (Hyclone), 100 ng/ml de Factor citoblástico (SCF), 10 ng/ml de interleucina 3 (IL-3) y 25 ng/ml de FLT3-L (adquiridos todos de R&D Systems). Las líneas celulares HL60 y U937 fueron un obsequio de J. M. Cayuela (Saint-Louis Hospital, Paris). Se cultivaron las células en medio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con FCS al 5% y antibióticos.

**Tabla 1: Características de los pacientes de LMA utilizados en este estudio**

Sexo	edad	Subtipo FAB	WBC	(/mm3) %	Cariotipo de blastos
M	42	M4éo	6400	21	46,XY,t(16;16)(p13;q22)[17]/46,XY [3]
M	79	M2/MDS	5000	6	43,XY,-2,add(5)(q?31),-7,del(7)(q21),-13,-14,-16,-17,+3 mar [11] /44,idem,+8 [3] / 46,XY [4]
M	53	M1	4 200	70	47,XY,+21[5]/46,XY [15]
F	49	M5	160 000	77	46,XX [20]
M	61	M1	21 000	91	46,XY,del(9)(q12q33) [16] / 46,XY [4]
F	23	M5	200 000	98	46,XX,del(2)(q3?2),t(10;11)(p12;q23)
F	59	M4	60 000	55	46,XX [20]
M	36	M2	6 000	55	fracaso
M	51	M5	165 000	80	fracaso
M	76	M2	28 000	19	46,XY [20]
F	68	M2	112 000	90	46,XX [20]
F	54	M2	24 000	16	46,XX [20]
M	40	M2	9 300	43	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
M	66	M0	10 000	80	48,XY,?del(7)(q3?3q3?5),?del(20)(q1?2),+21,+21
F	64	M1	27 400	85	81-92,XXXX [17]



**Tratamientos celulares y ensayos para la proliferación**

5 [0056] Novartis proporcionó Deferasirox. VP16, DFO, VD y FeCl<sub>3</sub> se adquirieron de Sigma-Aldrich. El mAb A24 se produjo y purificó tal como se describe en (Moura y col. (2001) J Exp Med 194: 417-25). Los inhibidores de JNK (SP600125), ERK (PD98059) y p38 (SB203580) MAPK se adquirieron de Santa-Cruz Biotechnology.

10 [0057] Para los ensayos de proliferación, la línea celular HL60 se volvió a suspender en medio RPMI-1640 con FCS al 5%, y los blastos de los pacientes en medio IMDM con BIT 9500 al 15% (Stem Cell Technologies). Las células se añadieron por triplicado a  $2,5 \times 10^4$  por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Falcon). La proliferación se midió tal como se describe en Lepelletier y col. (2007) Cancer Res 67: 1145-1154).

**Análisis citogenético**

15 [0058] Se llevó a cabo la fluorescencia en la hibridación in situ (FISH) utilizando protocolos normalizados con sondas centroméricas específicas para el cromosoma 8 (pZ8.4) y el cromosoma 12 (pBR12), utilizado como control.

**Aislamiento de ARN, PCR cuantitativa en tiempo real y análisis del transcriptoma**

20 [0059] Se extrajo el ARN total utilizando Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). Tras el tratamiento de la ADNasa, se sintetizó ADN monocatenario utilizando una transcriptasa inversa SuperScript (Invitrogen). Se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real con un equipo Chromo-IV PCR System (MJ Research) y los productos de la PCR se cuantificaron utilizando SybrGreen Technology (Jumpstart mastermix, Sigma Aldrich). Los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real se interpretaron utilizando el procedimiento delta-delta Ct (Livak y col. (2001) Methods 25: 25 402-408). La lista completa de las secuencias de cebadores utilizadas está disponible en la sección de datos complementarios, tabla 4.

30 [0060] Para las micromatrices, se utilizaron la micromatriz larga (60 pb) de oligonucleótidos de Agilent 44 K Whole Human Genome (G4112A) y el procedimiento de análisis de doble color en el que las sondas de las muestras tratadas y del ARN de referencia se marcaron diferencialmente con cianina 5 y cianina 3. Estas micromatrices tienen 44.290 características con 41.000 oligonucleótidos distintos que pertenecen a 33.715 secuencias definidas por su número de acceso. El ARNc de cada muestra tratada se marcó con cianina 3 (Cy3)-citidina trifosfato (CTP) y el combinado de referencia del ARN de HL60 sin tratar con cianina 5 (Cy5)-CTP para la comparación directa. La transcripción inversa, la amplificación lineal, el marcado del ARNc, y la purificación, se llevaron a cabo con el kit de amplificación lineal de Agilent. Los datos de la micromatriz se analizaron principalmente con el software Resolver (Rosetta Inpharmatics). Se filtraron todos los datos para eliminar los valores de baja intensidad con 50 unidades arbitrarias para ambos colores.

**Xenoinjertos de tumores**

40 [0061] Para la prevención de la implantación del tumor,  $5 \cdot 10^6$  células HL60 se mezclaron con Matrigel (1:1, V/V) y se inyectaron por vía subcutánea en ratones atímicos lampiños hembras de 8-10 semanas de edad. Los ratones se inyectaron a continuación i.p. con A24 (40 mg/kg, una vez en el día 1), DFO (20 mg/día, 5 7 veces/semana, VD (1 µg dos veces a la semana) o PBS como vehículo control durante 25 días. Se midió el crecimiento tumoral tal como se describe en Lepelletier y col., ((2007) Cancer Res 67: 1145-1154).

**Inmunohistoquímica**

50 [0062] Se desparafinaron secciones en serie de 3 mm procedentes de los bloques de parafina en xileno, y se hidrataron en series decrecientes de alcohol. Se llevó a cabo la tinción usando el Lab Vision Immunohistochemical Autostainer (Lab Vision Corporation, Fremont, CA) con anticuerpos primarios dirigidos contra CD14, CD11b (Sigma-Aldrich, 1:200), p-ERK y p-Jun (Cell Signaling, 1:1000), seguido por anticuerpos dirigidos contra Ig biotinilada y estreptavidina-peroxidasa, y se desarrollaron en PBS con DAB (0,05 %) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003 %. Se obtuvieron imágenes utilizando el software IM50 en una cámara digital (DFC320, Leica) y un microscopio Leica (DM-2000).

**Análisis estadístico**

60 [0063] Se expresaron los datos como promedios  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico con el software GraphPadPrism 5. Se utilizaron tests de la t de Student para comparar dos grupos, mientras que se realizaron comparaciones multigrupo un test ANOVA unilateral seguido por el análisis post-hoc (test de Bonferroni). Se utilizaron el test de Kruskal-Wallis seguido por el test post de Dunn para las comparaciones no paramétricas donde se indica. Para la comparación de las curvas de animales exentos de tumor, se utilizaron pruebas de rango logarítmico. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a unos valores de P menores de 0,05 (\*), menores de 0,01 (\*\*) o menores de 0,001 (\*\*\*).

## RESULTADOS

### Ejemplo 1: La privación de hierro afecta la expresión del gen relacionada con la diferenciación celular

[0064] Los mecanismos moleculares implicados en el efecto antitumoral de las soluciones terapéuticas quelantes del hierro anteriormente mencionadas siguen por elucidarse de forma completa. Para conseguir un mayor comprensión sobre estos mecanismos, se identificaron genes que están afectados tanto por los agentes quelantes del hierro (deferoxamina (DFO) y deferasirox (DFX)) como por la deficiencia de TfR1 (mAb A24). El fundamento era que siguiendo esta estrategia sería disminuir la probabilidad de seleccionar genes irrelevantes. Estos estudios se centraron en un modelo de línea celular (HL60) para evitar la heterogeneidad de los datos de los diversos acontecimientos genéticos en la oncogénesis de pacientes de LMA. El análisis de los datos recogidos desveló que 105 genes fueron modulados por tres agentes diferentes. Entre estos genes, algunos estuvieron relacionados con la diferenciación celular. En particular, los marcadores de monocitos o los macrófagos activados estaban regulados en exceso (SERPINB8, ITGB2, TREML2, ITGAM) mientras que aquellos de la diferenciación de los granulocitos estaban regulados por defecto (ELA2, PRTN3, CLC, AZU) por agentes de privación del hierro.

### Ejemplo 2: La homeostasia del hierro tiene un papel en la diferenciación granulo-monocítica

[0065] Se ensayó el efecto de privación del hierro en progenitores hematopoyéticos primarios. Cultivos semisólidos de células CD34<sup>+</sup> primarias (con citosinas pluripotentes) en presencia o ausencia de agentes de privación del hierro (directamente como hacen los agentes quelantes del hierro o, de forma indirecta, mediante el uso del mAb A24 dirigido contra TfR) conducen a un número creciente de colonias de UFC-M en detrimento de UFC-G, lo que sugiere que el hierro quelante procedente de los precursores hematopoyéticos indujo un compromiso hacia el linaje monocítico sobre el granulocítico (**FIG. 1**) aunque no cambia los números totales de colonias. En cultivos líquidos, la privación del hierro no afecta la proliferación de las células sanguíneas del cordón pero modula su compromiso hacia el linaje monocítico. Igualmente, hubo una consistente regulación en exceso de los factores de transcripción específicos del linaje monocítico HOXA10, EGR1 y MafB. La evaluación citológica de los cultivos confirmó que los números de células monocíticas estuvieron potenciados en cultivos pobres en hierro. De esta manera, en nichos de médula ósea, la disponibilidad del hierro podría ser un factor determinante del resultado mielo-monocítico frente al granulocítico de la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

### Ejemplo 3: La privación de hierro induce la diferenciación de las células de la leucemia

[0066] Se ensayó la capacidad de privación del hierro para ignorar el bloqueo de la diferenciación de las células de LMA. En las líneas celulares de LMA, los marcadores monocíticos CD14 y CD11b (que se indujeron por la vitamina D3 (VD), un agente de diferenciación monocítico) se indujeron mediante la privación de hierro por el mAb A24, DFO y DFX. La inducción de marcadores superficiales celulares estuvo acompañada por modificaciones citológicas características de los monocitos. La privación del hierro indujo el ensanchamiento del citoplasma, la pérdida de gránulos basófilos y azurófilos del citoplasma. La regulación en exceso de la expresión de los marcadores de la diferenciación se abrogó cuando los cultivos se suplementaron con hierro soluble en exceso, confirmando que el origen primario del programa de diferenciación monocítico es dependiente de la disponibilidad de hierro en las células.

[0067] A continuación, se investigó si las células de los pacientes de LMA podrían inducirse también para diferenciarse tras la privación del hierro. Los blastos de LMA recientes procedentes de diferentes subtipos de LMA se aislaron en el momento del diagnóstico (la lista completa de los subtipos y parámetros biológicos de los pacientes utilizados en el estudio se relacionan en la **Tabla 1**) y se cultivaron en presencia del mAb A24 y DFO. Los marcadores de la expresión CD14 y CD11b se regularon en exceso de forma consistente en cultivos que indicaban que los blastos procedentes de diferentes subtipos de LMA, incluso aunque fueran heterogéneos en sus acontecimientos oncogénicos que conducen a la detención de la diferenciación, son susceptibles al tratamiento de diferenciación basado en la privación de hierro (**FIG. 2** y **FIG. 3**). Los estudios *in vitro* del intervalo de dosis mostraron que la diferenciación estuvo acompañada por la detención de la proliferación celular y la apoptosis.

### Ejemplo 4: Las rutas de la cinasa JUN están inducidas por la privación del hierro

[0068] Comparando (con un análisis no supervisado), el modelo de genes inducido por VD y los agentes quelantes del hierro, se encontró una elevada similitud entre los genes modulados. Treinta de los 105 genes modulados por la privación del hierro se compartían con genes modificados por VD. Este hallazgo subraya las potenciales similitudes entre ambos enfoques de diferenciación. Tanto los VD como los agentes quelantes del hierro regularon en exceso los marcadores de los monocitos (SERPINB8, ITGB2, TREML2, ITGAM) y regularon por defecto los marcadores neutrófilos (ELA2, PRTN3, CLC, AZU). La ruta de la cinasa JUN (JNK) es una ruta de MAPK principal implicada en la diferenciación monocítica y se había demostrado anteriormente que estaba inducida por VD (Wang y col.; (2003) J Cell Biochem 89: 1087-1101). Efectivamente, el gen c-Jun se indujo por VD pero también por la privación del hierro (**FIG. 4**). Además, la codificación de los transcritos de c-Fos y c-Jun estuvo también regulada en exceso por ambos tratamientos (**FIG. 5**). La inhibición del JNK por su inhibidor específico SP600125 abrogó la diferenciación inducida por el hierro con A24 o DFO. Las rutas de MAPK (cinasa-ERK regulada por la señal extracelular, JNK y p38)

convergen frecuentemente para amplificar la transducción de la señal (Johnson y col. (2002) Science 298: 1911-1912, Lopez-Bregami y col. (2007) Cancer Cell 11: 447-460). De acuerdo con esto, se ha encontrado que los agentes quelantes del hierro indujeron la activación de las rutas de ERK relacionadas con MAPK y p38, tal como se evidencia por la fosforilación de sus efectores moleculares. Además, la inhibición selectiva de las rutas de ERK y p38 bloqueó la diferenciación celular inducida por la privación del hierro. Sin embargo, los inhibidores de JNK y p38 (**FIG. 6 y FIG. 7**) pero no de ERK, evitaron la apoptosis celular inducida por la privación del hierro.

**Ejemplo 5: La asociación del agente quelante del hierro y la vitamina D3 tiene un efecto sinérgico sobre la diferenciación de los blastos de LMA**

[0069] A continuación, se investigó si la asociación de los agentes quelantes del hierro y VD podría tener un efecto sinérgico. La asociación de agentes quelantes con VD aumentó drásticamente la regulación por exceso de los marcadores monocíticos de la diferenciación celular (**FIG. 8 y FIG. 9**). Esto se podría explicar por la regulación en exceso de la transcripción génica de VDR (**FIG. 10**) que se ha implicado en la diferenciación celular monocítica (Himes y col; (2006) J Immunol 176: 2219-2228, Wang y col. (2003) J Cell Biochem 89: 1087-1101). La relevancia fisiológica del aumento de expresión del gen de VDR se evidenció por el robusto aumento en la transcripción de sus genes diana en la dirección 3', catelicidina (un aumento de 1000 veces) (**FIG. 11**) y CYP24A (un aumento de 6000 veces) (**FIG. 12**). La sinergia observada es también debida a la activación de la ruta de JNK ya que los genes c-Jun y C-Fos estaban regulados por exceso de forma notable debido a la quelación del hierro y a la asociación de VD (**FIG. 13 y FIG. 14**). Además, la fosforilación de JNK aumentó cuando se asoció VD con la privación del hierro. Estas profundas modificaciones estuvieron acompañadas por cambios morfológicos en las células tratadas. Por tanto, la asociación de la privación del hierro y de los agentes de diferenciación tales como VD, podría reducir los efectos secundarios en el tratamiento combinado manteniendo a la vez sus propiedades antileucémicas.

**Ejemplo 6: La asociación del agente quelante del hierro y de la vitamina D3 tiene un efecto sinérgico *in vivo* en un modelo de ratón de xenoinjertos de tumores**

[0070] De forma adicional, se evaluó *in vivo* la eficacia del tratamiento de la diferenciación en un modelo de ratón de xenoinjertos de tumores. La combinación del tratamiento de VD con DFO redujo significativamente el crecimiento del tumor en ratones (**FIG. 15**). La reducción del crecimiento del tumor se asoció con la apoptosis de las células tumorales, características de la diferenciación celular y fosforilación de MAPK (ERK y JNK).

**Ejemplo 7: La asociación del agente quelante del hierro y de la vitamina D3 indujo la diferenciación de los blastos en un paciente de LMA**

[0071] Se evaluó la eficacia del agente quelante del hierro y de VD en un paciente de LMA. Un hombre de 69 años de edad tuvo una transformación reciente del síndrome mielodisplásico (SMD) en leucemia mieloide aguda. Tras una elevada dosis de quimioterapia, el paciente permaneció en aplasia no blástica. Siete meses después del diagnóstico, los blastos reaparecieron en la sangre y se inició el tratamiento con un agente quelante del hierro (deferasirox 1 g/día) y VD (4000 UI/día). Este tratamiento combinado estuvo asociado con un aumento en el número de neutrófilos y no indujo hipercalcemia. De forma importante, el tratamiento combinado indujo la diferenciación de los blastos hacia el linaje monocítico tal como se observó mediante los frotis de sangre de MGG. Esta afirmación se confirmó adicionalmente por el acortamiento de las células seguido por el análisis citogenético en el que se encontró la trisomía de blastos original en monocitos maduros derivados de células inmaduras pero no en linfocitos y células NK. Por tanto, la homeostasia del hierro juega un papel clave en el control de la diferenciación celular en situaciones normales y patológicas. En entornos pobres en hierro, las células BM son propensas a la diferenciación monocítica y los blastos que proceden de LMA podrían experimentar la diferenciación en presencia de agentes quelantes del hierro. El cribado del genoma muestra que los genes asociados con la diferenciación celular están dirigidos por la privación del hierro y comparten mucho (30% de similitud) con VD.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende:
  - 5 a) al menos un inhibidor de la captación del hierro seleccionado entre el grupo que consiste en un agente quelante del hierro y un inhibidor del receptor de la transferrina, y
  - b) al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente quelante del hierro se selecciona entre el grupo que consiste en deferoxamina, deferasirox, deferiprona, triapina y di-2-piridilcetona-4,4-dimetil-3-tiosemicarbazona (Dp44mT).
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor del receptor de la transferrina es un anticuerpo dirigido contra el receptor de la transferrina.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el anticuerpo dirigido contra el receptor de la transferrina es un anticuerpo monoclonal A24 depositado en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, Paris) el 10 de mayo de 2001, con el número I-2665.
- 25 5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que al menos una vitamina D es la vitamina D3.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que al menos un análogo de la vitamina D se selecciona entre el grupo que consiste en colecalciferol, paracalcitriol, Maxacalcitol, 22-oxa-1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 (OCT) y, 1 $\alpha$ -dihidroxi-22,24-dieno-24,26,27-trihomo-vitamina D3 (EB1089).
- 30 7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que al menos un modulador del receptor de la vitamina D se selecciona entre el grupo que consiste en LY2108491, LY2109866 y LG190119.
- 35 8. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
  - vitamina D3, y
  - anticuerpo monoclonal A24 depositado en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, Paris) el 10 de mayo de 2001, con el número I-2665.
- 40 9. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
  - vitamina D3, y
  - deferoxamina y/o deferasirox.
- 45 10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en la prevención o el tratamiento del cáncer.
- 50 11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el cáncer es una neoplasia hematopoyética.
- 55 12. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda.
- 60 13. Al menos un inhibidor de la captación del hierro tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4, y al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D tal como se define en las reivindicaciones 5, 6 y 7 para uso en la prevención o el tratamiento del cáncer tal como se define en las reivindicaciones 10 a 12.
- 65 14. Productos que contienen:
  - a) al menos un inhibidor de la captación del hierro tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4, y
  - b) al menos una vitamina D y/o al menos uno de sus análogos y/o al menos un modulador del receptor de la vitamina D tal como se define en las reivindicaciones 5, 6 y 7, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención o el tratamiento del cáncer, tal como se define en las reivindicaciones 10 a 12.

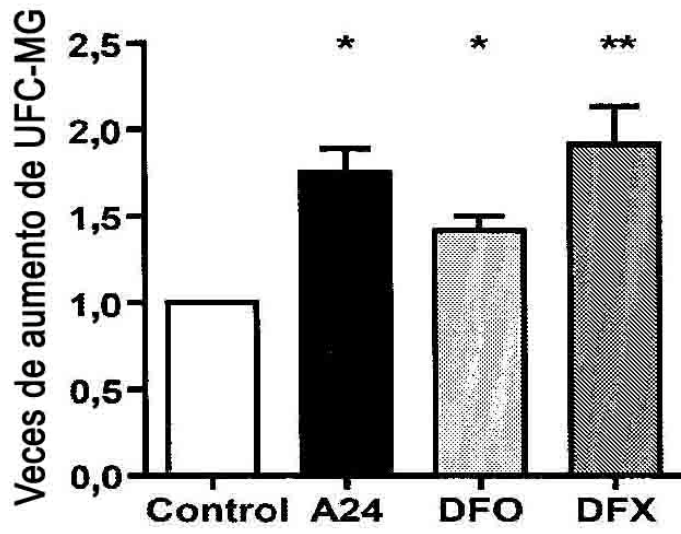


FIG.1

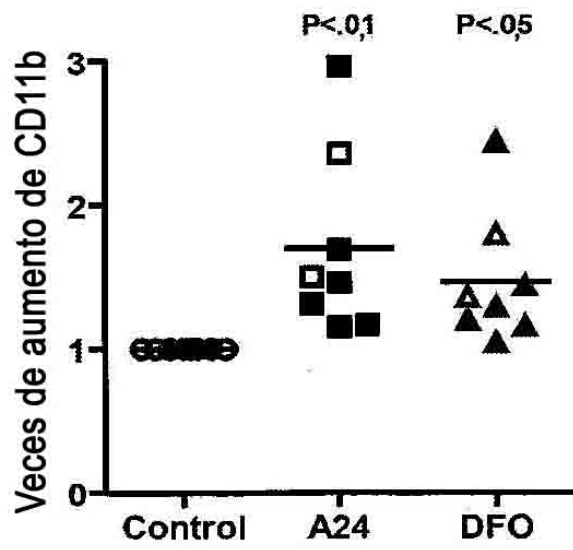


FIG.2

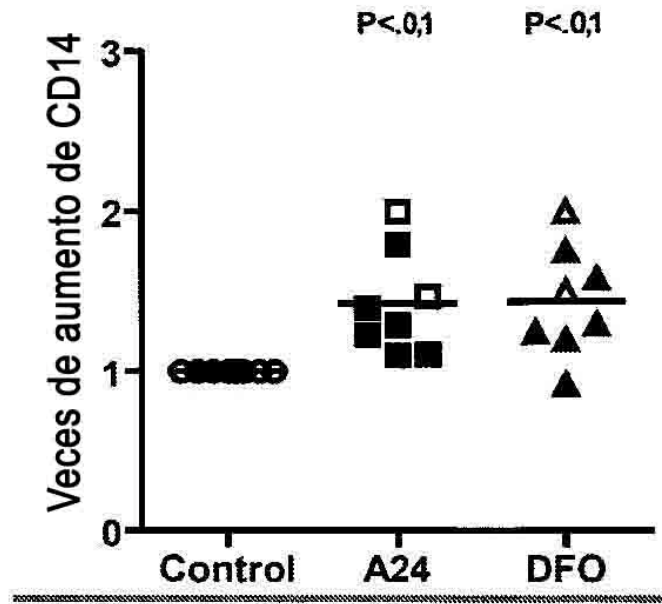


FIG.3

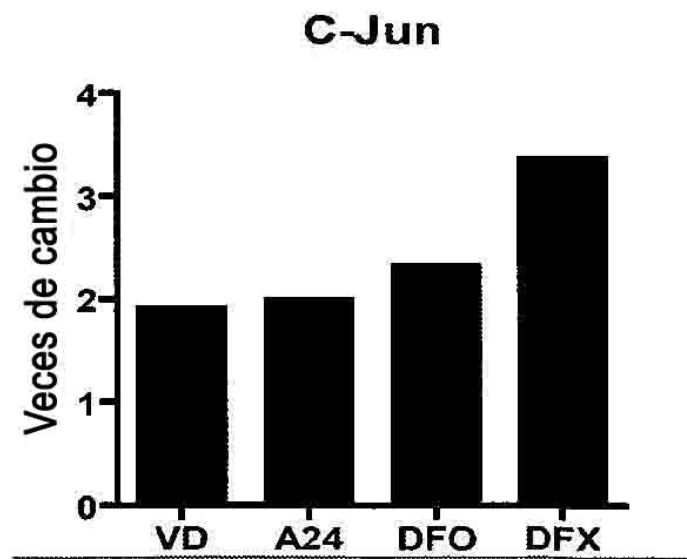
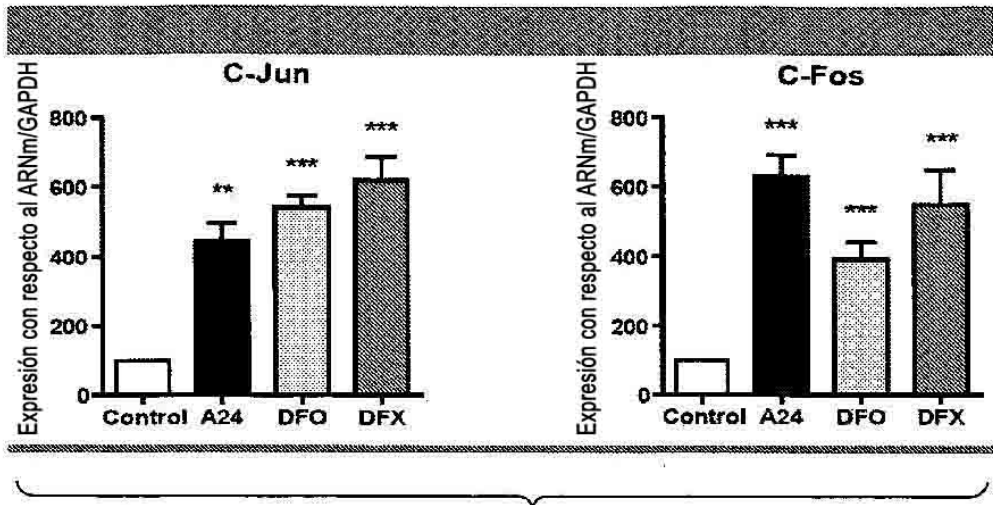
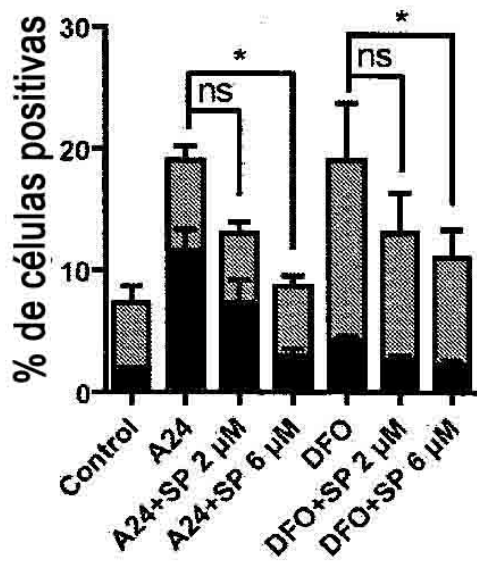


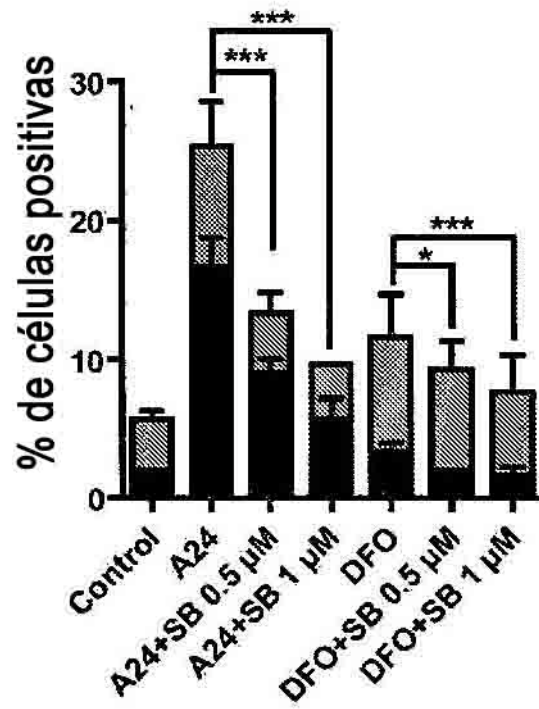
FIG.4



**FIG.5**

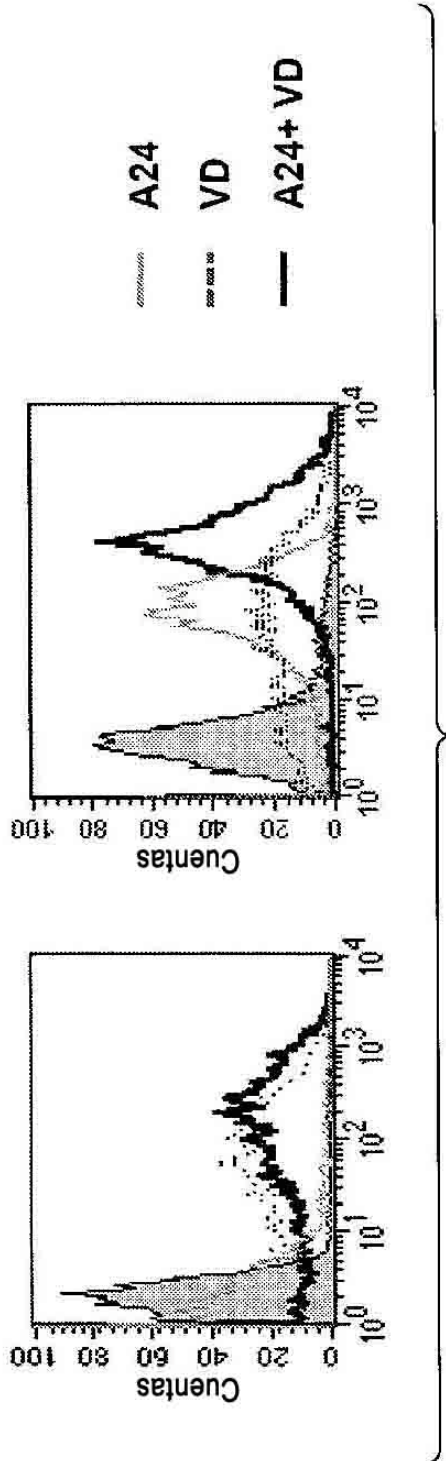


**FIG.6**

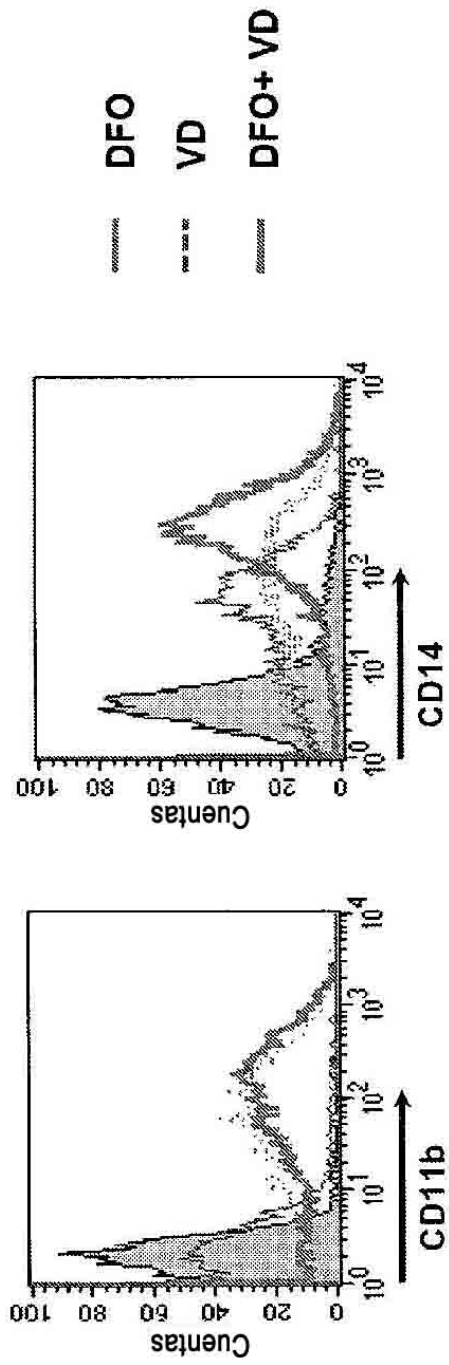


**FIG. 7**

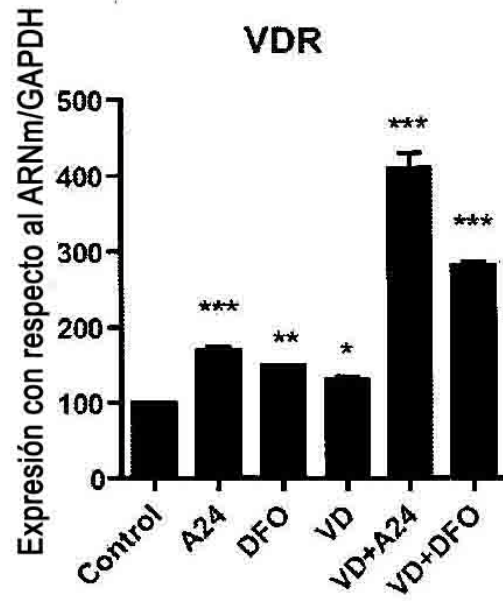




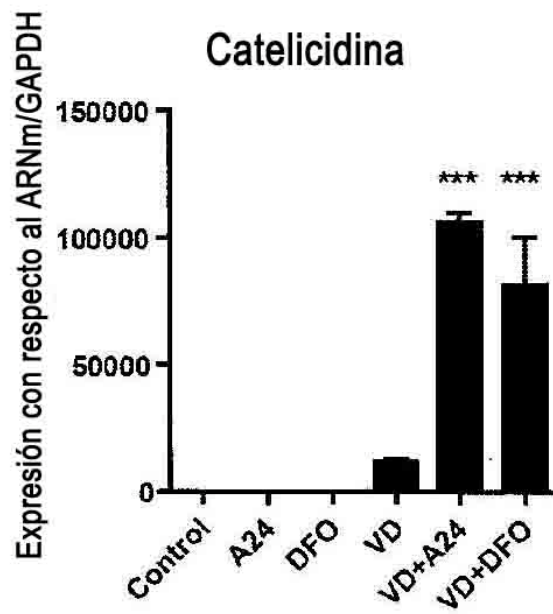
**FIG.8**



**FIG.9**



**FIG.10**



**FIG.11**

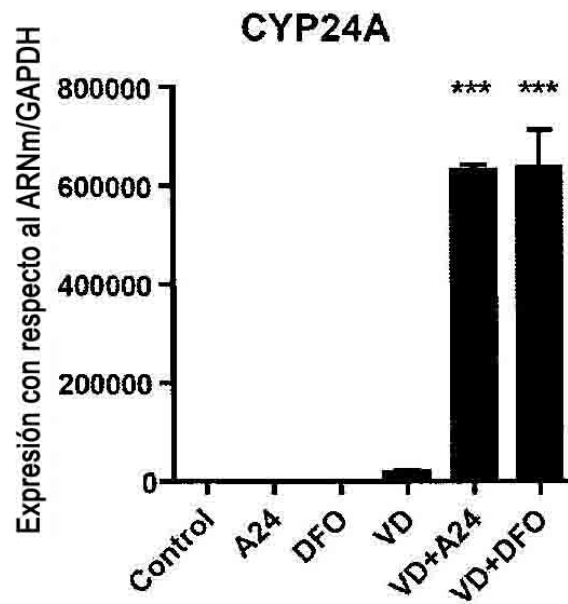


FIG.12

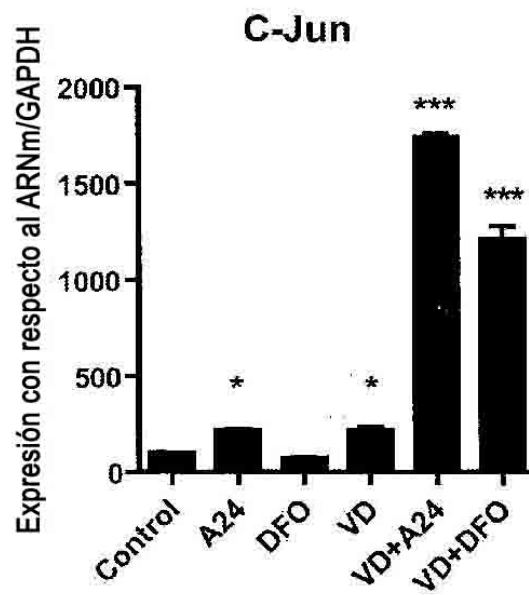
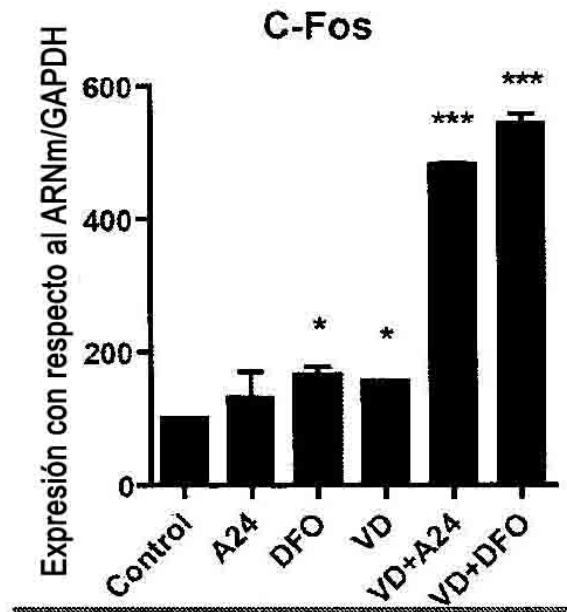
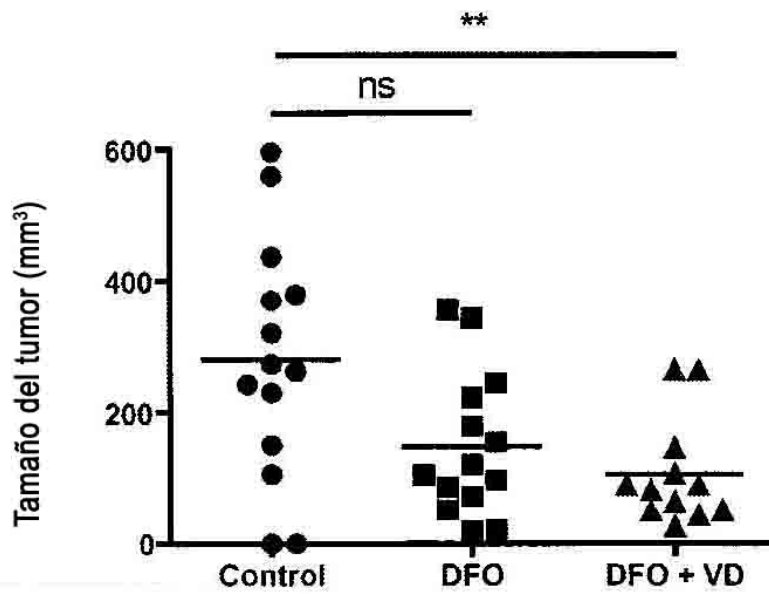


FIG.13



**FIG.14**



**FIG.15**