

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 310**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 31/404** (2006.01)  
**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61K 31/496** (2006.01)  
**A61K 31/5025** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/517** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/5377** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/IB2013/002583**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068397**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13821931 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2914250**

54 Título: **Combinación de un agente anticanceroso tal como un inhibidor de la tirosina cinasa y un antagonista STAT5, preferiblemente una tiazolidindiona, para eliminar las células madre de cáncer hematológico in vivo y para prevenir la recidiva de cáncer hematológico**

30 Prioridad:

**05.11.2012 US 201261722633 P**  
**15.03.2013 US 201361794367 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.05.2018**

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET  
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)  
25, Rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**PROST, STEPHANE;  
KIRSZENBAUM, MAREK;  
LE DANTEC, MIKAEL;  
ROUSSELOT, PHILIPPE y  
LEBOULCH, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 668 310 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

Combinación de un agente anticanceroso tal como un inhibidor de la tirosina cinasa y un antagonista STAT5, preferiblemente una tiazolidindiona, para eliminar las células madre de cáncer hematológico *in vivo* y para prevenir la  
5 recidiva de cáncer hematológico

## SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/722.633,  
10 presentada el 5 de noviembre de 2012 y 61/794.367, presentada el 15 de marzo 2013.

## ANTECEDENTES

Las células madre hematopoyéticas de médula ósea (HSC) se definen funcionalmente por su capacidad única de  
15 autorrenovación y de diferenciación para producir todos los tipos de células sanguíneas maduras. En general, el proceso de desarrollo de progenitores pluripotentes a células maduras con funciones específicas implica la pérdida progresiva del potencial de desarrollo de otros linajes. Este proceso se ha considerado lineal en el sentido de que una vez que una célula ha realizado una elección de desarrollo, no puede revertir. La célula linfoide restringida conocida más temprana en la médula ósea de ratón adulto es el progenitor de linfocitos común (CLP) y la célula  
20 mielode restringida más temprana conocida en la médula ósea de ratón adulto es el progenitor mielode común (CMP). Las células CD34<sup>+</sup> albergan virtualmente todo el potencial clonogénico *in vitro*; sin embargo, la población CD34<sup>+</sup> es heterogénea. Solo una pequeña fracción (1-10 %) de células CD34<sup>+</sup> que no expresan marcadores de linaje maduros (CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD56, CD11b, CD14 y CD15; Lin-) tiene potencial de desarrollo de múltiples linajes (linfoides y mieloides). La mayoría de las células CD34<sup>+</sup> (90-99 %) coexpresan el antígeno CD38, y  
25 este subconjunto contiene la mayoría de los progenitores restringidos por linaje. La desregulación de las rutas de autorrenovación, que normalmente están estrechamente reguladas en las HSC, se ha reconocido recientemente como un paso importante en la progresión de la leucemia.

Las hemopatías mieloides (mielógenas o no linfocíticas) incluyen la leucemia mielode aguda (AML) y las  
30 hemopatías crónicas denominadas enfermedades mielodisplásicas mieloproliferativas (MPD o CMP). La leucemia aguda se caracteriza por el rápido aumento de las células sanguíneas inmaduras y puede ocurrir en niños (ALL) y adultos jóvenes (AML). Las enfermedades mieloproliferativas (MPD) son un grupo heterogéneo de trastornos clónicos crónicos caracterizados por la proliferación celular de una o más líneas celulares hematológicas en la sangre periférica, distintas de la leucemia aguda. La proliferación lleva de meses a años para progresar y se  
35 distingue por la acumulación excesiva de células sanguíneas anormales relativamente maduras; dando como resultado un mayor número de granulocitos, glóbulos rojos y/o plaquetas en la sangre periférica. Las enfermedades mieloproliferativas incluyen: Leucemia mielógena crónica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis idiopática crónica (metaplasia mielode agnógena (AIM)), leucemia neutrofílica crónica (CNL), leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico (CEL/HES) y mastocitosis sistémica (SM). La enfermedad  
40 mieloproliferativa puede evolucionar a una de las otras afecciones mieloproliferativas, transformarse en leucemia aguda, o ambas.

Con la excepción de la leucemia mielode crónica (CML), la patogénesis molecular de la mayoría de los trastornos mieloproliferativos crónicos (CMPD) no se comprende bien y la mayoría de los casos de CMPD tienen un cariotipo  
45 normal o aneuploide. Sin embargo, CML y algunos CMPD están asociados con la activación de proteínas tirosina cinasas (PTK) de membrana o citoplasmáticas por mutación puntual o translocación cromosómica de los genes *KIT*, *FLT3* y *JAK2* respectivamente o los genes *ABL*, *PDGFR*, *15 FGFRI* y *FGFR3* respectivamente. La leucemia mielógena crónica se caracteriza por una translocación recíproca t(9; 22)(q34; q11) (der22 o cromosoma Ph+) y expresión de la proteína de fusión BCR-ABL. La actividad de la tirosina cinasa citoplasmática desregulada de BCR-  
50 ABL es responsable del fenotipo leucémico. La proteína BCR-ABL se denomina p185<sup>bcr-abl</sup> o p210<sup>bcr-abl</sup>, dependiendo de la inclusión del segundo exón de BCR. p185<sup>bcr-abl</sup> causa leucemia aguda, típicamente linfoblástica; p210<sup>bcr-abl</sup> generalmente causa CML que puede progresar a una crisis blástica mielode o linfoide. En policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis, la lesión genética prevalente parece ser una sustitución de valina a fenilalanina en la posición de aminoácido 617 (V617F) en el gen Janus cinasa 2 (*JAK2*). La AML y la mastocitosis  
55 sistémica se han relacionado con la mutación D816 del gen *KIT*. Las fusiones BCR-PDGFR $\alpha$  o F1P1L1-PDGFR $\alpha$  se han identificado en pacientes con síndrome hipereosinofílico.

Imatinib, una molécula de 2-fenilaminopirimidina, ocupa el sitio de unión a ATP e inhibe la fosforilación de tirosina de ABL, c-KIT y PDGFR $\alpha$ . El mesilato de Imatinib (STI571, Gleevec o Glivec) fue el primer inhibidor de tirosina cinasa

(TKI) dirigido contra BCR-ABL que se probó con éxito *in vivo* y ahora es el estándar de oro para el tratamiento de CML *de novo* en fase crónica (O'Brien et al., N. Engl. J. Med., 2003, 348, 994-1004; Druker et al, N. Engl. J. Med., 2006, 355, 2408-2417). La notable eficacia de imatinib no ha logrado, sin embargo, erradicar este trastorno, y la enfermedad de CML residual sigue siendo detectable por PCR para la mayoría de los pacientes. Incluso en 5 pacientes con remisión molecular completa (CMR) durante más de dos años, se observan recaídas moleculares en 6 meses en la mitad de los pacientes (Rousselot et al., Blood, 2007 Jan 1; 109(1):58-60. Epub 2006 Sep 14).

Imatinib inhibe la actividad de tirosina cinasa de BCR-ABL y erradica el grupo proliferante de células de CML sin ser activo en células inactivas de CML.

10

Estudios recientes han identificado una población de células madre primitivas, inactivas, raras (LSC) en todos los pacientes con CML, ya sean derivadas de sangre periférica o de médula ósea. Estas células madre son predominantemente Ph+, expresan altos niveles de CD34<sup>+</sup> pero carecen de los marcadores CD38, CD45RA o CD71, y pueden salir espontáneamente G<sup>0</sup> para entrar en un estado de proliferación continua, para producir la progenie 15 Ph+ (Graham et al., Blood, 2002, 99, 319-325; Barnes et al., Cell cycle, 2006, 5, 2862-2866). Estas células presentan un nivel excepcionalmente alto de insensibilidad inherente a los agentes quimioterapéuticos convencionales, incluido el mesilato de imatinib. Dicha insensibilidad es distinta de la resistencia adquirida, después de la exposición crónica al fármaco por lo que la resistencia a imatinib está mediada frecuentemente por la selección de subclones que contienen BCR-ABL con mutaciones puntuales en el dominio ABL-cinasa. Otros mecanismos que han estado 20 implicados en la resistencia clínica (resistencia adquirida o resistencia secundaria) a imatinib incluyen la sobreexpresión de BCR-ABL, la amplificación del oncogén *BCR-ABL* y la mejora del eflujo del fármaco.

Esta insensibilidad o resistencia inherente al tratamiento farmacológico tiene implicaciones importantes para la gestión clínica de CML-, particularmente con respecto a la recaída después de una remisión inducida por imatinib. 25 Sin embargo, contrariamente a la resistencia adquirida al imatinib, no se conocen los mecanismos moleculares responsables de la insensibilidad de las células madre inactivas de CML. Por lo tanto, no existen dianas moleculares obvias y no se pueden hacer elecciones racionales con respecto a qué agentes combinar con imatinib para dirigirse a las células madre inactivas de CML. Se han usado varios enfoques para tratar de mejorar la eficacia de imatinib; exposición intermitente al factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y vacunación con péptidos T 30 capaces de inducir una respuesta citotóxica de linfocitos T específica. Por consiguiente, se necesitan terapias mejoradas para prevenir la recidiva del cáncer hematológico.

## RESUMEN

35 La presente invención proporciona métodos para reducir o eliminar células madre de cáncer hematológico *in vivo*, y prevenir de este modo una recidiva, mediante la administración conjunta de un agente anticanceroso (por ejemplo, un TKI), seguido de un antagonista transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5), que es un agonista de PPAR $\gamma$ , que, a su vez, regula negativamente HIF 2a.

40 En un aspecto, la invención proporciona un método para eliminar células madre de cáncer hematológico *in vivo* que comprende: (A) administrar a un paciente con cáncer hematológico, una cantidad eficaz de un agente anticanceroso; y (B) administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista transductor de señal y activador de transcripción 5 (STAT5) como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención proporciona un método para 45 prevenir la recidiva de cáncer hematológico en un paciente que comprende: (A) administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente anticanceroso; y (B) administrar al paciente una cantidad efectiva de un antagonista STAT5 como se define en las reivindicaciones. Cada uno de los aspectos anteriores de la invención puede incluir una o más de las siguientes realizaciones.

En algunas realizaciones, el agente anticanceroso (por ejemplo, TKI) se administra antes del antagonista STAT5 50 (por ejemplo, compuesto de tiazolidindiona), hasta que se consigue una incidencia acumulativa estable de respuesta en el paciente. En ciertas realizaciones, la respuesta se selecciona del grupo que consiste en remisión hematológica completa (CHR), remisión citológica mayor (MCR), remisión citológica completa (CCR), remisión molecular mayor (MMR) y remisión molecular completa (CMR). En diversas realizaciones, el agente anticanceroso se administra durante al menos 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 o 33 meses o más antes de la administración del antagonista 55 STAT5.

En otras realizaciones, el antagonista STAT5 se administra (después del transcurso inicial del tratamiento con el agente anticanceroso) durante al menos 2, 4, 6, 8, 10 o 12 meses, o cualquier intervalo entre ellos (por ejemplo, 2-12 o 2-6 meses o más), al mismo tiempo que el agente anticanceroso. La administración del agente anticanceroso

5 puede continuar después de que finalice la administración del antagonista STAT5 (ya sea que haya finalizado temporal o permanentemente). En diversas realizaciones, la administración del agente anticanceroso continúa durante 2-12 meses o más (incluso de por vida), según sea necesario para mantener la remisión completa (por ejemplo, CMR). En otras realizaciones, el agente anticanceroso se suspende permanentemente una vez que se logra una remisión clínicamente completa en el paciente. De acuerdo con la invención, el antagonista STAT5 es un agonista de receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ). En una realización particular, el antagonista STAT5 es un compuesto de tiazolidindiona, tal como un compuesto de glitazona (por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona, troglitazona, englitazona, ciglitazona o netoglitazona). En una realización específica, el compuesto de tiazolidindiona es pioglitazona. Los antagonistas STAT5 empleados en la invención sirven para 10 suprimir la expresión del factor de transcripción, HIF 2a, permitiendo que las células madre inactivas (LSC) proliferen y potenciando el efecto de los productos terapéuticos anticancerosos, tales como TKI.

15 En otras diversas realizaciones, el paciente tiene leucemia. En realizaciones particulares, el paciente tiene leucemia mieloide crónica (CML) o leucemia mieloide aguda.

En realizaciones adicionales, el agente anticanceroso es un inhibidor de tirosina cinasa (TKI). En realizaciones particulares, el TKI se selecciona del grupo que consiste en imatinib, gefitinib, erlotinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, quizartinib y sunitinib. En una realización específica, el TKI es imatinib.

20 En ciertas realizaciones, el antagonista STAT5 se administra a una dosis de aproximadamente 15-60 mg/día (por ejemplo, aproximadamente 30-50 mg/día o dentro de otro intervalo de toxicidad tolerada). Por ejemplo, el antagonista STAT5 se puede administrar a una dosis de aproximadamente 30 mg/día durante 2 meses y aproximadamente 45 mg/día. En otras realizaciones, el agente anticanceroso se administra a una dosis de aproximadamente 300-800 mg/día (por ejemplo, aproximadamente 300-400 mg/día).

25 En una realización particular, el cáncer hematológico es un cáncer mieloide (por ejemplo, CML), el compuesto de tiazolidindiona es pioglitazona y el TKI es imatinib. El TKI se administra preferiblemente hasta que se logra una incidencia acumulativa estable de respuesta en el paciente, seguido de la administración de pioglitazona hasta que se logra una respuesta molecular completa (CMR). En una realización, el TKI (por ejemplo, imatinib) se administra a 30 aproximadamente 300-400 mg/día y la tiazolidindiona (por ejemplo, pioglitazona) se administra a aproximadamente 30-50 mg/día.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1 (a)-(d)** muestra los efectos diferenciales y sinérgicos de la pioglitazona y el imatinib en las células de CML.

40 La **Figura 2 (a)-(e)** muestra la purga de células madre de CML inactivas (LSC) mediante pioglitazona.

La **Figura 3 (a)-(f)** muestra la ruta PPAR $\gamma$ -STAT5 como diana de pioglitazona en LSC de CML.

La **Figura 4** muestra la CMR inducida por pioglitazona en pacientes con CML y el mantenimiento después de la abstinencia del fármaco.

45 La **Figura 5 (a)-(c)** muestra la especificidad de la acción del antagonista STAT5 en células que expresan BCR-ABL a través de PPAR $\gamma$ .

La **Figura 6 (a)-(b)** muestra la expresión de genes diana en células CP-CML en respuesta a la combinación de pioglitazona e imatinib.

La **Figura 7** muestra la incidencia acumulada de respuesta (CIR) después del tratamiento con 400 mg/día de imatinib oral.

50 La **Figura 8** muestra la especificidad de la acción antagonista STAT5 en células que expresan BCR-ABL (CD34<sup>+</sup>) en la expresión de HIF 1a y HIF 2a.

La **Figura 9** muestra la purga de células madre de CML inactivas (LSC) por supresión de HIF2a.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que las células madre de cáncer inactivas (por ejemplo, células madre de leucemia mieloide) dependen en gran medida de ("son adictas" a) STAT5 y, por lo tanto, pueden dirigirse selectivamente y erradicarse por regulando negativamente STAT5, particularmente durante o después de la quimioterapia convencional.

Dado que las células madre inactivas a menudo son responsables de la recaída y son resistentes a las quimioterapias estándar, la invención proporciona un método dirigido eficaz para prevenir la recidiva del cáncer. Como se demuestra en el presente documento, la administración a pacientes de leucemia de inhibidores de STAT5 (por ejemplo, agonistas de PPAR $\gamma$ , tales como glitazonas), después de quimioterapia estándar (por ejemplo, administración de agentes anticancerosos), da como resultado una remisión sostenida a largo plazo incluso a niveles indetectables. Además, la dependencia significativa de las células madre inactivas en STAT5 permite la administración del inhibidor de STAT5 a niveles que son tolerados por los pacientes. Antes de la presente invención, esto no se hubiera considerado posible, ya que se habría considerado necesario haber administrado dosis altas del inhibidor suficientes para erradicar la mayoría de las células madre en un paciente, incluso células madre normales que no son adictas a STAT5 (de manera no selectiva).

### Definiciones

15 Como se usa en el presente documento, "paciente" se refiere a un paciente con cáncer humano.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a un tratamiento que produce un efecto beneficioso, por ejemplo, mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno. Un efecto beneficioso puede adoptar la forma de una mejora con respecto al valor inicial, es decir, una mejora con respecto a una medición u observación realizada antes del inicio de la terapia de acuerdo con el método. Un efecto beneficioso también puede adoptar la forma de detención, prevención, erradicación, reducción, ralentización, retardo o estabilización de una progresión perjudicial de un marcador de cáncer. Por ejemplo, el tratamiento puede referirse a la reducción de la actividad clonogénica de las células madre de cáncer hematológico. El tratamiento también puede referirse a inhibir el crecimiento de células BCR-ABL positivas. El tratamiento puede referirse además a la inducción de un defecto clonogénico y/o proliferativo en las células madre de cáncer hematológico. El tratamiento también puede referirse a la regulación negativa de la actividad de STAT5 en células madre de cáncer hematológico. El tratamiento puede referirse además a lograr una respuesta molecular mayor (MMR), respuesta molecular completa (CMR) o una respuesta citológica completa (CCR) en un paciente con cáncer hematológico.

30 Como se usa en el presente documento, "cáncer hematológico" se refiere a cáncer que afecta a la sangre, a la médula ósea y a los ganglios linfáticos. En ciertas realizaciones, el cáncer puede derivar de cualquiera de los dos linajes principales de células sanguíneas: líneas celulares mieloides y linfoides. En algunas realizaciones, el cáncer hematológico incluye cáncer mielóide. En diversas realizaciones, el cáncer mielóide puede incluir cáncer mielóide crónico (CML) y cáncer mielóide agudo (ACL).

35 Como se usa en el presente documento, "células madre" se refieren a células madre de cáncer (CSC) o células cancerosas que se encuentran en cánceres hematológicos que poseen características asociadas con células madre normales. Por ejemplo, la capacidad de dar lugar a todos los tipos celulares encontrados en una muestra de cáncer particular. Las CSC son células tumorigénicas (formadoras de tumores). En algunas realizaciones, las CSC pueden generar tumores a través de los procesos de células madre de autorrenovación y diferenciación en múltiples tipos de células. En ciertas realizaciones, dichas células pueden persistir en los tumores como una población distinta y causar recidiva y metástasis dando lugar a nuevos tumores.

45 Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de uno o más agentes que da como resultado una incidencia acumulativa estable de respuesta en un paciente. Se puede lograr una incidencia acumulativa estable de respuesta, por ejemplo, en forma de una remisión hematológica completa (CHR) estable, remisión citológica mayor (MCR) o (MCyR), remisión citológica completa (CCR) o (CCyR), remisión molecular mayor (MMR) o remisión molecular completa (CMR) en un paciente con cáncer hematológico. En una realización particular, se logra una incidencia acumulativa estable de respuesta con respecto a MCR o CCR cuando los valores de las metafases del cromosoma Filadelfia (Ph-positivo) medidos en múltiples exámenes consecutivos de médula ósea durante un período de 6 meses no varían más del 20 %. En otra realización, se logra una incidencia acumulativa estable de respuesta con respecto a MMR o CMR cuando los niveles de transcripción de BCR-ABL medidos, por ejemplo, usando PCR cuantitativa en tiempo real, en múltiples exámenes consecutivos durante un período de 6 meses no varían más del 20 %. La **Figura 7** representa la incidencia acumulativa de respuesta (CIR) después del tratamiento con 400 mg/día de imatinib oral. Se logra una incidencia acumulativa estable de respuesta, por ejemplo, cuando cada curva que representa CHR, MCR, CCR, MMR y CMR, respectivamente, alcanza una meseta, es decir, cuando la diferencia en la incidencia acumulativa de respuesta durante un período de 6 meses es  $\leq 0,2$ .

Como se usa en el presente documento, "remisión hematológica completa (CHR)" se refiere a lograr una fase en la

que los recuentos sanguíneos del paciente han vuelto a los niveles normales, es decir, los niveles observados habitualmente en una persona sana.

Como se usa en el presente documento, "remisión citológica mayor (MCR) o (MCyR)" se refiere a lograr una fase en la que un número combinado de respuestas citológicas corresponde a  $\leq 35$  % de metafases del cromosoma Filadelfia (Ph-positivas).

Como se usa en el presente documento, "remisión citológica completa (CCR) o (CCyR)" se refiere a lograr una fase de fallo para detectar cualquier metafase del cromosoma Filadelfia (Ph-positivo) en dos exámenes consecutivos de médula ósea con un mínimo de 30 metafases examinadas. En algunas realizaciones, CCR se refiere a la ausencia de células cancerosas de los linajes mieloides (blastos) en la sangre y la médula de un sujeto que previamente tenía una hemopatía mieloide asociada con la activación de STAT5 que se trató con un agente anticanceroso. La respuesta citológica se analiza mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen: Detección morfológica de microscopía óptica, ensayos clonogénicos, análisis de inmunofenotipo, análisis de cariotipo, fluorescencia e hibridación *in situ*.

Como se usa en el presente documento, "remisión molecular mayor (MMR)" se refiere a lograr una disminución significativa en el número de transcritos de BCR-ABL. En algunas realizaciones, la MMR se logra cuando se detecta una disminución de 10 veces en el número de transcritos de BCR-ABL. En ciertas realizaciones, la MMR se logra cuando se observa una reducción de 3 log en los niveles de transcripción sobre la base de dos estudios moleculares consecutivos.

Como se usa en el presente documento, "remisión molecular completa (CMR)" se refiere a una disminución en el número de transcritos de BCR-ABL de manera que sean virtualmente indetectables. En algunas realizaciones, la CMR se logra cuando se detecta una disminución de 1000 veces en el número de transcritos de BCR-ABL. En diversas realizaciones, la CMR se logra cuando dos muestras consecutivas no dan como resultado transcritos detectables.

La CMR también se refiere a la ausencia de células del linaje mieloide que expresan un marcador molecular de la hemopatía mieloide en la sangre y la médula de un paciente que previamente tenía una hemopatía mieloide asociada con la activación de STAT5 que se trató con un agente anticanceroso. El marcador molecular puede ser la tirosina cinasa mutada responsable de la hemopatía mieloide, que se detecta mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante RT-QPCR. Normalmente, un marcador específico para las células cancerosas y un marcador específico para las células normales del mismo tipo se detectan simultáneamente para determinar la eficacia del tratamiento.

Como se usa en el presente documento, "remisión clínicamente completa" se refiere a alcanzar un nivel indetectable de transcripción de BCR-ABL durante un periodo de tiempo prolongado. En algunas realizaciones, la remisión clínicamente completa se refiere a una incidencia acumulada de un año de CMR4.5. CMR4.5 se define mediante una relación BCR-ABL/ABL IS  $\leq 0,0032$  %. En ciertas realizaciones, la remisión clínicamente completa se refiere a lograr una CMR sostenida hasta 4,5 años después de la retirada del antagonista STAT5, así como del agente anticanceroso.

Como se usa en el presente documento, "agente" se refiere a un producto químico, compuesto, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente mamíferos).

Como se usa en el presente documento, "agente anticanceroso" se refiere a cualquier agente que tenga la propiedad funcional de inhibir la proliferación de células hematopoyéticas del linaje mieloide y de inhibir el desarrollo o progresión de una hernia mieloide, excepto los antagonistas STAT5 y los agonistas de PPAR $\gamma$ . El agente anticanceroso incluye, sin limitación; inhibidores mitóticos, tales como vinblastina; agentes alquilantes, tales como cisplatino, carboplatino y ciclofosfamida; antimetabolitos, tales como 5-fluorouracilo, citosina arabinósido, hidroxiurea; agentes intercalantes de ácido nucleico, tales como adriamicina y bleomicina; enzimas, tales como asparaginasa; inhibidores de topoisomerasa, tales como etopósido; modificadores de la respuesta biológica, tales como interferón; agentes apoptóticos, tales como actinomicina D; antihormonas, por ejemplo, antiestrógenos tales como tamoxifeno o, por ejemplo, antiandrógenos; agentes que aumentan la respuesta inmune a tumores e inhibidores de transducción de señales. Otros ejemplos de agentes anticancerosos incluyen: inhibidores de la proteína de choque térmico (17-AAG), inhibidores de la farnesiltransferasa (zarnestra), inhibidores de la histona deacetilasa (SAHA, depsipéptido, MS-275..), inhibidores de CDK (flavopiridol), inhibidores del proteasoma

(bortezomib), agentes desmetilantes (decitabina, vizada), inhibidores de Bcl-2 (ABT-737), antraciclinas, daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, citarabina, etopósido, dexametasona, metotrexato, tioguanina, 6-mercaptopurina, ATRA, gemcitabina, vincristina, prednisona, mitoxantrona y rituxan.

5 Como se usa en el presente documento, "TKI" se refiere a un inhibidor de tirosina cinasa, es decir, un agente que puede inhibir la función de la enzima tirosina cinasa.

En algunas realizaciones, el agente anticanceroso es un inhibidor de tirosina cinasa. Los ejemplos de inhibidores de tirosina cinasa incluyen: Imatinib, AMN107, Dasitinib (BMS-354825), nilotinib (Tasigna®, NOVARTIS), CHIR-258,  
10 CEP-701, PKC412, SU11248, SU5416, SU5402, PD173074 y MLN518. Preferiblemente, el inhibidor de tirosina cinasa inhibe la fosforilación de BCR-ABL. Más preferiblemente, el inhibidor de tirosina cinasa se selecciona del grupo que consiste en: Imatinib, AMN107, Dasitinib (BMS-354825) y nilotinib (Tasigna®, NOVARTIS).

En algunas realizaciones, el TKI es imatinib. En ciertas realizaciones, el TKI es dasatinib. En diversas realizaciones,  
15 el TKI es nilotinib. En algunas realizaciones, el TKI es bosutinib. En ciertas realizaciones, el TKI es ponatinib. En diversas realizaciones, el TKI es ruxolitinib. En algunas realizaciones, el TKI es quizartinib.

Como se usa en el presente documento, "antagonista STAT5" se refiere a cualquier agente que inhiba la expresión y/o actividad de STAT5 que, a su vez, regula la expresión de HIF 2a. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, ARNsi,  
20 ARNsh y compuestos de molécula pequeña conocidos. De acuerdo con la invención, el antagonista STAT5 es un agonista de PPARγ.

Como se usa en el presente documento, "PPARγ" se refiere a miembros de la familia de receptores activados por el proliferador de peroxisoma que se expresan, entre otros, en células adipocíticas y hematopoyéticas (Braissant, O. et al. Endocrinology 137(1): 354-66), y que funcionan como reguladores clave de la diferenciación. Dentro de esta  
25 definición se contemplan variantes de los mismos, como por ejemplo, PPARγ1 y PPARγ2, que son dos isoformas que tienen diferentes terminales de N generados por corte y empalme alternativo de un transcrito de ARN primario (Tontonoz, P, et al., Genes & Dev., 1994, 8:1224-34; Zhu et al., J, Biol. Chem., 1993, 268: 26817-20).

30 Como se usa en el presente documento, "agonista de PPARγ" se refiere a un agente que imita un ligando natural al receptor de PPARγ e inhibe la transcripción de *STAT5* en una célula hematopoyética. Incluye cualquier agente de origen natural o no natural que se una selectiva y específicamente a una proteína PPARγ y, al unirse, active la transcripción de genes que contienen un elemento sensible a PPARγ. Los ejemplos de dichos ligandos incluyen, pero sin limitación, tiazolidindiona y derivados de los mismos, o metabolitos de prostaglandina (PG), por ejemplo,  
35 prostaglandina 15-desoxi-A2'14, PGJ2 y derivados de los mismos.

Se conocen compuestos útiles para poner en práctica la presente invención y métodos para preparar estos compuestos. Los ejemplos de agonistas de PPARγ gamma se describen en las solicitudes internacionales PCT WO 91/07107; WO 92/02520; WO 94/01433; WO 89/08651; WO 30 95/18533; WO 95/35108; WO 98/25598; WO  
40 01/16122; WO 01/16123; la publicación de patente japonesa 69383/92; y las Pat. de Estados Unidos N.º 5.523.314; 5.521.202; 5.510.360; 5.498.621; 5.496.621; 5.494.927; 5.480.896; 5.478.852; 5.468.762; 5.464.856; 5.457.109; 4.287.200; 4.340.605; 4.438.141; 4.444.779; 4.461.902; 4.572.912; 4.687.777; 4.703.052; 4.725.610; 4.873.255; 4.897.393; 4.897.405; 4.918.091; 4.948.900; 5.002.953; 5.061.717; 5.120.754; 5.132.317; 5.194.443; 5.223.522; 5.232.925; 5.260.445 ; 5.814.647 y 6.200.998.

45 En ciertas realizaciones, el antagonista STAT5, es decir, el agonista de PPARγ es un compuesto de tiazolidindiona. El compuesto de tiazolidindiona que se usa en la preparación combinada de la invención se puede seleccionar de:

50 5-[442-(5-etilpiridin-2-il)etoxi]Tencilitiadiazolidin-2,4-diona o 5-44-(2-(5-etil-2-piridinimetoxi)fenil)metil]-2,4-tiazolidindiona pioglitazona (Actosa o Glutin® TAKEDA);  
544-4-tiazolidindiona[(1-metilciclohexil)metoxi]bencilitiadiazoliclina-2,4-diona; ciglitazona;  
5-[(2-bencil-2,3-dihidrobencopiran)-5-ilmetil]tiadiazolina-2,4diona: englitazona;  
54[41-[(3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-2-il)metoxi]fenilmetil]-2,4-tiazolidindiona o 5-  
55 (44(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il-metoxi)bencil)-2,4-tiazolidindiona troglitazona (Rezulin®, Resulin® o Romozine);  
54[4-2-(metil-2-piridinilamino)etoxi]fenil]metil]2,4-tiazolidindiona rosigitazona (Avandia® ;  
GLAXOSMITHKLINE) 5-[(2-alcóxi-5-piridil)metil]-2,4-tiazolidindiona;  
5-[(sustituido-3-piridil)metil]-2,4-tiazolidindiona;  
544-(2-metil-2-fenilpropoxi)benil]tiadiazolidin-2,4-diona;

- 54443-(4-metoxifenil)-2-oxooxazolidin-5-il]-metoxi]bencil-2,4-tiazolidindiona;  
 544-[3-(3,4-difluorofenil)-2-oxooxazolidin-5-il]-metoxi]bencil-2,4-tiazolidindiona;  
 54443-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-oxooxazolidin-5-il]metoxi]bencil-2,4-tiazolidindiona;  
 55-[4-[3-(4-trifluorometoxifenil)-2-oxooxazolidin-5-il]metoxi]bencil-Z4 tiazolidindiona;  
 544-[3-(4-trifluorometilfenil)-2-oxooxazolidin-5-il]metoxi]bencil-2,4-tiazolidindiona;  
 54442-[3-(4-trifluorometilfenil)-2-oxooxazolidin-5-il]etoxi]bencil]-2,4-tiazolidindiona;  
 5444243-(4-cloro-2-fluorofenil)-2-oxooxazolidin-5-il]etoxi]bencil-4-tiazolidindiona;  
 54443-(4-piridil)-2-oxooxazolidin-5-il]metoxi-bencil-2,4-tiazolidindiona;  
 2-óxido de 4-(2-naftilmetil)-1,2,3,5-oxatiazol;  
 15544-424N-(benzoxazol-2-il)-N-metilamino]etoxi]bencil]-5-metiltiazolidin-2,4-diona;  
 5444242,4-dioxo-5-feniltiazolidin-3-il-metoxi]bencil]tiazolidin-2,4-diona;  
 54442-[N-metil-N-(fenoxicarbonil-imino]etoxi]bencil]tiazolidin-Z4-diona;  
 544-(2-fenoxietoxi]bencil]tiazolidin-2,4-diona;  
 54442-(4-clorofenil)etilsulfonil]bencil]tiazolidin-2,4-diona;  
 5-[4-[3-(5-metil-2-feniloxazol-4-il)propionil]bencil]tiazolidin-2,4-diona;  
 5-[[4-(3-hidroxi-1-metilciclohexil-metoxi]bencil]tiadiazolidin-2,4-diona;  
 54442-(5-metil-2-feniloxazol-4-il)etoxil]bencil]tiadiazolidin-2,4-diona;  
 5-[[2-(2-naftilmetil)benzoxazol]-5-ilmetil]tiadiazolin-2,4-diona;  
 25544[2-(3-fenilureido)etoxil]bencil]tiadiazolin-2,4-diona;  
 54442-[N-(benzoxazol-2-il)-N-metilamino]etoxi]bencil]tiadiazolin-2,4-diona;  
 5 44-[3-(5-metil-2-feniloxazol-4-371)propionil]bencil]tiadiazolina-174-diona;  
 5-[2-(5-metil-2-feniloxazol-4-ilmetil)benzofuran-5-ilmetil]-oxazolidina-2,4-diona;  
 54442-[N-metil-N-(2-piridil)amino]etoxil]bencil-tiazolidina-2,4-diona;  
 54442-[N-(benzoxazol-2-il)-N-metilamino-etoxibencil]-oxazolidina-2,4-diona y  
 54(64(2-fluorofenilmetoxi)-2-naftalenil)metil)-2,4-tiazolidindiona netoglitazona (MCC 555, MCC-555 o RWJ-  
 241947; MITSUBISHI-TOKYO

#### PRODUCTOS FARMACÉUTICOS.

- 30 Los ejemplos particulares de tiazolidindionas que se usan en los métodos de la invención son los compuestos convencionalmente conocidos para el tratamiento de la diabetes. Véanse, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N.º 4.812.570; 4.775.687; 4.725.610; 4.582.839; y 4.572.912 para encontrar fuentes ejemplares de dichos compuestos. La Patente de Estados Unidos N.º 5.521.201 y las Solicitudes de Patente Europeas 0008203, 0139421, 0155845, 0177353, 0193256, 0207581 y 0208420; y Chem, Pharm, Bull 30 (10) 3580-3600 se refieren a derivados de tiazolidindiona, y describen fuentes comerciales/esquemas sintéticos para una diversidad de antagonistas STAT5 y análogos de tipo antagonista STAT5, que pueden ser útiles para realizar la preparación combinada de la presente invención. En algunas realizaciones, los compuestos de tiazolidindiona incluyen: troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona y netoglitazona.
- 35
- 40 En ciertas realizaciones, las hemopatías mieloides se seleccionan del grupo que consiste en leucemia mielóide aguda (AML) y trastornos mieloproliferativos/mielodisplásicos, incluyendo leucemia mielógena crónica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis idiopática crónica (metaplasia mielóide agnógena (AMM)), leucemia neutrófila crónica (CNL), leucemia eosinófila crónica/síndrome de hipereosinofilia (CEL/I-JES) y mastocitosis sistémica (SM). En una realización particular, la hemopatía mielóide es leucemia mielógena crónica
- 45 (CML).

El antagonista STAT5, por ejemplo, el agonista de PPAR $\gamma$  y el agente anticanceroso se preparan en forma de composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral. En algunas realizaciones, el antagonista STAT5, por ejemplo, agonista de PPAR $\gamma$  y el agente anticanceroso, están en una única forma de dosificación o como formas de dosificación separadas adecuadas para administración oral (una o más cápsulas, sobres, comprimidos).

50

La preparación combinada comprende una cantidad eficaz del antagonista STAT5, es decir, agonista de PPAR $\gamma$  y del agente anticanceroso. En ciertas realizaciones, la combinación se administra en una cantidad eficaz para lograr CMR.

55

La cantidad exacta de antagonista STAT5, es decir, agonista de PPAR $\gamma$  y del agente anticanceroso que se utilizará en la preparación combinada a administrar variará de acuerdo con factores tales como la célula de hiperplásica/cancerosa específica implicada y la enfermedad específica; el grado, o implicación, o gravedad de la enfermedad; el tamaño, la edad y la salud general del paciente; la respuesta del paciente individual; el compuesto

particular administrado; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el tipo de tratamiento concurrente; características farmacodinámicas de los compuestos y su modo y vía de administración; y otras características relevantes que el médico o un experto en la técnica determinarán fácilmente mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias 5 análogas.

En algunas realizaciones, la presente invención implica la administración de 300-400 mg de Imatinib y 30-50 mg de pioglitazona en una única forma de dosificación o como formas de dosificación separadas adecuadas para administración oral. En ciertas realizaciones, el imatinib se administra primero hasta que se logra una incidencia 10 acumulativa estable de respuesta, seguido de una dosis diaria de un antagonista STAT5, es decir, agonista de PPAR $\gamma$ , hasta que el paciente alcanza la remisión molecular completa (CMR).

Por consiguiente, el antagonista STAT5, por ejemplo, agonista de PPAR $\gamma$ , y el agente anticanceroso pueden administrarse concurrentemente o secuencialmente. En ciertas realizaciones, el antagonista STAT5, es decir, el 15 agonista de PPAR $\gamma$  y el agente anticanceroso se administran concurrentemente a un paciente que tiene una hemopatía mielóide, realizándose la administración hasta el momento en que se observa una respuesta molecular completa (CMR) en el paciente. La administración simultánea generalmente se usa para pacientes que responden muy mal al agente anticanceroso; el antagonista STAT5, por ejemplo, agonista de PPAR $\gamma$ , se usa para potenciar el efecto del agente anticanceroso (por ejemplo, retirando las células madre del cáncer de uno o más linajes mieloides 20 de quiescencia, de tal forma que sean eliminadas por el agente anticanceroso).

Por consiguiente, la administración secuencial generalmente comprende una terapia de primera línea con el agente anticanceroso hasta que se logra una incidencia acumulativa adecuada de respuesta. El antagonista STAT5 (por ejemplo, agonista de PPAR $\gamma$ ) se administra entonces hasta que se logra una respuesta molecular completa (CMR), 25 evitando así la recaída de la enfermedad eliminando las células cancerosas residuales del linaje o líneas mieloides. Generalmente, se prefiere la administración secuencial cuando el paciente es un buen respondedor (respuesta citológica rápida y prolongada al agente anticanceroso).

En otro aspecto, la invención o descripción proporciona un kit para realizar la administración de la preparación 30 combinada como se ha definido anteriormente, que comprende un antagonista STAT5 o un agonista de PPAR $\gamma$ , como se ha definido anteriormente, y al menos un agente anticanceroso, como se ha definido anteriormente, como una única forma de dosificación o como formas de dosificación separadas.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de 35 biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M, AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait 40 ed., 1984); Mullis et al. Pat. de Estados Unidos N.º 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Blames & S, J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. L Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds. jefe, Academic Press, Inc., Nueva York), específicamente, Vol.154 y 155 (Wu et al. eds.) y Vol. 185, "Gene Expression 45 Technology" (D. Goeddel, ed); Gene Transfer Vectors For Manunalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor. Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular. Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Current Protocols in Human Genetics (John Wiley 10 & Sons, Inc, 2008), específicamente 50 Capítulo 12 "Vectors For Gene Therapy" y Capítulo 13 "Delivery Systems for Gene Therapy").

Además de las características anteriores, la invención comprende además otras características que serán evidentes a partir de la siguiente descripción, y ejemplos que ilustran el uso del antagonista STAT5, es decir, agonista de PPAR $\gamma$  para mantener la remisión de cánceres hematológicos después de la terapia estándar contra el cáncer. 55

1. Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., Eaves, C. J. Cancer stem cells: an evolving concept. Nat Rev Cancer 12, 133-143 (2012).
2. Chomel, J. C., Turhan, A. G. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. Oncotarget 2, 713-727 (2011).

3. de Lavallade, H., et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 26, 3358-3363 (2008).
4. Graham, S. M., et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319-325 (2002).
- 5 5. Copland, M., et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107, 4532-4539 (2006).
6. Corbin, A. S., et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest* 121, 396-409 (2011).
7. Luo, J., Solimini, N. L., Elledge, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823-837 (2009).
8. Prost, S., et al. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest* 118, 1765-1775 (2008).
9. Berris, R., et al. Reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone treatment is not hemodilutional in Type II diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther* 82, 275-281 (2007).
10. Holyoake, T., Jiang, X., Drummond, M., Eaves, A., Eaves, C. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 16, 549-558 (2002).
11. Bonnet, D., Dick, J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737 (1997).
12. Wang, Z., Li, G., Tse, W., Bunting, K. D. Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement. *Blood* 113, 4856-4865 (2009).
13. Ilaria, R. L. Jr., Van Etten, R. A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704-31710 (1996).
14. Nieborowska-Skorska, M., et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 189, 1229-1242 (1999).
15. Nelson, E., et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood* 117, 3421-3429 (2011).
16. Hoelbl, A., et al. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood* 107, 4898-4906 (2006).
17. Hoelbl, A., et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* 2, 98-110 (2010).
18. Walz, C., et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood* 119, 3550-3560 (2012).
19. Warsch, W., et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood* 117, 3409-3420 (2011).
20. Wang, L., Giannoudis, A., Austin, G., Clark, R. E. Peroxisome proliferator-activated receptor activation increases imatinib uptake and killing of chronic myeloid leukemia cells. *Exp Hematol* 40, 811-819 (2012).
21. Chomel, J. C., et al. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood* 118, 3657-3660 (2011).
22. Laurie, C. C. et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nat Genet* 44, 642-650 (2012).
23. Mahon, F. X., et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 11, 1029-1035 (2010).
24. Ikezoe, T., et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 5 by the inhibitor of janus kinases stimulates dormant human leukemia CD34+ /CD38- cells and sensitizes them to antileukemia agents. *Int J Cancer* 128, 2317-2325 (2011).
25. Gough, D. J., et al. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 324, 1713-1716 (2009).

## Ejemplos

### Materiales y métodos

5 **Reactivos.** Para ensayos *in vitro*, Cayman Chemical (PPAR $\gamma$ -PAK; Bertin-pharma) proporcionó agonistas de PPAR $\gamma$ . El mesilato de imatinib se proporcionó por Novartis y se usó a 1  $\mu$ M en cultivo, una concentración inhibitoria bien establecida *in vitro* que también se acerca al nivel de fármaco alcanzable en el plasma de los pacientes.

**Cultivo celular y ensayos de proliferación.** Se cultivaron células K562 ( $2 \times 10^5$ ) en placas de 96 pocillos, en medio Eagle modificado de Dulbecco completo complementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco®, Life technologies) en solitario o con concentraciones variables de pioglitazona o troglitazona. Las células se cultivaron durante 7 días en presencia de 1  $\mu$ Ci/pocillo de [ $^3$ H]timidina, se recogieron por centrifugación y se contaron en un lector de placas (Wallac 1450 Microbeta Plus). Se usaron ocho réplicas para cada conjunto de condiciones y se obtuvieron resultados después de tres experimentos independientes. Las células CD34 $^+$  de pacientes en CP-CML en el momento del diagnóstico o en la sangre del cordón umbilical se inmunoseleccionaron (kit CD34 microBead, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El enriquecimiento de las células CD34 $^+$  se determinó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (clon 581; BD Pharmingen). Las células Ph1 $^+$ -CD34 $^+$  se cultivaron en medio sin suero (SFM) StemSpan (StemCell Technologies) sin factores de crecimiento.

20 **Ensayos de células formadoras de colonias (CFC) y células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC).** Para ensayos de CFC, las células CD34 $^+$  se suspendieron ( $1 \times 10^4$ ) en 3 ml de medio de metilcelulosa basado en alfa-MEM (GF H4434, Stemcell Technologies). Las células se puntuaron y se recogieron después de 14 días de incubación a 37 °C y CO $_2$  al 5 %. Después de la puntuación, las colonias se lavaron con PBS y se mantuvieron congeladas en RNAlater® (Invitrogen) para su posterior análisis. Se realizaron LTC-IC con ensayos de dilución limitante (LDA) en medio StemSpan SFEM (tecnologías Stemcell) en monocapas irradiadas MS5 a varias diluciones de células CD34 $^+$  (300, 150, 75 o 37 células por pocillo para células Ph1 $^+$ CD34 $^+$  y 200, 100, 50 o 25 células por pocillo para CD34 $^+$  de donantes sanos) en placas de 96 pocillos con 16 pocillos replicados por concentración. Después de cinco semanas con cambio semanal de la mitad del volumen de medio, todas las células se transfirieron en medio de metilcelulosa a base de alfa-MEM (GF H4434, tecnologías Stemcell) para determinar el contenido total de células clonogénicas de cada LTC. Las frecuencias de LTC-IC se determinaron usando el software L-Calc (tecnologías Stemcell).

**Citometría de flujo.** Se usaron los siguientes anticuerpos: IgG1 conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clon 679.1Mc7, Beckman Coulter), IgG1 conjugada con Alexa Fluor® 488 (clon MOPC-21, BD Pharmingen), IgG1 conjugada con alofococianina (APC) (clon MOPC-21, BD Pharmingen), IgG1 conjugada con peridina clorofila proteína-cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5) (clon X40, BD Pharmingen), IgG1 conjugada con ficoeritrina cianina (PE-Cy7) (clon MOPC-21, BD Pharmingen), CD45 conjugado con (PerCP-Cy5.5) (clon 2D1, BD Pharmingen), CD34 conjugado con (APC) (clon 581, BD Pharmingen), CD38 conjugado con (PE-Cy7) (clon HB7, BD Pharmingen), anti-STAT5 (pY694) conjugado con Alexa Fluor® 488 (clon 47, BD Pharmingen), anti-GLUT1 conjugado con (PE) (FAB1418P, R&D systems). Para todos los experimentos, la viabilidad celular se evaluó usando la tinción de células muertas Blue SYTOX® (Invitrogen Life Technologies).

**Ensayos de apoptosis.** Se usaron anexina V conjugada con FITC y yoduro de propidio (PI) (kit Anexina-V, BD Pharmingen) para cuantificar células apoptóticas de acuerdo con el fabricante.

45 **Ensayos de fosforilación de STAT5 intracelular.** En resumen, se recogieron 3,10 $^5$ /ml de células K562 cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco completo complementado con suero fetal de ternera al 10 % (PAA) en solitario y con o sin pioglitazona (10  $\mu$ M) o Imatinib (1  $\mu$ M) a 37 °C en CO $_2$  al 5 % en tiempo variable según se indica. Las células se fijaron y se permeabilizaron usando el kit Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) y se tiñeron con mAb Alexa Fluor® 488-anti-phospho-START5 (BD Phosflow) o control Alexa Fluor® 488-pareado al isotipo para obtener la fluorescencia menos comparativa en cada experimento. El análisis se realizó en un número mínimo de 50.000 eventos en la población celular viable. La intensidad de fluorescencia media delta de p-STAT5 después del tratamiento con fármaco (p-STAT5 $\Delta$ MFI) se determinó como se indica a continuación: (células no tratadas p-STAT5 MFI-células no tratadas isotipo-control MFI)-(células tratadas con fármaco p-STAT5 MFI-células tratadas con fármaco isotipo-control MFI).

**Ensayos CFSE.** Las células enriquecidas con CD34 $^+$  frescas se tiñeron con 2  $\mu$ M de succinimidil diéster de diacetato de 5- (y 6-) carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen). Las células se cultivaron (sembraron 5,10 $^5$ /ml) en SFM StemSpan (StemCell Technologies) sin factores de crecimiento y con o sin pioglitazona (10  $\mu$ M) o Imatinib (1  $\mu$ M).

Las células cultivadas en presencia de Colcemid® (100 ng/ml, Invitrogen Life Technologies) se usaron para establecer el intervalo de fluorescencia presentado por las células que no se habían dividido durante la incubación posterior al etiquetado. Las células se cosecharon en puntos temporales variables como se indica, se recogieron en tubos BD Trucount™ para el recuento absoluto (BD Biosciences) y se marcaron con anti-CD45 y anti-CD34. Después, las células se diluyeron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen Life Technologies) que contenía suero fetal bovino al 2 % (PAA) y se tiñeron para determinar su viabilidad. Todos los análisis se realizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto2.

**Extracción de ARN y análisis de RT-qPCR.** El ARN se extrajo de  $2 \times 10^5$  células usando RNAqueous-4PCR (Ambion). La transcripción inversa se realizó durante 1 hora a 42 °C usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript® Vilo™ (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador iCycler (CFX, Bio-Rad). Los pares de cebadores utilizados con la mezcla maestra de expresión génica Taqman® (Applied Biosystems) e iQ Supermix SYBR GRN (Bio-Rad) se enumeran en la Tabla 2a y la Tabla 2b, respectivamente. El método de CT comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ) se usó para comparar los niveles de expresión génica entre las diferentes condiciones de cultivo (con respecto a GAPDH).

**Análisis de transferencia western.** Para el análisis de proteína STAT5, se lisaron células K562 ( $2,5 \times 10^5$ ) en tampón de lisis RIPA sobre hielo. Los extractos de células enteras se hirvieron durante 5 minutos en tampón de muestra Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE en geles de acrilamida al 4-12 % (Nupage, Invitrogen Life Technologies). Las proteínas se transfirieron a filtros Hybond N+ (Amersham). Las membranas se sondaron con los siguientes anticuerpos: STAT5 (sc-1656), actina (sc-8432), y IgG-HRP anti-ratón de cabra (sc-2005) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). La unión al anticuerpo se detectó por ECL+ de quimioluminiscencia mejorada (Amersham).

**Producción y transducción de vectores lentivirales.** *Vector lentiviral STAT5B* El ADNc que codifica STAT5B se clonó, se secuenció (número de adquisición de Genbank DQ267926) y se insertó en el vector de transferencia lentiviral SIN-cPPT-PGK-WHV como se ha descrito previamente. Se usó un vector lentiviral SIN-cPPT-PGK-eGFP-WHV para el control.

*Vector lentiviral ARNsh anti-PPAR $\gamma$ .* La secuencia de emparejamiento de ARNm de PPAR $\gamma$  5'-TGTTCCGTGACAATCTGTC-3' (número de acceso de Genbank HUMPPAR1B) se diseñó y se sintetizó como se indica a continuación dentro de una estructura de ARNsh que comprende sitios de restricción únicos en cada extremo:

5'-GATCTCCTGTTCCGTGACAATCTGCTTCAAGAGA  
 ACAGATTGTCACGGAACATTTTTGGAAGAATTCC-3' sentido; 5'-CTGAG

GAATCTTCCAAAATGTTCCGTGACAATCTGTAAGTTCTCTACAGATTGTCACGGAACAGGA-3' antisentido.  
 Los oligonucleótidos se hibridaron y se ligaron en los sitios BglIII y XhoI del plásmido pSuper linealizado. PPAR $\gamma$  de ARNsh del promotor PolIII H1 se subclonó entonces en el vector lentiviral pTRIP. Los vectores se produjeron como se ha descrito previamente.

*Vector lentiviral BCR-ABL.* El ARN total de las células K562 se extrajo usando TRIZOL (Invitrogen Life Technologies). La transcripción inversa se realizó durante 1 hora a 50 °C usando SuperScript® III (Invitrogen Life Technologies). Se realizaron dos PCR independientes usando BCR-ABL F 1,5'-ATGGTGGACCCGGTGGGCTT-3' con BCR-ABL R 2831, 5'-CTGCTACCTCTGCACTATGTCACTG-3' y BCR-ABL F 2685, 5'-TCCGCTGACCATCAATAAGGA-3' con BCR-ABL R 6097, 5'-CTGCTACCTCTGCACTATGTCACTG-3' respectivamente. Se agruparon bandas de amplificación específicas, se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y se enfriaron en rampa a 25 °C durante un período de 45 minutos. El producto de hibridación se sometió a una tercera PCR con ADN polimerasa LA Taq™ (Takara) usando el siguiente par de cebadores: BCR-ABL F 1 asc1: 5'-AGGCGCGCCATGGTGGACCCGGTGGGCTT-3' y BCR-ABL R 6097 sbf1: 5'-CCTGCAGGCTGCTACCTCTGCACTATGTCACTG-3'. El producto de amplificación se subclonó en un plásmido pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen Life Technologies) antes de insertarse en el vector de transferencia lentiviral SIV GAE-SSFV seguido de secuenciación de ADN. Se usó un vector SIV GAE-SSFV-eGFP como control. Los vectores SIV se produjeron como se ha descrito previamente.

*Transducción de células CD34+.* Las células se suspendieron ( $1 \times 10^6$ /ml) en StemSpan (StemCell Technologies, Francia) complementado con sulfato de protamina (4  $\mu$ g/ml), SCF (100 ng/ml), Flt-3-L (100 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml) e IL-6 (20 ng/ml) en una placa de 96 pocillos recubierta con RetroNectin® (Takara Shuzo Co., Japón). Las suspensiones celulares se incubaron durante 16 horas. Luego se añadieron vectores lentivirales y las suspensiones celulares se incubaron durante 12 horas. Las células se lavaron dos veces antes de sembrarse.

*Ensayos de ARNsi.* Se sintetizó ARNsi que se dirige a la secuencia PPAR $\gamma$  humana 5'-TGTTCCGTGACAATCTGTC-

3' (Sigma-Aldrich Proligo). Las células de médula ósea CD34<sup>+</sup> se transfectaron con ARNsi específico de *PPARγ* (25 nM) o ARNsi de control en presencia de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se mantuvieron durante 48 horas antes del ensayo de CFC. El ARNsi de control se adquirió en Invitrogen Life Technologies (BLOCK-iT). La eficacia de la transfección se evaluó usando un dúplex de ARN bicatenario marcado con fluoresceína (BLOCK-iT FluorescentOligo; Invitrogen).

*Pacientes humanos.* La médula ósea fresca de pacientes con CML en fase crónica en el momento del diagnóstico, células sanguíneas del cordón umbilical de donantes sanos, y muestras de sangre o médula ósea de pacientes con diabetes y pacientes a los que se dio pioglitazona de indicación no habitual se obtuvieron con el consentimiento informado aprobado por la Institutional Review Board del hospital (« Comité de protection des personnes Ile-de-France XI ») bajo el protocolo aprobado EudraCT número: 2009-011675-79.

*Análisis estadístico.* Para los ensayos de cultivo y PCR cuantitativa en tiempo real, los valores se calcularon como media ± desviación estándar para al menos tres experimentos separados realizados por triplicado. El número específico de muestras y experimentos repetidos se indican en las leyendas de las Figuras. Se realizaron comparaciones pareadas y no pareadas, usando la prueba no paramétrica de rango de Wilcoxon y la prueba de Mann y Whitney, respectivamente. El análisis de dilución limitante se realizó con el software L-Calc (StemCell Technologies). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Negre, D. et al. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* 7, 1613-1623 (2000).

### Ejemplo 1

Se determinó en primer lugar que el efecto antiproliferativo de dos antagonistas STAT5 diferentes sobre células K562 sigue una curva graduada de respuesta a la dosis, un indicador de la especificidad de la diana (Figura 5a). La especificidad se soportó adicionalmente por la inclusión de un ARNsh contra el ARNm de *PPARγ* (Figura 5b). Las células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical de donantes sanos se transdujeron entonces con un vector lentiviral que expresaba p210 BCR-ABL.

### Resultados

La **Figura 5** representa la especificidad de la acción del antagonista STAT5 en células que expresan BCR-ABL a través de *PPARγ*. **a**, Curvas de respuesta a la dosis de dos antagonistas STAT5 sobre la proliferación de células K562 evaluada por incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina durante 7 días (3 experimentos, 8 repeticiones para cada uno). **b**, Proliferación de células K562 diferencial, con o sin exposición a pioglitazona (25 μM), y con o sin expresión mediada por lentivector de un ARNsh contra ARNm de *PPARγ* (sh-*PPARγ*) (3 experimentos). **c**, Verificación de la especificidad del lentivector de sh-*PPARγ* usado en la Figura 5b. Las células CD34<sup>+</sup> se transfectaron con ARNsi irrelevante o dirigido a *PPARγ* (25 nM cada una) o se transdujeron con el lentivector sh-*PPARγ* o un lentivector *eGFP*. Los transcritos de *PPARγ* se normalizaron a transcritos de *GAPDH* y se expresaron en relación con los niveles medidos en células no transfectadas/no transducidas.

### Ejemplo 2

A partir de los estudios *in vitro* anteriores, se demostró que la pioglitazona a dosis farmacológicas inhibe el crecimiento celular de la línea celular positiva para Bcr-Abl K562 a través de la activación de la ruta *PPARγ*/STAT5. Se realizaron otros estudios *in vitro* que demostraron que, en presencia de pioglitazona, el grado de reducción en las células formadoras de colonias (CFC) era 1,9 veces mayor (p <0,002) cuando se expresó BCR-ABL (Figura 1a). La combinación de pioglitazona e imatinib produjo un efecto inhibitorio de 3 veces (p <0,0001) (Figura 1a).

### Resultados

La **Figura 1** representa los efectos diferenciales y sinérgicos de la pioglitazona y el imatinib en las células de CML. **a**, Ensayos de CFC después de la expresión mediada por lentivirus de BCR-ABL o *eGFP* (control negativo) en células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón humano. Medios de 3 individuos por triplicado con desviación estándar (DE). **b**, Ensayos de CFC con células CP-CML de CD34<sup>+</sup> de pacientes en el momento del diagnóstico. Media de 29 pacientes con DE. **c**, Células CD34<sup>+</sup> de CP-CML en cultivo líquido (7 días) en medio libre de suero sin citocinas. Siete pacientes, cada uno puntuado como porcentaje de su propio control no tratado (véase la Tabla 1). **d**, Cinética (Paciente 4 de la Figura 1c). En todos los ensayos de CFC, se añadieron imatinib y/o pioglitazona durante 48 horas

antes.

**Ejemplo 3**

5 Se ensayó una cohorte de 29 pacientes con CML en fase crónica (CP) en el momento del diagnóstico cuyas células CD34<sup>+</sup> eran >90 % de Ph1<sup>+</sup>. El defecto clonogénico observado fue similar al descrito en el Ejemplo 2, pero el efecto de la combinación de fármacos fue más pronunciado (6 veces,  $p < 0,0001$ ) (Figura 1b). En el cultivo líquido de células de CP-CML CD34<sup>+</sup> en ausencia de citocinas, se observó una tendencia similar, aunque con respondedores bajos y altos (7 pacientes evaluados) para los agentes únicos (Figura 1c y Tabla 1). Sin embargo, cuando se  
10 combinaron imatinib y pioglitazona, la respuesta fue mayor y menos dispersa (Figura 1c).

Las LSC de CML son generalmente fenotípicamente indistinguibles de las HSC humanas normales y no son fácilmente trasplantables en ratones inmunodeficientes. Los ensayos de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) pueden ser un enfoque adecuado para la cuantificación de LSC de CML.

15

Tabla 1. Cultivo líquido de células CD34<sup>+</sup> CP-CML de 7 pacientes

Paciente	Inicial CD34 (%)	Ctrl D3		Imatinib D3		Pio D3		Imatinib + Pio D3		Ctrl D7		Imatinib D7		Pio D7		Imatinib + Pio D7	
		Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)	Múltiplo de exp.	viab. (%)
1	4,70	1,81	28,00	0,03	0,1	0,75	19,00	0,03	0,01	1,39	41,00	0,01	0,10	0,39	9,00	0,00	0,00
2	1,80	1,48	59,00	0,67	31,00	1,25	47,00	0,68	27,00	5,8	87,00	0,94	29,70	2,96	71,00	0,29	13,00
3	1,50	78,40	0,62	18,00	0,13	4,10	9,90	0,08	2,20	1,89	18,30	0,45	5,90	1,69	17,90	0,09	4,10
4	13,4	98,00	1,69	92,4	1,14	86,00	93,00	1,16	82,00	2,41	52,30	1,26	54,00	1,67	54,00	0,92	47,50
5	1,10	70,00	1,16	73,00	0,53	54,5	73,00	0,35	42,00	1,66	86,00	0,49	56,00	0,93	86,00	0,22	53,00
6	3,00	96,70	1,95	90,20	1,09	85,00	88,00	0,86	83,00	1,83	74,00	1,49	73,00	1,87	85,00	0,50	60,00
7	3,4	88,00	1,21	87,00	0,60	84,00	84,00	0,52	83,00	4,94	40,00	1,38	66,00	1,48	33,00	0,60	55,00
		media	1,42		0,60	1,17		0,53	0,53	2,85		0,86		1,54		0,36	

CTRL: células de control sin fármaco, D3: Día 3 en cultivo, D7: D7 en cultivo, Pio: pioglitazona, Clasificación: Porcentaje después de la clasificación celular, viab: células viables, exp: expansión.

#### Ejemplo 4

El imatinib en solitario no fue capaz de reducir significativamente la frecuencia de LTC-IC de CP-CML ( $p = 0,067$  y  $p = 0,02$ ). Sin embargo, la pioglitazona fue capaz de hacerlo, ya sea como agente único en 2,4 veces ( $p = 0,008$ ) o con un efecto sinérgico en 3,5 veces en presencia de imatinib ( $p < 0,001$ ) o 5 veces en presencia de dasatinib ( $p = 0,0038$ ) (Figura 2a y b). La pioglitazona tuvo un efecto opuesto al imatinib sobre el estado del ciclo celular desencadenando la salida de la inactividad y una mayor tasa de proliferación celular (Figura 2c-e). Además, la combinación de pioglitazona y el imatinib contrarresta en gran medida los efectos perjudiciales del imatinib sobre el estado del ciclo celular y, por lo tanto, actúa eficazmente en sinergia para agotar tanto las células proliferativas como las no proliferativas (Figura 2d y e).

#### Resultados

La **Figura 2** representa la purga de LSC de CML inactivas por pioglitazona. **a y b**, Análisis de dilución limitante (LDA) con ensayos de LTC-IC y frecuencias de LTC-IC calculadas. Se indica el número de CD34<sup>+</sup> sembradas. **a**, para 4 de los 7 pacientes (16 repeticiones para cada uno), en presencia de imatinib. **b**, para 1 paciente (16 repeticiones), en presencia de dasatinib. **c**, Análisis CFSE (Paciente 4) después del cultivo líquido en medio libre de suero sin citocinas. Un pico sombreado para cada número de división celular. P, "Células precursoras" detenidas por colcemida. **d**, Distribución (%) de células CD34<sup>+</sup> en cada pico de división que se muestra en la Figura 2c. **e**, Condiciones de cultivo idénticas, pero para el Paciente 2 y recuento absoluto de células. Escala izquierda, células totales que muestran células CD34<sup>+</sup> frente a CD34<sup>-</sup> (histogramas). Escala derecha, células CD34<sup>+</sup> no divididas (puntos y líneas).

El estado de ciclado celular es otro criterio para evaluar o predecir si la purga de LSC de CML puede ser eficaz. Los ensayos CFSE se realizaron con células CD34<sup>+</sup> de CP-CML en cultivo líquido que carecía de citocinas (Figura 2c). Los datos se analizaron tanto en porcentajes (Figura 2d) como en recuentos absolutos (Figura 2e) de células que nunca se dividieron ("P") o experimentaron un número determinado de divisiones. Las células CD34<sup>+</sup> de CP-CML de control no tratadas proliferaron y se diferenciaron activamente. La exposición a imatinib dio como resultado la eliminación de células en división activa pero también en la acumulación de células CD34<sup>+</sup> viables que nunca se habían dividido o se dividieron una sola vez (34 % frente a 5 % para el control no tratado) (Figura 2d). Se realizó un análisis de recuento absoluto de células e indicó que este fenómeno puede ser causado tanto por (1) una resistencia de las células de CML inactivas a la citotoxicidad de imatinib como (2) un efecto antiproliferativo de imatinib que disminuye la velocidad a la que las células CD34<sup>+</sup> de CP-CML abandonan la inactividad y continúan con divisiones celulares adicionales (Figura 2e).

#### Ejemplo 5

Se investigaron las posibles rutas moleculares que median la actividad de la pioglitazona contra las LSC de CML. El transductor de señal y activador de transcripción 5 (STAT5) era un objetivo a considerar. PPAR $\gamma$  puede ser un regulador de la transcripción negativo de *STAT5* (A y B), y puede causar un defecto clonogénico en los huéspedes infectados con VIH y SIV. *STAT5* (A y B) puede ser crítico para el mantenimiento y la aptitud de HSC normales en ratones de una manera dependiente de la dosis de alelo. En las células de CML, la activación de *STAT5* depende de la actividad de la cinasa BCR-ABL, mientras que la inactivación de la expresión de *STAT5* o la inhibición de su fosforilación suprimen la resistencia de las células de CML a la apoptosis y la independencia de las citocinas *in vitro*. La anulación de *STAT5* puede evitar la iniciación y el mantenimiento de un estado de CML que, de lo contrario, se desencadena por la transferencia retroviral de BCR-ABL. Los niveles de expresión de *STAT5* se correlacionan con los grados de progresión de la enfermedad en modelos de ratón y la sensibilidad a TKI inicial en seres humanos.

#### Resultados

La **Figura 3** representa la ruta PPAR $\gamma$ -STAT5 como diana de pioglitazona en LSC de CML. **a**, Cultivos como en la Figura 2e el Día 10. *STAT5B* RT-qPCR normalizado para ARNm de GAPDH (5 réplicas con DE). **b**, Ensayos de CFC con lentivectores *STAT5B* o *eGFP* en células CD34<sup>+</sup> de CP-CML. Media de 5 pacientes con DE. **c**, Células K562. La misma RT-qPCR que en la Figura 3a. si-PPAR $\gamma$ , ARNs contra ARNm de PPAR $\gamma$ . Media de 6 réplicas con DE. **d**, Citometría de flujo de células K562 permeabilizadas con IgG contra *STAT5* fosforilada (Tyr694). Sin tratamiento (línea de color negro) y con tratamiento farmacológico con (sombreado de color gris o línea de color gris). Panel de control, Sin tratamiento farmacológico pero control irrelevante del isotipo IgG (pico gris). Parte superior derecha, análisis de transferencia Western con anticuerpos pan-*STAT5* y anti-actina, que muestra una disminución de *STAT5* en 3,2 veces (normalizado) en el Carril 4. **e**, ensayos CFSE con lentivectores *STAT5B* o *eGFP* en células CD34<sup>+</sup> de

CP-CML y recuento celular absoluto como en la Figura 2e. Puntos negros, células CD34<sup>+</sup> no divididas. Panel derecho, control de lentivector *STAT5B*. f, LTC-IC (LDA) que muestra toxicidad aumentada de pioglitazona para CP-CML frente a células CD34<sup>+</sup> normales.

- 5 Se descubrió que los niveles de ARNm de *STAT5B* disminuyeron 8,5 veces ( $p < 0,0001$ ), 1,5 veces ( $p = 0,08$ ) y 10,5 veces ( $p < 0,0001$ ) en presencia de pioglitazona, imatinib y la combinación de fármacos, respectivamente, en células CP-CML después de 10 días de cultivo líquido sin citocinas (Figura 3a). Se obtuvieron valores similares para *STAT5A*. La disminución de la clonogenicidad de células CD34<sup>+</sup> de CP-CML en presencia de pioglitazona se eliminó cuando *STAT5B* se sobreexpresó después de la transferencia lentiviral (Figura 3b). La disminución de los niveles de
- 10 ARNm de *STAT5B* también se observó en células K562, y este efecto fue negado por un ARNsi frente al ARNm de *PPAR $\gamma$*  (Figura 3c). Debido a que la cinética de la citotoxicidad es más lenta con pioglitazona sola que en presencia de imatinib (Figura 1d), se investigaron sus mecanismos de acción diferenciales en la actividad de *STAT5*. Se descubrió que el imatinib actúa rápidamente (minutos) al prevenir la fosforilación de *STAT5*, mientras que la pioglitazona actúa lentamente (días) al disminuir los niveles de proteína *STAT5* (Figura 3d). La capacidad de la
- 15 pioglitazona tanto para sacar las células de CP-CML de la quiescencia como para ser citotóxicas, según se evaluó mediante recuentos de células absolutas en ensayos CFSE, se eliminó por completo cuando *STAT5B* se sobreexpresó mediante transferencia lentiviral (Figura 3e). De manera importante, se encontró que la pioglitazona era más inhibitoria/citotóxica para LTC-IC de CML que para LTC-IC normales (Figura 3f).

## 20 Ejemplo 6

Se examinaron cultivos sin citocinas de células CD34<sup>+</sup> de CP-CML de 10 pacientes, con niveles de expresión de ARNm de 7 supuestas dianas transcripcionales aguas abajo de *STAT5* y/o *PPAR $\gamma$*  relevantes para LSC de CML, después de la exposición a imatinib, con o sin pioglitazona, durante 10 días. Estos incluyen *STAT3*, *SIRT1*, *GLUT1*,

25 *OCT1*, *PML1*, *MDR1* y *ALOX5*. Se encontró que solo los niveles de ARNm de *OCT1* se aumentaron moderadamente (3,75 veces,  $p = 0,049$ ) después del cultivo en presencia de pioglitazona + imatinib frente a imatinib en solitario (Figura 6). La regulación ascendente de la expresión de *OCT1* puede aumentar la captación celular de imatinib, aunque se sabe que las LSC de CML dependen débilmente de la actividad de la cinasa BCR-ABL.

## 30 Resultados

La Figura 4 representa la CMR inducida por pioglitazona en pacientes con CML y el mantenimiento después de la abstinencia del fármaco. Ensayos por RT-qPCR para BCR-ABL/ABL en células de sangre nucleadas de pacientes a relaciones internacionales (IS). Tres pacientes mostraron una presencia sostenida de células sanguíneas de ARNm<sup>+</sup>

35 de *BCR-ABL* durante 3 a 6 años a pesar de que la terapia continua con imatinib (bloques grises) recibió pioglitazona en  $t = 0$  en varias duraciones (flechas horizontales). El tratamiento con pioglitazona se interrumpió hace 18 a 54 meses, aunque el Paciente 1 reanudó el tratamiento brevemente para la diabetes. El Paciente 2 lo interrumpió después de 1 año de CMR. El Paciente 3 también detuvo el tratamiento con imatinib sin recaída molecular durante 6 meses. Todos los pacientes alcanzaron una CMR (4,5log) durante >12 a 56 meses.

40 El Paciente 1 fue diagnosticado con una CML de puntuación Sokal baja a la edad de 62 años en 2002, cuando se inició el imatinib (300-400 mg/día - niveles en plasma de 924 ng/ml). Se logró una respuesta molecular importante después de 17 meses de tratamiento, pero nunca alcanzó una CMR (relaciones de ARNm de *BCR-ABL/ABL* IS entre el 0,01 % y el 0,04 %). Se inició la pioglitazona 30 mg/día por su endocrinólogo en junio de 2007 después de 5 años de terapia con imatinib. La pioglitazona se suspendió temporalmente en abril de 2008 y se reanudó brevemente desde agosto de 2010 hasta abril de 2011 por su diabetes. Inesperadamente, la CMR (5log) se logró en junio de 2008, y permanece en CMR (5log) desde hace 56 meses (Figura 4). El Paciente 2 fue diagnosticado con una CML de puntuación Sokal alta a la edad de 61 años en 2002, cuando se inició el imatinib (300-400 mg/día - niveles en plasma de 310 ng/ml). El mejor nivel molecular de respuesta fue del 0,02 %. En marzo de 2008, después de 6 años

50 de tratamiento con imatinib, se inició pioglitazona 30 mg/día. Se obtuvo una CMR (5log) en agosto de 2010 y se mantuvo durante 12 meses, momento en el que se interrumpió (Figura 4). Antes de presentar una solicitud formal de ensayo clínico, se recetó pioglitazona a un tercer paciente con CML. El Paciente 3 fue diagnosticado con una CML de puntuación Sokal baja a la edad de 58 años en 2005, cuando se inició el imatinib (400 mg/día - niveles en plasma de 790 ng/ml). Sus mejores relaciones BCR-ABL/ABL IS estuvieron entre 0,012 % y 0,07 %. La pioglitazona se inició

55 en diciembre de 2009 (45 mg/día). Llegó a una CMR (5log) después de 6 meses de terapia con pioglitazona, que se detuvo en abril de 2011. Desde entonces, ha permanecido en CMR (5log) (un total de 28 meses) (Figura 4).

En un informe reciente, las células que expresan ARNm de *BCR-ABL* se han detectado a altas frecuencias mediante ensayos de CFC realizados con células CD34<sup>+</sup> de médula ósea obtenidas de pacientes con CML rara en CMR

durante muchos años (>11 años) después de tratamiento con imatinib y/o interferón. Aquí, se encontró que la expresión de ARNm de *BCR-ABL* era detectable pero no cuantificable por RT-qPCR en grupos de CFC del Paciente 3 que había alcanzado CMR (5log) 1 año después del inicio de la pioglitazona.

- 5 Se pueden realizar ensayos posteriores para confirmar si los pacientes permanecen en CMR después de suspender tanto imatinib como pioglitazona, dado que más del 50 % de los pacientes en CMR durante 2 años recaen un año después de suspender los TKI.

Los ejemplos anteriores indican que las LSC de CML tienen una "adicción no oncogénica" a STAT5, como se ha propuesto previamente en modelos de ratón. Esto es probablemente distinto de la activación canónica de STAT5 mediada por BCR-ABL en la mayor parte de las células de CML más diferenciadas. Las LSC de CML pueden ser especialmente sensibles a los niveles de STAT5 para su entrada en el ciclo celular o depende de una función aún no identificada de STAT5, que recuerda el papel mitocondrial accesorio desempeñado por STAT3 en la oncogénesis.

### 15 Ejemplo 7

Se incluyeron 27 pacientes en el ensayo clínico y 24 fueron evaluables (1 se excluyó en CMR4.5, 1 paciente no estaba en MMR y 1 paciente no dio su consentimiento). La media de edad fue de 61,6 años (24,1-79) y la media de seguimiento después de la inclusión fue de 13 meses (9,8-21). Todos los pacientes evaluables comenzaron con pioglitazona según lo planeado. Siete pacientes (29,2 %) interrumpieron la pioglitazona antes de los 12 meses, ningún paciente la interrumpió debido a eventos adversos. Las interrupciones se produjeron entre el mes 3 y el mes 9. La duración media de la terapia con pioglitazona fue de 11,2 meses (2,6-15,4) y la dosis media diaria fue de 39,9 mg. No se observó interacción entre imatinib y pioglitazona en términos de nivel antes (media de 850 ng/ml) y después (media de 927 ng/ml) del inicio de pioglitazona ( $p = ns$ ). Los principales eventos adversos fueron el aumento de peso y el empeoramiento de la retención de líquidos en 3 pacientes. Tres pacientes (14 %) obtuvieron un nivel confirmado indetectable de transcripción de BCR-ABL. La incidencia acumulativa en un año de CMR4.5 fue del 57 %. La cuantificación de ARNm de Stat5 disminuyó significativamente en muestras de pacientes en M6 y M12 en comparación con los valores iniciales y también se observó una reducción del potencial clonogénico en células de médula ósea en M6 y M12. Los "pacientes control" se reunieron con características similares ( $n = 20$ ). La incidencia acumulativa de CMR4.5 en este grupo de control fue del 27 % en comparación con el 57 % en el grupo de pioglitazona ( $p = 0,02$ ).

### Resultados

35 La **Figura 6** representa la expresión de genes diana en células CP-CML en respuesta a la combinación de pioglitazona e imatinib. **a**, se cultivaron células CD34<sup>+</sup> de CP-CML en medio libre de suero sin citocinas durante 7 días con imatinib en solitario (1  $\mu$ M) o imatinib y pioglitazona (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, respectivamente). Las células se procesaron entonces para ensayos de RT-qPCR con cebadores y se usaron sondas específicas para *OCT1*, *MDR1*, *SIRT1*, *STAT3*, *ALOX5* y *PML1 CD36*, humana, que se sabe que se regulan positivamente mediante agonistas de PPAR $\gamma$ , como control positivo. Los resultados se normalizaron a niveles de ARNm de *GAPDH* y se representaron en relación con la expresión de ARNm para la condición de "Imatinib solo" (medio de 11 pacientes con DE para cada gen evaluado). **b**, La expresión de la superficie celular de GLUT1 se cuantificó mediante citometría de flujo (media de 5 pacientes).

45 Se observó que la ruta PPAR $\gamma$ /STAT5 inducía un defecto clonogénico en células CD34<sup>+</sup> de pacientes con CML. Además, la activación de la ruta PPAR $\gamma$ /STAT5 también indujo un defecto clonogénico y proliferativo en LTC-IC de CML. Después, se confirmó que el imatinib indujo una selección de células de CML inactivas insensibles y se mostró que este efecto se anuló por la activación de la ruta PPAR $\gamma$ /STAT5.

50 Tabla 2. Cebadores y sondas usados para RT-qPCR

a	Nombre	Secuencias de cebador y sonda	Modificación	Conc.
	<i>GAPDH F</i>	5'-TCGTGGAAGGACTCATGACC-3'		900 nM
	<i>GAPDH R</i>	5'-TCAGCTCAGGGATGACCTTG-3'		900 nM
	<i>GAPDH P</i>	5'-AGTCCATGCCATCACTGCCACCCA-3'	5'-[5HEX]3'- [BHQ1a~5HEX]	250 nM
	<i>STAT5B F</i>	5'-GGCAGAGTCGGTGACAGAAG-3'		750 nM

ES 2 668 310 T3

<i>STAT5B R</i>	5'-GGCTCTGCAAAAGCATTGTC-3'		750 nM
<i>STAT5B P</i>	5'-CAGCCAGGACAACAATGCGACGG-3'	5'-[6~FAM]3'- [TAMRA~6~FAM]	250 nM
<i>BCR-ABL F</i> (ENF 501)	5'-TCCGCTGACCATCAATAAGGA-3'		
<i>BCR-ABL R</i> (ENR 561)	5'-CACTCAGACCCTGAGGCTCAA-3'		
<i>BCR-ABL P</i> (ENP 541)	5'-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-3'	5'-[6~FAM]3'- [TAMRA~6~FAM]	
<i>ABL F</i>	5'-TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGG-3'		
<i>ABL R</i>	5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'		
<i>ABL P</i>	5'-CCATTTTGGTTTGGGCTTACACCATT-3'	5'-[6~FAM]3'- [TAMRA~6~FAM]	
<b>b</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencias de cebador</b>	<b>Conc.</b>
	<i>STAT5A F</i>	5'-CGAGTGCAGTGGTGAGATCC-3'	750 nM
	<i>STAT5A R</i>	5'-TCCTCTGTACGGACTCTGC-3'	750 nM
	<i>PPAR<math>\gamma</math> F</i>	5'-AGCTCCGTGGATCTCTCCGT-3'	650 nM
	<i>PPAR<math>\gamma</math> R</i>	5'-CATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT-3'	650 nM
	<i>CD36 F</i>	5'-TTGGCCAAGCTATTGCGACA-3'	750 nM
	<i>CD36 R</i>	5'-GCAAAGGCATTGGCTGGAAG-3'	750 nM
	<i>hOCT1 F</i>	5'-CTGAGCTGTACCCACATTTCG-3'	750 nM
	<i>hOCT1 R</i>	5'-CCAACACCGCAAACAAAATGA-3'	750 nM
	<i>MDR1 F</i>	5'-AGACATGACCAGGTATGCCTA-3'	750 nM
	<i>MDR1 R</i>	5'-AGCCTATCTCCTGTGCGATTA-3'	750 nM
	<i>SirT1 F</i>	5'-GATGACGATGACAGAACGTCACA-3'	900 nM
	<i>SirT1 R</i>	5'-GGATCGGTGCCAATCATGAG-3'	900 nM
	<i>STAT3 F</i>	5'-ACCTGCAGCAATACCATTGAC-3'	750 nM
	<i>STAT3 R</i>	5'-AAGGTGAGGGACTCAAACCTGC-3'	750 nM
	<i>ALOX5 F</i>	5'-CACATGTTCCAGTCTTCTTGGA-3'	650 nM
	<i>ALOX5 R</i>	5'-ATGACCCGCTCAGAAATAGTGT-3'	650 nM
	<i>PML F</i>	5'-TGCCAGTGTACGCCTTCTCC-3'	600 nM
	<i>PML R</i>	5'-AGCCAACCTTGCCTCCTTCC-3'	600 nM

FAM: éster de 6-carboxifluoresceína, HEX: hexacloro fluoresceína, TAMRA: tetrametil-6-carboxirodamina, TAMRA: tetrametil-6-carboxirodamina, BHQ1: Black Hole Quencher, Conc: concentración.

**Ejemplo 8**

Se realizaron estudios para mostrar que la regulación descendente de STAT5 disminuye la expresión anormalmente alta del factor de transcripción HIF 2a, dando como resultado la purga de células madre de CML (LSC) inactivas, al combinarse con Imatinib. El ARNsi de HIF 2a se usó para inhibir la expresión en células madre CD34<sup>+</sup>, en solitario y en combinación con Imatinib. Los resultados del día 7 se muestran en la Figura 9, lo que indica que la combinación de inhibición de HIF 2a e Imatinib causó una erosión significativa de las células madre. Dado que las LSC son dependientes de HIF 2a (regulado por STAT5), la supresión de HIF 2a por inhibidores de STAT5 (por ejemplo, agonistas de PPAR, tal como pioglitazona) induce la proliferación de LSC, y potencia el efecto de la terapia con Imatinib.

**Ejemplo 9**

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si la expresión de STAT5 como diana con pioglitazona afectaba la actividad clonogénica de las células de leucemia mieloide crónica (CML) *in vitro*, dando como resultado la mejora de la respuesta molecular *in vivo*.

**Pacientes y métodos**

Los estudios preliminares *in vitro* probaron la capacidad de la pioglitazona para afectar a la viabilidad y la clonogenicidad de células primarias CD34<sup>+</sup> de pacientes con CML. Se realizaron estudios clonogénicos y de LTC-IC. Las células Ph<sup>+</sup>-CD34<sup>+</sup> cultivadas se caracterizaron por facs y se analizaron mediante un ensayo de CSFE. La expresión de BCR-ABL y STAT5 se cuantificó mediante PCR en tiempo real. Los experimentos de control se realizaron usando vectores lentivirales y ensayo de ARNsi para Stat5 y PPAR- $\gamma$ .

Los pacientes con CML fueron aptos en el ensayo ACTIM (EudraCT 2009-011675-79) si fueron tratados con imatinib durante al menos 2 años, con una dosis diaria estable durante al menos 3 meses, y en respuesta molecular mayor sin haber logrado CMR4.5 (definido por una relación BCR-ABL/ABL IS  $\leq 0,0032$  %). Después de la inclusión, los pacientes recibieron imatinib (sin modificación de la dosis) e iniciaron la administración de pioglitazona (Actos®) 30 mg/día durante 2 meses y 45 mg/día a partir de entonces durante 12 meses. El nivel de transcripción de BCR-ABL se controló cada 3 meses durante el período de estudio. El objetivo principal fue la proporción de pacientes que alcanzaron un nivel confirmado indetectable de transcripción de BCR-ABL. Los objetivos secundarios incluyeron la incidencia acumulativa de CMR4.5 y la seguridad. Un estudio biológico complementario evaluó el imatinib a través de los niveles, la expresión de STAT5 en la médula ósea al inicio, los meses 6 y 12, y la actividad clonogénica de las células mononucleares de la médula ósea al inicio, los meses 6 y 12.

**Resultados**

A partir de los estudios *in vitro*, se demostró en primer lugar que la pioglitazona a dosis farmacológicas inhibió el crecimiento celular de la línea celular positiva para Bcr-Abl K562 a través de la activación de la ruta PPAR- $\gamma$ /STAT5. A continuación, se mostró que la ruta PPAR- $\gamma$ /STAT5 indujo un defecto clonogénico en células CD34<sup>+</sup> de pacientes con CML. Además, la activación de la ruta PPAR- $\gamma$ /STAT5 también indujo un defecto clonogénico y proliferativo en LTC-IC de CML. Después, se confirmó que el imatinib indujo una selección de células de CML inactivas insensibles y se mostró que este efecto se anuló por la activación de la ruta PPAR- $\gamma$ /STAT5.

Se incluyeron veintisiete pacientes en el ensayo clínico y 24 fueron evaluables (1 se excluyó en CMR4.5, 1 paciente no estaba en MMR y 1 paciente no dio su consentimiento). La media de edad fue de 61,6 años (24,1-79) y la media de seguimiento después de la inclusión fue de 13 meses (9,8-21). Todos los pacientes evaluables comenzaron con pioglitazona según lo planeado. Siete pacientes (29,2 %) interrumpieron la pioglitazona antes de los 12 meses, 6 tras la decisión del investigador después de la advertencia del ministerio de salud francés sobre el riesgo de cáncer de vejiga, y 1 por su propia decisión. Ningún paciente lo interrumpió debido a eventos adversos. Las interrupciones se produjeron entre el mes 3 y el mes 9. La duración media de la terapia con pioglitazona fue de 11,2 meses (2,6-15,4), la dosis diaria media fue de 39,9 mg. Los niveles de imatinib no se vieron significativamente afectados antes (media de 850 ng/ml) y después (media de 927 ng/ml) del inicio de pioglitazona ( $p = ns$ ), lo que indica falta de interacción. Los principales eventos adversos fueron el aumento de peso y el empeoramiento de la retención de líquidos en 3 pacientes. Tres pacientes (14 %) obtuvieron un nivel confirmado indetectable de transcripción de BCR-ABL. La incidencia acumulativa en un año de CMR4.5 fue del 57 %. La cuantificación de ARNm de STAT5 disminuyó significativamente en muestras de pacientes en M6 y M12 en comparación con los valores iniciales y también se observó una reducción del potencial clonogénico en células de médula ósea en M6 y M12. Se agruparon

"pacientes de control" con características similares (n = 20). Ninguno de estos pacientes obtuvo una CMR confirmada y la incidencia acumulativa de CMR4.5 en este grupo de control fue del 27 % en comparación con el 57 % en el grupo de pioglitazona (p = 0,02).

## 5 Conclusión

El estudio *in vivo* amplió los resultados anteriores *in vitro*, demostrando que los agonistas de PPAR- $\gamma$  produjeron una regulación descendente de STAT5 en las células CD34<sup>+</sup> de CML y redujeron preferentemente su potencia clonogénica y a largo plazo en los ensayos de CFC y LTC-IC. Específicamente, el estudio demostró que estos efectos se traducen *in vivo* por el logro de una MMR en más de la mitad de los pacientes tratados con la combinación de pioglitazona e imatinib, lo que sugiere que es posible dirigir las células de LMC inactivas *in vivo* y apoyar el concepto de erosión de la agrupación de células madre.

## LISTA DE SECUENCIAS

15	<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES	
	<120> MÉTODOS PARA PREVENIR LA RECIDIVA DE CÁNCER HEMATOLÓGICO	
20	<130> N405618EP	
	<140> EP 13821931.6	
	<141> 05-11-2013	
25	<150> US 61/794.367	
	<151> 15-03-2013	
	<150> US 61/722.633	
	<151> 05-11-2012	
30	<160> 40	
	<170> PatentIn versión 3.5	
35	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia de emparejamiento de ARNm sintético	
	<400> 1	
	tggtccgtga caatctgtc19	
45	<210> 2	
	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> sitio de restricción	
	<400> 2	
	gatctcctgt tccgtgacaa tctgtcttca agagaacaga ttgtcacgga acatttttgg	60
55	aagaattcc	69
	<210> 3	

ES 2 668 310 T3

<211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sitio de restricción

<400> 3  
 ctgaggaatt cttccaaaaa tgttccgtga caatctgtaa gttctctaca gattgtcacg 60  
 gaacagga 68

10 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador sintético

20 <400> 4  
 atggtggacc cggtgggctt 20

<210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Cebador sintético

30 <400> 5  
 ctgctacctc tgcaactatgt cactg 25

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador sintético

40 <400> 6  
 tccgctgacc atcaataagg a 21

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador sintético

50 <400> 7  
 ctgctacctc tgcaactatgt cactg 25

55 <210> 8  
 <211> 29  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 5  
 <400> 8  
 aggcgcgccca tggaggacc ggtgggctt29  
 <210> 9  
 10 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador sintético  
 <400> 9  
 cctgcaggct gctacctg cactatgtca ctg 33  
 20 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 10  
 tgttccgtga caatctgtc19  
 <210> 11  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 35 <400> 11  
 tcgtggaagg actcatgacc 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 45 <400> 12  
 tcagctcagg gatgacctg 20  
 <210> 13  
 <211> 24  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Sonda sintética  
 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 668 310 T3

<222> (1)..(1)  
 <223> 5'-[5HEX] (HEX: hexacloro fluoresceína)

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> 3'-[BHQ1a~5HEX] (BHQ1a: Black Hole Quencher; HEX: hexacloro fluoresceína)

10 <400> 13  
 agtccatgcc atcactgcc ccca 24

15 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador sintético

25 <400> 14  
 ggcagagtcg gtgacagaag 20

30 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador sintético

40 <400> 15  
 ggctctgcaa aagcattgtc 20

45 <210> 16  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sonda sintética

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5'-[6~FAM] (FAM: 6-carboxifluoresceína éster)

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 <223> 3'-[TAMRA~6~FAM] (TAMRA: tetrametil-6-carboxirrodamina; FAM: 6-carboxifluoresceína éster)

65 <400> 16  
 cagccaggac aacaatgcca cgg 23

70 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sintético

5 <400> 17  
 tccgctgacc atcaataagg a 21

10 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador sintético

20 <400> 18  
 cactcagacc ctgaggctca a 21

25 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sonda sintética

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5'-[6~FAM] (FAM: 6-carboxifluoresceína éster)

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(25)  
 <223> 3'-[TAMRA~6~FAM] (TAMRA: tetrametil-6-carboxirrodamina; FAM: 6-carboxifluoresceína éster)

45 <400> 19  
 cccttcagcg gccagtagca tctga 25

50 <210> 20  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador sintético

<400> 20  
 tggagataac actctaagca taactaaagg 30

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sintético

<400> 21  
 gatgtagttg ctgggaccc a 21

<210> 22  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda sintética  
  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 5'-[6~FAM] (FAM: 6-carboxifluoresceína éster)  
  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> 3'-[TAMRA~6~FAM] (TAMRA: tetrametil-6-carboxirrodamina; FAM: 6-carboxifluoresceína éster)  
  
 20 <400> 22  
 ccattttggt ttgggcttca caccatt 27  
  
 <210> 23  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 30 <400> 23  
 cgagtgccagt ggtgagatcc 20  
  
 <210> 24  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 40 <400> 24  
 tcctctgtca cggactctgc 20  
  
 <210> 25  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 50 <400> 25  
 agctccgtgg atctctccgt 20  
  
 55 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> Cebador sintético	
5	<400> 26 catgagggag ttggaaggct ct	22
10	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 27 ttggccaagc tattgcgaca	20
20	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 28 gcaaaggcat tggctggaag	20
30	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético	
40	<400> 29 ctgagctgta cccacattc g	21
45	<210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 30 ccaacaccgc aaacaaaatg a	21
55	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	

ES 2 668 310 T3

	<400> 31 agacatgacc aggtatgcct a	21
5	<210> 32 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
15	<400> 32 agcctatctc ctgtcgatt a	21
20	<210> 33 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético	
30	<400> 33 gatgacgatg acagaacgac aca	23
35	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 34 ggatcgggca caatcatgag	20
50	<210> 35 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 35 acctgcagca ataccattga c	21
	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 36 aaggtgaggg actcaaactg c	21
	<210> 37	

# ES 2 668 310 T3

	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 37	
10	cacatgtcc agtctcttg ga	22
	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 38	
20	atgacccgct cagaaatagt gt	22
	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 39	
30	tgccagtga cgcctctcc	20
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 40	
40	agccaacctt gcctcctcc	20

## REIVINDICACIONES

1. Un agente anticanceroso para su uso en un método para prevenir la recidiva de cáncer hematológico en un paciente, comprendiendo el método:
- 5 (A) administrar al paciente una cantidad eficaz del agente anticanceroso hasta que se consiga una incidencia acumulativa estable de respuesta en el paciente, en el que el agente anticanceroso es un inhibidor de tirosina cinasa (TKI); y
- 10 (B) administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista del receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ), en el que el agonista de PPAR $\gamma$  inhibe la transcripción del Transductor de señal y el Activador de la Transcripción 5 (STAT5).
2. Un agonista de PPAR $\gamma$  para su uso en un método para prevenir la recidiva de cáncer hematológico en un paciente, comprendiendo el método:
- 15 (A) administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente anticanceroso hasta que se consiga una incidencia acumulativa estable de respuesta en el paciente, en el que el agente anticanceroso es un inhibidor de tirosina cinasa (TKI); y
- 20 (B) administrar al paciente una cantidad eficaz del agonista de PPAR $\gamma$ , en el que el agonista de PPAR $\gamma$  inhibe la transcripción del Transductor de señal y el Activador de la Transcripción 5 (STAT5).
3. El agente anticanceroso para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el agonista de PPAR $\gamma$  es un compuesto de tiazolidindiona.
- 25 4. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el compuesto de tiazolidindiona es una glitazona, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en pioglitazona, rosiglitazona, troglitazona, englitazona, ciglitazona y netoglitazona.
5. El agente anticanceroso o el agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o
- 30 4, en el que el compuesto de tiazolidindiona es pioglitazona.
6. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente tiene leucemia.
- 35 7. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente tiene leucemia mieloide crónica (CML) o leucemia mieloide aguda.
8. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el TKI se selecciona del grupo que consiste en imatinib, dasatinib, nilotinib,
- 40 bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, quizartinib, sunitinib y AMN107.
9. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el TKI inhibe la fosforilación de BCR-ABL.
- 45 10. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- (a) el agonista de PPAR $\gamma$  se administra a una dosis de aproximadamente 15-60 mg/día o aproximadamente
- 50 30-50 mg/día; y/o
- (b) el TKI se administra a una dosis de aproximadamente 300-800 mg/día o aproximadamente 300-400 mg/día.
11. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la respuesta se selecciona del grupo que consiste en remisión hematológica
- 55 completa (CHR), remisión citológica mayor (MCR), remisión citológica completa (CCR), remisión molecular mayor (MMR) y remisión molecular completa (CMR).
12. El agente anticanceroso o el agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- (a) el TKI se administra durante al menos 3 meses antes de la administración del agonista de PPAR $\gamma$ ;  
(b) el agonista de PPAR $\gamma$  se administra durante 2-12 meses simultáneamente con el TKI; y/o  
(c) la administración del TKI se continúa después de que se interrumpa la administración del agonista de PPAR $\gamma$ .

5

13. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el cáncer es un cáncer mieloide, el TKI se administra a una dosis de aproximadamente 300-400 mg/día, el agonista de PPAR $\gamma$  se administra al paciente a una dosis de aproximadamente 30-50 mg/día, y el agonista de PPAR $\gamma$  es un compuesto de tiazolidindiona.

10

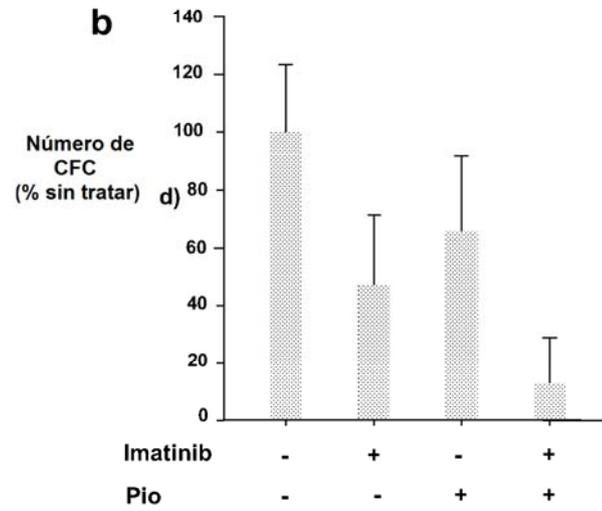
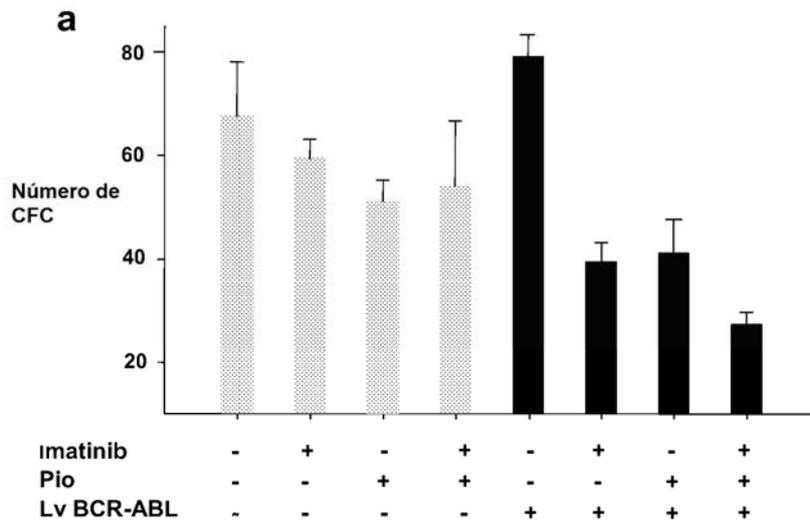
14. El agente anticanceroso o el agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el compuesto de tiazolidindiona es una glitazona y:

15

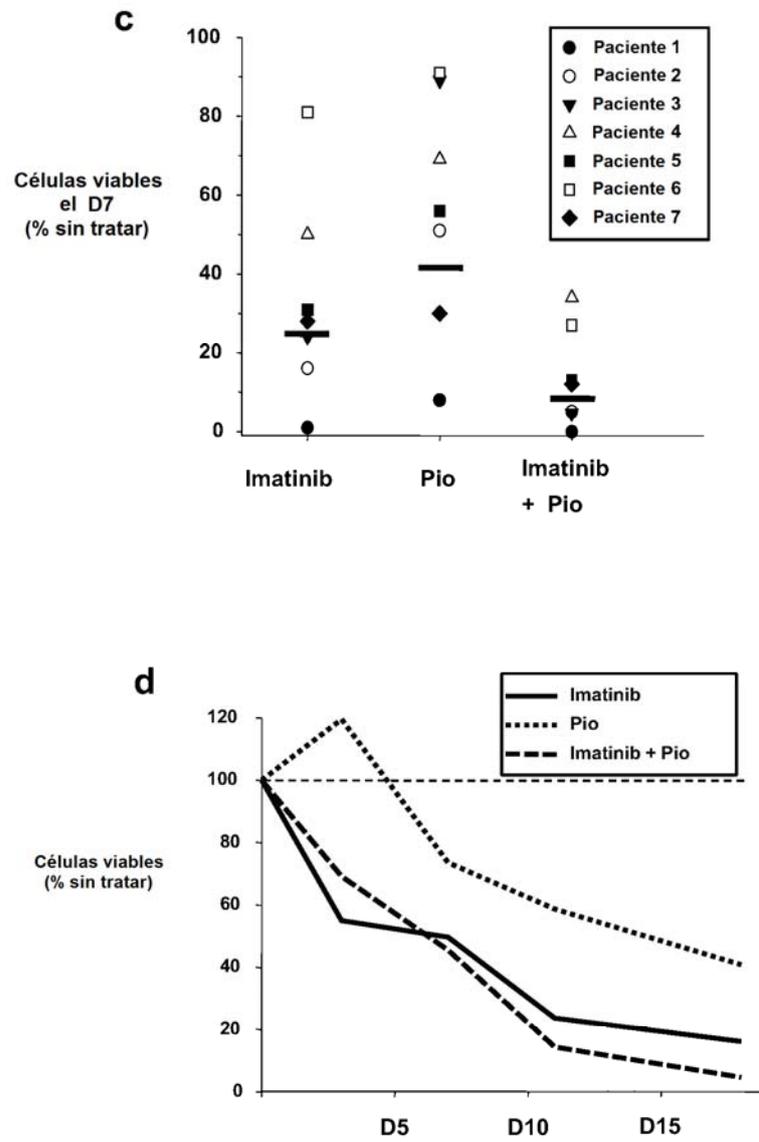
- (a) la glitazona se administra durante aproximadamente 2-12 meses hasta que se logra una CMR; y/o  
(b) la glitazona se administra a una dosis de aproximadamente 30 mg/día durante 2 meses y aproximadamente 45 mg/día a partir de entonces durante un total de 12 meses.

15. El agente anticanceroso o agonista de PPAR $\gamma$  para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el cáncer es CML, **caracterizado por** una translocación recíproca t(9;22)(q34;q11) (der22 o cromosoma Ph+) y la expresión de la proteína de fusión BCR-ABL, el TKI se administra a un paciente con CML a una dosis de aproximadamente 300-400 mg/día, el TKI inhibe la fosforilación de BCR-ABL, el agonista de PPAR $\gamma$  se administra al paciente a una dosis de aproximadamente 30-50 mg/día hasta lograr una respuesta molecular completa (CMR), y el agonista de PPAR $\gamma$  es una glitazona.

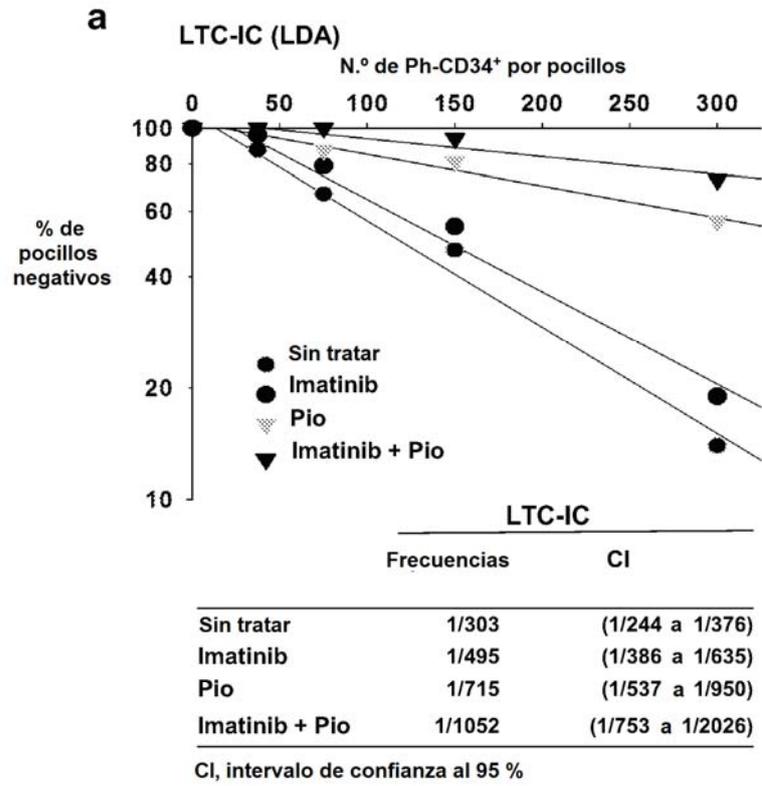
20  
25



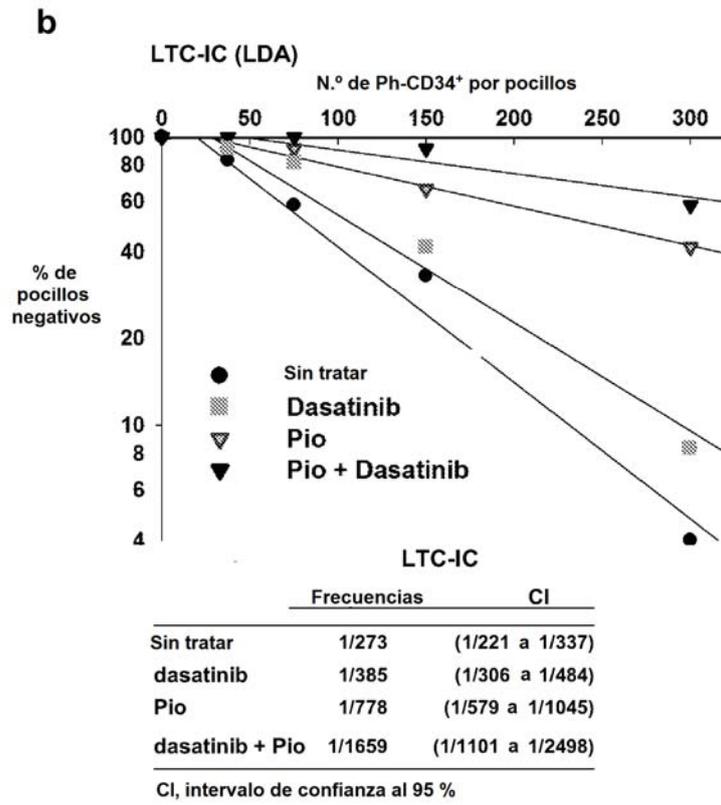
**Fig. 1**



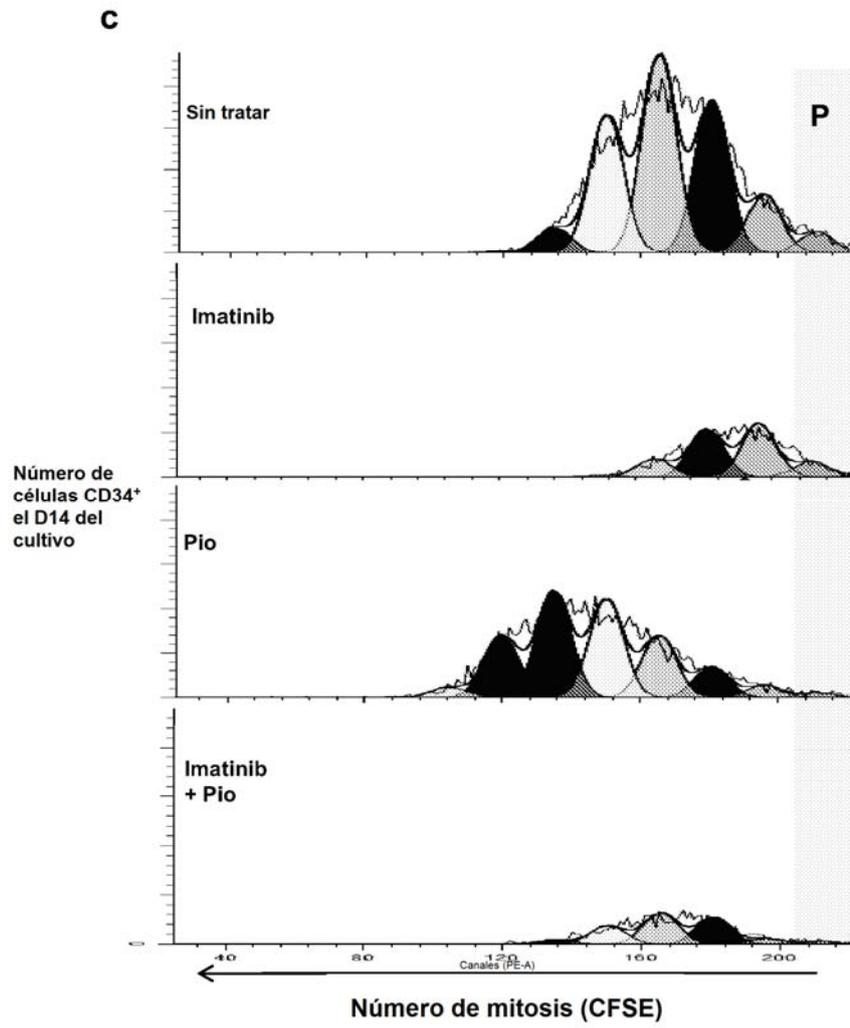
**Fig. 1- cont.**



**Fig. 2**



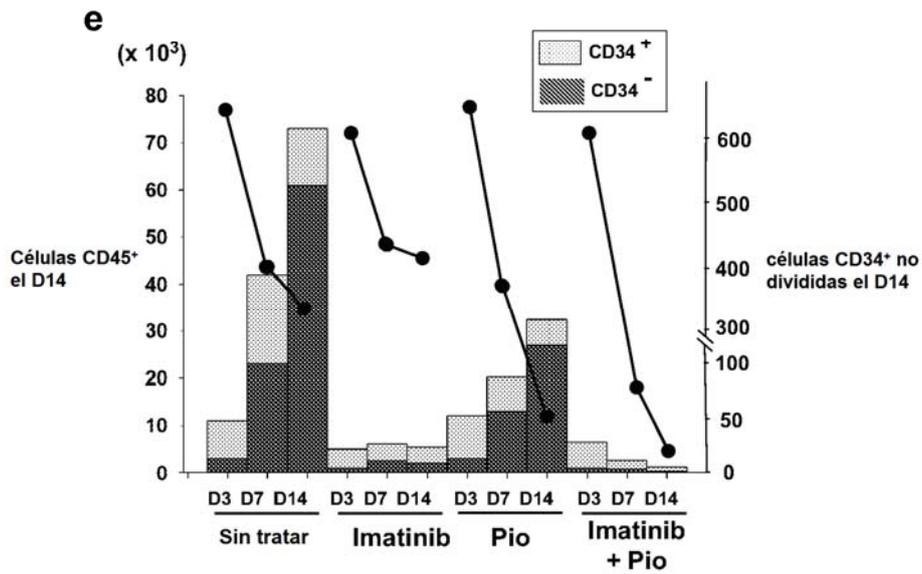
**Fig. 2-cont.**



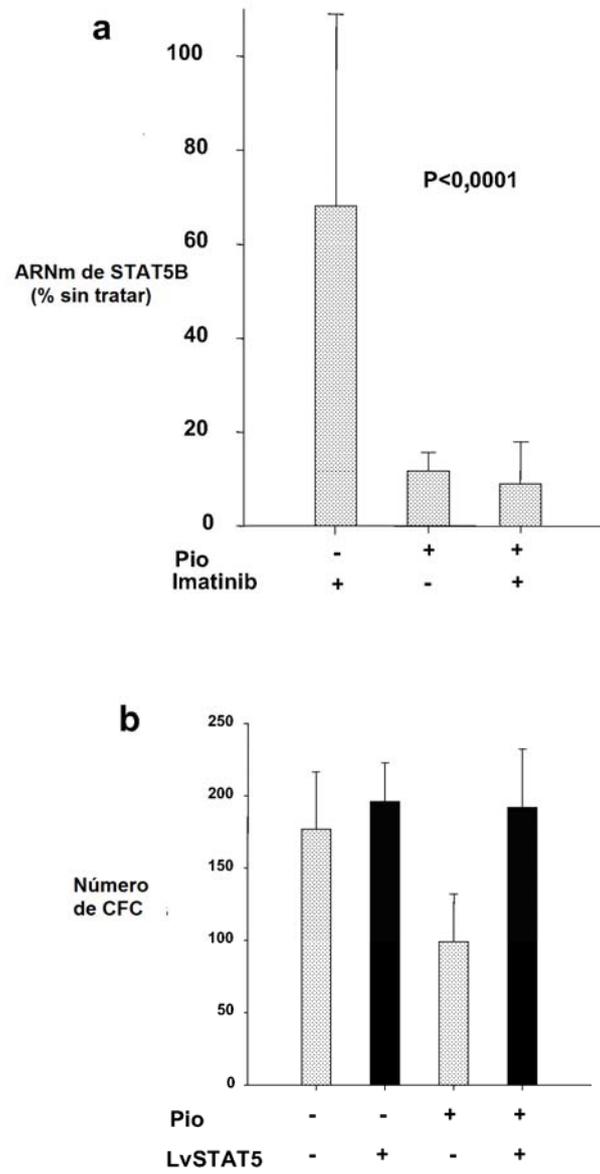
**Fig. 2-cont.**

**d** Distribución de las células CD34<sup>+</sup> el D14 (%)

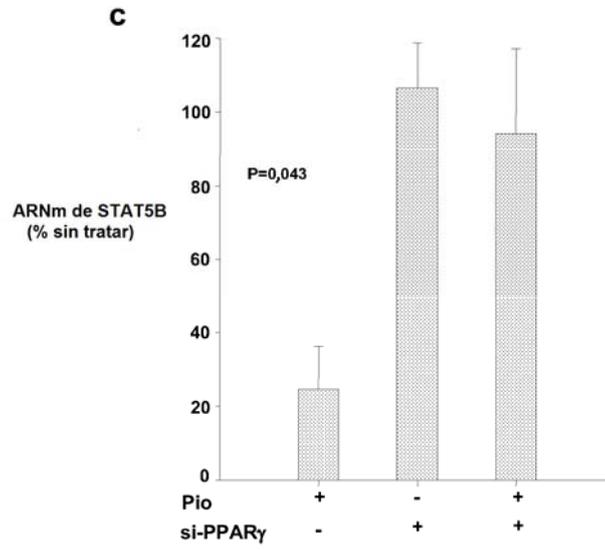
	Números de división celular								P
	8	7	6	5	4	3	2	1	
Sin tratar	0	0	0,3	4,3	23	33	25,6	9,8	3,4
Imatinib	0	0	0,7	6,2	13	26	20	23	13
Pio	0,1	2,5	16	27	25	16	7,9	3	1,1
Imatinib + Pio	0	0	0,3	5,23	24	33	26	6,5	2,9



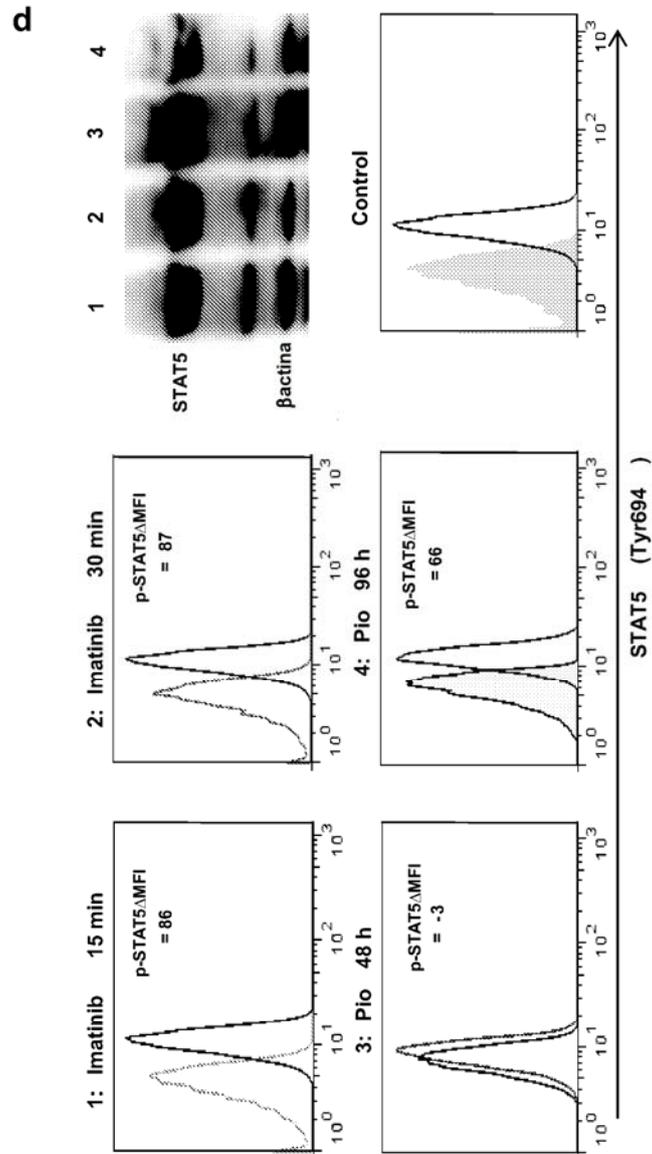
**Fig. 2-cont.**



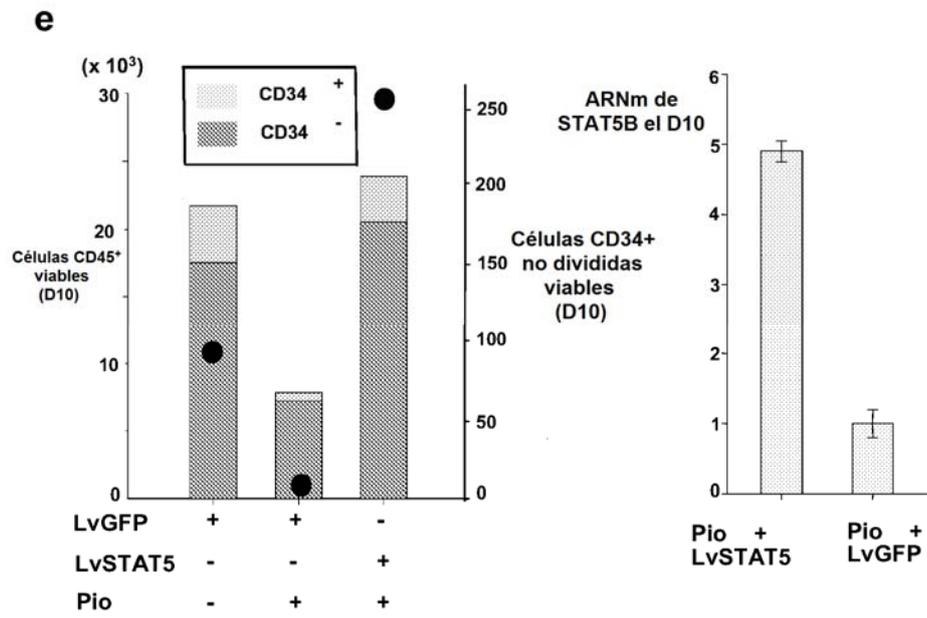
**Fig. 3**



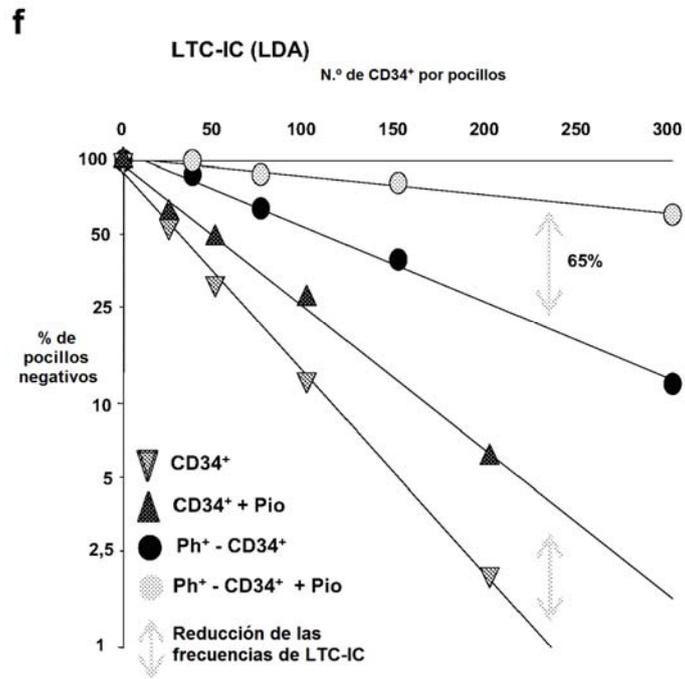
**Fig. 3- cont.**



**Fig. 3- cont.**



**Fig. 3- cont.**



**Fig. 3- cont.**

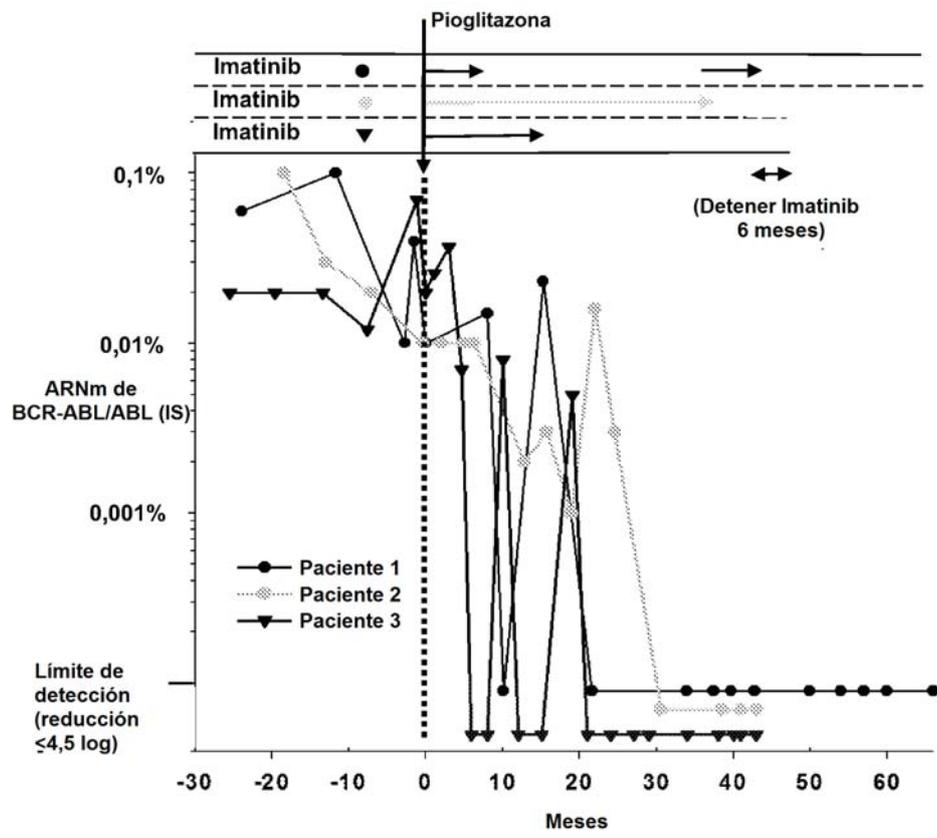
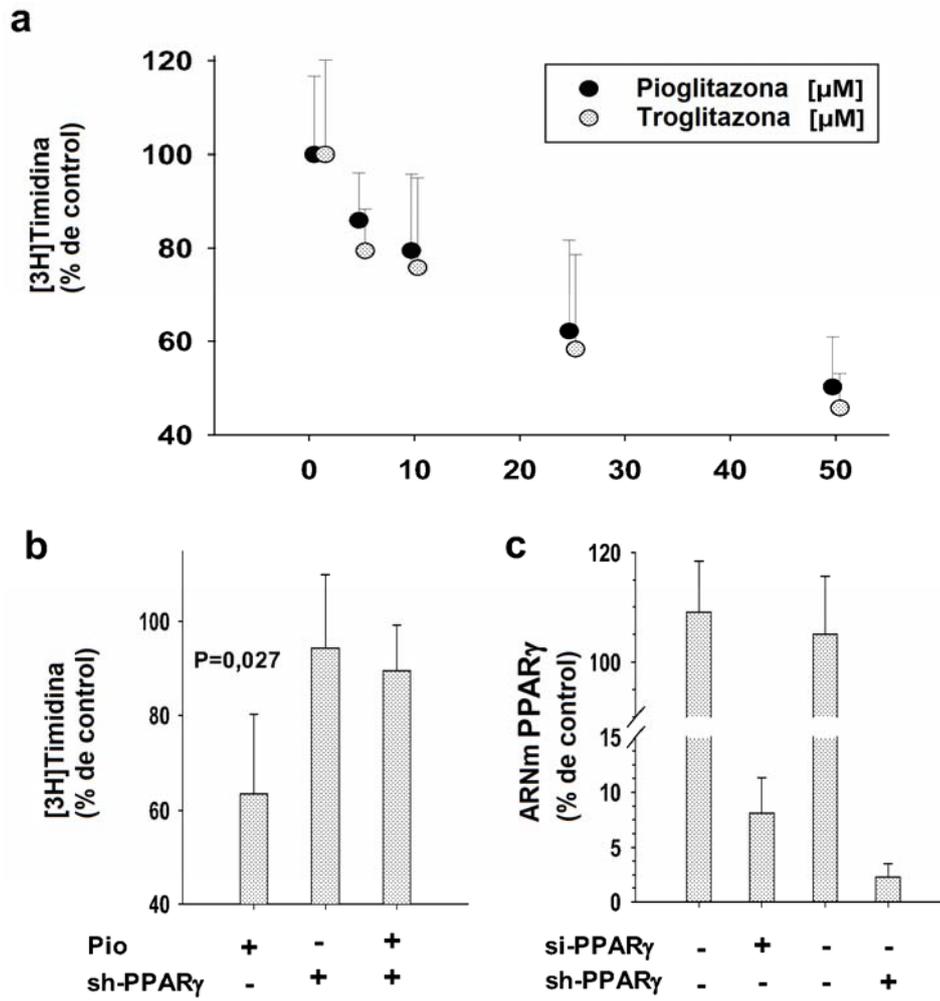
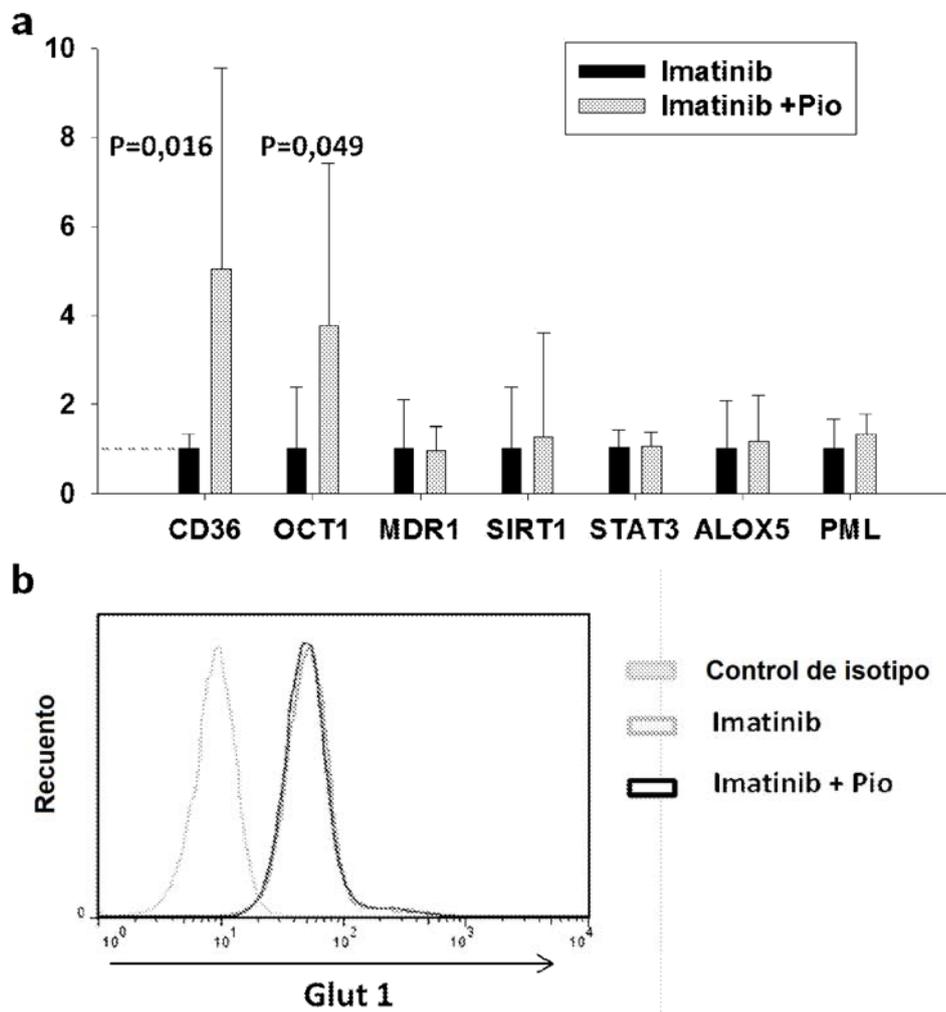


Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**

Tratamiento de seguimiento con 400 mg/día de Imatinib oral

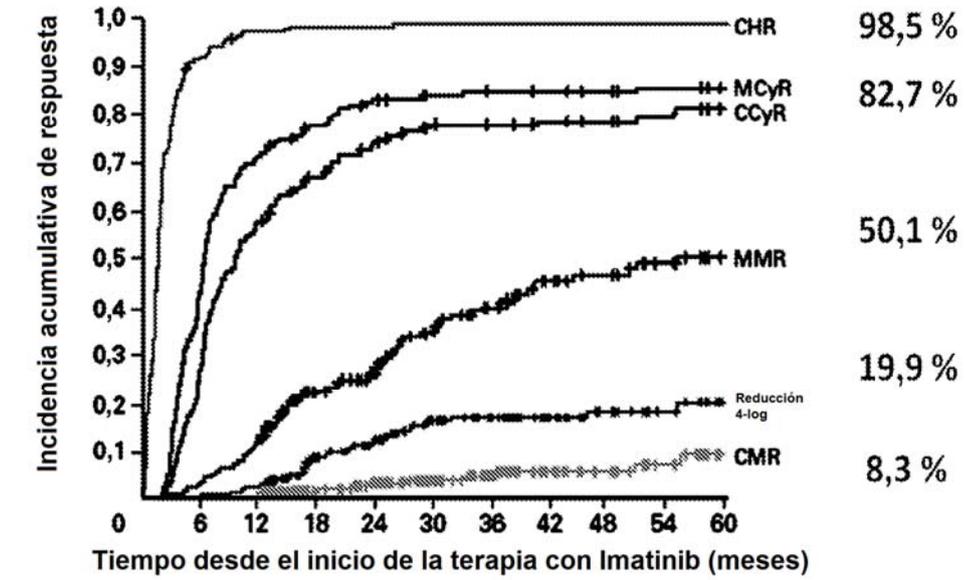
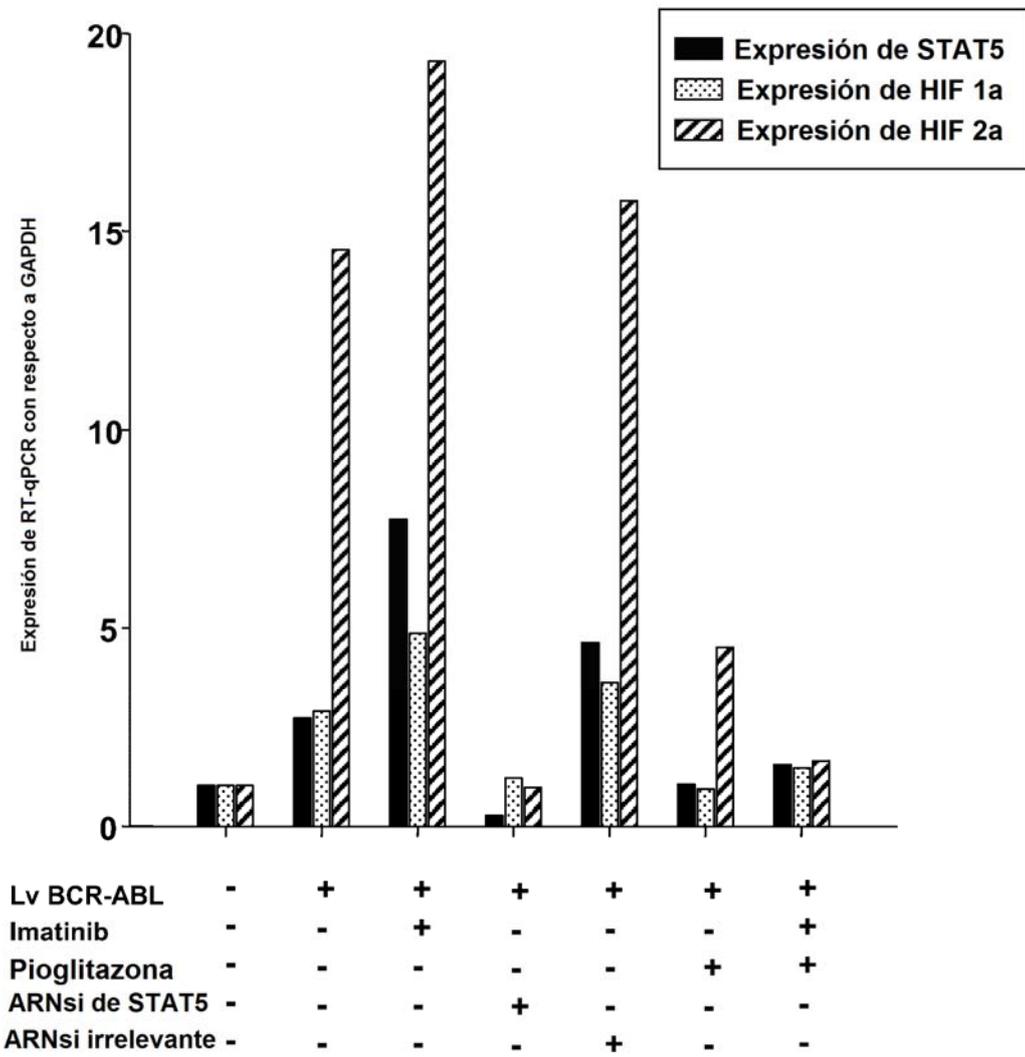
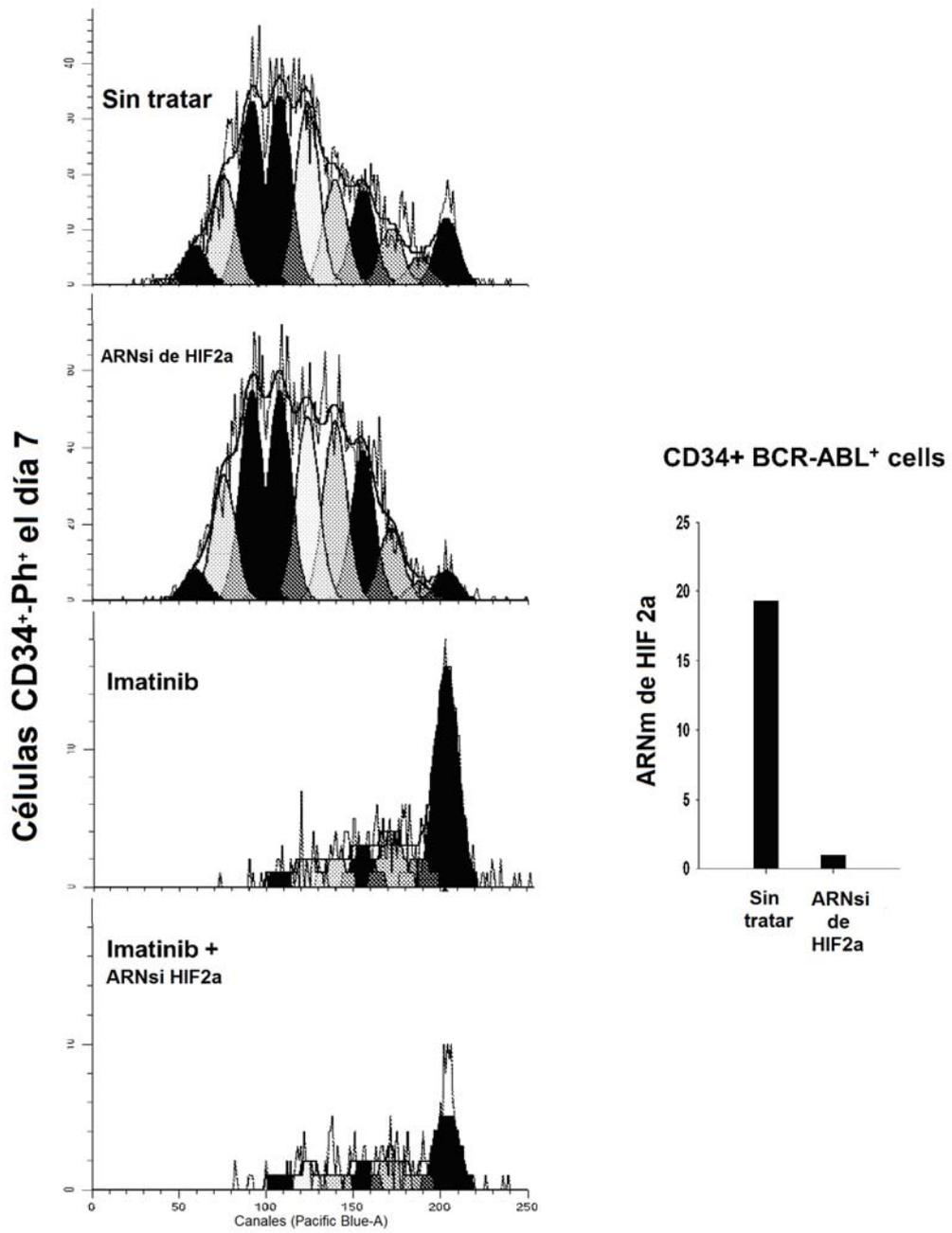


Fig. 7



**Fig. 8**



**Fig. 9**