

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 228**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009 E 09835713 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2381780**

54 Título: **Composiciones que comprenden decitabina y tetrahidrouridina y sus usos**

30 Prioridad:

22.12.2008 US 139710 P

10.03.2009 US 158937 P

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

03.06.2015

73 Titular/es:

**BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
ILLINOIS (100.0%)**

**506 South Wright Street, Urbana
Illinois 61801, US**

72 Inventor/es:

**DESIMONE, JOSEPH y
SAUNTHARARAJAH, YOGEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 537 228 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 que comprenden decitabina y tetrahidrouridina y sus usos

5 Declaración de derechos a invenciones realizadas bajo investigación patrocinada a nivel federal

Este trabajo ha sido apoyado por el gobierno, en parte, a través de la colaboración de los Institutos Nacionales de Salud (Acceso rápido al desarrollo de intervención del NIH). El número de referencia interno para el proyecto, titulado "Formulaciones alternativas de decitabina para reactivar la expresión de hemoglobina fetal", fue TNR42. Por lo tanto, el gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

Antecedentes de la invención

La ECF es una enfermedad congénita grave que afecta a 1 de cada 500 afroamericanos, así como a personas de otras razas, imponiendo un peaje importante en cuanto a morbilidad y mortalidad a los aproximadamente 100.000 estadounidenses afectados. Los pacientes con ECF pueden tener episodios frecuentes de dolor debilitante grave, que con frecuencia requiere visitas a salas de emergencia u hospitalización, y tener que ausentarse del trabajo o la escuela. Aunque algunos pacientes responden a la hidroxiurea (HU, el tratamiento convencional para los pacientes sintomáticos), y algunos pueden ser candidatos a trasplante alogénico de células madre, la mayoría de los pacientes continúan sufriendo. Además, la HU se usa a unas dosis que provocan daño agudo en el ADN y citotoxicidad, y tiene posibles efectos genotóxicos, teratogénicos y anti-fertilidad. Del mismo modo, el trasplante alogénico de células madre se realiza con acondicionamiento citotóxico y riesgos concomitantes de mortalidad relacionada con el tratamiento.

Un esfuerzo de investigación clínica para desarrollar inductores farmacológicos de expresión de HbF culminó con la aprobación en 1998 por parte de la FDA del anti-metabolito HU para tratar los síntomas de la ECF. Un seguimiento reciente de los pacientes incluidos en el ensayo fundamental con HU confirmó que la disminución en el riesgo de mortalidad en estos pacientes está relacionada con los niveles de HbF (Steinberg, M.H., y col. 2003 JAMA 289:1645-1651; Rosse, W.F., y col. 2000 Am Soc Hematol Educ Program. 2-17). Sin embargo, los niveles de HbF no se incrementan en aproximadamente el 40 % de los pacientes que se someten a HU (Steinberg, M.H., y col. 1997 Blood 89:1078-1088; Steinberg, M.H., y col. 1999 Expert Opin Investing Drugs 8:1823-1836; Atweh, G.F., y col. 2001 Curr Opin Hematol 8:123-130). Por último, la HU se usa en dosis citotóxicas que dañan el ADN, posiblemente agravando el daño de la médula ósea que se acumula en la ECF.

La mayoría de las células del cuerpo, incluyendo las células cancerosas o las células de trastornos de la sangre, tales como las células falciformes, contienen el mismo complemento de genes. La función y especialización de una célula viene determinada, por lo tanto, por cuál de estos genes se enciende (activado), y cuál se desactiva (reprimido). La activación se refiere a la expresión de la proteína codificada por el gen, mientras que la represión del gen implica que la proteína codificada por ese gen se expresa a niveles más bajos o nada en absoluto. La ADN metil-transferasa 1 (DNMT1) es una enzima que desempeña un papel crítico y central en la maquinaria de represión de los genes. Por lo tanto, la alteración de los niveles de DNMT1 dentro de una célula puede tener potentes efectos sobre el patrón de expresión génica, la función y la especialización de una célula.

La decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina) es un fármaco análogo de nucleósidos -un fármaco que mimetiza un componente natural del ADN. La decitabina es relativamente única entre la gran familia de fármacos análogos de nucleósidos en el sentido de que puede unirse irreversiblemente a la DNMT1 y agotarla.

La citidina desaminasa es una enzima que se expresa en gran cantidad en el hígado y el intestino y destruye rápidamente la decitabina dentro del cuerpo. La tetrahidrouridina es un análogo de nucleósidos de pirimidina seguro y bien tolerado que inhibe la citidina-desaminasa. En los seres humanos, el gen de la citidina-desaminasa está sometido a polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos que producen variantes de la citidina-desaminasa que presentan diferencias en la actividad enzimática del orden de 3 veces o superior (Gilbert, J.A., y col. 2006 Clin Cance Res 12, 1794-1803; Kirch, H.C., y col. 1998 Exp Hematol 26, 421-425; Yue, L., y col. 2003 Pharmacogenetics 13, 29-38).

JAN H BEUMER Y COL. (2007): "Plasma pharmacokinetics and oral bioavailability of 3,4,5,6-tetrahydrouridine, a cytidine deaminase inhibitor, in mice", CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 62, no. 3, 457-464, informa acerca de la farmacocinética y biodisponibilidad en ratones de la 3,4,5,6-tetrahidrouridina (THU) que se describe como un potente inhibidor CD.

El documento de Estados Unidos 2001/025032 (VON BORSTEL REID Y COL.) se refiere a derivados acilados de nucleósidos de pirimidina no metilados. Se dice que los compuestos son capaces de atenuar el daño al sistema hematopoyético en animales que han recibido quimioterapia antivírica o antineoplásica.

DESIMONE Y COL. (1985): "TETRAHYDROURIDINE CYTIDINE ANALOG AND HEMOGLOBIN F", AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 18, no. 3, 1985, 283-288, informa acerca de la influencia de la THU sobre las

propiedades de incremento de la Hb-F, y otros efectos, de la 5-azacitidina (azaC) y la 2-desoxi-5-azacitidina (d-azaC) en un modelo animal.

LALIBERTE JOSEE Y COL. (1992): "Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase", CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, 30, no.1, 7-11, informa acerca de una investigación sobre los efectos de los inhibidores aminasa Zebularina, 5-F-Zebularina y ribósido de diazepamona sobre la desaminación de CR, ARA-C y 5-AZA-CdR usando CR desaminasa humana purificada.

10 Sumario de la invención

Históricamente, la decitabina se desarrolló como anti-metabolito o fármaco que daña el ADN destinado a eliminar las células cancerosas al causar extensos daños en las células. Su aplicación clínica o experimental no ha sido optimizada para el agotamiento de la DNMT1. Con el objetivo de usar decitabina para agotar la DNMT1 y cambiar el comportamiento celular, no son deseables efectos anti-metabolito que maten las células. Se desea la optimización de la decitabina para agotar la DNMT1 sin causar otros efectos tóxicos o "fuera del objetivo".

La optimización de la decitabina para agotar la DNMT1 *in vivo* puede tener poderosos beneficios terapéuticos en un espectro de enfermedades, como la enfermedad de las células falciformes, la talasemia, y los cánceres de múltiples tejidos. Por ejemplo, en la enfermedad de las células falciformes y la β -talasemia, al agotar la DNMT1, la decitabina impide la represión del gen de la hemoglobina fetal (HbF). El aumento resultante en Hb anula los efectos causantes de la enfermedad de los genes anómalos falciformes o de la talasemia. Por otra parte, el agotamiento de la DNMT1 por la decitabina varía la especialización de las células sanguíneas, por lo que se producen más glóbulos rojos, haciendo frente aún más a la anemia debilitante de estas dolencias.

En células cancerosas, el agotamiento de la DNMT1 por la decitabina impide la represión de los genes de diferenciación y renueva la diferenciación de las células cancerosas – el crecimiento anómalo de las células cancerosas está provocado por un bloqueo en su proceso normal de diferenciación, que se alivia con la decitabina. En especial, el agotamiento de la DNMT1 en las células madre normales aumenta su auto-renovación; es decir, el agotamiento de la DNMT1 aumenta el número de células madre normales -lo opuesto a sus efectos sobre las células cancerosas. Por lo tanto, el agotamiento de la DNMT1 por la decitabina podría ser una terapia eficaz del cáncer, muy segura y bien tolerada.

Debido a la capacidad única de la decitabina para agotar la DNMT1, y, por tanto, alterar la expresión, la función, y la especialización génicas de las células; debido a que el agotamiento de la DNMT1 por regímenes de decitabina diseñados para agotar la DNMT1 sin causar daños en el ADN aumenta la HbF, y produce una mejoría clínica, incluso en pacientes con enfermedad de las células falciformes con enfermedad grave a pesar del nivel de atención (Sauntharajah, y col., 2008 Brit J Haematol 141 (1): 126-9), (la decitabina) se contempla para el tratamiento de estos y otros pacientes.

Debido a que el agotamiento de la DNMT1 por la decitabina induce la diferenciación terminal y la apoptosis de las células cancerosas, mientras incrementa la auto-renovación de las células madre normales (efecto opuesto sobre células cancerosas frente a las células madre normales), la decitabina se contempla además para el tratamiento de estos pacientes.

Un objetivo de la terapia farmacológica es maximizar el tiempo por encima de la concentración umbral para agotar la DNMT1 ($\geq 0,1-0,2 \mu\text{M}$), evitando al mismo tiempo los altos niveles máximos ($\geq 0,5-1 \mu\text{M}$) que dañan el ADN.

El efecto de agotamiento de la DNMT1 debe ser intermitente. Como resultado, las células se pueden dividir y presentan nuevos comportamientos. La exposición continua a decitabina puede impedir la división celular o incluso matar directamente las células.

Debido a que la vía de administración, los regímenes y formulaciones de decitabina conocidos actualmente producen altos niveles máximos del fármaco, que pueden matar las células mediante efectos anti-metabolito pero que producen un breve periodo de tiempo por encima de la concentración umbral para agotar la DNMT1; debido a que la vía de administración, los regímenes y formulaciones de decitabina conocidos actualmente no agotan la DNMT1 intermitentemente para permitir la división celular, sino, más bien, producen efectos citotóxicos o citostáticos; debido a que la destrucción de la decitabina por la enzima citidina desaminasa (CDA) produce una semi-media *in vivo* abreviada de < 20 minutos (a pesar de que la semi-media *in vitro* es de 5-9 horas) (Liu, Z., y col. 2006 Rapid Common Mass Spectrum 20:1117-1126); y esta drástica reducción de la semi-vida es una barrera importante para la traducción eficaz *in vivo* de las observaciones *in vitro*; debido a que la variación farmacogenómica en la CDA (Gilbert, J.A., y col. 2006 Clin Cancer Res 12, 1794-1803; Kirch, H.C., y col. 1998 Exp Hematol 26, 421-425; Yuc, L., y col. 2003 Pharmacogenetics 13, 29-38) produce una gran variación entre individuos en la farmacocinética (PK) y los efectos clínicos; debido a que las inyecciones o infusiones de decitabina se deben administrar en una clínica o un hospital, lo que limita enormemente su uso en la enfermedad de las células falciformes, en la que el objetivo es la modificación de la enfermedad crónica para toda la vida del paciente; debido a

que la destrucción intestinal mediada por CDA limita enormemente su biodisponibilidad oral (aunque la semi-vida *in vitro* de la decitabina es de 5-9 h, tiene una semi-vida abreviada de < 20 minutos *in vivo* debido a la destrucción mediada por CDA) (Liu, Z., y col. 2006 Rapid Commun Mass Spectrum 20:1117-1126; Liu, Z., y col. 2007 Nucleic Acids Res 35:e31), impidiendo el paradigma de tratamiento propuesto de una terapia crónica de muchos años para producir beneficios terapéuticos sostenidos durante toda la vida, debido a que las células malignas pueden desarrollar resistencia al destruir la decitabina con CDA (Ohta, T., y col. 2004 Oncol Rep 12:1115-1120; Hubeek, I., y col. 2005 Br J Cancer 93:1388-1394; Huang, Y., y col. 2004 Cancer Res 64:4294-4301), y debido a que las células malignas pueden encontrar refugio a los efectos terapéuticos de la decitabina residiendo en tejidos con altos niveles de CDA, en el presente documento se contempla una vía de administración oral de decitabina. En este documento se considera dicha administración oral para disminuir los niveles máximos e incrementar el tiempo por encima de la concentración umbral para agotar la DNMT1; para permitir un tratamiento crónico, frecuente pero no diario (es decir, metronómico) para mantener los efectos terapéuticos de larga duración al tiempo que permite la división celular y la minimización de la toxicidad; y permitir el uso generalizado del fármaco en todo el mundo. Además, para abordar las limitaciones y problemas mencionados anteriormente, en este documento se contempla la combinación de decitabina con tetrahidouridina (THU) para su administración por vía oral.

La THU inhibe la CDA; la THU presenta un perfil de toxicidad benigno y una PK bien caracterizada; la THU supera las barreras de primer paso intestinal y hepática a la biodisponibilidad oral de decitabina; la THU aborda la variación farmacogenómica en la CDA, que produce gran variación entre individuos en la PK y los efectos terapéuticos de la decitabina; la THU puede producir un efecto más predecible de una dosis de decitabina de un individuo a otro; la THU puede incrementar el tiempo por encima de la concentración umbral de la decitabina para agotar la DNMT1; la THU puede eliminar los refugios para las células malignas de los efectos terapéuticos de la decitabina; y la THU puede abordar directamente uno de los mecanismos de resistencia de las células cancerosas a los efectos terapéuticos de la decitabina. En este documento se describe una composición para su administración oral que comprende de 10 aproximadamente a 150 mg/m² de decitabina aproximadamente y de 100 aproximadamente a 500 mg/m² de THU aproximadamente.

La invención proporciona una composición para su uso en un método para tratar un trastorno de la sangre o hematológico o un tumor maligno sólido en un sujeto humano, el método que comprende administrar la composición al sujeto, en el que la composición es para su administración oral y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina y tetrahidouridina, en la que la tetrahidouridina está bio-disponible de 30 a 60 minutos antes que la decitabina, en la que la composición es eficaz para dar como resultado una concentración en plasma de decitabina a un nivel máximo no superior a 0,5 µM en el sujeto.

En una realización, una composición de la invención es para el tratamiento de un trastorno de la sangre en un sujeto. En otra realización más, el trastorno de la sangre es una hemoglobinopatía o una talasemia. Por ejemplo, la hemoglobinopatía puede ser la enfermedad de las células falciformes.

En otra realización, una composición de la invención es para el tratamiento de tumores malignos hematológicos o sólidos – cánceres que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos, incluyendo leucemia, linfoma y mieloma múltiple, así como trastornos relacionados como el síndrome mielodisplásico, enfermedad mieloproliferativa, mielofibrosis, trastornos relacionados como el síndrome mielodisplásico, enfermedad inflamatoria incluida artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias del intestino, anemia de insuficiencia renal crónica, anemia asociada a infecciones crónicas tales como VIH o hepatitis, anemia debido a trombocitopenia asociada a tumor maligno, trombocitopenia idiopática púrpura y enfermedades víricas, incluyendo tumores malignos relacionados con virus. Ejemplos de tumores malignos relacionados con virus incluyen tumores malignos del EBV, incluyendo, sin limitación, linfoma de Burkitt, linfomas asociados a inmunosupresión, otros linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, adenocarcinoma gástrico, carcinomas de tipo linfopitelioma y leiomiomas relacionados con inmunodeficiencias. En otra realización, la composición es para el tratamiento de cánceres que afectan a otros tejidos – cánceres que afectan al cerebro, cabeza, cuello, tiroides, huesos, músculo, pulmón, esófago, estómago, intestino, mama, próstata, testículos, ovarios, útero, vagina, y piel.

En otra realización, la composición es para su administración oral, en la que la THU y la decitabina se combinan en una sola cápsula o comprimido. Por ejemplo, se contempla una composición en forma de cápsula que comprende 500 mg de THU aproximadamente y 100 mg de decitabina aproximadamente, para facilitar un régimen oral próximo a 500 mg/m² de THU combinado con 100 mg/m² de decitabina. En otra realización de la invención, la administración de la composición produce una concentración en plasma de decitabina de 0,1-0,5 µM. En otra realización más, una composición de la invención se administra una vez a la semana o una vez cada dos semanas a pacientes que sufren un trastorno de la sangre. En otra realización adicional, una composición de la invención se administra entre una y tres veces por semana a pacientes con cáncer. En aún otra realización más, una composición de la invención se administra entre una vez cada dos semanas y con una frecuencia de hasta tres veces por semana en pacientes en riesgo de desarrollar un tumor maligno hematológico o sólido, o en riesgo de tener una recaída en un diagnóstico previo de tumor maligno hematológico o sólido.

En este documento se describe una composición para la administración oral en forma de cápsula, que comprende THU y decitabina, en la que la THU se libera más rápidamente que la decitabina. Por ejemplo, la THU puede estar

sometida a una velocidad de disolución más rápida, o la THU puede estar situada en la superficie de la cápsula, mientras que la decitabina se encuentra dentro de la cápsula. En la composición de la invención, la THU está bio-disponible entre 30 y 60 minutos aproximadamente antes que la decitabina. La THU también se puede administrar por separado a continuación (con primero con THU, y a continuación decitabina).

5 La composición de la invención se puede almacenar con un desecante. Esto puede servir para prolongar la vida útil de una composición de la invención y facilitar su distribución y su uso a escala global.

10 En este documento se describe un método para tratar un trastorno de la sangre en un sujeto que comprende la administración de una composición que comprende decitabina y tetrahidrouridina como se ha descrito anteriormente. En este documento se describe un método para tratar un cáncer en un sujeto que comprende la administración de una composición que comprende decitabina y tetrahidrouridina como se ha descrito anteriormente. La administración se puede producir 1-3 veces por semana.

15 En este documento se describe una composición para su administración oral que comprende de 10 aproximadamente a 150 mg/m² de decitabina aproximadamente y de 100 aproximadamente a 500 mg/m² de tetrahidrouridina aproximadamente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En este documento se describe una composición para su administración oral que comprende 100 mg de decitabina aproximadamente y 500 mg de tetrahidrouridina aproximadamente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, la composición de la invención es para el tratamiento de un trastorno de la sangre en un sujeto. En otra realización más, el trastorno de la sangre es una hemoglobinopatía o una talasemia. En realizaciones adicionales, la hemoglobinopatía es una enfermedad de las células falciformes y la talasemia es una beta-talasemia (por ejemplo, la beta-talasemia de hemoglobina E).

25 En otra realización, la composición de la invención es para el tratamiento de un tumor maligno hematológico o sólido en un sujeto. En otra realización más, el tumor maligno se selecciona del grupo constituido por leucemia, linfoma, mieloma múltiple, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de boca, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer del mediastino, cáncer del timo, cáncer del mesotelio, cáncer del peritoneo, cáncer de hueso, cáncer de músculo, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de la vagina, y tumores malignos relacionados con virus. En una realización adicional, el tumor maligno relacionado con virus es un tumor maligno del EBV.

35 En la composición de la invención, la tetrahidrouridina está bio-disponible entre 30 y 60 minutos aproximadamente antes que la decitabina. En una realización, la THU y la decitabina se administran simultáneamente. En otra realización, la THU se administra primero, y la decitabina se administra después.

40 En este documento se describe una composición para su administración oral en forma de cápsula o comprimido que comprende decitabina y tetrahidrouridina y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la tetrahidrouridina está bio-disponible entre 30 y 60 minutos aproximadamente antes que la decitabina. En una realización, la tetrahidrouridina se encuentra en la superficie de la cápsula o comprimido, y la decitabina se encuentra dentro de la cápsula o comprimido. En la invención, la THU se puede administrar primero en una cápsula o comprimido, y la decitabina se administra más tarde en una segunda cápsula o comprimido.

45 En este documento se describe un método para tratar un trastorno de la sangre en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición como se ha descrito en el presente documento. El trastorno de la sangre descrito en este documento es una hemoglobinopatía o talasemia. En otra realización, al sujeto se le proporciona una forma de terapia adicional.

50 En este documento se describe un método para tratar un tumor maligno hematológico o sólido en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición como se ha descrito en el presente documento. En una realización, el tumor maligno se selecciona del grupo constituido por leucemia, linfoma, mieloma múltiple, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de boca, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de tiroides, cáncer de los pulmones, cáncer del mediastino, cáncer del timo, cáncer del mesotelio, cáncer del peritoneo, cáncer de hueso, cáncer de músculo, cáncer de piel, cáncer de la próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de la vagina, y tumores malignos relacionados con un virus. En otra realización, el tumor maligno relacionado con un virus es un tumor maligno del EBV. En otra realización más, al sujeto se le proporciona una forma de terapia adicional.

60 La invención se puede usar para disminuir la variación entre individuos en la farmacocinética y/o efectos clínicos de la decitabina en sujetos, que comprende administrar a los sujetos una composición como se ha descrito en el presente documento.

65 La invención se puede usar para prolongar el tiempo por encima de la concentración umbral para agotar la DNMT1 con decitabina en un sujeto y evitar los altos niveles máximos que dañan el ADN de la decitabina, que comprende

administrar al sujeto una composición como se ha descrito en el presente documento.

En la invención, el sujeto es un ser humano.

5 Breve descripción de las Figuras

La siguiente descripción detallada de la invención, dada a modo de ejemplos, pero que no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con las Figuras adjuntas, en las que:

- 10 La Figura 1A cuantifica, en forma de gráfico de barras, el daño del ADN evaluado en células hematopoyéticas CD34+ normales sometidas a diversas concentraciones de decitabina. La Figura 1B muestra histogramas que representan el daño del ADN evaluado por fosforilación de la histona H2AX. La Figura 1C representa gráficamente la fase S/G2M con varias concentraciones de tratamiento de decitabina.
- 15 La Figura 2A representa gráficamente los recuentos de células para las células CD34+, células AML1-ETO CD34+ y células KASUMI-1 expuestas a Ara-C frente a dos dosis diferentes de decitabina. La Figura 2B muestra, en forma de gráfico de barras, la capacidad de formación de colonias de células CD34+ normales y células AMLi-ETO CD34+ tratadas con decitabina frente a Ara-C con el tiempo.
- 20 La Figura 3A muestra una tabla que proporciona el tipo FAB y anomalías citogénicas para muestras de varios pacientes. La Figura 3B representa gráficamente los recuentos de células en el día 7 en las células tratadas con decitabina frente a células no tratadas.
- 25 La Figura 4 representa gráficamente los recuentos de células tratadas con decitabina frente a células no tratadas el día 9.
- La Figura 5A representa gráficamente el volumen del tumor con el tiempo en ratones tratados con PBS (control) frente a decitabina frente a Sunitinib frente a una combinación de decitabina y Sunitinib. La Figura 5B representa gráficamente el número de células con el tiempo para los ratones.
- La Figura 6 muestra, en forma de gráfico de barras, la represión de HoxB4, Bmi-1, y cKIT y la activación de Mscfr, Gmcsfr, y F4/80 con el tiempo en células PUER.
- La Figura 7A representa gráficamente la proliferación celular con el tiempo de tratamiento con OHT frente a OHT + decitabina frente a OHT seguido de decitabina. La Figura 7B representa gráficamente la diferenciación de macrófagos (F4/80) y células madre (c-KIT) con el tiempo de tratamiento con OHT frente a OHT + decitabina frente a OHT seguido de decitabina.
- 30 La Figura 7C muestra, en forma de gráfico de barras, Bmi1, HoxB4, cKIT, F4/80, Gmcsfr y Mscfr con el tiempo de tratamiento con OHT frente a OHT + decitabina frente a OHT seguido de decitabina.
- 35 La Figura 8 muestra, en forma de gráfico de barras, Bmi1, HoxB4, cKIT, F4/80, Gmcsfr, y Mscfr con el tiempo en células PUERshRunx1.
- La Figura 9A muestra, en forma de gráfico de barras, PU.1, CEBP α , CEBP ϵ y GATA-1 en diversas muestras de pacientes. La Figura 9B enumera, en forma de tabla, la clasificación de la OMS y las anomalías citogénicas para cada una de las muestras. La Figura 9C muestra, en forma de gráfico de barras, la metilación del gen precursor y la metilación de genes de diferenciación para células CD34+ normales, células normales de médula ósea,
- 40 células de SMD, y células de LMA.
- La Figura 10 representa la supervivencia de ratones leucémicos sin tratar frente a ratones tratados con decitabina.
- La Figura 11 representa gráficamente los niveles máximos de decitabina y el tiempo por encima del umbral para el agotamiento de la DNMT1 producido por decitabina subcutánea frente a decitabina oral.
- 45 Las Figuras 12A y 12B muestran, en forma de gráfico de barras, el agotamiento de la DNMT1 en líneas celulares sensibles a decitabina y resistentes a decitabina (en términos de % de crecimiento del control para los gráficos de barras).
- La Figura 13 representa gráficamente la elevación de la expresión de HbF con el tiempo asociada a la decitabina.
- 50 La Figura 14 representa gráficamente las curvas de concentración en plasma-tiempo de la decitabina en primates no humanos.
- La Figura 15 representa gráficamente las curvas de concentración en plasma-tiempo de la decitabina después de la administración oral a babuinos a 10 mg/kg.
- 55 La Figura 16 representa gráficamente las curvas de concentración en plasma-tiempo de la decitabina en babuinos después de administración oral sola o 60 minutos después de THU
- La Figura 17 representa gráficamente las curvas de concentración en plasma-tiempo de la decitabina en babuinos después de administración oral sola a 5 mg/kg o 60 minutos después de 2 o 20 mg/kg de THU
- 60 La Figura 18A representa, en forma de gráfico de barras, la distribución de las AUC en 7 animales tratados con 10 mg/kg de decitabina sola por sonda oral o 20 mg/kg de THU por sonda oral seguido de 5 mg/kg de decitabina por sonda oral 60 minutos más tarde. La línea horizontal en la caja = mediana, los límites de la caja = rango intercuartil, conectando la línea diagonal se une la media en los dos grupos. La amplia separación de la mediana y la media en el grupo de decitabina sola se redujo sustancialmente en el grupo de decitabina-THU. La diferencia en las medianas entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa ($p = 0,22$, Wilcoxon). La diferencia en las medias entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa ($p = 0,08$, prueba t apareada). La Figura
- 65 18B representa, en forma de gráfico de barras, los resultados de A desglosados por animales individuales.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

- 5 El término "tratar", como se usa en este documento, se refiere a alterar el curso de la enfermedad del sujeto que está siendo tratado. Efectos terapéuticos de tratamiento incluyen, sin limitación, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico.
- 10 Los tumores malignos hematológicos son un grupo de neoplasias que surgen por la transformación maligna de las células derivadas de la médula ósea. Se pueden subdividir en trastornos mieloides y linfoides e incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes, linfoma central folicular, linfoma de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma, gammapatía monoclonal de significación incierta, síndrome de linfocitos granulares grandes, síndrome prolinfocítico T, síndrome de Sezary, linfoma, linfoma angio-inmunoblástico, linfoma anaplásico de células grandes, micosis fungoide, papulosis linfomatoide, linfoma del intestino delgado, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, mielofibrosis, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia aplásica, anemia asociada a tumor maligno, trombocitopenia asociada a tumor maligno, tumores malignos relacionados con virus, síndrome linfoproliferativo post-trasplante, linfoma NK/T, linfoma relacionado con el sida, linfoma de Burkitt, y linfoma no Burkitt de células pequeñas. La leucemia linfocítica crónica, el linfoma no Hodgkin, y la leucemia mieloide son tumores malignos particularmente prevalentes contemplados para su tratamiento en este documento.
- 25 Las neoplasias tumorales malignas sólidas son un grupo de neoplasias que surgen por la transformación maligna de las células en tejidos no relacionados con la sangre. Estos incluyen, sin limitación, tumores malignos del cerebro, cabeza, cuello, boca, faringe, esófago, estómago, intestino, tiroides, pulmones, mediastino, timo, mesotelio, peritoneo, hueso, músculo, piel, próstata, mamas, ovarios, útero y vagina.
- 30 Las hemoglobinopatías y talasemias se pueden caracterizar ambas como "trastornos de la sangre" y son causadas por anomalías en los genes de la globina. Los trastornos de la sangre incluyen trastornos que pueden tratarse, prevenirse o mejorarse de otro modo mediante la administración de un compuesto de la invención. Un trastorno de la sangre es cualquier trastorno de la sangre y de los órganos hematopoyéticos. El término trastorno de la sangre incluye anemias nutricionales (por ejemplo, la anemia por deficiencia de hierro, disfasia sideropénica, síndrome de Plummer-Vinson, anemia por deficiencia de vitamina B12, anemia por deficiencia de vitamina B12 debida a factores intrínsecos, anemia perniciosa, anemia por deficiencia de ácido fólico y otras anemias nutricionales), síndrome mielodisplásico, insuficiencia de la médula ósea o anemia como resultado de quimioterapia, radiación u otros agentes o terapias, anemias hemolíticas (por ejemplo, anemia debido a trastornos enzimáticos, anemia debido a deficiencia de fosfato deshidrogenasa (G6PD), favismo, anemia debido a trastornos del metabolismo del glutatión, anemia debido a trastornos de las enzimas glucolíticas, anemias debido a trastornos del metabolismo de nucleótidos y anemias debidas a trastornos enzimáticos sin especificar), talasemia, α -talasemia, β -talasemia (por ejemplo, beta talasemia de hemoglobina E), $\delta\beta$ -talasemia, rasgos de talasemia, persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFP), y otras talasemias, trastornos de las células falciformes (anemia de células falciformes con crisis, anemia de células falciformes sin crisis, trastornos drepanocíticos heterocigotos dobles, rasgos de células falciformes y otros trastornos de células falciformes), anemias hemolíticas hereditarias (esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, otras hemoglobinopatías y otras anemias hemolíticas hereditarias específicas, como estomatocitosis), anemia hemolítica adquirida (por ejemplo, anemia hemolítica autoinmune inducida por fármacos, otras anemias hemolíticas autoinmunes, como anemia hemolítica autoinmune cálida, anemia hemolítica no autoinmune inducida por fármacos, síndrome hemolítico urémico, y otras anemias hemolíticas no autoinmunes, tales como anemia hemolítica microangiopática; anemias aplásicas (por ejemplo, aplasia pura adquirida de glóbulos rojos (eritoblastopenia), otras anemias aplásicas, tal como anemia aplásica constitutiva y anemia de Fanconi, anemia post-hemorrágica aguda y anemias en enfermedades crónicas), defectos de la coagulación (por ejemplo, coagulación intravascular diseminada (síndrome de difibrinación)), deficiencia hereditaria del factor VIII (hemofilia A), deficiencia hereditaria del factor IX (enfermedad de Christmas), y otros defectos de la coagulación tales como la enfermedad de Von Willebrand, deficiencia hereditaria del factor XI (hemofilia C), púrpura (por ejemplo, defectos plaquetarios cualitativos y enfermedad de Glanzmann), neutropenia, agranulocitosis, trastornos funcionales de neutrófilos polimorfonucleares, otros trastornos de glóbulos blancos de la sangre (por ejemplo, eosinofilia, leucocitosis, linfocitosis, linfopenia, monocitosis y plasmacitosis), enfermedades del bazo, metahemoglobinemia, otras enfermedades de la sangre y órganos que forman la sangre (por ejemplo, eritrocitosis familiar, policitemia secundaria, trombocitosis esencial y basofilia), trombocitopenia, anemia infecciosa, hipoproliferativas o anemias hipoplásicas, enfermedad de la hemoglobina C, D y E, enfermedad Lepore de la hemoglobina y las enfermedades IIbII y IIbS, anemias debidas a la pérdida de sangre, radioterapia o quimioterapia, o trombocitopenias y neutropenias debido a radioterapia o quimioterapia, anemias sideroblásticas, anemias mielopépticas, anemias mediadas por anticuerpos y ciertas enfermedades que implican al tejido linforeticular y el sistema reticulohistiocítico (por ejemplo, histiocitosis de células de Langerhans, granuloma eosinófilo, enfermedad de Hand-Schüller-Christian, linfocitosis histiocítica hemofagocítica y síndrome hemofagocítico asociado a infección).

Las talasemias se clasifican según qué cadena de la molécula de hemoglobina se encuentra afectada. En α -talasemias, la producción de la cadena de α globina se encuentra, mientras que en la P talasemia, se encuentra afectada la producción de la cadena de β globina. Las cadenas de β globina están codificadas por un único gen en el cromosoma 11.

Las beta talasemias se deben a mutaciones en el gen IIBB en el cromosoma 11. La gravedad de la enfermedad depende de la naturaleza de la mutación. Las mutaciones se caracterizan como (β^0 o β talasemia mayor) si impiden toda formación de cadenas P (que es la forma más grave de beta talasemia); se caracterizan como (β^+ o P talasemia intermedia) si permiten que se produzca cierta formación de cadena β . En cualquier caso, hay un exceso relativo de cadenas α , pero éstas no forman tetrámeros: más bien, se unen a las membranas de los glóbulos rojos, produciendo daño en la membrana, y a altas concentraciones forman agregados tóxicos.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a portadores y vehículos que son compatibles con el principio activo de una composición farmacéutica descrita en el presente documento (y preferentemente capaz de estabilizarla) y no perjudicial para el sujeto a tratar. Por ejemplo, se pueden usar agentes de solubilización que forman complejos específicos más solubles con los compuestos descritos en este documento como excipientes farmacéuticos para la administración de los compuestos. Los portadores y vehículos adecuados son conocidos por los expertos en la materia. El término "excipiente" como se usa en este documento abarcará todos estos vehículos, adyuvantes, diluyentes, disolventes, u otros aditivos inactivos. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de éter de petróleo, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento también se pueden esterilizar y, si se desea, se pueden mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos de la invención.

El término "bio-disponible", como se denomina en el presente documento, se refiere a cuando el agente activo (tetrahidouridina o decitabina) puede ser absorbido y usado por el cuerpo. "Bio-disponible por vía oral" indica que el agente se ha tomado por la boca y puede ser absorbido y usado por el cuerpo.

El término "sujeto" como se usa en este documento, se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate, aún más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, sin limitación, seres humanos, primates, animales salvajes, animales de granja, animales deportivos, y mascotas.

El término "obtención" como en "la obtención de la composición" está previsto que incluya la compra, síntesis, o adquisición de otra manera de la composición (o agente(s) de la composición).

Los términos "comprende", "que comprende", está previsto que tengan el significado amplio que se les atribuye en la Ley de Patentes de Estados Unidos y puede significar "incluye", "que incluye" y similares.

La invención se puede entender con más profundidad en referencia a la siguiente descripción y ejemplos ilustrativos detallados, que están destinados a ejemplificar realizaciones no limitantes de la invención.

II. Realizaciones adicionales de la invención

Composiciones farmacéuticas

En este documento se describen composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden de 10 aproximadamente a 150 mg/m² de decitabina aproximadamente y de 100 aproximadamente a 500 mg/m² de THU aproximadamente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en cantidades relativas y formuladas de tal manera que una composición o una forma de dosificación farmacéutica dada reactive la expresión de hemoglobina fetal (HbF) y/o expanda las células madre hematopoyéticas normales y/o provoque un cambio hacia el linaje eritropoyético. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación pueden comprender 100 mg de decitabina aproximadamente y 500 mg de THU aproximadamente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden formular de tal manera que una composición farmacéutica o una forma de dosificación dada disminuyan la represión aberrante de genes relacionados con la diferenciación en tumores malignos hematológicos o sólidos, reduciendo o inhibiendo el crecimiento de las células transformadas (cancerosas). Dichas composiciones farmacéuticas y formas de dosificación pueden comprender uno o más agentes activos adicionales. Para el tratamiento de tumores malignos hematológicos o sólidos, dichos agentes activos adicionales incluyen agentes quimioterapéuticos conocidos en la técnica.

Las composiciones de la invención se administran por vía oral en dosis eficaces, dependiendo del peso, el área de superficie corporal, y el estado del sujeto que está siendo tratado. Se pueden producir variaciones dependiendo de

la especie del sujeto tratado y su respuesta individual a dicho medicamento, así como del tipo de formulación farmacéutica seleccionada y del periodo y del intervalo de tiempo a los cuales se lleva a cabo dicha administración.

5 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otras composiciones conocidas para el tratamiento de trastornos de la sangre en un sujeto humano. En una realización, el sujeto padece un trastorno de la sangre. En otra realización, el sujeto presenta riesgo de padecer un trastorno de la sangre.

10 En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otras composiciones conocidas para el tratamiento de tumores malignos hematológicos en un sujeto humano. En una realización, el sujeto padece un tumor maligno hematológico. En otra realización, el sujeto presenta riesgo de padecer un tumor maligno hematológico.

15 El lenguaje "en combinación con" una composición conocida está previsto que incluya la administración simultánea de la composición de la invención y la composición conocida, la administración en primer lugar de la composición de la invención, seguido de la composición conocida y la administración en primer lugar de la composición conocida, seguido de la composición de la invención. En los métodos de la invención se puede usar cualquier composición conocida en la técnica para el tratamiento de trastornos de la sangre o tumores malignos hematológicos.

20 La administración de las composiciones de la invención se puede llevar a cabo en una sola dosis o en varias dosis. Por ejemplo, las composiciones de esta invención se pueden administrar de forma ventajosa en una amplia variedad de formas de dosificación diferentes, es decir, se pueden combinar con diversos vehículos inertes farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas para chupar, trociscos, caramelos duros, suspensiones acuosas, elixires, jarabes, y similares. Dichos vehículos incluyen diluyentes o cargas
25 sólidas, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, etc. Además, las composiciones farmacéuticas orales pueden estar convenientemente edulcoradas y/o aromatizadas. En general, los compuestos farmacéuticamente eficaces usados en esta invención están presentes en dichas formas de dosificación a niveles de concentración que oscilan entre el 5,0 % aproximadamente y el 70 % en peso aproximadamente.

30 Para la administración por vía oral, se pueden emplear comprimidos que contienen diversos excipientes tales como celulosa microcristalina, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio y glicina junto con diversos desagregantes tales como almidón (y preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), ácido algínico y ciertos silicatos complejos, junto con aglutinantes de granulación como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábica. Además, con frecuencia son muy útiles agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato
35 sódico y talco para la formación de comprimidos. También se pueden emplear como agentes de relleno composiciones sólidas de un tipo similar en cápsulas de gelatina; los materiales preferidos en este sentido también incluyen lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desea la administración oral de las suspensiones y/o elixires acuosos, el principio activo se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, y, si así se desea, también con agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones similares.

40 Se pueden formular composiciones de liberación sostenida que incluyen aquellas en las que el componente activo se obtiene con recubrimientos degradables de forma diferencial, por ejemplo, mediante microencapsulación, múltiples recubrimientos, etc. En una composición de la invención, el THU está biodisponible de 30 a 60 minutos aproximadamente antes que la decitabina.

45 Se apreciará que las cantidades reales preferidas de compuestos activos usados en un tratamiento determinado variarán dependiendo de las composiciones particulares formuladas. Las tasas de administración óptimas para un protocolo de administración dado pueden ser evaluadas fácilmente por los expertos en la materia usando los ensayos convencionales de determinación de la dosificación realizados según las directrices anteriores.

50 También se entenderá que se han de tomar las precauciones normales conocidas en general con respecto a la administración de los compuestos usados en la invención de forma general para garantizar su eficacia en circunstancias de uso normales. En particular cuando se emplean para el tratamiento terapéutico de seres humanos *in vivo*, el facultativo debe tomar todas las precauciones razonables para evitar contraindicaciones y efectos tóxicos conocidos de forma general.

60 La composición, forma y tipo de formas de dosificación de la invención normalmente variarán dependiendo de su uso. Este aspecto de la invención será muy evidente para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington (1990) 18a ed., Mack Publishing, Pa Oriental.

65 Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación pueden comprender uno o más compuestos que reducen la velocidad a la cual se descompone el compuesto de la invención. Dichos compuestos, que en este documento se denominan "estabilizantes" incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH, o tampones salinos.

La interrelación de dosificaciones para animales y seres humanos (basado en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) se describe en Freireich, y col. 1966 Cancer Chemother Rep. 50: 219. La superficie corporal se puede determinar de forma aproximada a partir de la altura y peso del paciente. Véase, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, Nueva York, 1970, 537.

5

Métodos de tratamiento

Una composición de la invención se puede administrar a un paciente en necesidad de tratamiento de un trastorno de la sangre. Una composición de la invención se puede administrar a un paciente en necesidad de un tratamiento de un tumor maligno hematológico o sólido.

10

La capacidad de respuesta de la enfermedad a composiciones de la invención se puede medir directamente por comparación con fármacos convencionales (por ejemplo, para tumores malignos hematológicos o sólidos, agentes quimioterapéuticos; para ciertos trastornos de la sangre, hidroxurea, inhibidores de histona desacetilasa, o eritropoyetina), o se puede inferir basándose en la comprensión de la etiología y progresión de la enfermedad. Por ejemplo, hay una serie de sistemas de ensayo de expresión HbF que son ampliamente aceptados en la técnica como predictores de efectos *in vivo*. Por tanto, la demostración de que un compuesto de esta invención induce la expresión de HbF en estos ensayos es la evidencia de la utilidad clínica de estos para el tratamiento de una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre.

15

20

25

"Tratamiento" o "tratar" puede referirse a una mejora de una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre, o al menos uno de sus síntomas discernibles. En otra realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejora de al menos un parámetro físico medible, no necesariamente discernible por el paciente. En otra realización más, "tratamiento" o "tratar" se refiere a inhibir la progresión de una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre, ya sea físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, estabilización de un parámetro físico, o de ambos. En otra realización más, "tratamiento" o "tratar" se refiere a retrasar el comienzo de una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre, o sus síntomas.

30

35

"Tratamiento" o "tratar" puede referirse a una mejora de un tumor maligno hematológico o sólido o al menos uno de sus síntomas discernibles. En otra realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejora de al menos un parámetro físico medible, no necesariamente discernible por el paciente. En otra realización más, "tratamiento" o "tratar" se refiere a la inhibición de la progresión del cáncer, bien sea físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible, bien fisiológicamente, por ejemplo, estabilización de un parámetro físico, o de ambos. En otra realización más, "tratamiento" o "tratar" se refiere a retrasar el comienzo de un tumor maligno hematológico o sólido o sus síntomas.

40

Las composiciones de la invención se pueden someter a ensayo *in vitro* o *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de modelos animales para demostrar la seguridad y eficacia de los compuestos de esta invención.

45

50

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que las composiciones de esta invención inducen la expresión de genes, por ejemplo, la expresión de la hemoglobina fetal y, como resultado, se pueden usar para tratar o prevenir una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre. Además, sin desear estar ligado por la teoría, se cree que las composiciones de esta invención se unen y agotan la ADN metil transferasa (específicamente, la DNMT1), disminuyendo la represión o la represión aberrante de genes que podrían tener efectos terapéuticos si se expresasen, y, como resultado, se pueden usar para tratar o prevenir tumores malignos hematológicos o sólidos. Cabe señalar, sin embargo, que las composiciones pueden actuar a través de una actividad secundaria o diferente, tal como, sin limitación, la estimulación de la hematopoyesis, la eritropoyesis, y el aumento de la auto-renovación de las células madre normales.

55

La expresión alterada de genes también podría incrementar el reconocimiento de células malignas por las células del sistema inmune, independientemente de que el sistema inmune sea el sistema inmune del propio paciente o un sistema inmune alogénico reconstituido a través de un trasplante alogénico de células madre o infusión de linfocitos del donante.

Terapia combinada

60

65

Los métodos descritos en este documento para el tratamiento de una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre, en un sujeto además pueden comprender la administración al sujeto al que se le administra una composición de esta invención de una cantidad eficaz de uno o más de otros agentes terapéuticos. En una realización de la invención, en la que a un sujeto se le administra otro agente terapéutico, la cantidad eficaz de la composición de la invención es inferior a su cantidad eficaz si no se administrase el otro agente terapéutico. En otra realización, la cantidad eficaz del otro agente terapéutico es inferior a su cantidad eficaz si no se administrase la composición de la invención.

Los métodos descritos en este documento para el tratamiento de un tumor maligno hematológico o sólido en un sujeto además puede comprender la administración al sujeto tratado con una composición de la invención de una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos diferentes. En una realización de la invención en la que se administra otro agente terapéutico a un sujeto, la cantidad eficaz de la composición de la invención es inferior a su cantidad eficaz si no se administrase el otro agente terapéutico. En otra realización, la cantidad eficaz del otro agente terapéutico es inferior a su cantidad eficaz si no se administrase la composición de la invención.

El método descrito en este documento puede incluir una modalidad terapéutica adicional. Por ejemplo, la modalidad terapéutica adicional es terapia de radiación o un agente quimioterapéutico citotóxico, tal como un antimetabolito (por ejemplo, 5-FU, con leucovorina), irinotecan (u otro inhibidor de la topoisomerasa), doxorubicina, inhibidores de IIDAC, agentes antivíricos, agentes anti-retrovirales, o cualquier combinación de todos estos agentes, incluyendo la administración de todos estos agentes. Incluido con el tratamiento con el agente anti-antivírico puede estar el pre-tratamiento con un agente que induce la expresión de la timidina quinasa vírica.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden incluir el seguimiento del sujeto para el efecto farmacodinámico de la terapia, por ejemplo, por agotamiento de la DNMT1 en las células normales y en células malignas.

Los métodos además pueden incluir la etapa de seguimiento del sujeto, por ejemplo, para una reducción en uno o más de: una reducción en el tamaño del tumor; reducción de los marcadores de cáncer, por ejemplo, niveles de antígeno específico de cáncer; reducción en la aparición de nuevas lesiones, por ejemplo, en una gammagrafía ósea; una reducción en la aparición de nuevos síntomas relacionados con la enfermedad; o disminución o estabilización del tamaño de la masa de tejido blando; o cualquier parámetro relacionado con la mejora de los resultados clínicos. Se puede hacer un seguimiento del sujeto en uno o más de los siguientes periodos: antes de comenzar el tratamiento; durante el tratamiento; o después de que se hayan administrado uno o más elementos del tratamiento. El seguimiento se puede usar para evaluar la necesidad de más tratamiento con la composición de la invención o para el tratamiento adicional con agentes adicionales. Generalmente, una disminución o estabilización de uno o más de los parámetros descritos anteriormente son indicativas de una mejoría en las condiciones del sujeto. La información acerca del seguimiento se puede registrar, por ejemplo, en forma electrónica o digital.

Los métodos de tratamiento desvelados en este documento se pueden usar en combinación con una o más modalidades de tratamiento adicionales, incluyendo, pero no limitado a: cirugía; terapia de radiación, y quimioterapia.

Con referencia a los métodos desvelados en este documento, el término "combinación" se refiere al uso de uno o más agentes o terapias adicionales para tratar al mismo paciente, en el que el uso o la acción de los agentes o terapias se solapan con el tiempo. Los agentes o terapias adicionales se pueden administrar al mismo tiempo que se administra la composición de la invención, o secuencialmente en cualquier orden. Las administraciones secuenciales son administraciones que se dan en diferentes momentos. El tiempo entre la administración de un agente y otro puede ser de minutos, horas, días o semanas.

El agente o terapia adicional también puede ser otro agente o terapia anticancerígenos. Ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen, por ejemplo, agentes anti-microtúbulos, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, agentes alquilantes, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con una vía de transducción de señales, agentes que promueven la apoptosis, radiación, y anticuerpos dirigidos contra otros antígenos asociados al tumor (incluyendo anticuerpos desnudos, inmunotoxinas y radioconjugados). Ejemplos de clases particulares de agentes anticancerígenos se proporcionan con detalle de la forma siguiente: antitubulina/antimicrotúbulos, por ejemplo, paclitaxel, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, taxotere; inhibidores de la topoisomerasa I, por ejemplo, irinotecan, topotecan, camptotecina, doxorubicina, etopósido, mitoxantrona, daunorrubicina, idarrubicina, tenipósido, amsacrina, epirubicina, merbarona, clorhidrato de piroxantrona; antimetabolitos, por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, citarabina/Ara-C, trimetrexato, gemcitabina, acivicina, alanosina, pirazofurina, N-fosforacetil-L-aspartato = PALA, pentostatina, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, ara-A, cladribina, 5-fluorouridina, FUDR, tiazofurina, ácido N-[5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil]-L-glutámico; agentes alquilantes, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, BCNU (carmustina), melfalán, tiotepa, busulfan, clorambucilo, plicamicina, dacarbazina, fosfato de ifosfamida, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, mostaza de uracilo, pipobroman, 4-ipomeanol; agentes que actúan a través de otros mecanismos de acción, por ejemplo, dihidrolenperone, espiromustina, y desipéptido; modificadores de la respuesta biológica, por ejemplo, para mejorar las respuestas anti-tumorales, tales como el interferón; agentes apoptóticos, tales como actinomicina D; y anti-hormonas, por ejemplo anti-estrógenos tales como el tamoxifeno o, por ejemplo antiandrógenos tales como 4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3-(trifluorometil)propionanilida.

Asimismo se contemplan los inhibidores de la histona desacetilasa (inhibidores de la HDAC), una clase de compuestos que interfieren con la función de la histona desacetilasa, como agentes adicionales para la terapia combinada. Inhibidores de la HDAC incluyen, sin limitación, ácidos hiroxámicos (por ejemplo, tricotatina A), tetrapéptidos cíclicos (por ejemplo, trapoxina B), depsipéptidos (por ejemplo, romidepsina), benzamidas, cetonas

electrófilas, compuestos de ácido alifático (por ejemplo, fenilbutiral, ácido valproico), SAHA/vorinostat, FK228, Belinostat/PXD101, panobinostat, MS-275, LAQ824/IBI589, CI994, MGCD0103, nicotinamida, derivados NAI), dihidrocurmarina, naftopirana, 2-hidroxinaftaldehídos, derivados de dicarboxamida, derivados de piridilo y pirimidinilo, derivados de 4-carboxibencilamino, derivados fluorados de arilamida, compuestos similares al estilbeno, derivados de 3-(4-amidopirrol-2-ilmetilideno)-2-indolinona y fenoxazinona.

Una terapia combinada puede incluir la administración de un agente que reduce los efectos secundarios de otras terapias. El agente puede ser un agente que reduce los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer. Una terapia combinada también puede incluir la administración de un agente que reduce la frecuencia de administración de otras terapias. El agente puede ser un agente que disminuye el crecimiento del tumor después de que se hayan reducido los efectos anticancerígenos de otras terapias.

Los expertos en la materia entenderán y apreciarán las terapias combinadas útiles. Las posibles ventajas de dichas terapias combinadas incluyen la capacidad de usar menos de cada uno de los principios activos individuales para minimizar los efectos secundarios tóxicos, mejoras sinérgicas en la eficacia, mejora en la facilidad de administración o uso, y/o gasto global reducido en la preparación o formulación del compuesto. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar al sujeto para el tratamiento de una hemoglobinopatía y/o una talasemia, es decir, un trastorno de la sangre, en combinación con una o más citoquinas. En una realización, la citoquina se selecciona del grupo que consiste en IL-3, GM-CSF, G-CSF, factor de células madre (SCF) e IL-6.

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar sólo usando experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en este documento.

La invención se define en profundidad por referencia a los siguientes ejemplos que describen con detalle la preparación de los compuestos de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que se pueden poner en práctica muchas modificaciones, tanto de materiales como de métodos, sin apartarse del fin e interés de esta invención. Los siguientes ejemplos se exponen para ayudar a entender la invención y no se deben interpretar como específicamente limitantes de la invención descrita y reivindicada en este documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. La decitabina puede agotar la DNMT1 en las células madre y progenitoras hematopoyéticas normales sin causar daños medibles en el ADN o apoptosis

En este documento se demuestra que la decitabina agota la DNMT1 sin causar daños medibles en el ADN. La decitabina a una concentración de 0,2-0,5 μM agota la DNMT1 en células precursoras hematopoyéticas normales (datos no presentados). Se aislaron células precursoras hematopoyéticas normales CD34+ a partir de sangre de cordón umbilical. Un ensayo de inmunofluorescencia basado en Q-dot cuantifica el agotamiento de la DNMT1 por varias dosis de decitabina. Un segundo anticuerpo conjugado a Q-dot contra el primer anticuerpo dirigido contra DNMT1 permite la cuantificación del agotamiento de la DNMT1 en las células hematopoyéticas CD34+ humanas normales expuestas a diversos niveles de decitabina. La DNMT1 se cuantificó en 500 células para cada condición de tratamiento. Se usó DAPI para teñir los núcleos. Se usa en el *software* Image-quant para cuantificar la DNMT1 mediante la variable de fluorescencia de intensidad media (FIM). Los niveles de decitabina se evaluaron en μM .

Figuras 1A y B) Decitabina a una concentración de 0,5 μM , añadida a células madre y progenitoras hematopoyéticas normales 3x/sem, no provoca daño medible en el ADN. Sin embargo, la decitabina 1,0 μM provoca daños medibles en el ADN. A) Las células hematopoyéticas CD34+ normales sometidas a las concentraciones de decitabina anteriores se evaluaron para el daño del ADN por el método de Fast Micro para medir la escisión de ADN 24 horas después de la exposición a DAC (Riccardi, R., y col. 1982 Cancer Res. 42: 1736-1739). En contraste, dosis equimolares de Ara-C (Ara-C 0,5 μM) y niveles clínicamente relevantes de hidroxiurea (HU 500 μM), provocan daños significativos en el ADN (dosis de decitabina 0,5 μM D1, 3, 5; dosis de Ara-C 0,5 μM D 1, 3, 5; dosis de hidroxiurea 500 μM D1-5). La medición se realiza en D6. B) El daño del ADN también se evaluó mediante la fosforilación (γ) de la histona H2AX, un marcador temprano de la reparación del ADN que demuestra de nuevo que las concentraciones anteriores de Ara-C (Ara-C) y niveles clínicamente relevantes de HU provocan daños significativos en el ADN, no así cantidades equimolares de decitabina.

Histograma oscuro = control de isotipo para el análisis de citometría de flujo. Los histogramas claros muestran la tinción de γH2AX para las células de control no tratadas. La medición se realiza en D6.

Figura 1C) La DAC, a estos niveles que no dañan el ADN, pero que agotan la DNMT1, produce la detención transitoria del ciclo celular seguida de una hiperproliferación de rebote. El estado del ciclo celular se midió en los

diversos puntos de tiempo por evaluación de citometría de flujo con tinción de yoduro de propidio. El tratamiento de decitabina causa citostasis con un aumento del rebote en la fase S/G2M que se produce aproximadamente 48 horas después de la exposición al fármaco. Los resultados se expresan como porcentaje del control no tratado.

La cinética de agotamiento de la DNMT1 y la recuperación de precursores hematopoyéticos normales se expuso a una adición 1X de DAC 0,5 μ M. La DNMT1 se cuantificó con un ensayo basado en Q-dot. Los núcleos se tiñeron con DAPI. No se encontró ninguna evidencia o evidencias mínimas de que la decitabina provoque la apoptosis por medición de citometría de flujo de la anexina V-FITC y doble tinción 7AAD (datos no presentados). Dosis equimolares de Ara-C (Ara-C) y niveles clínicamente relevantes de HU (Kreis, W., y col. 1991 Leukemia 5: 991-998) causan apoptosis significativa y muerte celular. La medición se realiza en D6.

Por lo tanto, los efectos citotóxicos de la decitabina se pueden separar de sus efectos de agotamiento de la DNMT1 a concentraciones entre 0,2-0,5 μ M. Por lo tanto, para la terapia epigenética no citotóxica, el objetivo farmacológico es incrementar el tiempo por encima de la concentración umbral necesaria para agotar la DNMT (0,2 μ M aproximadamente) evitando al mismo tiempo altos niveles máximos que provocan daños en el ADN (> 0,5-1,0 μ M).

Ejemplo 2. Agotamiento de la DNMT1 sin daño del ADN, las dosis de decitabina tienen efectos opuestos sobre las células madre normales (HSC) frente a células de leucemia

Células CD34 transducidas con AML1-ETO recapitulan algunas de las características de las células madre de leucemia (LSC) (diferenciación deteriorada y una mayor auto-renovación) y representaban una primera pista o modelo temprano de transformación leucémica. La línea celular Kasumi-1 se obtuvo de un paciente con leucemia AML1-ETO y representa un modelo de transformación en la última fase y evolución maligna. Ambos modelos se diferencian terminalmente con dosis de decitabina que no provocan daños en el ADN pero agotan la DNMT1. Figura 2A) Recuentos de células: se observó un índice terapéutico ideal, con proliferación de células normales, mientras que las células de leucemia declinan. En contraste, la terapia convencional (Ara-C), administrada a dosis equimolares fue más devastadora para las células normales. Las células normales conservan la morfología primitiva con el tratamiento de decitabina (datos no presentados). Por el contrario, las células CD34 AML1-ETO y Kasumi-1 se diferenciaron morfológicamente (disminución de la relación citoplásmica nuclear, segmentación nuclear o condensación, granulación citoplasmática y vacuolización). Figura 2B) células CD34+ normales tratadas con decitabina mostraron una mayor auto-renovación (Milhem, M., y col. 2004 Blood 103: 4102-4110), por lo tanto, el tratamiento de decitabina mantiene la capacidad de formación de colonias. En contraste, las células CD34 AML1-ETO (células leucémicas) se diferencian terminalmente con el tratamiento de decitabina y se suprimió su capacidad formadora de colonias (datos no presentados).

Ejemplo 3. El agotamiento de la DNMT1 sin daño en el ADN produce la diferenciación terminal (apoptosis no inmediata) de las células leucémicas primarias procedentes de pacientes

Células de leucemia primaria obtenidas de médula ósea o sangre periférica (con el consentimiento informado en un protocolo aprobado por IRB) se cultivaron en medio suplementado con citoquinas con o sin decitabina 0,5 μ M añadida 2X/semana. Estas concentraciones de decitabina no provocan daño al ADN o la apoptosis inmediata. Figura 3A) Las muestras se obtuvieron a partir de un espectro de subtipos de LMA. Figura 3B) Recuentos de células en D7 en control no tratado frente a células tratadas con decitabina. La tinción de Giemsa demostró la diferenciación terminal mielomonocítica de células tratadas con decitabina en 12 de 14 casos (datos no presentados). En los casos de resistencia, se mantuvo la expresión de DNMT1 en las células, que indica un fallo de la actividad de la decitabina, en lugar de resistencia a los efectos del agotamiento de la DNMT1 (datos no presentados).

Concentraciones de decitabina 0,5 μ M, que no provocan apoptosis temprana tal como se mide por tinción con Anexina, diferenciaron terminalmente líneas de células tumorales sólidas (cáncer renal, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer hepatocelular, cáncer de próstata, cáncer de vejiga), que producen cambios morfológicos de diferenciación (aumento del tamaño de células, disminución de la relación nuclear citoplasmática). El melanoma es un cáncer resistente a la terapia convencional basada en la apoptosis. La decitabina 0,5 μ M indujo cambios de diferenciación terminal en 7 líneas celulares de melanoma. Figura 4) Recuentos de células en células de control y células tratadas con decitabina en D9. Células control y tratadas teñidas con Giemsa en D8 – los cambios morfológicos indican que el tratamiento con decitabina indujo la diferenciación (datos no presentados).

Ejemplo 4. Un régimen de terapia de diferenciación de decitabina es eficaz y muy bien tolerado en un modelo de xeno-trasplante de cáncer renal resistente a avastina

En un esfuerzo por aplicar la formulación y el régimen propuestos para tratar diferentes histologías de cáncer, se desarrolló una línea de células de cáncer de células renales (Reno-1) a partir de una muestra quirúrgica de cáncer renal y se usó en un experimento de xeno-trasplante. En un modelo de xenoinjerto de cáncer renal resistente, decitabina SQ administrada 3X/semana a una dosis de 1 mg/m² (comenzando el Día 9-Vol. tumor 100) disminuyó significativamente el volumen del tumor sin evidencias de toxicidad en los ratones (sin cambio en el peso, apariencia o recuentos sanguíneos). Este tumor es relativamente resistente a avastina y sunitinib, agentes convencionales usados para tratar el cáncer renal. Figura 5A) La decitabina (DAC) disminuyó el volumen del tumor ($p < 0,001$,

prueba t), en comparación con el control (PBS) o sunitinib. El sunitinib antagoniza el efecto de la decitabina, presumiblemente por citostasis que redujo la incorporación dependiente de la fase S de la decitabina al tumor. La tinción H&E de secciones embebidas en parafina demostró necrosis en las muestras tratadas con decitabina (datos no presentados). El porcentaje de necrosis en cada sección de tejido se evaluó de manera ciega. Los animales tratados con PBS (controles) tenían tejido denso y sano que está mal teñido (tejido gris resaltado con flechas blancas). Figura 5B) Las secciones embebidas en parafina no se prestan a análisis para detalles citológicos. Por lo tanto, se examinó *in vitro* la morfología de las células Reno-1 teñidas con Giemsa cultivadas con decitabina. Las células tratadas con decitabina aumentan de tamaño y demuestran grupos de cromatina nuclear prominentes.

Ejemplo 5. El modelo PUER de diferenciación hematopoyética mediada por PU.1 ofrece una visión de los mecanismos que subyacen a los efectos opuestos del agotamiento de la DNMT1 en la auto-renovación de HSC normales frente a células leucémicas

La diferenciación terminal depende de forma crítica de factores de transcripción que determinan el linaje tales como PU.1. PU.1, al igual que otros factores de unión al ADN que determinan el linaje, demuestra tanto la represión de la transcripción como funciones de activación de la transcripción, determinadas por la interacción con correpresores frente a coactivadores. La línea celular murina PUER se deriva de células *knock-out* PU.1, que han sido transducidas con un vector retroviral que expresa PU.1 fusionado al receptor de estrógeno. La adición del agonista de estrógeno tamoxifeno (OHT) a estas células provoca que PU.1 se vuelva a introducir funcionalmente en la célula a través de la translocación hacia el núcleo, y desencadena la diferenciación terminal.

Figura 6) La diferenciación terminal inducida por PU.1 implica la represión ordenada y secuencial de genes asociados con la auto-renovación (HoxB4, Bmi-1, c-Kit), seguido por la activación de genes asociados a la diferenciación terminal (Mcsfr, Gmcsfr, F4/80) (estos últimos datos no presentados).

Ejemplo 6. Las consecuencias fenotípicas del agotamiento de la DNMT1 dependen de la cronología de la diferenciación de la célula

Figura 7A) El efecto de la decitabina en la proliferación de PUER depende del momento de la adición de decitabina en relación con la activación de PU.1 (PU.1 se activa funcionalmente mediante la adición de OHT a las células). La adición de decitabina con la activación simultánea de PU.1 perjudicó la diferenciación terminal mediada por PU.1 y conservó cierta proliferación celular. Sin embargo, la adición de decitabina 6 h después de la activación de PU.1 no. Figura 7B) La decitabina y la activación simultánea de PU.1 inhibieron la diferenciación, pero la decitabina 6 horas después de la activación de PU.1 no. La citometría de flujo se usó para medir F4/80 como marcador de diferenciación de macrófagos terminales y c-Kit como marcador de células madre. La morfología celular fue consistente con los datos de la citometría de flujo (datos no presentados). Figura 7C) La adición simultánea de decitabina con la activación de PU.1 impidió la primera etapa en la diferenciación terminal de represión del gen que favorece la auto-renovación. Sin embargo, la adición de decitabina después de que se hubo producido la represión del gen que favorece la auto-renovación (6 horas después de OHT) aumentó la expresión del gen que favorece la diferenciación.

Por lo tanto, las consecuencias fenotípicas del agotamiento de la DNMT1 dependen de forma crítica de la cronología de diferenciación de la célula. Al impedir la primera etapa en la diferenciación, que es la represión de los genes que favorecen la auto-renovación, la decitabina puede incrementar la auto-renovación incluso en un contexto que promueve la diferenciación. Estos hallazgos son una explicación razonable de nuestra observación publicada de que la decitabina incrementa la auto-renovación de HSC normales (Milhem, y col. 2004 Blood 103 (11): 4102-10). En contraste, el aumento de la diferenciación en respuesta a la decitabina que se añade después de ya se hayan reprimido los genes de auto-renovación, se asemeja al efecto de la decitabina sobre células de leucemia. Se podría proponer que los efectos opuestos de la decitabina sobre HSC frente a las células de leucemia resultan a causa de que la leucemia es una diferenciación detenida en marcha, distinta de la auto-renovación de HSC.

Ejemplo 7. Eventos moleculares cuando un evento de primer impacto de leucemia (interrupción de Runx1) inhibe la diferenciación mediada por PU.1

La interrupción de Runx1, por mutaciones de Runx1 congénitas o adquiridas y translocaciones cromosómicas, es uno de los eventos genéticos más frecuentes en mielodisplasia y leucemia.

La inducción de una reducción en la expresión de Runx1 en células PUER no impidió la represión mediada por PU.1 de genes que favorecen la auto-renovación, pero inhibió la activación mediada por PU.1 de genes que favorecen la diferenciación. Usando la administración de shRNA lenti-vírico, se indujo una reducción de la expresión de Runx1 en células PUER, y se confirmó la disminución de la expresión de Runx1 por transferencia de Western (entre el 25-50 % de los niveles de control), en diferentes clones de PUERshRunx1 (datos no presentados). Las células PUERshRunx1 no se diferencian terminalmente en respuesta a la activación de PU.1 (+OHT) (datos no presentados). Figura 8) En células PUERshRunx1, la primera etapa en la diferenciación mediada por PU.1 de la represión que favorece la auto-renovación (Bmi-1, HoxB4, c-Kit) se encuentra intacta. Sin embargo, la inducción de una reducción en la expresión de Runx 1 impidió la siguiente etapa cronológica en la diferenciación – activación de

genes que favorecen la diferenciación (F4/80, mcsfr, gmscfr).

Ejemplo 8. Células de leucemia procedentes de pacientes conforme al modelo

5 Para examinar la relevancia clínica de las conclusiones anteriores relativas a la detención en el tránsito a la diferenciación, se midieron los niveles de factores que especifican el linaje en células leucémicas primarias procedentes de pacientes. Factores de transcripción clave que especifican el linaje en la hematopoyesis incluyen PU.1 (necesario para la producción de macrófagos y linfocitos B), CEBP α y CEBP ϵ necesarios para la producción de neutrófilos y GATA1 para la producción eritroide (Iwasaki, H., y col. 2006 Genes Dev. 20: 3010-3021). Los niveles de
10 estos factores se incrementan durante la diferenciación hacia los respectivos linajes. Los niveles de expresión de estos factores se midieron en células aspiradas de médula ósea de donantes sanos, pacientes con bajo riesgo de síndrome mielodisplásico (SMD – un trastorno hematológico clonal que a menudo precede a la LMA) y pacientes con alto riesgo de síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda (enfermedad de alto riesgo). Los aspirados de médula ósea de pacientes con SMD de bajo riesgo contienen células inmaduras anormalmente diferenciadas e incrementadas, pero < 5 % de mieloblastos. En los aspirados de médula ósea de pacientes de alto riesgo, el porcentaje medio de mieloblastos fue del 40 %. Las muestras de alto riesgo, aunque morfológicamente las menos maduras, tenían los niveles más altos de factores específicos del linaje mieloide CEBP α , CEBP ϵ y PU.1 (Figura 9A). Los niveles de GATA1 no incrementaron significativamente en las muestras de la enfermedad en comparación con los controles normales. Se muestra la anotación clínica de las muestras analizadas (Figura 9B).

20 Los datos de expresión génica en un micro-array procedente de 54 pacientes con LMA mostraron un patrón similar de incremento en la expresión de factores específicos del linaje en muestras de LMA en comparación con las células normales de médula ósea (Yagi, T., y col. 2003 Blood 102: 1849-1856).

25 A diferencia de la mutación del ADN o de la aberración cromosómica, no es evidente de inmediato que una diferencia en la metilación de CpG en el promotor entre una muestra maligna y una muestra normal sea anómala, ya que la metilación de CpG del promotor varía entre los diferentes tejidos y con la fase de diferenciación. Por lo tanto, la clasificación de los sitios CpG del promotor por los cambios de metilación que se producen durante la diferenciación normal podría mejorar la interpretación de los estudios de metilación del ADN en cáncer y leucemia.
30 En particular, dicha clasificación podría arrojar luz acerca del papel de la diferenciación en los patrones específicos de células malignas de metilación de CpG del promotor.

Para abordar esta cuestión, se usó un micro-array de metilación de CpG del promotor para clasificar sitios CpG por hipo-metilación, hiper-metilación, o ningún cambio de metilación significativo durante la diferenciación mieloide normal. Esta clasificación se aplicó a un estudio de los patrones de metilación de CpG del promotor en células de síndrome mielodisplásico primario (SMD) y de leucemia mieloide aguda (LMA). En células de SMD primario, la metilación en CpG sensibles a la diferenciación era lo inverso de la de células madre hematopoyéticas normales CD34+ y progenitoras (HSPC), con hipo-metilación de CpG que normalmente están hiper-metilados en HSPC CD34+ y viceversa. En muestras SMD/LMA de alto riesgo ($\geq$ 5 % de mieloblastos), y líneas de células de LMA que incluyen líneas de células CD34+ LMA, este patrón era aún más exagerado. Esta diferencia entre la epigenética de células HSPC normales y SMD/LMA podría contribuir a contrastar destinos de diferenciación en respuesta a fármacos que inhiben las enzimas que modifican la cromatina (Figura 9C).

45 Esta observación da una idea acerca de la leucemogénesis y la biología del SMD/LMA. La metilación de CpG del promotor refleja la fase o el contexto de diferenciación. El patrón de metilación de CpG del promotor en las células SMD/LMA es consistente con un contexto de diferenciación que es más avanzado o comprometido que HSPC normales. Esta posibilidad se clarifica por la alta expresión de factores de transcripción clave que especifican el linaje PU.1 y CEBP α en células SMD/LMA en comparación con células madre y progenitoras hematopoyéticas normales. Por lo tanto, el patrón de metilación de CpG del promotor indica, y probablemente es una dimensión de,
50 un contexto de diferenciación comprometido con el linaje de células SMD/LMA.

Figura 9. Las células de leucemia procedentes de pacientes presentan una diferenciación deteriorada después del compromiso con el linaje. A) células SMD y LMA de alto riesgo expresan altos niveles de factores que especifican el linaje (medidos por RQ-PCR). Las muestras son médula ósea de pacientes normales con bajo riesgo de SMD (<5 % de mieloblastos), y alto riesgo de SMD/LMA (> 5 % de mieloblastos). B) Clasificación de la OMS y anomalías cromosómicas detectadas en las muestras analizadas. C) En médula ósea de SMD y LMA, la dirección del cambio de metilación en sitios CpG sensibles a la diferenciación mimetiza la que se observa durante la diferenciación normal, sólo que de forma exagerada. Los niveles de metilación están representados por un valor β entre 0 (no metilado) y 1 (totalmente metilado). Los sitios CpG del promotor se clasificaron en 3 categorías: sitios CpG que experimentan un aumento significativo ($p < 0,001$, prueba t) de metilación de células madre y progenitoras normales (HSPC, NCD34+) a células maduras normales (NBM) (108 CpG, 'hipomet. en NCD34+') (diagramas en la caja de la izquierda); Sitios CpG que experimentan una disminución significativa ($p < 0,001$, prueba t) en la metilación de NCD34+ a NBM (162 CpG, 'hipermet. en NCD34+') (diagramas en la caja del medio); Sitios CpG que no experimentan cambio en la metilación entre NCD34+ y NBM (1236 CpG, 'sin cambio en la metilación durante la n. difn.') (diagramas en la caja de la derecha). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre la mediana en el grupo de muestra en comparación con el grupo NBM (Kruskal-Wallis). Los valores de p reales

son: 'Hipo-met en NCD34' – NBM v NCD34 < 0,0001, NBM v LoRisk < 0,0001, NBM v HiRisk < 0,0001. 'Hiper-met en NCD34' – NBM v NCD34 < 0,0001, NBM v LoRisk = 0,024, NBM v HiRisk < 0,0001. 'Sin cambio' – NBM v NCD34 < 0,0001#, NBM v LoRisk NBM v LoRisk = 0,024, NBM v HiRisk < 0,0001, NBM v HiRisk < 0,0001. NCD34 = células CD34+ aisladas de médula ósea normal (n = 9), NBM = médula ósea entera normal (n = 42), LoRisk = médula ósea de pacientes con SMD de bajo riesgo (n = 27), HiRisk = médula ósea de pacientes SMD/IMA de alto riesgo (n = 130). Límites gráficos de la caja = rango intercuartil, línea horizontal = mediana, '+' = media, bigotes = intervalo de valores, cajas pequeñas = valores fuera de rango. # CpG se clasificaron como 'sin cambio en la met' basándose en una prueba t para comparar las medias entre NCD34 y NBM, mientras que en este documento se usó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas.

Ejemplo 9. Modelo de diferenciación normal y auto-renovación de leucemia que explica por qué el agotamiento de la DNMT1 tiene efectos opuestos sobre células normales y malignas

La diferenciación mediada por un factor de transcripción que especifica el linaje o por citocinas (Milhem, M., y col. 2004 Blood 103: 4102-4110) requiere la represión ordenada de genes asociados a células madre, seguido por la regulación positiva de genes asociados al destino de diferenciación. La represión de los genes asociados a células madre requiere proteínas de modificación de la cromatina como la DNMT1. Por lo tanto, el agotamiento de la DNMT1, mediante la prevención de esta fase inicial, impide la diferenciación y mantiene la auto-renovación de la división de las células madre normales, incluso en condiciones que inducen la diferenciación (Milhem, M., y col. 2004 Blood 103: 4102-4110) (datos no presentados).

En un número sustancial de casos de LMA, la detención de la diferenciación se produce después del compromiso del linaje (por lo tanto, las células de LMA expresan marcadores de linaje y altos niveles de factores que especifican el linaje) y después de la fase de represión de genes asociados a células madre. Por lo tanto, la auto-renovación (proliferación al mismo nivel de diferenciación) de las células de leucemia es una persistencia aberrante de la división celular de células que se diferencian, que por lo general termina con la finalización del proceso de diferenciación. El deterioro en la diferenciación que mantiene esta auto-renovación anómala, aunque se puede iniciar por anomalías genéticas, finalmente está mediada por mecanismos epigenéticos que reprimen aberrantemente genes necesarios para la diferenciación. Por lo tanto, el agotamiento de la DNMT1 para antagonizar la maquinaria de represión de la transcripción restaura la diferenciación para las que estas células están preparadas y de este modo termina con la auto-renovación anómala. Observaciones en líneas celulares de cáncer que representan un espectro de histologías del cáncer indican que el modelo propuesto es relevante en muchos tipos de cáncer.

Ejemplo 10. El traslado de estas observaciones *in vitro* a terapias *in vivo* efectivas debe superar una serie de obstáculos farmacológicos

El modelo de xenoinjerto MA9 de leucemia humana se trató con decitabina intraperitoneal sola (1 mg/m² 3X/semana). La decitabina incrementó la supervivencia en un 20 % aproximadamente, pero todos los ratones sucumbieron a la leucemia (Figura 10). Este mal resultado, que no refleja los hallazgos *in vitro*, destaca las barreras farmacológicas que limitan la actividad *in vivo* de la decitabina y dificultan el traslado con éxito de hallazgos *in vitro* muy prometedores. La CDA es la barrera farmacológica más importante al traslado con éxito de los hallazgos *in vitro* a la terapia *in vivo*. La invención aborda esta barrera al traslado clínico con éxito de las observaciones *in vitro*.

Un antagonista de la enzima de degradación de decitabina citidina desaminasa (CDA) – tetrahidrouridina (THU). La THU es un análogo de pirimidina que inhibe la CDA (Ki 3-5x10⁻⁸ M). La THU tiene un perfil de toxicidad benigna, una PK bien caracterizada, y se ha administrado a seres humanos por vía intravenosa (IV), subcutánea (SQ), y (PO) oral en una serie de ensayos clínicos (Ho, D.H., y col. 1978 J Clin Pharmacol 18:259-265; Kreis, W., y col. 1977 Cancer Treat Rep 61:1347-1353; Kirch, H.C., y col. 1998 Exp Hematol 26:421-425; Yue, L., y col. 2003 Pharmacogenetics 13:29-38; Gilbert, J.A., y col. 2006 Clin Cancer Res 12:1794-1803; Bhojwani, D., y col. 2006 Blood 108:711-717; Liu, Z., y col. 2007 Nucleic Acids Res 35:e31).

Ejemplo 11. Obstáculo farmacológico: Variación entre individuos en la respuesta a los análogos de citosina

El genotipo AA de la CDA se asocia a un mal pronóstico en respuesta a la terapia con análogos de nucleótidos. En seres humanos, la CDA está sometida a polimorfismos de nucleótido único no sinónimo (SNP) (RS2072671) que produce una transición A → C en el alelo ancestral, cambia la lisina a glutamina en la posición del aminoácido 27 y disminuye 3 veces la actividad de la CDA (Gilbert, J.A., y col. 2006 Clin Cancer Res 12, 1794-1803; Kirch, H.C. y col. 1998 Exp Hematol 26, 421-425; Yue, L., y col. 2003 Pharmacogenetics 13, 29-38). En el HapMap humano (mapa de haplotipos del genoma humano disponible para el público), el 40 % de los caucásicos son homocigotos con el genotipo AA, el 50 % son heterocigotos con el genotipo AC y el 10 % son homocigotos con el genotipo CC (la frecuencia de AA es > 90 % en asiáticos y africanos). Puesto que la CDA puede mediar en la resistencia del cáncer a los análogos de citosina, se examinó si estos diferentes genotipos de CDA predecían resultados clínicos en pacientes con SMD y LMA tratados con arabinósido de citosina (ARA-C), 5-azacitidina o decitabina.

El genotipo AA de CDA, que tiene una mayor actividad enzimática, se asocia a una recaída temprana durante el tratamiento con análogos de citosina, pero no con la terapia de análogos distintos a la citosina. Se planteó la hipótesis de que el genotipo AA más activo enzimáticamente de la CDA, al limitar aún más la actividad de los análogos de citosina (ARA-C, 5-azacitidina o decitabina), podría causar resistencia primaria o recaída temprana (recaída en menos de 2 años) en pacientes con SMD o LMA tratados con estos fármacos, pero no en pacientes con SMD o LMA no tratados con análogos de citosina. Usando los HumanNS-12 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) y la secuenciación del ADN específico del alelo, se estratificó la supervivencia a 24 meses por genotipo de CDA en 81 pacientes con LMA y SMD tratados en la Clínica Cleveland. Como era de esperar, el genotipo AA estaba asociado a una menor supervivencia a 24 meses ($p = 0,05$ Cox) en los pacientes tratados con análogos de citosina (datos no presentados). Las cifras para el genotipo CC son pequeñas, pero podría proponerse que el genotipo CC puede incrementar la mortalidad por toxicidad, pero disminuir la mortalidad por recaída. En pacientes que no fueron tratados con análogos de citosina (estos pacientes recibieron arsénico o gemtuzumab), el genotipo CDA no influyó en los resultados de supervivencia (datos no presentados).

Estos datos pueden explicar los resultados de leucemia más pobres observados en poblaciones no caucásicas (que son $> 90\%$ del genotipo AA), e indica que la combinación de agentes decitabina y tetrahidrouridina (THU) contemplada en este documento debe ser un avance significativo en la terapia de SMD y LMA (y, posiblemente, en terapia para otros tipos de cáncer) en todas las poblaciones, ya que mediante la inhibición de CDA, es probable hacer frente a un importante mecanismo que subyace en los malos resultados con análogos de citosina.

Se cree que la recaída temprana de la leucemia representa la selección de clones resistentes a quimioterapia, mientras que la recaída tardía puede representar la aparición y evolución de las células madre de leucemia que estaban en reposo y no expuestas a inducción y quimioterapia de consolidación. La combinación de decitabina con THU tiene el potencial para hacer frente a las dos formas de recaída. La recaída precoz se puede reducir al mejorar el perfil farmacológico (aumentando el tiempo por encima de la concentración umbral, disminuyendo la variación entre individuos) de la decitabina. La falta de toxicidad del enfoque propuesto, que debería facilitar una terapia crónica a largo plazo, puede hacer frente a una recaída tardía, ya que incluso LSC relativamente quiescentes en algún momento deben quedar expuestos a la decitabina que se administra de forma crónica.

Ejemplo 12. Obstáculo farmacológico: La semi-vida *in vivo* muy breve de la decitabina

Como se ha visto anteriormente, el genotipo CDA está asociado a resultados significativamente diferentes en respuesta a la terapia de análogos de citosina. Esto refleja la gran influencia que tiene la CDA sobre el tratamiento *in vivo* con análogos de citosina: (i) debido a la destrucción por la enzima CDA, la semi-vida *in vivo* de la decitabina IV es < 20 minutos, en comparación con una semi-vida *in vitro* de 5 -9 horas (Liu, Z., y col. 2006 Rapid Common Mass Spectrum 20: 1117-1126). Con el fin de explotar la cualidad única de la decitabina entre los análogos de nucleósidos, su capacidad para agotar la DNMT1 a bajas concentraciones, el objetivo de la terapia farmacológica es maximizar el tiempo por encima de la concentración umbral para agotar la DNMT1 ($> 0,2 \mu\text{M}$), evitando al mismo tiempo los altos niveles máximos ($> 1 \mu\text{M}$) que dañan el ADN (el daño en el ADN que se produce en los niveles superiores provocan toxicidad que limita la dosis acumulada de fármaco y es, por tanto, contraproducente). Para examinar cómo pueden servir a este objetivo farmacológico las diferentes vías de administración, se estudiaron las farmacocinéticas de la decitabina en el modelo de babuino primate no humano.

Figura 11: La decitabina por vía subcutánea (SQ) y oral produce niveles máximos más bajos, pero un tiempo por encima del umbral para el agotamiento de la DNMT1 ($\sim 0,2 \mu\text{M}$) más prolongado que la decitabina IV. Los babuinos se trataron con decitabina IV 0,5 mg/kg (2 animales), decitabina SQ 0,5 mg/kg (2 animales), o decitabina oral 10 mg/kg (2 animales). Se recogió sangre para su análisis farmacocinético (PK) en 7 puntos de tiempo por animal y se midieron los niveles de decitabina mediante LC-MS (Liu, Z., y col. 2006 Rapid Common Mass Spectrum 20: 1117-1126). Estos datos demuestran: (i) la administración por vía SQ y oral puede producir un tiempo por encima de la concentración umbral ($\sim 0,2 \mu\text{M}$) más prolongado para agotar la DNMT1 que la decitabina IV. De hecho, la decitabina intravenosa (IV) tiene una semi-vida media abreviada de < 20 minutos; (ii) la administración IV, pero no SQ u oral, puede producir niveles pico ($> 1 \mu\text{M}$) asociados a daños en el ADN; (iii) variabilidad significativa entre individuos en la PK que es más prominente con la administración oral del fármaco.

Ejemplo 13. Obstáculo farmacológico: La resistencia de las células malignas a la decitabina es farmacológica y no biológica.

La resistencia a los efectos de la decitabina parece ser farmacológica en lugar de biológica, es decir, la resistencia está asociada a un fallo de la decitabina para agotar la DNMT1, en lugar de la proliferación continua a pesar del agotamiento de la DNMT1.

Figuras 12A y B) Usando el ensayo de inmunofluorescencia Q-Dot para los niveles de DNMT1, las líneas celulares sensibles a decitabina demuestran el agotamiento de la DNMT1 desde el núcleo (en comparación con líneas celulares resistentes a decitabina). Sin embargo, la línea celular resistente a decitabina PC3 demostró la expresión persistente de DNMT1. Esto indica que el mecanismo de resistencia implica la disminución de la entrada de decitabina en la célula, el aumento de la destrucción CDA de decitabina, o la disminución de la activación por DCK.

Ejemplo 14. Farmacocinética no clínica de decitabina solo y en combinación con THU

Farmacocinética de la decitabina en primates no humanos, mala biodisponibilidad oral de decitabina en primates no humanos: la farmacocinética de la decitabina se evaluó en dos babuinos después de la administración oral, SQ e intravenosa. Este experimento demostró que la biodisponibilidad oral de decitabina en estos dos babuinos osciló del 0,2 % al 7,0 % aproximadamente (Figura 14). La decitabina se administró a dos babuinos IV (0,5 mg/kg), SQ (0,5 mg/kg) y por vía oral (10 mg/kg). La sangre se recogió en 7 puntos de tiempo y las concentraciones en plasma se determinaron usando un método de LC/MS/MS adaptado de un método 26 publicado previamente. Estos datos demuestran: (i) que la administración SQ y oral pueden producir un tiempo por encima de la concentración umbral más prolongado ($\sim 0,2 \mu\text{M}$) para el agotamiento de la DNMT1 que la decitabina IV; (ii) que a las dosis estudiadas, la administración IV, pero no SQ u oral, puede producir niveles pico ($> 1 \mu\text{M}$) asociados a daños en el ADN; y (iii) la gran variabilidad entre individuos en la exposición a decitabina que es más prominente con la administración oral del fármaco.

Ejemplo 15. Variación sustancial entre individuos en la biodisponibilidad oral de decitabina en babuinos

La variabilidad entre individuos también se observó en siete babuinos que recibieron 10 mg/kg de decitabina por vía oral, con la PK que se mide en 6 o 7 puntos de tiempo (Figura 15).

Ejemplo 16. La administración de THU oral antes de la decitabina oral hace frente a una considerable variabilidad entre individuos en la biodisponibilidad oral de decitabina

Babuinos que responden bien y mal (PA7470 y PA7484, respectivamente) fueron administrados con 10 mg/kg de decitabina sola, 0,5 mg/kg de decitabina y 20 mg/kg de tetrahidouridina (THU) simultáneamente, o 0,5, 2, o 5 mg/kg de decitabina 60 minutos después de 20 mg/kg de tetrahidouridina (THU). Se midieron la C_{max} (ng/ml), T_{max} (min), y $\text{AUC}_{\text{final}}$ (min*ng/ml) y se muestran en la Tabla 1, a continuación, y en la Figura 16. Después de la administración oral de los fármacos, la concentración de plasma generalmente alcanza, en principio, un solo pico, bien definido (C_{max}) a tiempo T_{max} . El AUC final se refiere al área bajo una curva de concentración en plasma-tiempo trazada (no mostrada) en el último punto de tiempo registrado.

Tabla 1:

Animal	Decitabina (mg/kg)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (min)	AUC final (min*ng/ml)
PA7470	10 mg/kg	51,59	60	6278,775
PA7470	0,5 mg/kg + 20 mg/kg THU (0 min)	4,24	30	347,25
PA7470	0,5 mg/kg + 20 mg/kg THU (60 min)	3,06	66	356,81
PA7470	5 mg/kg + 20 mg/kg THU (60 min)	48,54	189	7534,665
PA7484	10 mg/kg	2,33	45	190,35
PA7484	2 mg/kg + 20 mg/kg THU (60 min)	34,01	180	1729,15
PA7484	5 mg/kg + 20 mg/kg THU (60 min)	65,87	120	5621,05

Es de destacar que la administración de THU y decitabina aumenta la biodisponibilidad oral de decitabina en babuino que responde mal y converge la PK entre los babuinos que responden mal y bien (4º y 7º valor en la columna final) en comparación con la decitabina sola (1º y 5º valor en la columna final). En efecto, la combinación de THU con decitabina oral aumenta la exposición de la decitabina aproximadamente 60 veces en un animal con una biodisponibilidad relativamente baja y aproximadamente 2 veces en un animal con una biodisponibilidad relativamente alta, de manera que la extensa variabilidad entre individuos en la exposición de decitabina se reduce sustancialmente.

Ejemplo 17: Identificación de la dosis de THU a usar para incrementar la biodisponibilidad oral

Los babuinos recibieron dosis variables (2 mg/kg o 20 mg/kg) de tetrahidouridina 60 minutos antes de una dosis (5 mg/kg) de decitabina. Dos babuinos (PA7484 y PA7470) fueron administrados por vía oral con 20 mg/kg de THU (500 mg/m²) 60 minutos antes de la administración por vía oral de 5 mg/kg de decitabina, o decitabina sola. Después de un periodo de clarificación de más de 2 semanas, estos dos mismos animales fueron administrados por vía oral con 2 mg/kg de THU (50 mg/m²) 60 minutos antes de 5 mg/kg de decitabina oral, o decitabina oral sola. A diferencia de los 20 mg/kg (500 mg/m²), los 2 mg/kg (50 mg/m²) de THU eran insuficientes para alcanzar la concentración objetivo en plasma de decitabina de $> 50 \text{ ng/ml}$ (Figura 17). Ambas dosis de tetrahidouridina incrementaron significativamente la biodisponibilidad oral de decitabina, pero este aumento fue significativamente mayor con la dosis más alta (500 mg/m², o 20 mg/kg) de tetrahidouridina.

Ejemplo 18. Identificación del momento óptimo entre la administración de THU oral y decitabina oral (biodisponibilidad oral de decitabina tras la administración simultánea frente a la administración previa de tetrahidouridina)

- 5 Cada uno de los babuinos con una buena respuesta y una mala respuesta recibieron 20 mg/kg (500 mg/m²) de tetrahidouridina (THU) por vía oral 60 minutos antes de la administración oral de 5 mg/kg de decitabina o simultáneamente con la decitabina. Se midieron los niveles de decitabina en diferentes puntos de tiempo por LC-MS.
- 10 En particular, cuando la tetrahidouridina se administra por vía oral simultáneamente con la decitabina, la biodisponibilidad oral de esta última presenta una caída significativa en comparación con la administración de tetrahidouridina 60 minutos antes de la decitabina (datos no presentados).

Ejemplo 19: Confirmación de que la THU oral aumenta la biodisponibilidad oral de la decitabina aproximadamente 4 veces, y disminuye la gran variación entre individuos en la biodisponibilidad oral de decitabina

- 15 En siete babuinos, la administración de THU antes de la decitabina aumenta la biodisponibilidad oral de decitabina aproximadamente 4 veces y reduce la variación entre individuos en la farmacocinética de la decitabina. Siete babuinos fueron tratados con 10 mg/kg de decitabina sola por sonda oral, o después de un periodo de clarificación de al menos 2 semanas, con 20 mg/kg de THU por sonda oral seguido por 5 mg/kg de decitabina por sonda oral. En
- 20 7 animales administrados con decitabina oral sola a 10 mg/kg, el AUC media fue de 1604 y la mediana del AUC fue de 463 min*ng/ml (Figura 18A). En estos mismos 7 animales administrados con 20 mg/kg de THU, seguido de la mitad de la dosis de decitabina (5 mg/kg), el AUC media fue de 2820,914 y la mediana del AUC fue de 2284 min*ng/ml (Figura 18A). Por lo tanto, la administración oral de THU antes de la decitabina por vía oral produce un
- 25 aumento de la biodisponibilidad oral de aproximadamente 10 veces cuando se consideran las medianas, y de aproximadamente 3,5 veces cuando se consideran las medias. Los mayores aumentos en las AUC con la administración conjunta se observaron en los animales con AUC bajas con decitabina sola (Figura 18B). Por lo tanto, la gran variación entre individuos observada con decitabina sola, representada por la separación entre la media y la mediana del AUC, se amortiguó sustancialmente por la co-administración de THU con decitabina (Figura 18A).
- 30 Los ratones recibieron dosis variables (30 mg/kg, 15 mg/kg, y 7,5 mg/kg) de tetrahidouridina 30 minutos antes de una dosis (16 mg/kg) de decitabina. Se midieron los niveles de decitabina por LC-MS. 50 mg/m² de tetrahidouridina administrada antes de la administración de decitabina produjo un aumento de 5 veces aproximadamente (sin duda farmacológicamente significativo) en la biodisponibilidad oral de la decitabina (datos no presentados). Se observó
- 35 una leve caída en la biodisponibilidad oral de la decitabina medida cuando la dosis de THU se redujo de 50 a 25 mg/m².

Es de destacar que se constató un patrón de expresión de citidina desaminasa similar en seres humanos y ratones (datos no presentados). Estos datos de expresión génica se pueden obtener a partir en la base de datos pública de expresión génica GenAtlas.

40

Ejemplo 20. Estudio de fase 1/2 de administración IV crónica de bajas dosis de decitabina en ECF

- Basándose en los ensayos realizados con anterioridad, en los que no se produjeron eventos adversos clínicamente significativos, se realizó un estudio de administración crónica para identificar la toxicidad y eficacia de la dosificación
- 45 repetida de decitabina a lo largo de 36 semanas (9 meses) en 7 sujetos con ECF refractaria a HU (DeSimone, J., y col. 2002 Blood 99: 3905-3908). Se administró decitabina por vía intravenosa a 0,3 mg/kg/día, 5 días consecutivos por semana durante 2 semanas, seguido de un periodo de observación de 4 semanas. Si el recuento absoluto de neutrófilos (RAN) cae por debajo de $1 \times 10^9/l$, la dosis se reduce a 0,05 g/kg/día en el siguiente ciclo de 6 semanas. Se obtuvo una dosis óptima del fármaco para cada sujeto, y se produjo un aumento de la HbF sin neutropenia (nadir
- 50 del RAN $> 1,5 \times 10^9/l$).

- Efectos farmacodinámicos: los niveles de HbF promedio y los niveles de HbF máximos alcanzados durante las últimas veinte semanas de tratamiento para los 7 sujetos de la ECF fueron del $13,93 \pm 2,35 \%$ y el $18,35 \% \pm 4,46 \%$, respectivamente (respecto a una línea basal del $3,12 \% \pm 2,75 \%$). Los valores de hemoglobina promedio y
- 55 promedio máximo fueron de $8,81 \pm 0,42 \text{ g/dl}$ y $9,7 \pm 0,53 \text{ g/dl}$, respectivamente (respecto a una línea basal de $7,23 \pm 2,35 \text{ g/dl}$) (Tabla 2, a continuación).

Tabla 2: Niveles de hemoglobina y HbF antes y durante las últimas 20 de 36 semanas de tratamiento con decitabina

Sujeto	Pre	HbF (%)		Hemoglobina Total (g/dl)		
		Promedio	Max	Pre	Promedio	Max
1	0,8	$12,40 \pm 1,25$	14,4	6,2	$9,05 \pm 0,48$	9,6
2	6,8	$14,55 \pm 1,32$	16,3	8,2	$9,37 \pm 0,60$	10,3
3	1,4	$12,75 \pm 2,28$	17,2	6,0	$8,34 \pm 0,55$	9,5
4	0,6	$10,80 \pm 2,05$	14,4	7,2	$8,28 \pm 0,52$	9,0

5	2,9	16,42 ± 2,81	24,6	8,0	8,91 ± 0,57	9,6
7	6,2	16,70 ± 2,55	23,2	7,8	8,92 ± 0,79	10,4
Media ± SD	3,12 ± 2,75	13,93 ± 2,35	18,35 ± 4,46	7,32 ± 0,94	8,81 ± 0,42	9,73 ± 0,53

Las cifras de células F individuales máximas durante el ensayo oscilaron entre el 58-87 % (es decir, un promedio para los 7 sujetos del 69 ± 10,12 %).

- 5 Efectos secundarios hematológicos y toxicidad: A pesar de depresiones periódicas en los RAN, que se produjeron 5-6 semanas después de comenzar cada ciclo de tratamiento, la media del RAN durante las últimas 20 semanas de tratamiento ($4,2 \pm 1,35 \times 10^9/l$) no fue significativamente diferente del pretratamiento promedio ($4,6 \pm 1,56 \times 10^9/l$). Los RAN de dos sujetos que no responden a HU no cayeron por debajo de $2,0 \times 10^9/l$ y los nadires, que se produjeron a las 5-6 semanas de cada ciclo, en general se mantuvieron por encima de $3,0 \times 10^9/l$. No se produjeron secuelas clínicas a los cambios en el hemograma.

Toxicidad no hematológica: No se produjo ninguna toxicidad no hematológica. Los pacientes no necesitaron de antieméticos.

15 Ejemplo 21. Estudio de fase 1/2 de administración SQ de decitabina

- Se inició un estudio de fase ½ usando decitabina administrada por vía SQ con el fin de evaluar la seguridad de la decitabina administrada por vía SQ, para producir aumentos acumulativos de la hemoglobina fetal y total a través de la administración semanal, y explorar el mecanismo por el cual la decitabina aumenta la HbF (Sauntharajah, Y., y col. 2003 Blood 102: 3865-3870). Se trataron ocho sujetos con múltiples complicaciones clínicamente significativas de la ECF. La decitabina se administró SQ a 0,2 mg/kg de 1 a 3 veces por semana en 2 ciclos de duración de 6 semanas con un intervalo de 2 semanas entre ciclos. En el ciclo 1, el fármaco se administró dos veces por semana en 2 días consecutivos. Si el paciente alcanza un porcentaje de células F (% de células F) de al menos el 80 % durante el ciclo 1, la frecuencia de la dosis se reduce a una vez por semana en el ciclo 2. Si el % de células F más elevado durante el ciclo 1 era inferior al 80 %, la frecuencia de la dosis se aumentó a 3 veces por semana en el ciclo 2.

- Efectos farmacodinámicos: todos los sujetos mostraron aumentos estadísticamente significativos en la expresión de HbF (Figura 13). El análisis de metilación de ADN del promotor de la γ -globina en ADN aislado de células aspiradas de médula ósea mostró una hipometilación post-tratamiento en este locus (datos no presentados). A dosis más altas, se sabe que la decitabina es citotóxica. Para determinar si esta dosis y el calendario de decitabina era citotóxica, se evaluó la morfología de la médula ósea mediante la revisión hematopatología ciega e independiente de aspirados de médula ósea antes del tratamiento y después del tratamiento. No hubo disminución en la celularidad de la médula ósea. Se observó un aumento de células eritroides y megacariocitos (datos no presentados). El análisis de citometría de flujo de células aspiradas de médula fresca teñidas con yoduro de propidio no mostró un aumento en la fracción apoptótica sub-G1 (datos no presentados).

- Efectos secundarios hematológicos y toxicidad: un paciente presentaba (Instituto Nacional del Cáncer/Programa de Evaluación de Terapias del Cáncer (NCI/CTEP) neutropenia de grado 4 (nadir del RAN $0,4 \times 10^3/l$), dos presentaban neutropenia de grado 3 (nadir del RAN $0,8 \times 10^3/l$). La neutropenia se recuperó en los 7 días de la última dosis de decitabina. No se produjo fiebre neutropénica. Los recuentos de plaquetas incrementaron en todos los sujetos durante el tratamiento. El recuento de plaquetas más elevado fue de $877 \times 10^9/l$. No se produjeron secuelas clínicas a estos cambios en el hemograma.

- 45 Había una relación inversa entre el recuento de plaquetas y de neutrófilos (datos no presentados). Los cambios en la morfología de la médula ósea y los estudios *in vitro* con niveles no citotóxicos de decitabina indican que el mecanismo de disminución de neutrófilos y un aumento simultáneo de las plaquetas es una diferenciación alterada de células madre hematopoyéticas (Sauntharajah, Y., y col. 2003 Blood 102: 3865 a 3870).

- 50 Cuatro pacientes consintieron el aspirado en serie de médula ósea y el análisis de la biopsia antes y cada ciclo de 6 semanas de tratamiento de decitabina.

Tabla 3. Resultados de aspirado de médula ósea y análisis de la biopsia

ID #	Pre-Tratamiento			Después del ciclo 1			Después del ciclo 2		
	Celul.	Relación M:E	MK/IPF	Celul.	Relación M:E	MK/IPF	Celul.	Relación M:E	MK/IPF
UPN1	Hyper	0,8	4	Hyper	0,7	10	Hyper	0,6	13
UPN3	Hyper	0,8	2-3	-	-	-	Hyper	0,3	6
UPN5	Norm	2	2	Norm	0,8	6	Norm	0,5	6
UPN7	Hyper	1	1	Hyper	0,3	8	Hyper	0,03	13

No hubo disminución en la celularidad de la médula después de la revisión hematopatología (Tabla 3, más arriba), que era ciego al estado de tratamiento. En UPN3, el aspirado de médula ósea parcial fue técnicamente infructuoso.

Toxicidad no hematológica: se usaron los Criterios de toxicidad del NCI para evaluar la toxicidad. No se produjo toxicidad local en los sitios de inyección SQ. No se produjo toxicidad no hematológica. Ningún sujeto describió náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, o disminución del apetito.

Eficacia: La Hb total aumentó de $7,6 \pm 2$ a $9,6 \pm 1,8$ (media ± 2 SD del pre-tratamiento a Hb máxima, prueba t apareada, $p < 0,001$). Tanto el recuento absoluto de reticulocitos (ARC) ($p = 0,0006$) como la bilirrubina total ($p = 0,01$, prueba t apareada de 2 colas) disminuyeron durante el tratamiento. El ARC está correlacionado inversamente con la tHb ($p < 0,0001$). En ECF, la exposición anómala de moléculas tales como la fosfatidil-serina en la superficie de RBC y la adhesión de RBC a células endoteliales/daño endotelial puede desencadenar la coagulación y vías inflamatorias. La adhesión de RBC tanto a TSP como a laminina disminuyó después del ciclo 1 ($p < 0,005$). De acuerdo con informes anteriores (Tomer, A., y col. 2001 J Lab Clin Med 398-407; Francis, R.B., Jr. 1989 Haemostasis 19:105-111; Peters, M., y col. 1994 Thromb Haemost 71:169-172), al inicio del estudio se observaron niveles más altos de los marcadores de coagulación activa, la trombina-antitrombina (TAT), F1+2 y D-dímeros. El tratamiento redujo los niveles de D-dímero, una medida de la fibrinólisis de fibrina reticulada ($p < 0,04$), mientras que los marcadores de generación de trombina, TAT y F1+2, disminuyeron, pero no en un grado estadísticamente significativo. La molécula de adhesión VCAM soluble (sVCAM-1) y el péptido del factor de von Willebrand (VWFpp) se liberan de las células endoteliales dañadas, los niveles de ambas moléculas disminuyeron con el tratamiento ($p < 0,05$). La proteína C-reactiva (CRP), un marcador de la inflamación, se elevó al inicio del estudio y, aunque hubo una tendencia a la baja con la terapia, no fue estadísticamente significativa ($p = 0,18$) (véase Tabla 4, a continuación).

Tabla 4. Cambios en los puntos finales clínicos subrogados. Los valores son la media $\pm$ SE; prueba t apareada 2 de colas. P * = significación del cambio desde pre-terapia a post-ciclo 1. P ** = cambio desde pre-terapia a post-ciclo 2.

		Preterapia	Después del Ciclo 1	P*	Después del Ciclo 2	P **	Intervalo normal
Medidas de adhesión de RBC al endotelio	Adhesión a TSP (RBCs/mm ²)	1570 $\pm$ 170	690 $\pm$ 150	< 0,001	910 $\pm$ 160	< 0,001	< 60
	Adh. to laminina (RBCs/mm ²)	3470 $\pm$ 500	1950 $\pm$ 300	0,004	1570 $\pm$ 210	< 0,001	< 250
Medida de la generación de trombina y la fibrinólisis	D-Dímero (ng/ml)	490 $\pm$ 90	320 $\pm$ 50	0,02	300 $\pm$ 50	0,03	< 400
	TAT (µg/l)	7,0 $\pm$ 1,7	8,6 $\pm$ 2,3	0,15	5,2 $\pm$ 0,9	0,11	1,0-4,1
	F1+2 (nmol/l)	1,75 $\pm$ 0,22	1,56 $\pm$ 0,16	0,23	1,41 $\pm$ 0,15	0,051	0,04-1,1
Medida de la inflamación	CRP (mg/dl)	1,25 $\pm$ 0,27	1,19 $\pm$ 0,34	0,80	0,83 $\pm$ 0,26	0,18	< 0,7
Medidas de daño celular endotelial	sVCAM (ng/ml)	1170 $\pm$ 140	930 $\pm$ 100	0,01	640 $\pm$ 100	0,02	395-714
	VWFpp (α/dl)	196 $\pm$ 26	156 $\pm$ 28	0,015	144 $\pm$ 13	0,049	74-153

Ejemplo 22. Administración crónica de decitabina a pacientes con ECF gravemente enfermos (Sauntharajah, Y., y col. 2008 Br J Haematol 141: 126-129)

Los estudios anteriores de decitabina como posible agente modificador de patologías de la enfermedad de las células falciformes (ECF) no estaban diseñados para demostrar su eficacia clínica. En cuatro pacientes de ECF con enfermedad aguda grave en un contexto de deterioro clínico crónico durante los años o meses precedentes, se administró decitabina (0,1-0,2 mg/kg 1-2X/semana) fuera de indicación durante periodos por encima de los 12 meses. El uso fuera de indicación de decitabina en ECF fue para proporcionar un beneficio directo para estos pacientes y no para su investigación. Se consideró la decitabina debido al deterioro clínico y complicaciones que amenazan la vida a pesar de la terapia con HU, la eritropoyetina para reticulocitopenia relativa (hemoglobina < 9 g/dl y reticulocitos $\leq 250 \times 10^9/l$), la disminución de la disponibilidad y el aumento de los riesgos de transfusión de ≥ 5 de aloanticuerpos y auto-anticuerpos de glóbulos rojos (RBC), y la no elegibilidad para terapia del protocolo disponible.

Se produjeron incrementos en la hemoglobina de > 1,5 g/dl en 2-4 semanas con incrementos máximos de hemoglobina de 3,5-5 g/dl. La hemoglobina aumentó a través de un incremento en los reticulocitos y un incremento de la hemoglobina fetal (el aumento de la hemoglobina no se explica por el incremento de la hemoglobina fetal sola). Generalmente, los recuentos de reticulocitos se incrementaron durante las primeras 2-8 semanas de terapia. Las

tendencias de reticulocitos se invierten después de niveles de hemoglobina > 9 g/dl. Esto fue más evidente en el Paciente A, que no estaba recibiendo eritropoyetina exógena. Una mejora duradera sintomática y en el estado funcional durante los 4-12 meses de seguimiento contrastaban con tendencias graves y de deterioro antes de la decitabina.

Es de destacar que todos los pacientes tenían enfermedad aguda severa en un contexto de deterioro crónico y anemia progresiva durante los años o meses precedentes; el periodo de seguimiento que oscila entre 4-12 meses permitió la documentación de mejoras técnicas duraderas que obviamente contrastaban con el estado clínico y la tendencia de los meses precedentes; a pesar de que 3 de los 4 pacientes estaban con eritropoyetina simultánea, se había administrado a dosis estables durante más de 6 meses con anemia progresiva y exacerbaciones de anemia grave recurrente, a pesar de que 2 de los 4 pacientes habían recibido transfusiones durante la terapia con decitabina, éstas no explican el incremento duradero en la hemoglobina y la eventual independencia de la transfusión. Las circunstancias clínicas graves y complicadas en estos pacientes normalmente no aparecen representadas en los ensayos clínicos. Por tanto, esta descripción puede complementar los estudios clínicos y proporcionar orientación adicional con respecto a la dosis, el calendario, las toxicidades previstas y los criterios de inclusión.

Ejemplo 23. Farmacodinamia de decitabina sola y en combinación con THU

Gran variabilidad entre individuos en las respuestas farmacodinámicas en babuinos. La importancia biológica de las diferencias en las respuestas farmacocinéticas a la decitabina oral se examinaron en un grupo diferente de babuinos, en los que se observaron grandes diferencias en las respuestas farmacodinámicas e individuales (expresión de hemoglobina fetal) y actividad biológica (recuento de neutrófilos) (Tabla 5, a continuación).

Animal	Fármaco	Vía	Dosis mg/kg/d	% de Pre-HbF	% de Post-HbF	Nadir de RAN
6974	Dac	SQ	0,52	7,7	68,8	1668
	Dac-m	Oral	9,35	10,3	40,5	2000
	Dac-m	Oral	18,7	7,7	67,8	1659
7001	Dac	SQ	0,52	7,2	66,1	1491
	Dac	Oral	9,35	6,6	17,4	1331
	Dac-m	Oral	4,1	7,4	13,1	1417
7002	Dac	SQ	0,52	7,4	86,3	524
	Dac-m	Oral	6,7	7,9	31,4	481
	Dac-m	Oral	9,35	8,3	62,3	463
7254	Dac	SQ	0,52	8,4	76,3	1320
	Dac	Oral	18,7	7,1	68,1	1969
7257	Dac	Oral	9,35	6,0	72,0	749

Tabla 5. Respuestas farmacodinámicas después de la administración SQ y oral de decitabina a babuinos

Expresión fetal de hemoglobina, % de HbF, pre y post tratamiento con la dosis indicada de decitabina. Disminución en el recuento de neutrófilos, otro efecto biológico esperado de la decitabina, en paralelo a los aumentos del % de HbF. El tratamiento oral fue con decitabina o una decitabina ligeramente modificada (decitabina-mesilato – Dac-m). La variabilidad entre individuos en la respuesta farmacodinámica a la misma dosis de decitabina oral se resaltan con las cajas.

Ejemplo 24. La administración de THU antes de la decitabina disminuye la variabilidad entre individuos en la decitabina

Del mismo modo, la administración de THU oral antes de la decitabina oral en otros dos babuinos (PA 6974 y 7001) produjo un aumento sustancial de las respuestas farmacodinámicas (expresión de hemoglobina fetal) a la decitabina oral (Tabla 6, a continuación).

Tabla 6. Las respuestas farmacodinámicas (expresión de hemoglobina fetal, % de HbF) se han mejorado sustancialmente mediante la administración oral de decitabina después de THU oral.

Animal	Fármaco	Vía	Dosis mg/kg/d	THU oral 20 mg/kg	% de Pre-HbF	% de Post-HbF
6974	Dac	Oral	9,35	-	10,3	40,5
	Dac	Oral	0,3	+	3,2	28,4
7001	Dac	Oral	9,35	-	6,6	17,4
	Dac	Oral	1,42	+	6,2	61,6

La decitabina se administró a las dosis indicadas en dos bloques consecutivos de 5 días cada uno. La THU a las dosis indicadas se administró 60 minutos antes de cada dosis de decitabina.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para tratar un trastorno de la sangre o un tumor maligno hematológico o sólido en un sujeto humano,
5 comprendiendo el método la administración de la composición al sujeto,
en donde la composición es para la administración oral y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina y tetrahidrouridina,
en donde la tetrahidrouridina está bio-disponible de 30 a 60 minutos antes que la decitabina,
10 en donde la composición es eficaz para dar lugar a una concentración en plasma de decitabina a un nivel máximo no superior 0,5 μM en el sujeto.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición es eficaz para producir una concentración en plasma de decitabina a un nivel máximo de 0,1 a 0,5 μM en el sujeto.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la composición está en forma de cápsula o comprimido que comprenden decitabina, tetrahidrouridina y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. La composición para el uso de la reivindicación 3 que es una cápsula, en donde la tetrahidrouridina se encuentra
20 en la superficie de la cápsula y la decitabina se encuentra dentro de la cápsula.
5. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es para su uso en un método para tratar un trastorno de la sangre en el sujeto.
- 25 6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en donde el trastorno de la sangre es una hemoglobinopatía o una talasemia.
7. La composición para el uso de la reivindicación 5, en donde:
 - 30 i) al sujeto se le proporciona una forma adicional de terapia; o
 - ii) el sujeto es refractario o intolerante al tratamiento con hidroxiurea.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es para su uso en un método
35 para el tratamiento de un tumor maligno hematológico o sólido en el sujeto.
9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en donde:
 - 40 i) el tumor maligno se selecciona del grupo constituido por leucemia, linfoma, mieloma múltiple, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de boca, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de tiroides, cáncer de los pulmones, cáncer del mediastino, cáncer del timo, cáncer del mesotelio, cáncer del peritoneo, cáncer de hueso, cáncer de músculo, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer de mamas, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de la vagina, tumores malignos del EBV, linfoma de Burkitt, linfomas asociados a inmunosupresión, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, adenocarcinoma gástrico, carcinomas de tipo linfopitelioma, y leiomiomasarcoma
 - 45 relacionado con inmunodeficiencia; o
 - ii) al sujeto se le proporciona una forma adicional de terapia.
10. La composición para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, para disminuir la variación entre
50 individuos en la farmacocinética de la decitabina y/o los efectos clínicos en sujetos.
11. La composición para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, para prolongar el tiempo por encima de la concentración umbral para agotar la DNMT1 con decitabina en el sujeto y evitar altos niveles máximos de decitabina que dañen el ADN.
- 55 12. La composición para el uso de la reivindicación 5, en donde el método además comprende la administración de la composición al sujeto una vez a la semana o una vez cada dos semanas.
13. La composición para el uso de la reivindicación 8 para el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde el método
60 además comprende la administración de la composición al sujeto 1-3 veces por semana.
14. La composición para el uso de la reivindicación 8 para su uso en un método para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar un tumor maligno hematológico o sólido, o un sujeto en riesgo de sufrir una recaída de un diagnóstico previo de tumor maligno hematológico o sólido, comprendiendo el método la administración de la
65 composición al sujeto de una vez cada dos semanas a tres veces por semana.

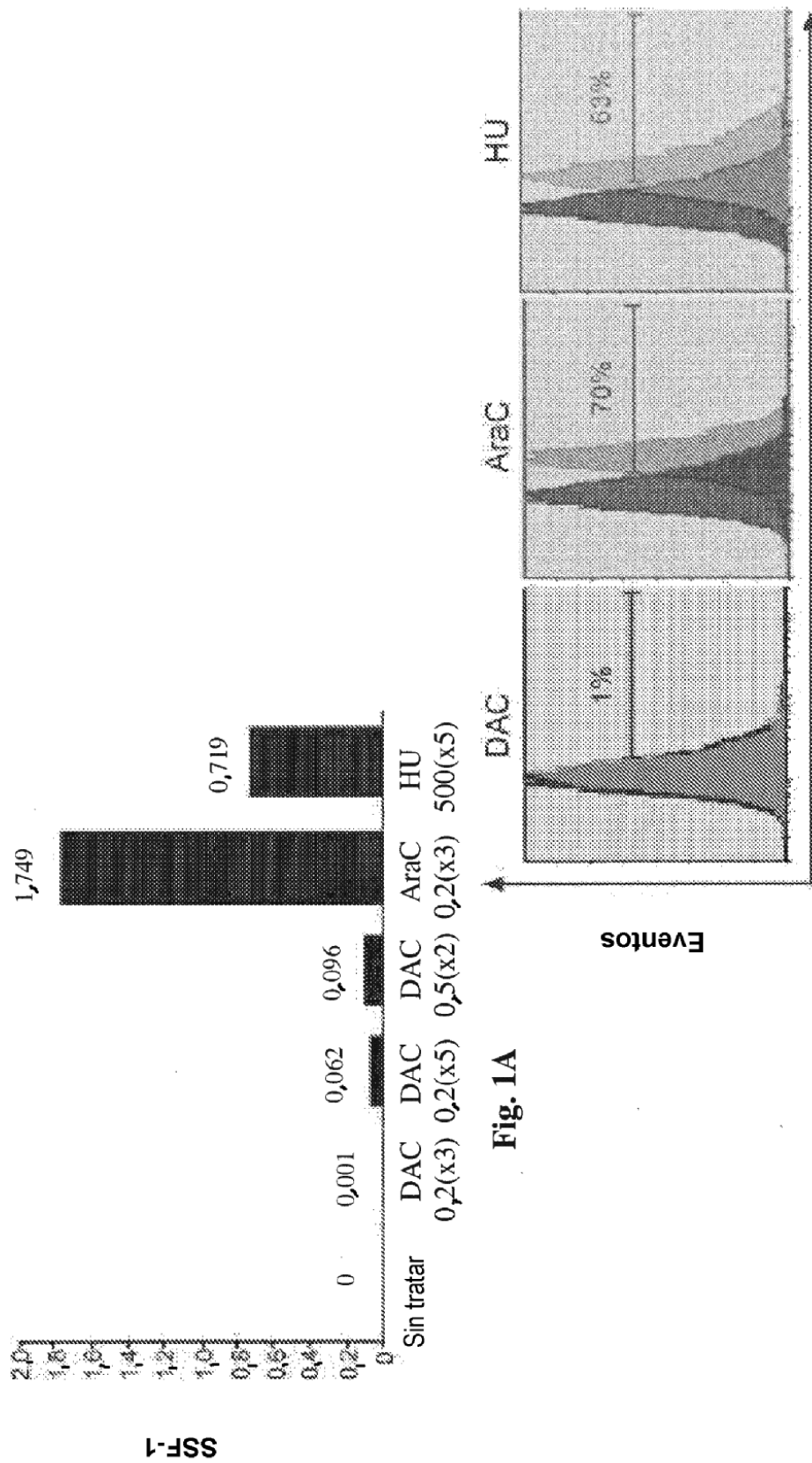


Fig. 1B

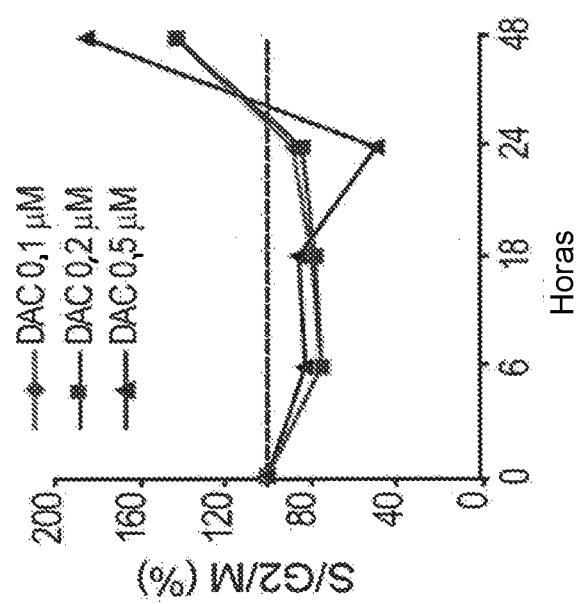


Fig. 1C

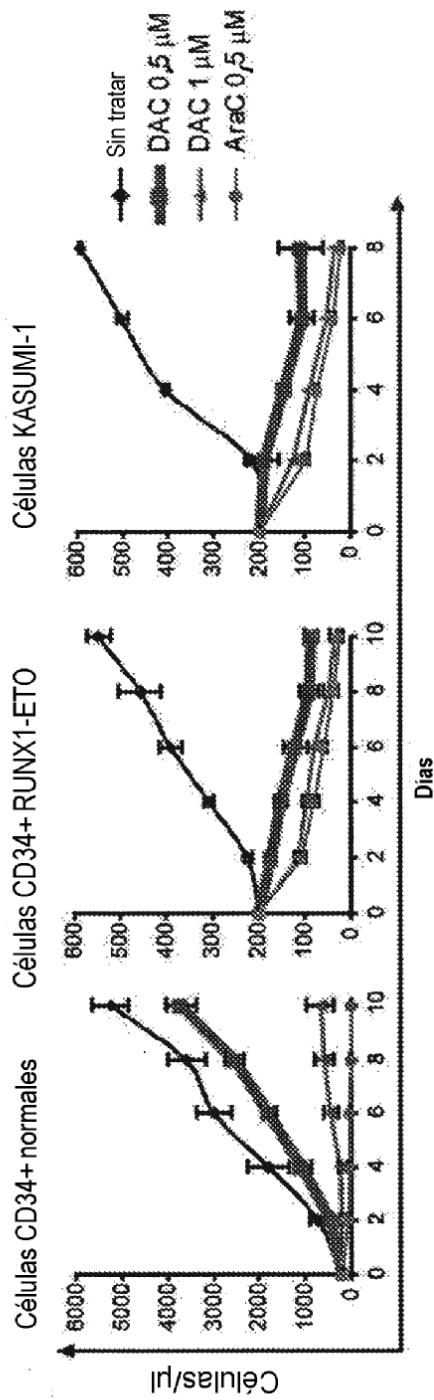


Fig. 2A

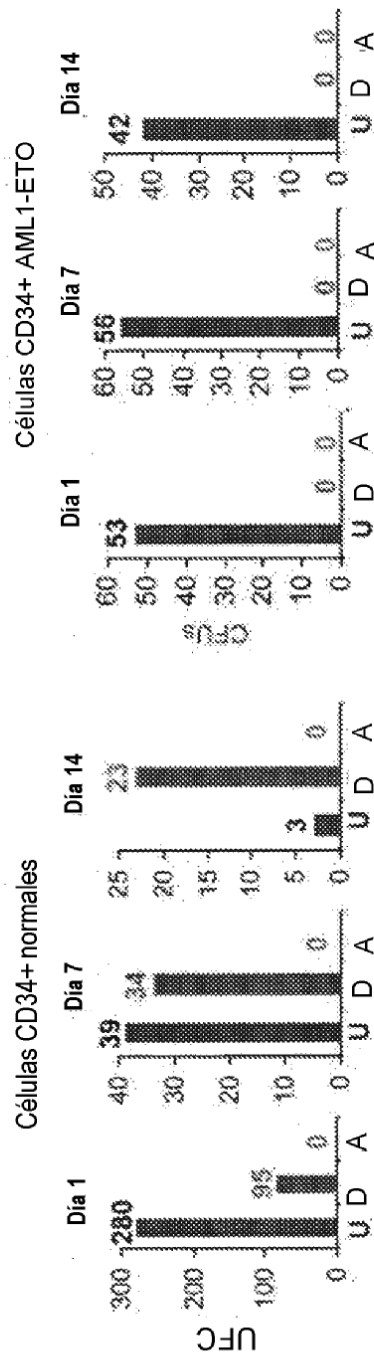


Fig. 2B

Nº Paciente	Tipo de FAB	Anomalias citogenéticas
Muestras sensibles		
9848	AML Sin	+8
4486	AML Sin especificar	-Y,(1;22) del(6)
2640	AML M1	del(5)
2714	AML M1	t(9;14)(10;11)
2066	AML M2	(8;21)
1897	AML M2	t(8;21)
4284	AML M4	inv(16)
5672	AML M5	add(8)
2730	AML M5	del(7)
2465	AML M6	Normal
9884	AML M8	add(8)
4252	AML M7	add(6) del(11) del(13) del(7)
Muestras resistentes		
3699	AML M1	inv(16)
3630	AML M4	-X,(8;21)

Fig. 3A

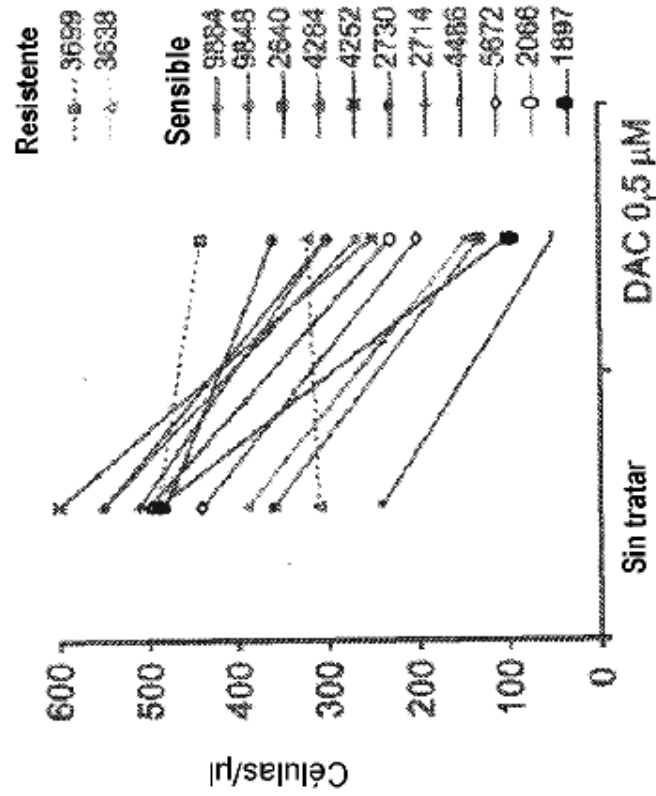


Fig. 3B

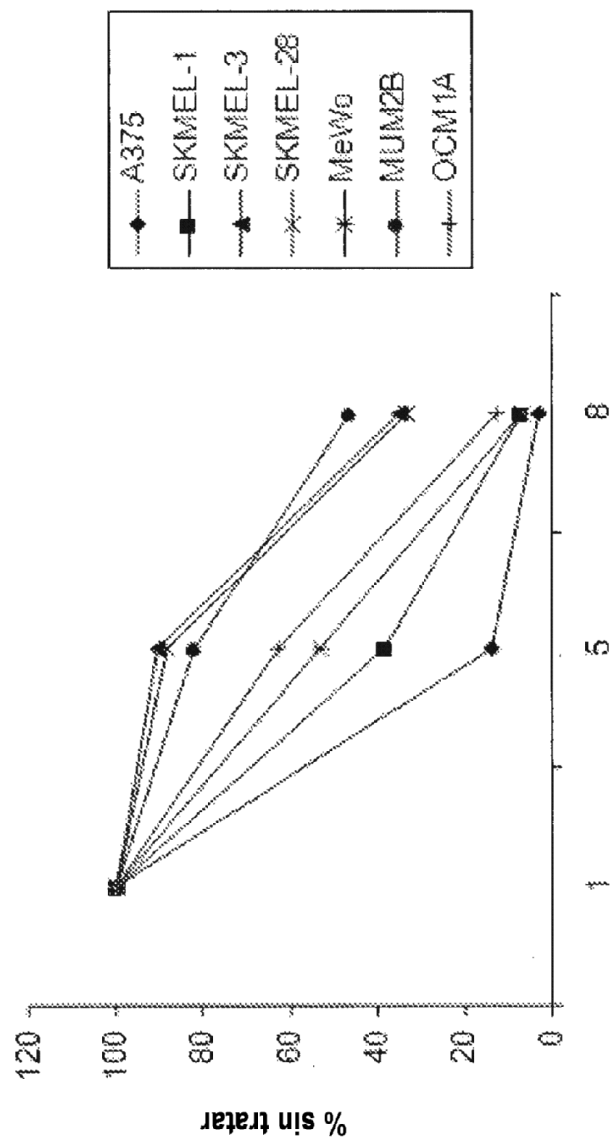


Fig. 4

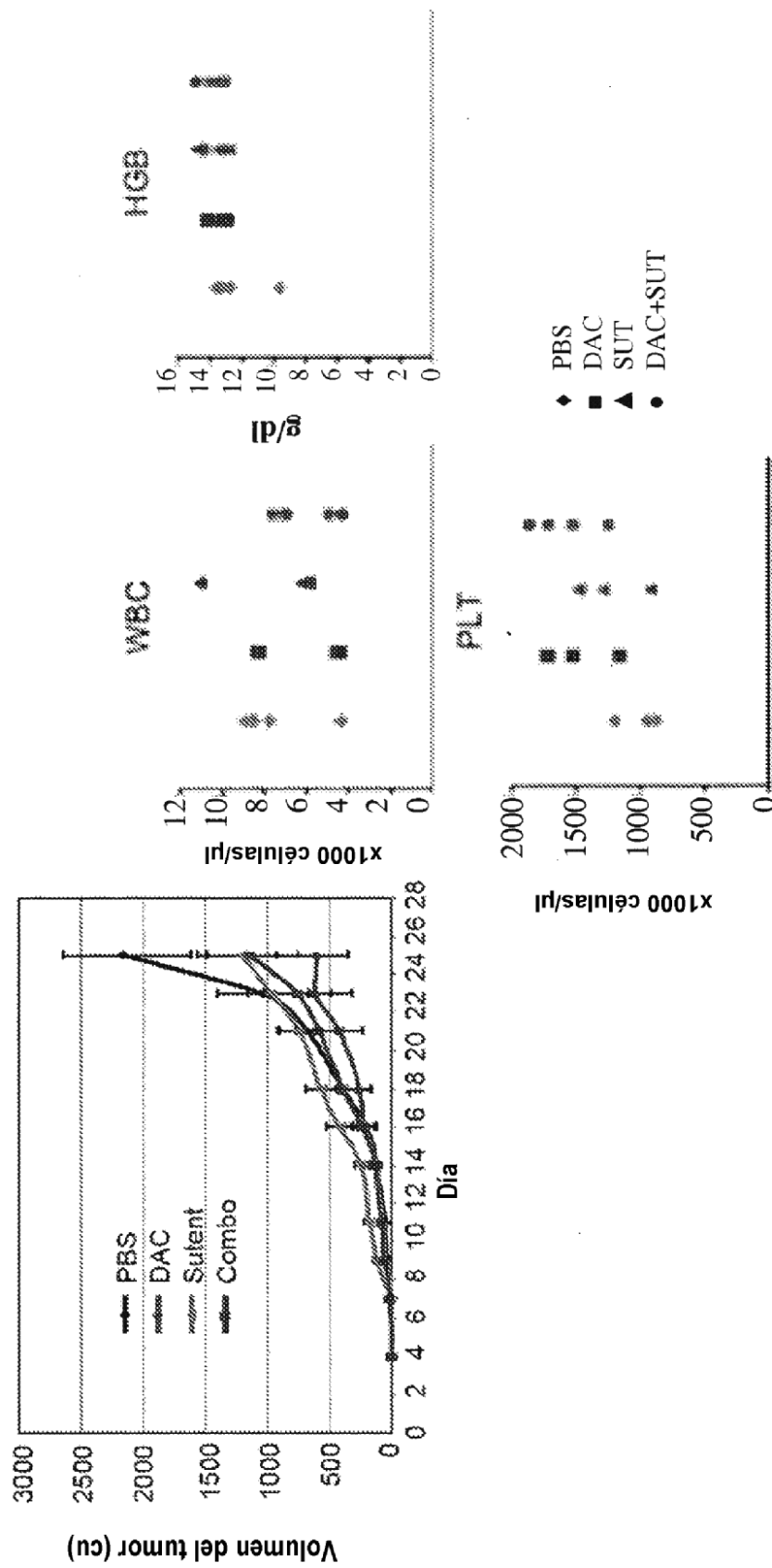


Fig. 5A

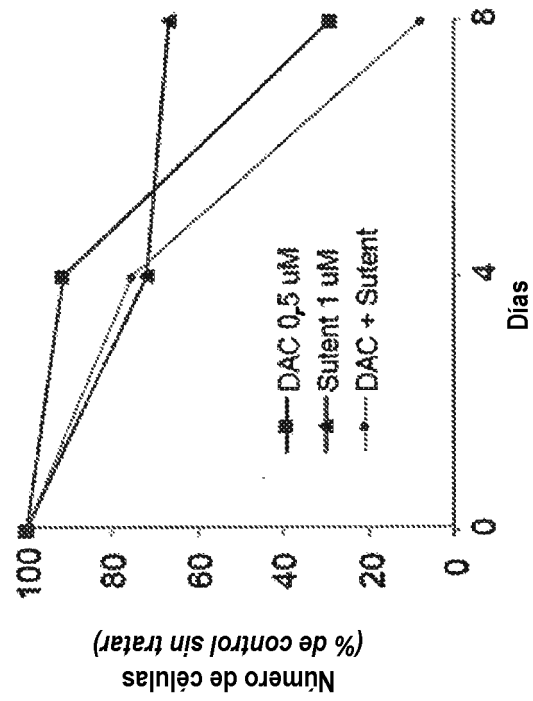


Fig. 5B

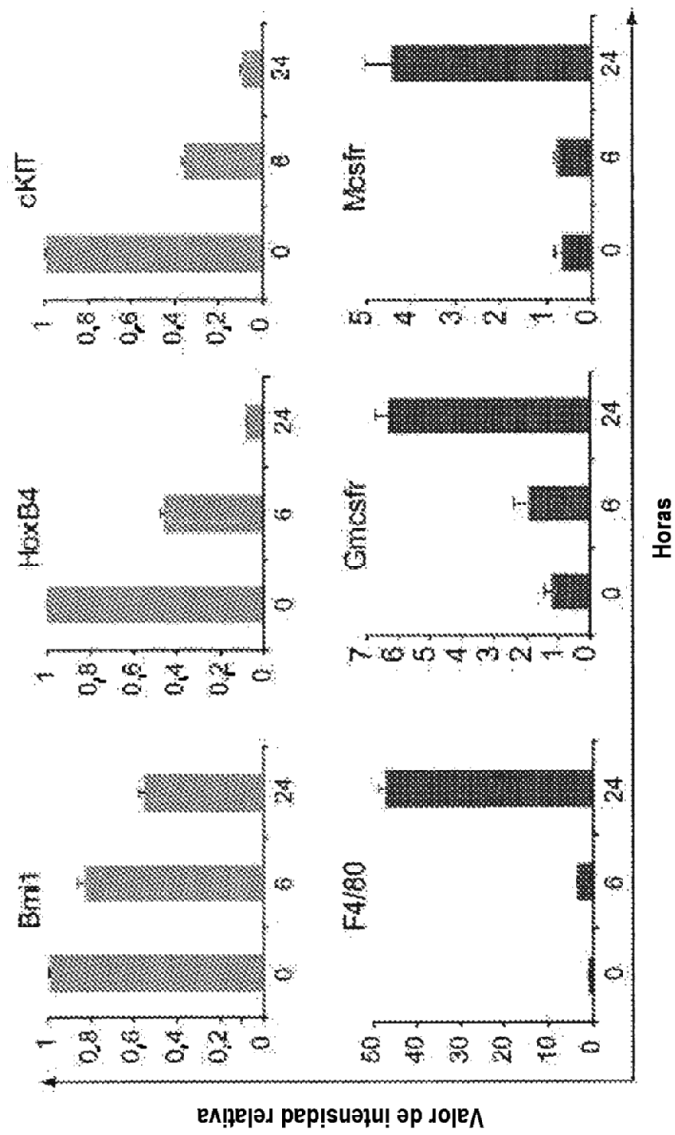


Fig. 6

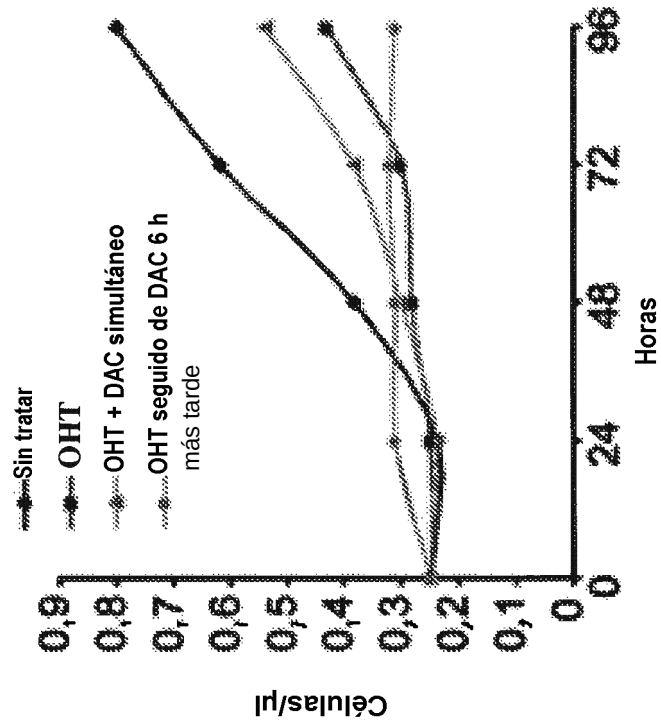


Fig. 7A

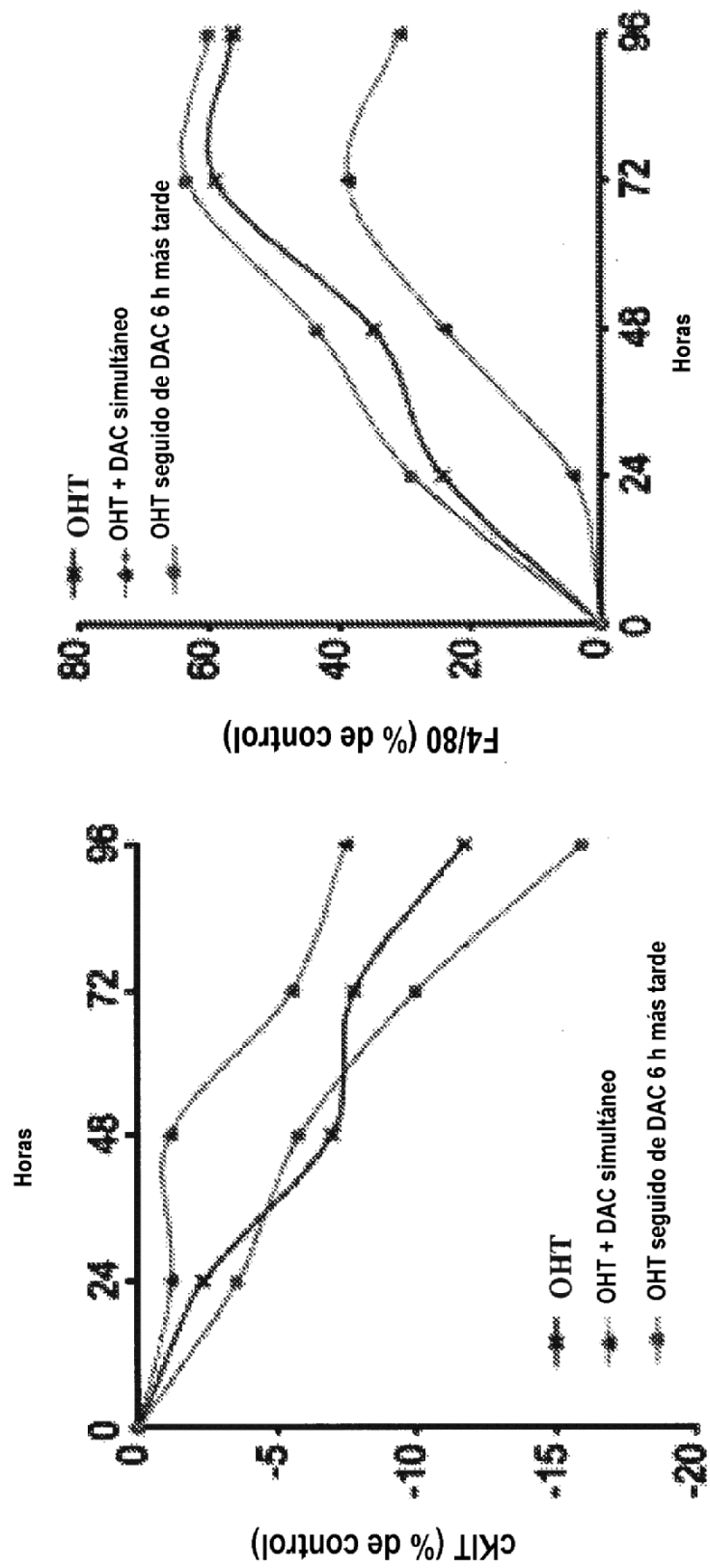


Fig. 7B

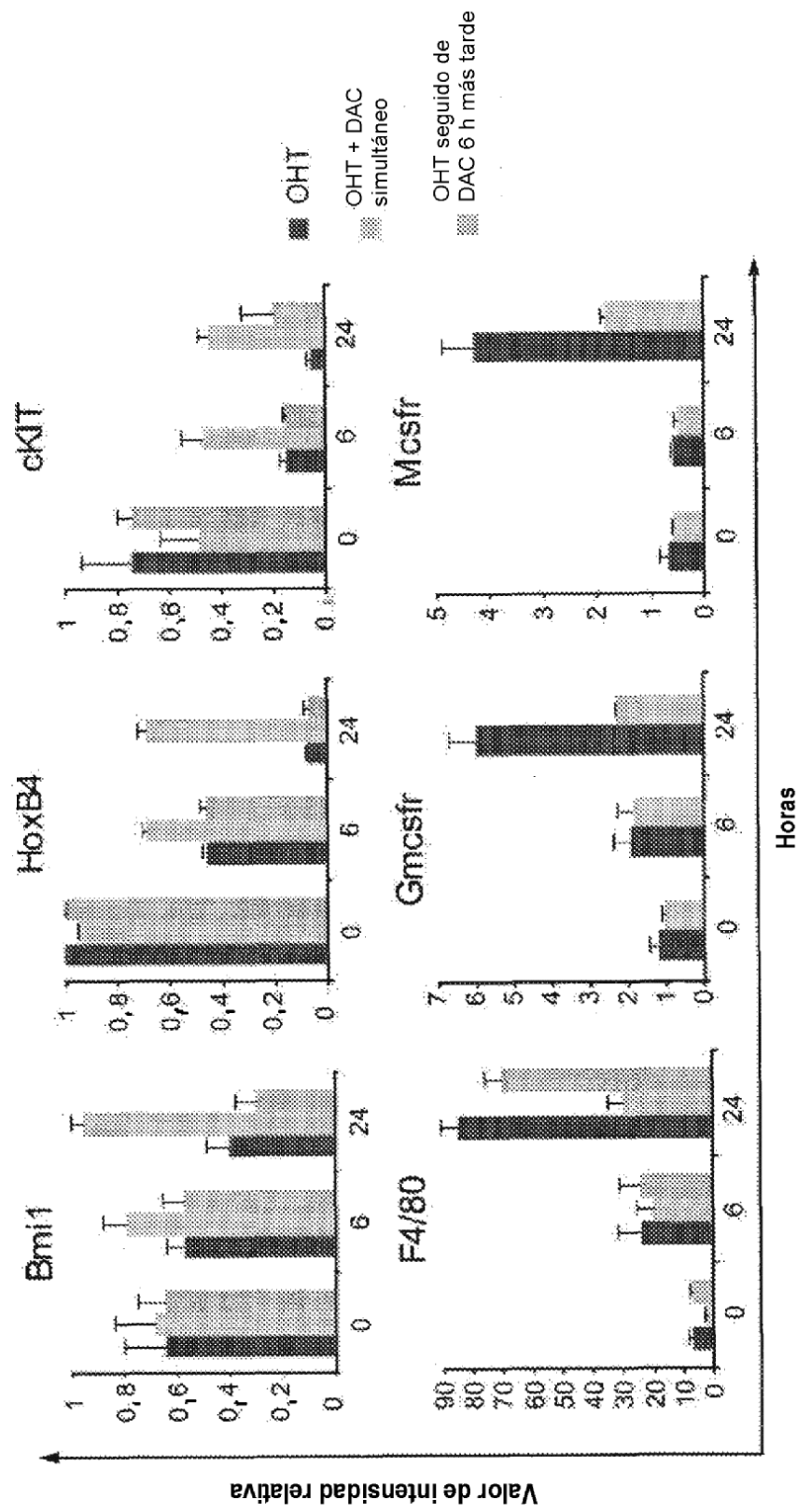


Fig. 7C

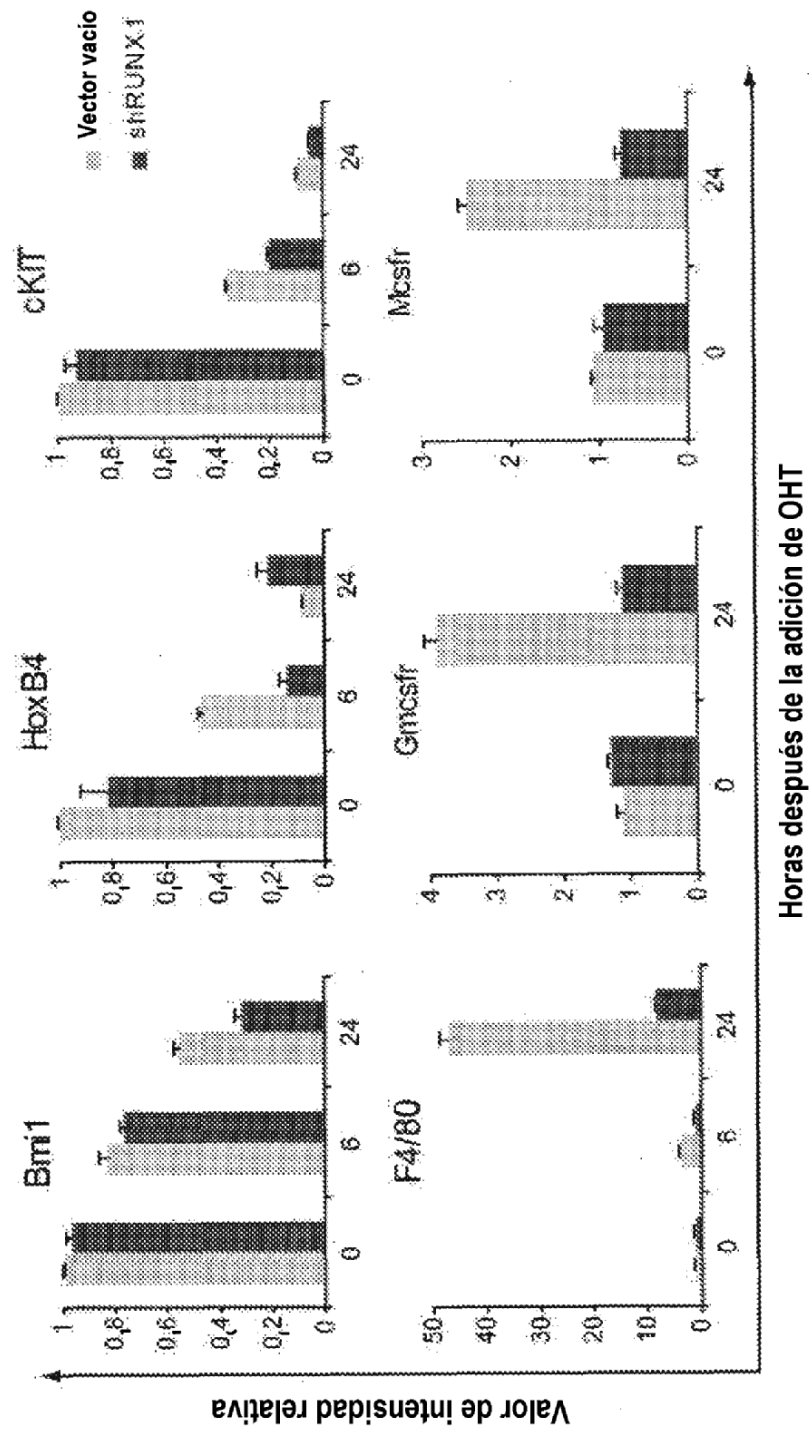


Fig. 8

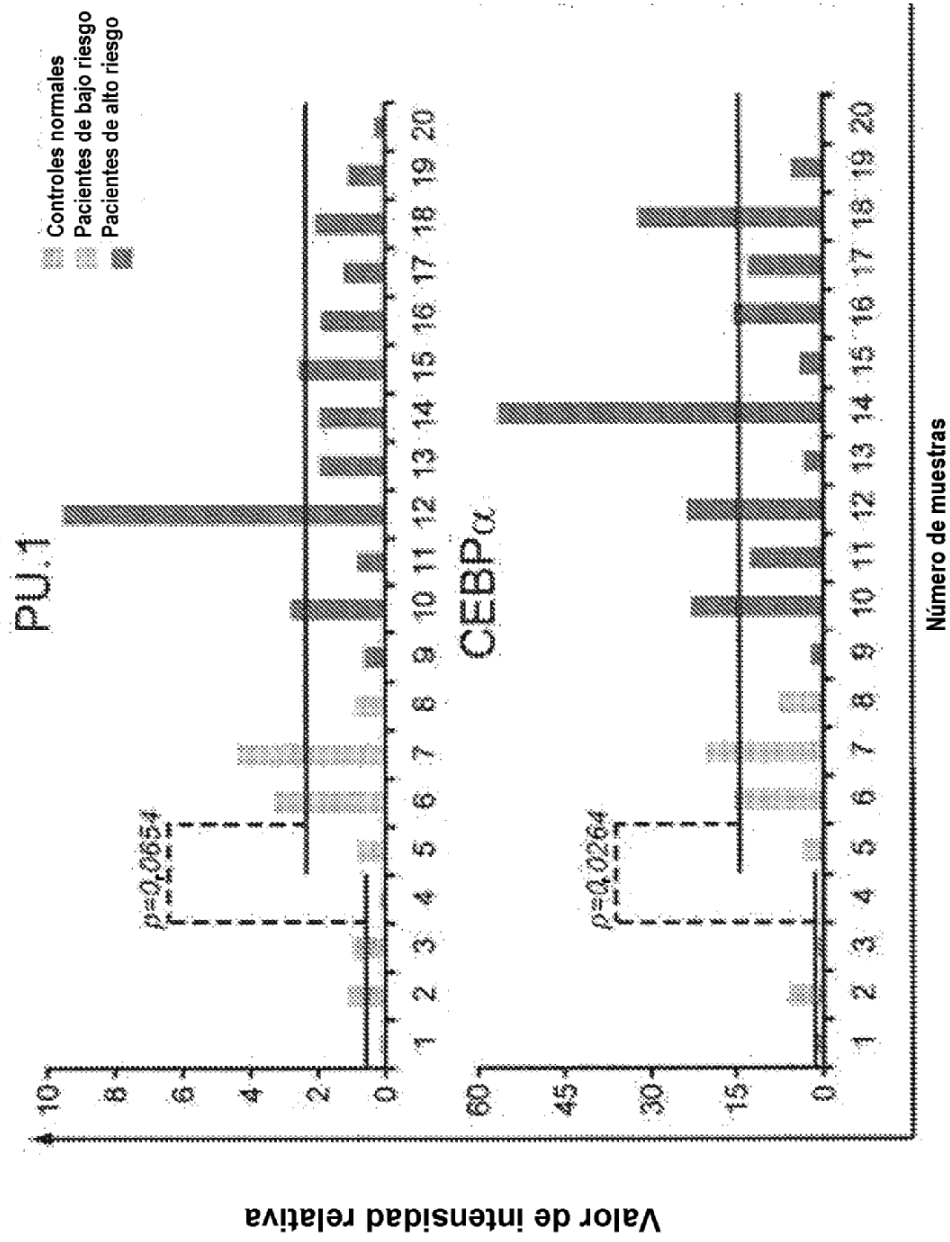


Fig. 9A (página 1)

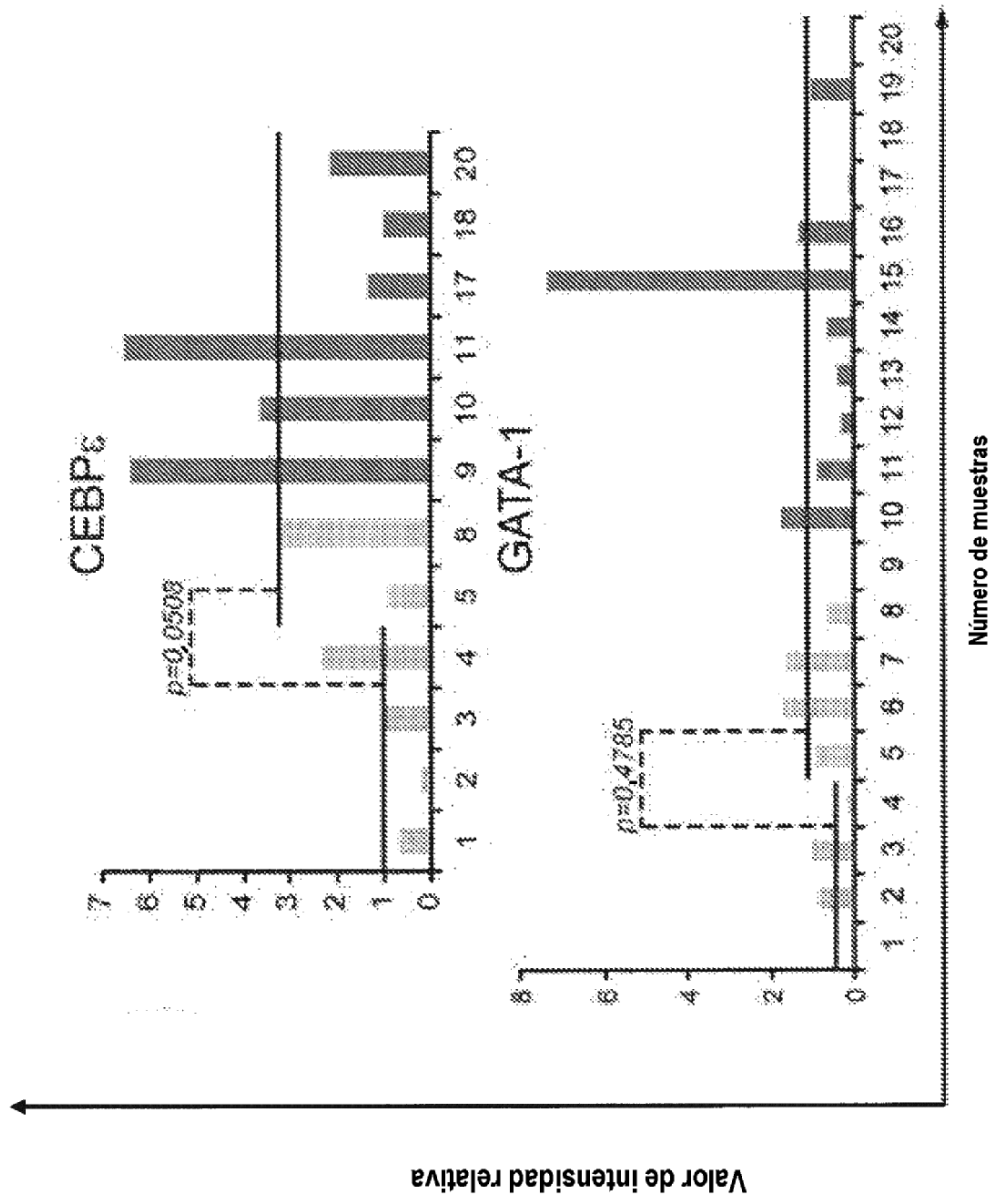


Fig. 9A (página 2)

Número de muestra	Tipo de la OMS	Anomalías citogenéticas
1	Normal	Normal
2	Normal	Normal
3	Normal	Normal
4	Normal	Normal
5	AML, sin especificar	+8, +19, +21
6	RCMD	Normal
7	Síndrome 5q-	5q-
8	AML, sin especificar	Normal
9	AML, M2	-Y
10	AML, sin especificar	Normal
11	AML, sin especificar	inv16
12	AML, M1	Normal
13	AML, sin especificar	Normal
14	AML, sin especificar	Normal
15	AML, sin especificar	Normal
16	AML, sin especificar	+8, +19, +21
17	AML, sin especificar	Normal
18	AML, M4	t(6, 11), +3, +8, +13, +14, +19, +21
19	AML, M5	Normal
20	AML, sin especificar	+21, +Y

Fig. 9B

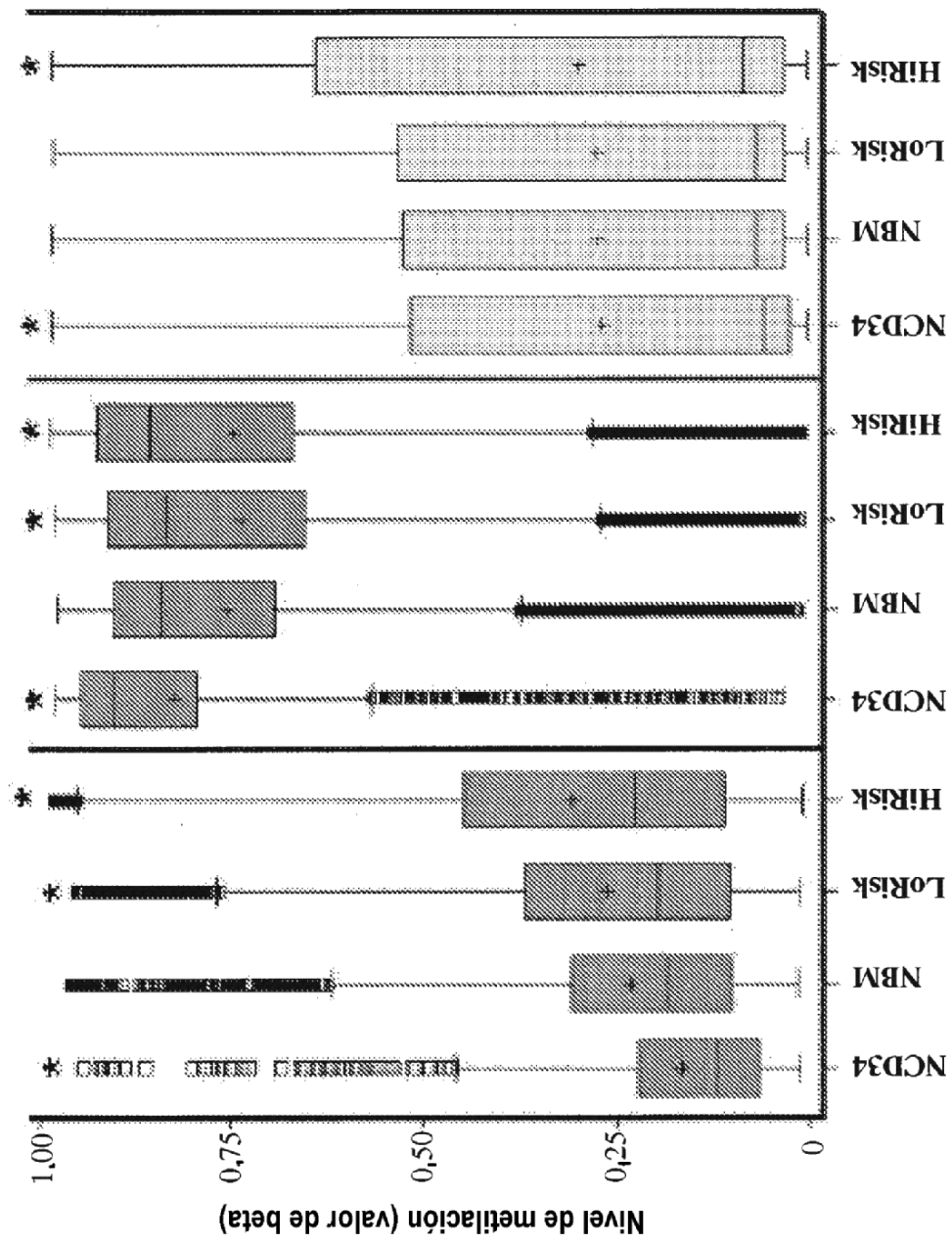


Fig. 9C

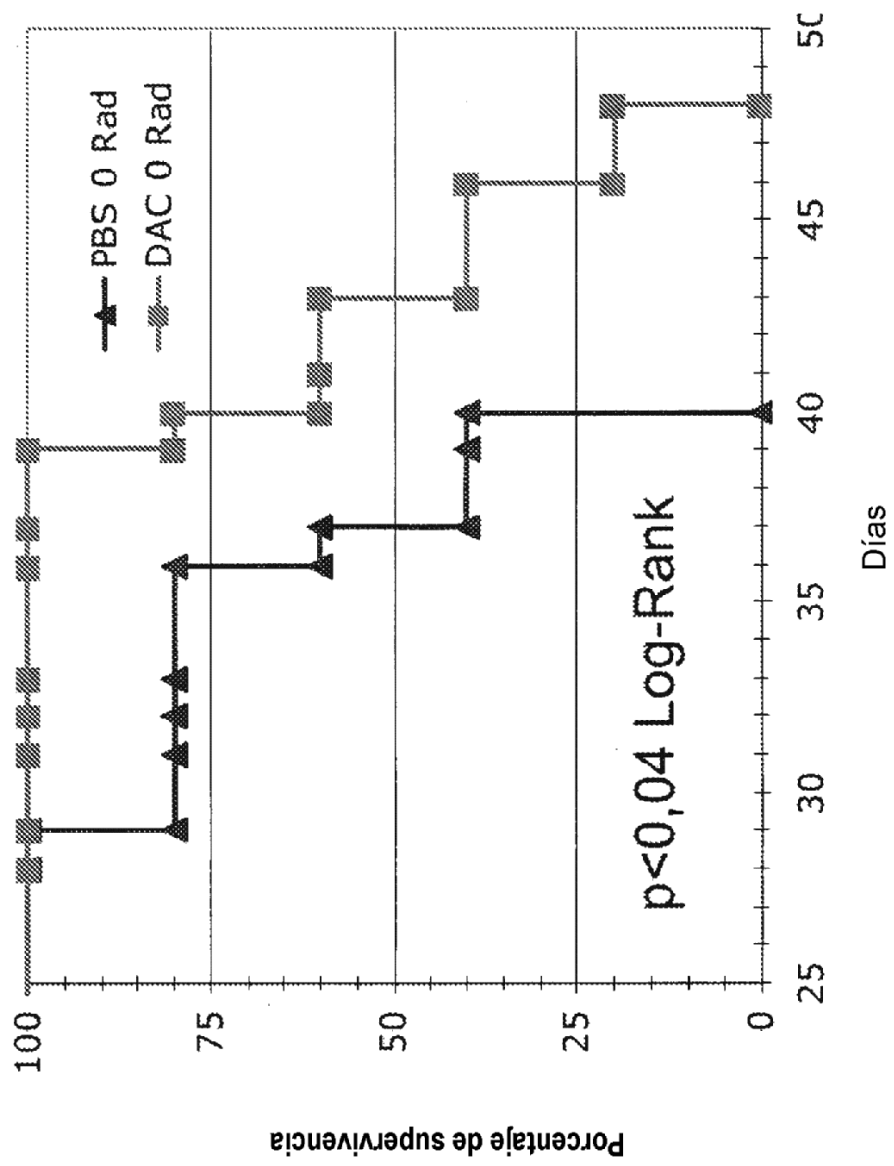


Fig. 10

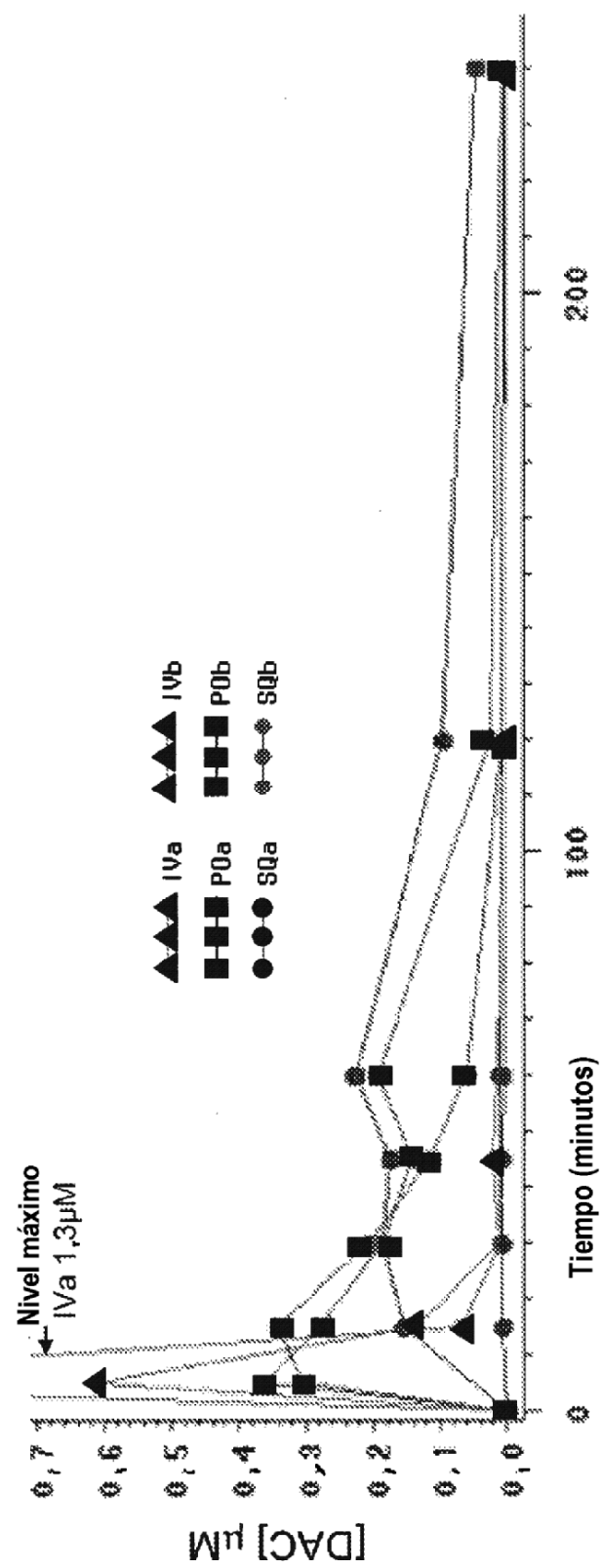


Fig. 11

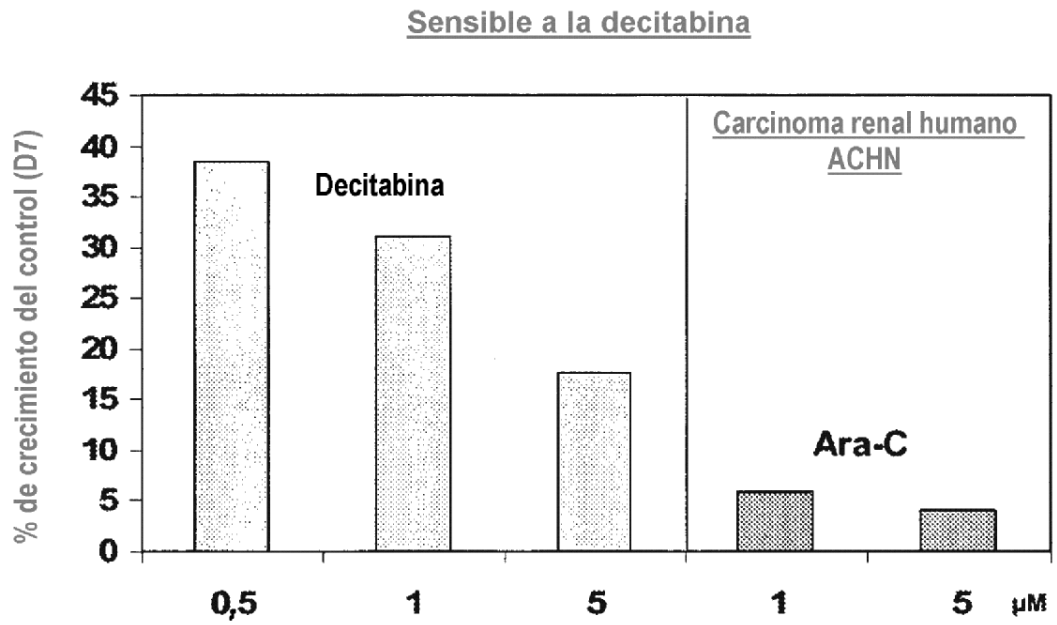


Fig. 12A

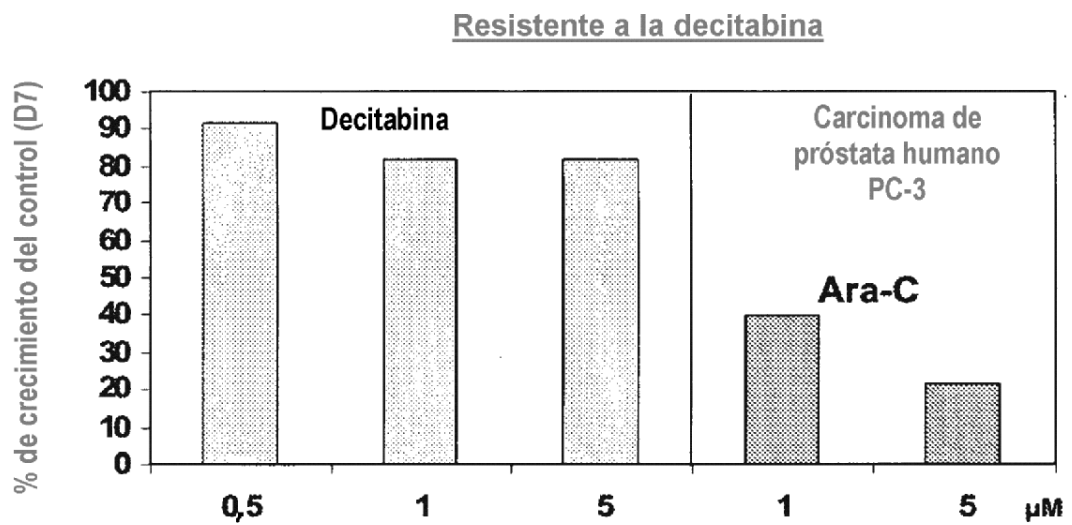


Fig. 12B

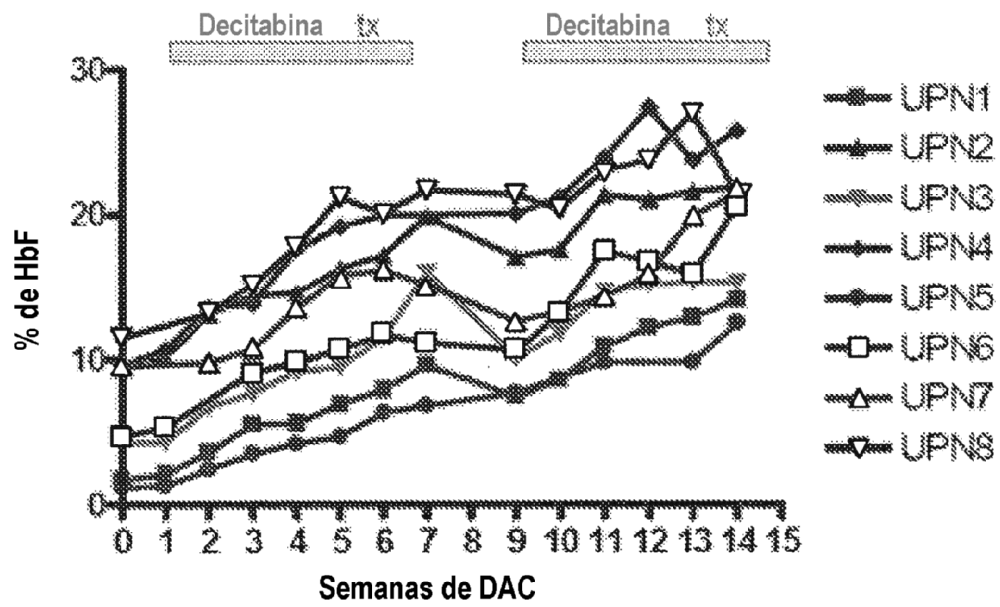


Fig. 13

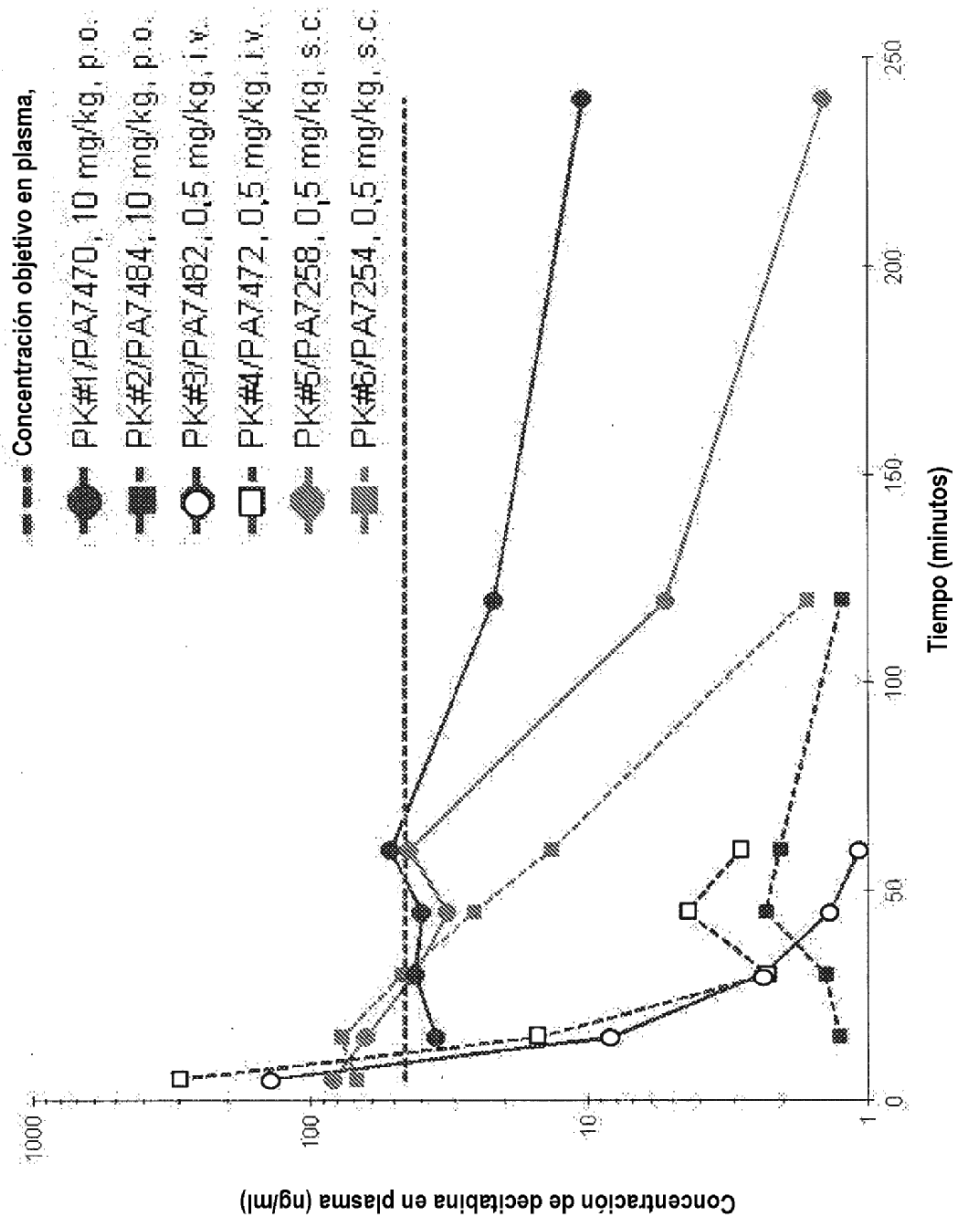


Fig. 14

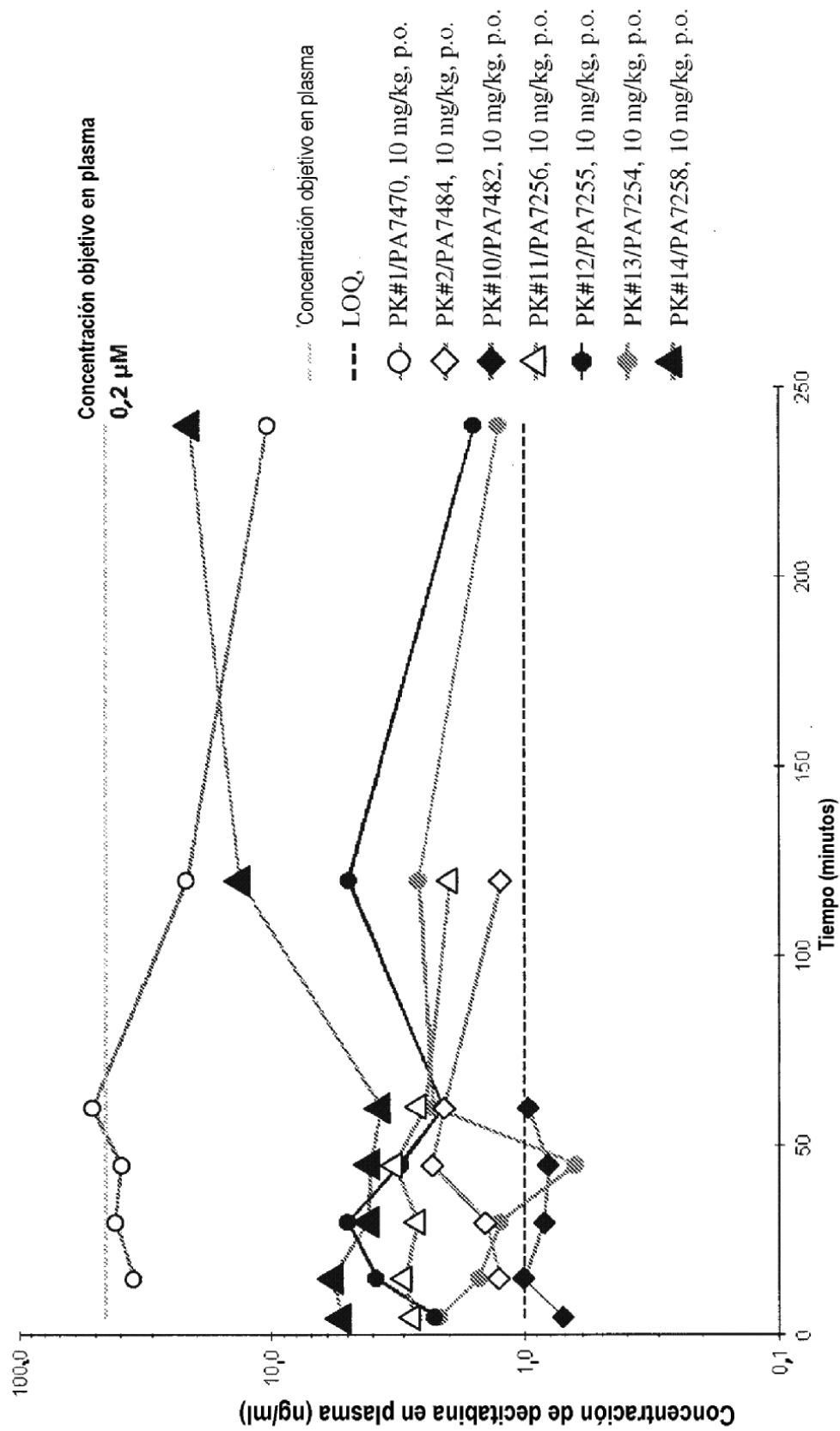


Fig. 15

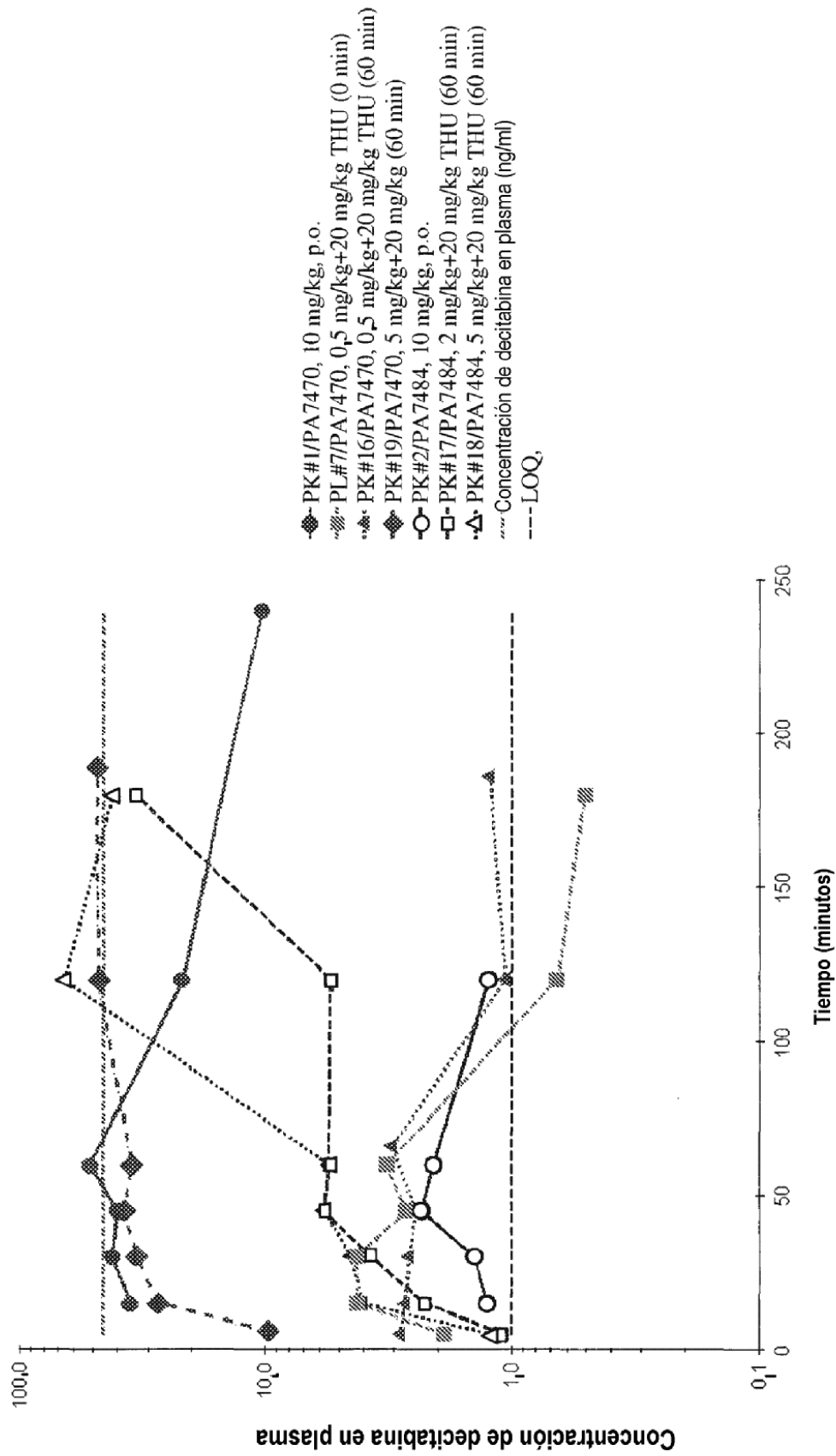


Fig. 16

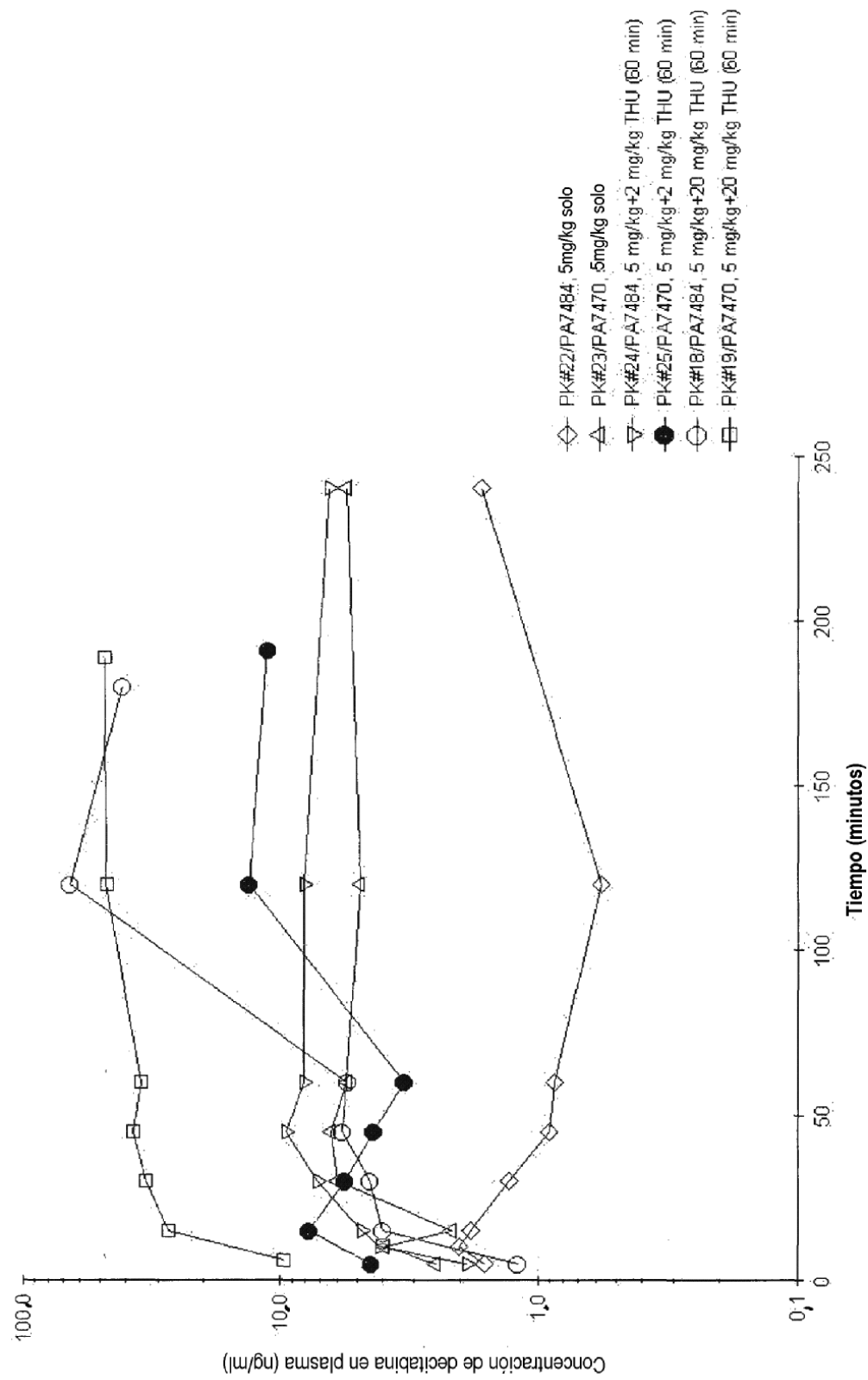


Fig. 17

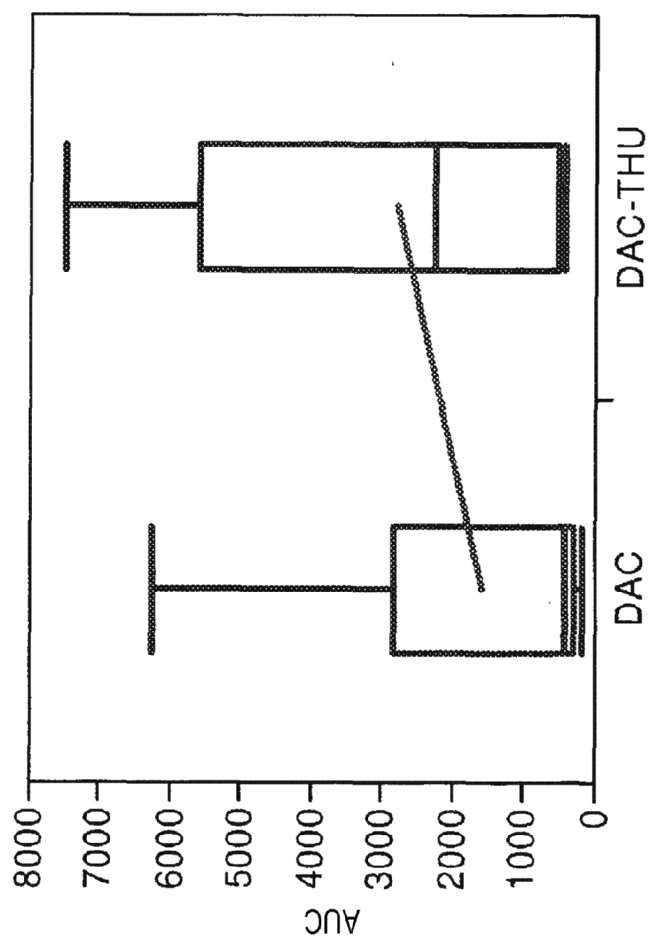


Fig. 18A

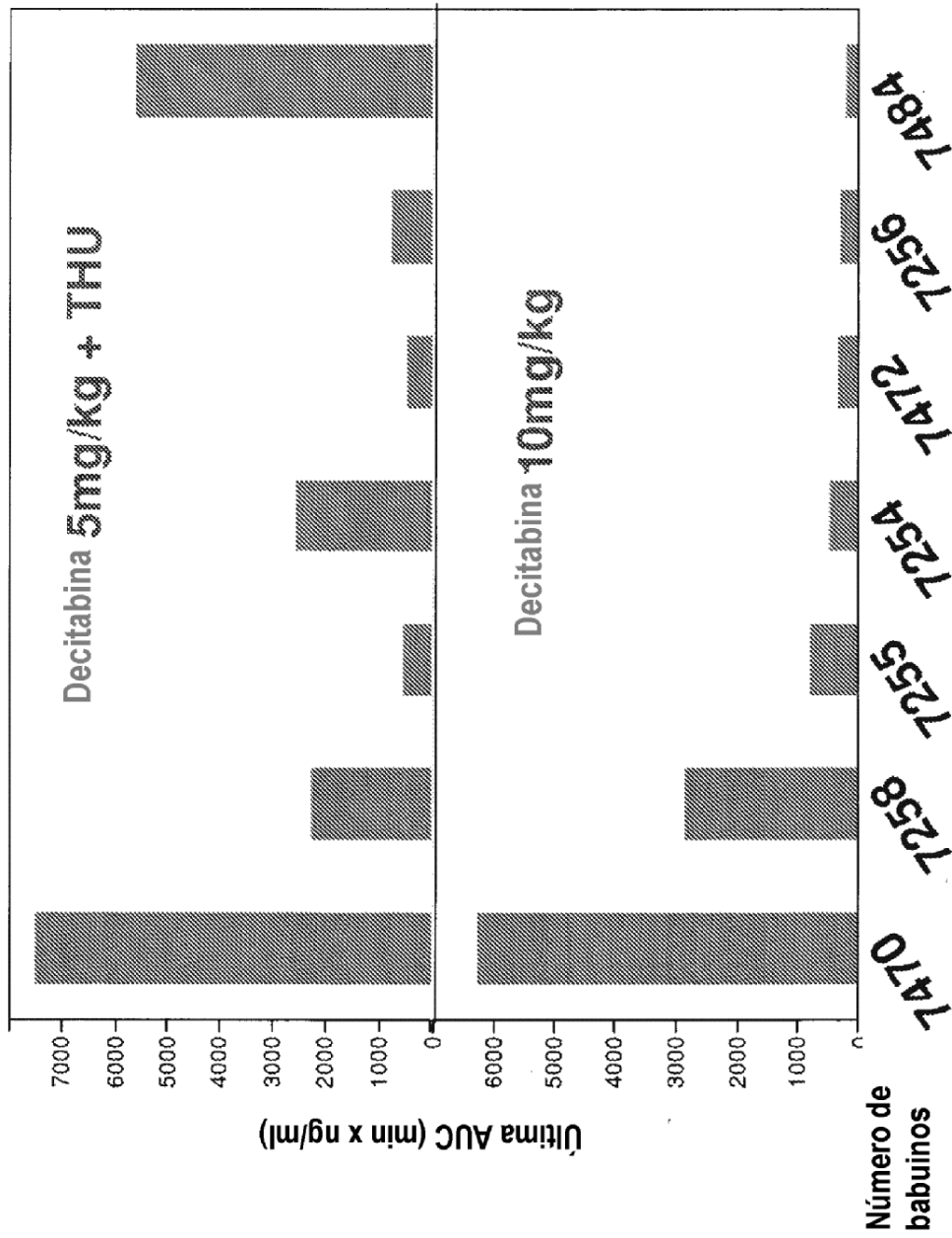


Fig. 18B