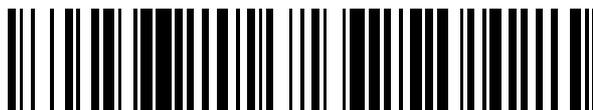


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 714**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/4184** (2006.01)  
**A61K 31/7076** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2008** **E 12177257 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2564846**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de cánceres hematológicos que utilizan inhibidores de PNP tales como la forodesina en combinación con los agentes anti-CD20**

30 Prioridad:

**10.12.2007 US 12762 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.05.2018**

73 Titular/es:

**BIOCRIST PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**4505 Emperor Blvd.**  
**Durham, NC 27703, US**

72 Inventor/es:

**BANTIA, SHANTA;**  
**BREITFELD, PHILIP y**  
**BABU, YARLAGADDA SUDHAKARA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 670 714 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

Procedimientos de tratamiento de cánceres hematológicos que utilizan inhibidores de PNP tales como la forodesina en combinación con los agentes anti-CD20

La presente solicitud se refiere al tratamiento de cánceres hematológicos, por ejemplo, cánceres de la sangre, que resultan útiles en procedimientos que incluyen la administración de un inhibidor de nucleósido purina fosforilasa (PNP). En particular, se describen procedimientos de tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC) y la leucemia linfocítica aguda (ALL).

### Antecedentes

El cáncer es actualmente la causa principal de muerte en los Estados Unidos y más de 8.000.000 de personas en Estados Unidos han sido diagnosticadas de cáncer. En 1995, el cáncer representaba el 23,3% de todas las muertes en Estados Unidos (ver, por ejemplo, U.S. Dept. of Health and Human Services, National Center for Health Statistics, Health United States 1996-97 e Injury Chartbook 117, 1997).

Actualmente el cáncer se trata principalmente con una terapia o una combinación de tres tipos de terapia: cirugía, radiación y quimioterapia. La cirugía incluye la eliminación en masa del tejido enfermo. Aunque la cirugía en ocasiones resulta eficaz en la eliminación de tumores situados en determinados sitios, por ejemplo, en la mama, el colon y la piel, no puede utilizarse en el tratamiento de tumores situados en otras zonas, tales como la columna vertebral, ni en el tratamiento de condiciones neoplásicas diseminadas, tales como la leucemia. La terapia de radiación implica la exposición del tejido vivo a radiación ionizante que causa la muerte o daños a las células expuestas. Los efectos secundarios de la terapia de radiación pueden ser agudos y temporales, mientras que en otros casos pueden ser irreversibles. La quimioterapia implica la disrupción de la replicación celular o del metabolismo celular. Se utiliza más frecuentemente en el tratamiento de los cánceres de mama, de pulmón y testicular. Una de las causas principales del fracaso en dicho tratamiento del cáncer es el desarrollo de resistencia farmacológica por las células de cáncer, un problema grave que puede conducir a la recurrencia de la enfermedad o incluso a la muerte. De esta manera, resultan necesarios tratamientos más eficaces del cáncer.

### Sumario

En la presente memoria se describe un procedimiento de tratamiento de un cáncer hematológico (por ejemplo, la CLL y la ALL) en un sujeto. El procedimiento incluye las etapas de: (a) administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de nucleósido purina fosforilasa (PNP) y (b) administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un agente anti-CD20 y opcionalmente un agente alquilante. El inhibidor de PNP es forodesina y el agente anti-CD20 es el rituximab. En otras formas de realización, el agente alquilante se selecciona de entre un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino y un compuesto carboxamida de imidazol. En algunas formas de realización el agente alquilante es la bendamustina.

En la presente memoria se proporciona la utilización de forodesina en combinación con rituximab en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer hematológico.

En algunas formas de realización, la forodesina y el rituximab se administran concurrentemente, mientras que en otras formas de realización, la forodesina y el rituximab se administran secuencialmente. En la última forma de realización, el rituximab puede administrarse una o más veces antes de administrar la forodesina.

En otra forma de realización, la invención se refiere a forodesina en combinación con rituximab para la utilización en el tratamiento de cáncer hematológico. En una forma de realización adicional, la forodesina y el rituximab se administran concurrente o secuencialmente. En algunas formas de realización, la forodesina en combinación con rituximab para dicha utilización puede comprender además un agente alquilante. En algunas formas de realización, el rituximab se administra una o más veces antes de administrar forodesina. En formas de realización adicionales de forodesina en combinación con rituximab, para dicha utilización puede administrarse un agente alquilante una o más veces antes de administrar forodesina.

El cáncer hematológico se selecciona de entre leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda y linfoma no de Hodgkin.

En algunas formas de realización, el agente alquilante opcional se selecciona de entre: un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino y un compuesto carboxamida de imidazol, preferentemente bendamustina.

El procedimiento descrito de tratamiento de un sujeto con un cáncer hematológico puede incluir las etapas de: (a) detectar una delección en p53 en una o más células de cáncer en una muestra del sujeto y (b) administrar en el sujeto forodesina. El procedimiento descrito puede incluir además detectar la presencia de una delección 17p y/o

determinar si una o más células de cáncer en la muestra son resistentes a uno o más agentes quimioterápicos (por ejemplo, un agente alquilante y un análogo de nucleósido purina).

5 En la presente memoria se proporciona además una composición farmacéutica que comprende forodesina y rituximab, que opcionalmente comprende además un agente alquilante.

10 En la presente memoria se proporciona además un kit que comprende forodesina y rituximab, que comprende opcionalmente además un agente alquilante. En algunas formas de realización, el kit puede incluir además un sistema de administración para la forodesina, el rituximab, el agente alquilante opcional o cualquier combinación de los mismos. En otra forma de realización, el kit puede incluir además instrucciones para el tratamiento de un sujeto.

15 En otra forma de realización, un kit comprende un inhibidor de PNP. En una forma de realización, el kit incluye además una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse en un sujeto que es resistente a un agente alquilante. En algunas formas de realización, el kit incluye además una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse en un sujeto con una delección de p53. En una forma de realización final, el kit puede incluir una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse con un agente alquilante o un agente anti-CD20. El agente alquilante preferentemente se selecciona de entre: un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino y un compuesto carboxamida de imidazol. Particularmente preferentemente el agente alquilante es bendamustina.

Determinadas formas de realización proporcionan la utilización de forodesina y rituximab para la preparación de un medicamento útil para tratar un cáncer hematológico en un animal.

25 Los datos de una o más formas de realización de la invención se indican en los dibujos adjuntos y en la descripción, a continuación. Otras características, objetivos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y de las reivindicaciones.

### 30 Descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B detallan el efecto de citotoxicidad de la forodesina en las células de CLL que muestran niveles de ZAP-70 tanto elevados como bajos.

35 La figura 2 representa la correlación entre un incremento intracelular de los niveles de dGTP tras el tratamiento de forodesina y el nivel de muerte celular inducido.

La figura 3 representa los valores que detallan los casos de CLL con delección de p53 que presentan una respuesta elevada a la forodesina.

40 La figura 4 representa los datos sobre el tratamiento con forodesina de casos de CLL con baja o nula sensibilidad al tratamiento de bendamustina o fludarabina.

Las figuras 5A y 5B representan los datos de índice de combinación para forodesina/bendamustina y forodesina/fludarabina.

45 La figura 6 detalla los datos de índice de combinación para forodesina/rituximab.

### Descripción detallada

50 Tal como se indica en la presente memoria, el tratamiento con forodesina indujo muerte celular dependiente del tiempo y de la dosis en células primarias de LLC. Se observó una respuesta citotóxica superior a 60% con forodesina 2  $\mu$ M y dGuo 20  $\mu$ M en 48% de los casos y en sólo 9% de los casos la citotoxicidad fuera inferior a 40%. No se observaron diferencias en la respuesta con respecto a anomalías genéticas tales como delecciones en 17p13 (TP53) y 11q22-q23 (ATM), anomalías genéticas adquiridas en la enfermedad

55 avanzada y asociadas a resistencia farmacológica y tiempo corto de supervivencia de los pacientes de LLC. Los casos de CLL con alteraciones de p53 o 11q mostraron una sensibilidad elevada a la forodesina (citotoxicidad media de 60,1% a las 48 horas), alcanzándose una buena respuesta citotóxica en pacientes de CLL quimiorrefractarios. La combinación de forodesina con regímenes antileucemia clínicos potenció las respuestas citotóxicas in vitro, observándose un fuerte efecto sinérgico en la combinación de forodesina y dosis bajas de bendamustina, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab o la ciclofosfamida. En contraste, se encontró un efecto antagónico con la fludarabina. Por lo tanto, la forodesina representa un nuevo enfoque quimioterapéutico capaz de inducir apoptosis de las células de CLL que evita la ruta de ATM/p53.

65 De acuerdo con lo expuesto anteriormente, determinadas formas de realización describen procedimientos de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto que comprende las etapas de administración en el sujeto una cantidad eficaz de forodesina en forma de inhibidor de nucleósido purina fosforilasa (PNP) y de

- administración en el sujeto de una cantidad eficaz de rituximab como agente anti-CD20 y opcionalmente un agente alquilante.
- 5 En determinadas formas de realización, el agente alquilante se selecciona de entre un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino y un compuesto carboxamida de imidazol.
- En determinadas formas de realización, el agente alquilante es un derivado de mostaza. En determinadas formas de realización, el agente alquilante es la bendamustina.
- 10 En determinadas formas de realización, la forodesina y el rituximab y opcionalmente el agente alquilante se administran concurrentemente.
- En determinadas formas de realización, la forodesina y el rituximab y opcionalmente el agente alquilante se administran secuencialmente.
- 15 En determinadas formas de realización, el agente alquilante o el rituximab se administran una o más veces antes de la administración de la forodesina.
- 20 En determinadas formas de realización, el cáncer hematológico se selecciona de entre leucemia linfocítica crónica y leucemia linfoblástica aguda.
- En determinadas formas de realización, el cáncer hematológico es la leucemia linfocítica crónica.
- En determinadas formas de realización, el cáncer hematológico es la leucemia linfoblástica aguda.
- 25 En determinadas formas de realización, se administra en el sujeto una cantidad eficaz de un agente alquilante.
- En determinadas formas de realización, se administra una cantidad eficaz de un agente anti-CD20.
- 30 Los procedimientos indicados pueden comprender la administración en el sujeto de una cantidad eficaz de forodesina, una cantidad eficaz de rituximab y una cantidad eficaz de un agente alquilante.
- En determinadas formas de realización, la forodesina, el agente alquilante y el rituximab se administran simultáneamente.
- 35 En determinadas formas de realización, la forodesina, el agente alquilante y el rituximab se administran secuencialmente.
- En determinadas formas de realización, el agente alquilante y el agente rituximab se administran una o más veces antes de la administración de forodesina.
- 40 Se describen además procedimientos de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto resistente a uno o más agentes quimioterápicos, que comprenden las etapas de identificar un sujeto resistente a uno o más agentes quimioterápicos y administrar en el sujeto un inhibidor de PNP.
- 45 El sujeto puede ser resistente a uno o más agentes quimioterápicos seleccionados de entre el grupo que consiste en un agente alquilante y un análogo nucleósido purina, en el que el agente alquilante puede ser la bendamustina o la fluradabina.
- 50 Se describen además procedimientos de tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer hematológico, que comprenden las etapas de detectar una delección de p53 en una o más células de cáncer en una muestra del sujeto y administrar en el sujeto forodesina y rituximab.
- 55 Los procedimientos descritos pueden comprender además la detección de la presencia de una delección de 17p.
- Los procedimientos descritos pueden comprender además la determinación de si una o más células de cáncer en la muestra son resistentes a uno o más agentes quimioterápicos.
- 60 La célula o células de cáncer pueden ser resistentes a uno o más agentes quimioterápicos seleccionados de entre el grupo que consiste en un agente alquilante y un análogo de nucleósido purina.
- Determinadas formas de realización proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden forodesina y rituximab y opcionalmente un agente alquilante.
- 65 En determinadas formas de realización, la composición comprende forodesina, bendamustina y rituximab.

Determinadas formas de realización proporcionan kits que comprenden forodesina y rituximab.

En determinadas formas de realización, los kits pueden comprender además un sistema de administración para la forodesina, el agente alquilante, el rituximab o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización, los kits pueden comprender además instrucciones para el tratamiento de un sujeto.

En determinadas formas de realización, los kits comprenden forodesina, bendamustina y rituximab.

Los kits pueden comprender una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse en el sujeto que es resistente a un agente alquilante.

En determinadas formas de realización, los kits pueden comprender además una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse en un sujeto con una delección de p53.

En determinadas formas de realización, los kits pueden comprender además una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse con un agente alquilante.

Al contrario que otros análogos de nucleósido, la forodesina no se incorpora en el ADN. El tratamiento de forodesina conduce a un incremento de dGTP en las células de CLL y este incremento se correlaciona con citotoxicidad celular, indicando que los niveles de dGTP alcanzados tras el tratamiento de forodesina serían un marcador sustitutivo indicador de la respuesta citotóxica. La susceptibilidad de la CLL a la forodesina podría deberse a la elevada actividad de dCK observada en estas células; una actividad regulada positivamente por la fosforilación de dCK en la Ser-74. Se ha observado una correlación positiva significativa entre la proporción fosfo-dCK/dCK y la apoptosis inducida por forodesina. dCK cataliza además la fosforilación requerida para la activación de varios análogos de nucleósido antileucémicos, tales como la fludarabina, la gemcitabina o la cladribina. El efecto antagónico observado entre la forodesina y la fludarabina podría explicarse por la reducción de los niveles de dGTP observada tras la combinación de fludarabina con forodesina. Estos resultados indican que la fosforilación de dCK y el posterior incremento de dGTP desempeñan un papel importante como primeras etapas en la inducción de apoptosis por la forodesina de las células de LLC.

Se han propuesto varios mecanismos para la muerte celular mediada por dGTP. Por ejemplo, los desoxinucleósidos acumulados pueden ser fosforilados en las mitocondrias por la desoxiguanosín-quinasa y la timidina quinasa, conduciendo a una acumulación anormal de dNTP que podría interferir con la síntesis y reparación del ADN mitocondrial, dando lugar a una mayor sensibilidad al daño mitocondrial, a la activación de p53 y a la apoptosis. El desequilibrio de la dGTP mitocondrial también podría afectar a la síntesis mitocondrial de ATP y/o a la inactivación de enzimas antioxidantes de la cadena transporte electrónico mitocondrial, conduciendo a la producción de ROS. El genoma mitocondrial es altamente sensible al daño por estrés oxidativo que puede iniciar rápidamente la apoptosis. Tal como se indica en la presente memoria, la forodesina activa la ruta apoptótica mitocondrial por la producción de ROS y la pérdida de  $\Delta\Psi_m$ , conduciendo a una apoptosis dependiente e independiente de caspasa. Las ROS son generados por el transporte electrónico mitocondrial y bajo estrés oxidativo severo, el incremento de los niveles de  $O_2^-$ ,  $OH^-$  o  $H_2O_2$  provoca la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  y la muerte celular. Estos sucesos inducidos por la forodesina han sido revertidos mediante preincubación de las células de CLL con Tiron y NAC, secuestrantes específicos de  $O_2^-$ , apoyando un posible papel del estrés oxidativo como precedente de la activación de la ruta apoptótica mitocondrial. La fosforilación y activación de p53 resulta inducida por la respuesta al daño en el ADN, aunque también por varias señales de estrés. La sobreproducción de superóxido y la posterior inducción de daño en el ADN puede inducir apoptosis mediante activación de la ruta mitocondrial y activación de p53 mediadas por las ROS. En este sentido, la generación de ROS inducida por la forodesina podría actuar como un regulador cadena arriba de la activación de p53. En la presente memoria se describen resultados que demuestran la estabilización de p53 en los casos de CLL p53 de tipo salvaje y también que la forodesina activa la ruta apoptótica mitocondrial en casos con alteraciones de p53, indicando que la forodesina actúa mediante un mecanismo diferente y/o adicional que es independiente de p53. El estrés oxidativo y la producción de ROS también conducen a la activación del factor de transcripción E2F-1, que resulta la apoptosis tanto dependiente de p53 como independiente a través de rutas diferentes. ESF-1 incrementa la fosforilación de p53 en residuos que también resultan fosforilados en respuesta al daño en el ADN pero también es capaz de inducir la muerte celular mediante la activación del homólogo de p53 llamado p73 mediante una ruta apoptótica independiente de p53. Todavía no se comprende bien cómo la generación de ROS puede regular la activación de E2F-1, p53 y/o p73 y la muerte celular.

Un suceso temprano de la ruta apoptótica mitocondrial es la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9, que corta y activa la caspasa-3 así como la caspasa-8. La forodesina induce una activación dependiente del tiempo de la caspasa-9 y de la caspasa-3, así como de la pro-caspasa-8 simultáneamente a la activación de la caspasa-9. A su vez, la caspasa-8 induce el corte de la proteína BID en su forma truncada proapoptótica, que activa la ruta apoptótica mitocondrial. La inhibición selectiva de la caspasa-8 reduce la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  inducida por la forodesina, aunque el efecto sobre la muerte celular en tiempos posteriores

5 resulta moderado, lo que sugiere que la caspasa-8/BID conduce al bucle de amplificación de la ruta apoptótica mitocondrial. La activación de la caspasa-9 podría no resultar suficiente de por sí para inducir la apoptosis, de manera que la activación de la caspasa-8/BID junto con la reducción en los inhibidores de apoptosis XIAP y survivina podría incrementar las actividades de la caspasa-9 y la caspasa-3 y, por lo tanto, potenciar la apoptosis inducida por la forodesina.

10 La familia de proteínas de BCL-2 controla el compromiso de muerte celular apoptótica. El equilibrio entre los elementos prosupervivencia, tales como BCL-2 y MCL-1 y los elementos proapoptóticos de la familia BCL-2 (BAX, BAK y las proteínas BH3-only, BIM, PUMA, NOXA, BAD, BID, BMF, BIK y HRK) controla el final de muchas rutas de señalización de muerte. En los pacientes de LLC, los niveles elevados de BCL-2 y MCL-1 se correlacionan con el avance de la enfermedad, una supervivencia baja y el fracaso en la consecución de una respuesta completa a la terapia con agentes alquilantes, análogos de nucleósidos y rituximab. La forodesina indujo la acumulación de proteína BIM y la reducción de los niveles de MCL-1, sin cambios en los niveles de BCL-2. En las células de LLC, BIM se asocia a MCL-1, de manera que la reducción de los niveles de MCL-1 haría que las células de CLL fuesen susceptibles a dicha proteína BH3-only. BIM, así como Bid truncado, presentan funciones dobles: como inhibidores de los elementos de BCL-2 antiapoptóticos y como activadores directos de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK. En este sentido, el incremento de los niveles de BIM junto con la activación de Bid podría conducir a la activación de BAX y BAK y, junto con la reducción de MCL-1, resultaría superada la capacidad antiapoptótica remanente de BCL-2. Los resultados proporcionados en la presente memoria demuestran que el grado de reducción de MCL-1 junto con el incremento de BIM ejercidos por la forodesina se correlacionan significativamente con la inducción de apoptosis; los niveles basales de MCL-1 y BIM podrían determinar la sensibilidad de las células de CLL a la forodesina.

25 Se ha demostrado la activación de la ruta apoptótica mitocondrial independiente del estado de p53. Se ha informado que la inducción de p73, una diana transcripcional de p53, es capaz de superar la resistencia a la apoptosis de las células de CLL que no presentan p53 funcional. En respuesta a varios fármacos quimioterápicos, la forma proapoptótica de p73, TAp73, transactiva varios genes diana p53 que controlan la parada del ciclo celular y la apoptosis de una manera dependiente, pero también independiente, del estado de p53. Se encontró que la forodesina inducía p53 y también TAp73 en las células de CLL con p53 funcional, aunque notablemente también se incrementaban los niveles de ARNm y de proteína de p73 en las células de CLL con delección de p53. El estrés oxidativo y la producción de ROS condujo a la activación de TAp73, así como de E2F1, siendo ambas proteínas que participan en la activación de la ruta apoptótica mitocondrial mediante mecanismos dependientes e independientes de p53. Por lo tanto, la elevación de las ROS inducida por forodesina podría proporcionar una señal que activa E2F-1 y/o regula positivamente TAp73. La familia FOXO de factores de transcripción regula la expresión de muchos genes que participan en la apoptosis y puede ser activada por un estrés oxidativo incrementado. FOXO1 y FOXO3a son dianas transcripcionales de E2F-1 y se ha demostrado que resultan esenciales para la apoptosis inducida por ROS, además de ser factores de transcripción de la expresión de BIM en las células hematopoyéticas. Además, con varios estímulos apoptóticos, los secuestrantes de ROS bloquean la inducción de FOXO3a y BIM. Se ha descrito que la expresión de tanto FOXO1 como BIM y la consiguiente apoptosis están regulados por p73 en las células tumorales defectivas en p53. Tras el tratamiento de forodesina, se ha demostrado una marcada regulación positiva de proteínas y ARNm de p73 y BIM independiente del estado de p53, así como un incremento de los niveles de FOXO1 y FOXO3a, incrementos que se detectaron en tiempos tempranos. La expresión de los genes diana regulados por FOXO podría estar controlada por cualquiera de los miembros de la familia FOXO, indicando un mecanismo redundante de acción, tal como muestra la regulación transcripcional de BIM ejercida tanto por FOXO1A como por FOXO3A.

50 De esta manera, los resultados indicados en la presente memoria proporcionan evidencia de un mecanismo implicado en la muerte celular inducida por forodesina en las células de CLL independiente del estado de p53, que revela que pueden coexistir diferentes rutas de muerte celular programada en la misma célula y que pueden ser inducidas selectivamente por diversos estímulos.

55 Estos resultados indican que la forodesina como agente único o en combinación con bendamustina o rituximab, resulta altamente eficaz en el tratamiento de la LLC. Por lo tanto, la forodesina, disponible en, por ejemplo, la formulación oral e intravenosa con perfiles de toxicidad bajos, es una opción de tratamiento para pacientes con mal pronóstico (por ejemplo, pacientes sin 17p), pacientes con enfermedad refractaria y/o como opción de tratamiento para pacientes de edad avanzada. Se inició un ensayo clínico de fase I multicéntrico de etiqueta abierta de la forodesina en pacientes de CLL en recaída.

#### 60 A. Procedimientos de tratamiento de cánceres hematológicos

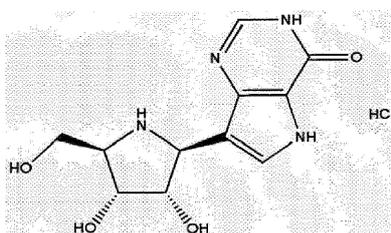
65 En la presente memoria se describen procedimientos de tratamiento de cánceres hematológicos, por ejemplo, cánceres de la sangre, en un sujeto. Entre los ejemplos de estos tipos de cánceres se incluyen, por ejemplo, la leucemia mieloide aguda, la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (LLC), las enfermedades mieloproliferativas, el mieloma múltiple y el síndrome mielodisplásico, el linfoma de Hodgkin, el linfoma no de Hodgkin (linfoma maligno) y la macroglobulinemia de Waldenström. En

algunas formas de realización, el cáncer hematológico es el LLC. En otras formas de realización, el cáncer hematológico es la ALL.

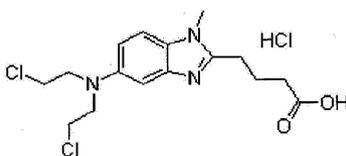
5 Un sujeto puede incluir tanto mamíferos como no mamíferos. Entre los mamíferos se incluyen, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, por ejemplo, simios y monos, vacas, caballos, ovejas, ratas, ratones, cerdos y cabras. Entre los no mamíferos se incluyen, por ejemplo, peces y aves.

10 El procedimiento descrito puede incluir la administración de forodesina y rituximab y un agente alquilante en el sujeto. En otra forma de realización, la forodesina y el rituximab se administran después de identificar un sujeto resistente a uno o más agentes quimioterápicos (por ejemplo, la bendamustina o la fludarabina). En una forma de realización adicional, la forodesina y el rituximab se administran después de detectar una delección de p53 en el sujeto.

15 Sin vincularse a ninguna teoría, un inhibidor de PNP puede inducir un incremento de la 2'-desoxiguanosina (dGuo) plasmática y la acumulación de la desoxiguanosina trifosfato (dGTP) intracelular, conduciendo a la inducción de muerte celular. El inhibidor de PNP es la forodesina o una sal de la misma, incluyendo la sal HCl:



20 Sin vincularse a ninguna teoría, el agente alquilante se refiere a un compuesto quimioterapéutico que modifica químicamente el ADN y altera su función. Algunos agentes alquilantes causan la formación de enlaces cruzados entre nucleótidos en la misma cadena, o de la cadena complementaria de una molécula de ADN de doble cadena, mientras que otros provocan un apareamiento incorrecto de pares de bases entre cadenas de ADN. Un agente alquilante puede ser un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino o un compuesto carboxamida de imidazol. Entre los agentes de agentes alquilantes se incluyen bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitotano, mitomicina, pipobromán, procarbazina, estreptozocina, tiotepa y trietilenmelamina. En algunos casos el agente alquilante puede ser bendamustina o una sal de la misma, incluyendo la sal HCl:



El agente anti-CD20 es el rituximab.

35 La forodesina, el rituximab y opcionalmente el agente alquilante pueden administrarse por cualquier vía, por ejemplo, intraoperatoria, intratecal, intradiscal, peridiscal, epidural (incluyendo perirradicular y transforaminal), cualquier combinación de intradiscal, epidural y peridural, periespinal, i.v., intramuscular, s.c., oral, intranasal, por inhalación, transdérmica y parenteral.

40 La forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional pueden formularse con un portador farmacéuticamente aceptable seleccionando basándose en la vía seleccionada de administración y la práctica farmacéutica estándar. La forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional pueden formularse en formas de administración según prácticas convencionales en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Ver Alphonso Gennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA. Las formas de administración adecuadas pueden comprender, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, soluciones, soluciones parenterales, trociscos, supositorios o suspensiones.

50 Para la administración parenteral, la forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional pueden mezclarse con un portador o diluyente adecuado, tal como agua, un aceite (en particular un aceite vegetal), etanol, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones azucaradas relacionadas, glicerol o un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol. Las soluciones para la administración parenteral preferentemente contienen una sal soluble en agua de forodesina y rituximab y/o el agente alquilante. También pueden añadirse agentes estabilizadores, agentes antioxidantes y conservantes. Entre los agentes antioxidantes adecuados se incluyen sulfito, ácido ascórbico, ácido cítrico y sus sales, y EDTA sódica. Entre los conservantes adecuados se incluyen

cloruro de benzalconio, metilparabeno o propilparabeno y clorbutanol. La composición para la administración parenteral puede adoptar la forma de una solución, dispersión, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa.

5 Para la administración oral, la forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional pueden agruparse con uno o más principios inactivos sólidos para la preparación de comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos u otras formas de administración oral adecuadas. Por ejemplo, la forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional pueden agruparse con por lo menos un excipiente, tal como rellenos, ligantes, humectantes, agentes desintegrantes, retardantes de solución, aceleradores de absorción, agentes humectantes, absorbentes o agentes lubricantes.

10 La dosis específica de forodesina y rituximab y el agente alquilante opcional evidentemente estará determinada por las circunstancias particulares del paciente individual, incluyendo el tamaño, el peso, la edad y el sexo del paciente, la naturaleza y estadio de la enfermedad bajo tratamiento, la agresividad de la enfermedad o trastorno y la vía de administración del compuesto. Las dosis y programas de los compuestos, por ejemplo, forodesina, bendamustina y rituximab, pueden administrarse individualmente o en combinación según, por ejemplo, las dosis y los programas indicados en las etiquetas aprobadas por la FDA.

15 En algunas formas de realización, la forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional pueden administrarse concurrentemente, mientras que en otras formas de realización, la forodesina y el rituximab y el agente alquilante opcional se administran secuencialmente. En una forma de realización, el agente alquilante o el rituximab pueden administrarse una o más veces antes de la administración de la forodesina (por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, 10 veces o 20 veces). En una forma de realización adicional, la forodesina puede administrarse una o más veces antes de la administración del agente alquilante o del rituximab (por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, 10 veces o 20 veces).

20 El tratamiento descrito de un cáncer hematológico en un sujeto puede incluir la identificación de un sujeto que es resistente a uno o más agentes quimioterápicos. Una de las causas principales de fracaso en el tratamiento del cáncer es el desarrollo de resistencia farmacológica por parte de las células de cáncer. Ello constituye un problema muy grave que puede llevar a la recurrencia de la enfermedad o incluso a la muerte. En una forma de realización, el sujeto que es resistente a uno o más agentes quimioterápicos puede ser identificado por medios conocidos de la técnica. El sujeto puede ser resistente a cualquier agente quimioterapéutico conocido. En determinadas formas de realización, el sujeto puede ser resistente a un agente alquilante (por ejemplo, la bendamustina) y/o análogo de nucleósido purina (por ejemplo, la fludarabina).

25 Tras la identificación de un sujeto resistente a la quimioterapia, puede administrarse forodesina y rituximab en el sujeto. En algunas formas de realización la forodesina es HCl de forodesina.

30 En otra forma de realización, el tratamiento descrito de un cáncer hematológico en un sujeto puede incluir la detección de la presencia de una delección de p53, por ejemplo, una delección de 17p, en una o más células de cáncer en una muestra del sujeto. La delección de 17p es un marcador que puede identificar un sujeto de cáncer hematológico que puede mostrar un comportamiento biológico y clínico diferente. Por ejemplo, las alteraciones de p53 pueden transmitir resistencia farmacológica y periodos de supervivencia más cortos.

35 En una forma de realización, en un sujeto que presenta una delección de p53 puede administrarse forodesina y rituximab. En formas de realización seleccionadas, la forodesina es HCl de forodesina.

40 Los procedimientos de tratamiento indicados anteriormente implican tanto la monoterapia como la terapia de combinación. En el contexto de la terapia de combinación, la exposición contempla la administración de tres o más agentes quimioterápicos, en particular, forodesina, rituximab y un agente alquilante. Algunos de dichos compuestos ya han sido aprobados para la utilización en el tratamiento de una o más indicaciones de cáncer. Otros se encuentran en diversos estadios de desarrollo preclínico y clínico.

45 En algunas formas de realización, la administración de forodesina, rituximab y un agente alquilante puede producir un efecto sinérgico. Este efecto puede demostrarse mediante el desarrollo de un índice de combinación (IC). en determinadas formas de realización, el índice puede calcularse como una función de la fracción de células afectada según el procedimiento de Chou et al., *Advance Enz. Regul.* 22:27-55, 1985. Lo anterior es un ensayo bien conocido que evalúa las interacciones de coeficientes frente a un abanico de proporciones de muerte celular. Por ejemplo, en el caso de que el tratamiento con el fármaco A resulte en 30% de muerte celular y el tratamiento con el fármaco B resulte en 50% de muerte celular, se esperaría que la combinación de los dos fármacos resultaría en 65% de muerte celular. De acuerdo con lo anterior, una proporción entre la muerte celular predicha y la medida con la combinación de los fármacos de uno, indicaría un efecto sinérgico. Sin embargo, en el caso de que la proporción fuese superior a uno, se observaría un efecto antagónico. La combinación de forodesina y bendamustina muestra un efecto sinérgico, mientras que la combinación de forodesina y fludarabina muestra un efecto antagónico (ver el Ejemplo 5).

## B. Composiciones farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden forodesina (BCX-1777) y rituximab y opcionalmente un agente alquilante. En determinadas formas de realización, un agente alquilante puede incluir la bendamustina.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria contienen forodesina y rituximab, y opcionalmente un agente alquilante en cantidades que resultan útiles en el tratamiento de cánceres hematológicos y un portador farmacéuticamente aceptable. Entre los portadores farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en la presente memoria se incluyen cualesquiera portadores conocidos por el experto en la materia que resultan adecuados para el modo particular de administración.

Las composiciones pueden, en una forma de realización, formularse en preparaciones farmacéuticas adecuadas, tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones o elixires de liberación sostenida, para la administración oral o en soluciones o suspensiones estériles para la administración parenteral, así como una preparación de parches transdérmicos e inhaladores de polvos secos (ver, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, cuarta edición, 1985, 126).

La concentración de forodesina y rituximab o de forodesina, rituximab y el agente alquilante en la composición farmacéutica dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción de los compuestos, de las características fisicoquímicas de los compuestos, del programa de administración y de la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la cantidad que se administra resulta suficiente para tratar la leucemia linfocítica crónica, tal como se describe en la presente memoria.

La composición farmacéutica puede administrarse de una vez o puede dividirse en varias dosis más pequeñas que deben administrarse en intervalos de tiempo. Se entiende que la dosis precisa y la duración del tratamiento son una función de la enfermedad bajo tratamiento y que pueden determinarse empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayo in vivo o in vitro. Debe indicarse que las concentraciones y valores de dosis también pueden variar según la gravedad de la condición que debe aliviarse. Además, debe apreciarse que para cualquier sujeto particular deben ajustarse los regímenes de administración específicos con el tiempo según la necesidad del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de concentración indicados en la presente memoria son únicamente ejemplificativos y no limitativos del alcance o la puesta en práctica de las composiciones reivindicadas.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para la administración en el ser humano y en animales en formas de administración unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles y soluciones o suspensiones orales y emulsiones de aceite-agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticos terapéuticamente activos y derivados de los mismos, en una forma de realización, se formulan y se administran en formas de administración unitaria o en múltiples formas de administración. Las formas de dosis unitaria tales como las utilizadas en la presente memoria se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas para los sujetos humanos y animales y se empaquetan individualmente tal como es conocido de la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Entre los ejemplos de formas de dosis unitaria se incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas empaquetados individualmente. Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de administración unitaria idénticas envasadas en un único envase que debe administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Entre los ejemplos de formas de dosis múltiples se incluyen los viales, las botellas de comprimidos o cápsulas, o las botellas de pintas o galones. Por lo tanto, una forma de múltiples dosis es un múltiplo de dosis unitarias que no se encuentran segregadas en el envasado.

Las composiciones farmacéuticamente administrables líquidas pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, dispersión o, de otro modo, la mezcla de un compuesto activo tal como se ha definido anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol y similares, formando de esta manera una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que debe administrarse puede contener además cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizadores, agentes amortiguadores del pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina y otros agentes similares.

Los procedimientos actuales de preparación de dichas formas de administración son conocidos o resultarán evidentes para el experto en la materia; ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, 15a edición, 1975.

Pueden administrarse formas de administración o composiciones que contienen forodesina y rituximab o forodesina y rituximab y un agente alquilante en el intervalo de 0,005% a 100% siendo el resto hasta el total de portador no tóxico. Los procedimientos de preparación de dichas composiciones son conocidos por el experto en la materia. Las composiciones contempladas pueden contener 0,001% a 100% de principio activo; en una forma de realización, entre 0,1% y 95%; en otra forma de realización, entre 75% y 85%.

### C. Kits

En la presente memoria también se proporcionan kits. Típicamente, un kit incluye forodesina y rituximab y opcionalmente un agente alquilante. En determinadas formas de realización, un kit puede incluir uno o más sistemas de administración, por ejemplo, para forodesina, rituximab, el agente alquilante o cualquier combinación de los mismos, e instrucciones de utilización del kit (por ejemplo, instrucciones para el tratamiento de un sujeto). En determinadas formas de realización, un kit puede incluir forodesina y rituximab y opcionalmente el agente alquilante. En algunas formas de realización, el kit puede incluir forodesina y rituximab y una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse en un sujeto resistente a agentes alquilantes, tales como bendamustina. En otra forma de realización, el kit puede incluir forodesina y rituximab y una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse en un sujeto con una delección de p53 (por ejemplo, una delección de 17p). En una forma de realización adicional, un kit puede incluir forodesina y rituximab y una etiqueta que indica que el contenido debe administrarse con un agente alquilante.

### D. Definiciones

Tal como se utilizan en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La expresión "cantidad eficaz", utilizada para referirse a una cantidad de compuesto en un procedimiento, se refiere a la cantidad de un compuesto que consigue el efecto farmacológico deseado u otro efecto, por ejemplo, una cantidad que inhibe el crecimiento o proliferación anormal, o induce la apoptosis de las células de cáncer, resultando en un efecto útil.

Las expresiones "que trata" y "tratamiento" se refieren a que causa un efecto terapéuticamente beneficioso, tal como la mejora de los síntomas existentes, la prevención de síntomas adicionales, la mejora o prevención de las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, la postergación o la prevención del desarrollo ulterior de un trastorno y/o la reducción de la gravedad de los síntomas que se desarrollan o se espera que se desarrollen.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: citotoxicidad de la forodesina en CLL - ZAP-70<sup>elevada</sup> versus ZAP-70<sup>baja</sup>

Las células de 16 pacientes de CLL con niveles elevados de ZAP-70 (>20%) y de 13 pacientes de CLL con niveles bajos de ZAP-70 (<20%) se trataron con forodesina 2 µM + dGuo 20 µM durante 48 horas. Se analizó la citotoxicidad mediante tinción de anexina V-FITC (expresada como porcentaje respecto a células no tratadas de control). Los resultados indican que la citotoxicidad media para los niveles de ZAP-70 tanto altos como bajos era superior al 50% (ver las figs. 1A y 1B).

#### Ejemplo 2: incremento intracelular de los niveles de dGTP

Se trataron células de 26 pacientes de CLL con forodesina durante 20 horas. Se extrajeron los nucleótidos totales (metanol al 60%) y se cuantificaron los niveles de dGTP mediante ensayo de ADN polimerasa. Se analizó la viabilidad celular en comparación con el control (células no tratadas) a las 48 horas mediante tinción de anexina V-FITC. El incremento intracelular de los niveles de dGTP tras el tratamiento de forodesina se correlacionaba bien con la muerte celular inducida (ver la fig. 2).

#### Ejemplo 3: respuesta de los casos de CLL con delección de p53 a la forodesina

Se trataron células procedentes de 11 pacientes de CLL con delecciones de 17p (g=>85% de las células, análisis de FISH) con forodesina 2 µM + dGuo 20 µM, bendamustina 25 µM o fludarabina 1 µg/ml durante 48 horas. Los resultados indicaban que los casos de CLL con delección de p53 mostraban una respuesta elevada a la forodesina (ver la fig. 3).

#### Ejemplo 4: efecto de la forodesina sobre los casos de CLL con resistencia quimioterapéutica

Las células de pacientes de CLL que se observó que presentaban una sensibilidad baja o nula a la bendamustina o la fludarabina se trataron con forodesina 2 µM y dGuo 10-20 µM. Los resultados indican que dichas células mostraban una buena respuesta al tratamiento de forodesina (ver la fig. 4).

**Ejemplo 5 (ejemplo de referencia): efecto de la forodesina/bendamustina y de combinaciones de forodesina/fludarabina**

Las células de pacientes de CLL se trataron con forodesina 2  $\mu\text{M}$  + dGuo 10-20  $\mu\text{M}$  y bendamustina 10-25  $\mu\text{M}$  o fludarabina 3,75-7,5  $\mu\text{M}$  durante 48 horas. Se analizó el índice de combinación (IC) tras 48 horas. Un valor de CI inferior a 1 es indicativo de un efecto sinérgico (algoritmo de Chour y Talalay) mientras que un valor de CI superior a 1 es indicativo de un efecto antagónico. Los resultados indican que la forodesina/bendamustina presenta un efecto sinérgico mientras que la forodesina/fludarabina presentan un efecto antagónico (ver las figuras 5A y 5B).

**Ejemplo 6: efecto de la combinación de forodesina/rituximab**

Las células de 7 pacientes de CLL (3 con niveles elevados de ZAP-70 (>35%) y 4 con deleciones de p53) se trataron con HCl de forodesina 2  $\mu\text{M}$  + dGuo 10-20  $\mu\text{M}$  y rituximab 25-50  $\mu\text{M}$  durante 24 a 48 horas. Se analizó el índice de combinación (CI) tras 48 horas. Las células se analizaron mediante citometría de flujo utilizando tinción de anexina V-FITC y ensayos de permeabilidad de PI. Un valor de IC inferior a 1 era indicativo de un efecto sinérgico (algoritmo de Chour y Talalay) mientras que un valor de CI superior a 1 era indicativo de un efecto antagónico. Los resultados indican que la combinación de forodesina/rituximab presenta un efecto sinérgico (ver la fig. 6).

**Ejemplo 7: la forodesina indujo la apoptosis mitocondrial independiente de p53**

Tal como se indica en la presente memoria, el inhibidor de la nucleósido purina fosforilasa forodesina induce la apoptosis mitocondrial independiente de p53 en las células de leucemia linfocítica crónica mediante la regulación negativa de Mcl-1 y la inducción de p73 y Bim.

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una entidad clínica heterogénea derivada de la expansión monoclonal de linfocitos B CDS<sup>+</sup> de vida prolongada con regulación anormal de la apoptosis y bajas tasas de proliferación. A pesar de los recientes avances, las nuevas terapias en el tratamiento de la CLL no han mejorado la supervivencia global de los pacientes y muchos desarrollan eventualmente resistencia farmacológica. Un perfil no mutado de los genes de inmunoglobulina, una expresión elevada de la proteína ZAP-70, una expresión elevada de CD38 y la presencia de determinadas anomalías citogenéticas (especialmente deleciones de 17p13 (TP53) y 11q22-q23 (ATM)) se asocian una supervivencia global más baja y un tiempo más corto hasta el avance de la enfermedad de los pacientes de LLC. Los fármacos anticancerosos quimioterápicos inducen apoptosis habitualmente mediante una respuesta de daño al ADN y activación de p53 y/o directamente mediante la perturbación de la función mitocondrial. La ruta de respuesta al daño del ADN aparentemente desempeña un papel en la apoptosis inducida por fármaco para la LLC, ya que las células de los pacientes de CLL con anomalías de TP53 muestran resistencia a la quimioterapia convencional y una supervivencia reducida. La falta de función de p53 mediante deleción de p53 y la mutación del otro alelo incrementa el carácter refractario del paciente de CLL frente a la quimioterapia, siendo 'dobles impactos' durante la adquisición de resistencia farmacológica que anulan la actividad transcripcional y apoptótica mitocondrial de p53. Por lo tanto, los nuevos enfoques eficaces deberían inducir la apoptosis mediante rutas independientes del daño en el ADN y/o mediante la activación directa de rutas apoptóticas independientes de p53.

Un carácter distintivo de las células de CLL es su resistencia a la inducción de apoptosis, siendo las proteínas de la familia de Bcl-2 reguladores cruciales de la apoptosis y supervivencia en las células de LLC. Los niveles elevados de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 se asocian a enfermedad agresiva y resistencia a la quimioterapia en la LLC. La MCL-1 también presenta un papel importante en la prolongación de la supervivencia de las células LLC, ya que los niveles de MCL-1 se correlacionan inversamente con la respuesta in vitro y clínica frente a varios fármacos.

La nucleósido purina fosforilasa (PNP) es un enzima en la ruta de recuperación de purinas que fosforila análogos de purina en sus bases respectivas y en desoxirribosa fosfato. La forodesina o la inucilina H (BCX-1777) es un potente inhibidor de análogo de estado de transición de PNP que ha demostrado ser un inhibidor de la proliferación de las células T in vitro e in vivo (Bantia et al., *Int. Immunopharmacol.* 1(6):1199-210, 2001; Kicska et al., *PNAS* 98(8):4593-4598, 2001; Bantia et al., *Int. Immunopharmacol.* 3(6):879-887, 2003, y Gandhi et al., *Semin. Oncol.* 34(6 supl. 5):S8-12, 2007). La forodesina muestra un perfil de toxicidad bajo (Gandhi et al., *Blood* 106(13):4253-4260, 2005, y Korycka et al., *Min Rev. Med. Chem.* 7(9):976-983, 2007) y se está estudiando en ensayos clínicos para pacientes con leucemia prolinfocítica de las células T, linfoma de células T cutáneo y leucemia linfoblástica aguda de células B (Galmarini et al., *IDrugs* 9(10):712-722, 2006). Además, la forodesina aparentemente ejerce un efecto citotóxico ex vivo en las células de CLL (Balakrishnan et al., *Blood* 108(7):2392-2398, 2006). La inhibición de PNP resulta en la elevación de los niveles plasmáticos de 2'-desoxiguanosina (dGuo) y la consiguiente acumulación intracelular de desoxiguanosina trifosfato (dGTP) en aquellas células con niveles elevados de actividad de desoxinucleósido quinasa, conduciendo a la inducción de apoptosis de los linfocitos T. Las células de CLL presentan una actividad elevada (dCK), que es un enzima primario en la conversión de dGuo en dGMP, que seguidamente es convertido en dGTP, siendo las células de CLL

susceptibles de la inhibición de PNP. Al contrario que otros análogos de nucleósido purina, tales como la fludarabina o la bendamustina, la forodesina no se incorpora en el ADN y presenta una nueva clase de agentes antitumorales selectivos con un nuevo mecanismo de acción que no se entiende por completo.

5 Tal como se indica en la presente memoria, se ha evaluado el efecto citotóxico de la forodesina en las células leucémicas primarias de 43 pacientes de LLC, así como la evaluación de la combinación in vitro de forodesina con fármacos utilizados en la práctica clínica, tales como la fludarabina, la bendamustina y el rituximab. Basándose en dichos resultados, la forodesina aparentemente es una terapia altamente eficaz en el tratamiento de los pacientes de CLL independientemente del estado de ZAP-70, CD38 o p53 o de las anomalías citogenéticas en los mismos. Además, la forodesina aparentemente induce la activación de la ruta apoptótica mitocondrial mediante la reducción de los niveles de la proteína Mcl-1 y de inducción de p73 y de la proteína proapoptótica Bim. Notablemente, no se han observado diferencias significativas en dichos marcadores apoptóticos basadas en el estado de p53, lo que sugiere una ruta apoptótica común independiente de la muerte celular mediada por p53.

15 Apoptosis inducida por forodesina en células primarias de pacientes de CLL independiente de ZAP-70, CD38 y estado citogenético.

20 Se llevó a cabo un estudio de escalado de dosis con el fin de evaluar la citotoxicidad de la forodesina in vitro en linfocitos leucémicos primarios procedentes de pacientes de LLC. Con el fin de obtener un efecto citotóxico in vitro, se añadió una fuente externa de dGuo junto con forodesina. La incubación de las células de CLL con niveles farmacológicamente alcanzables de forodesina (2-5-10  $\mu\text{M}$ ) con dosis crecientes de dGuo (10-20 o 30  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas indujo la muerte celular (analizada mediante tinción de anexina-V+), mientras que la forodesina o la dGuo por sí solas no indujeron un efecto citotóxico. No se observaron diferencias en la muerte celular con dosis más elevadas de forodesina (hasta 15  $\mu\text{M}$ ). Por el contrario, el incremento de la dosis de dGuo resultó en una inducción más elevada de la muerte celular, por lo que se llevaron a cabo estudios posteriores utilizando una sola dosis de forodesina (2  $\mu\text{M}$ ) junto con 10 o 20  $\mu\text{M}$  de dGuo.

30 A continuación, se analizó el efecto citotóxico de la forodesina y de dGuo en células leucémicas primarias procedentes de 43 pacientes con LLC. Se observó una citotoxicidad media con respecto al control de  $44,2\% \pm 11,4\%$  y  $57,4\% \pm 13,1\%$  a las 24 h y 48 h, respectivamente. El efecto citotóxico fue más elevado que 60% en 21 casos (48,8% del total), de entre 40% y 60% en 18 casos (41,8% del total) e inferior a 40% en sólo 4 casos (9,4% del total). No se observaron diferencias de muerte celular entre la utilización de muestras criopreservadas de CLL primario (n=32,  $58,3\% \pm 11\%$  a las 48 horas) y muestras frescas de CLL (n=10,  $56,6\% \pm 6,4\%$  a las 48 horas). La citotoxicidad de la forodesina 2  $\mu\text{M}$  y de dGuo (10-20  $\mu\text{M}$ ) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de donantes sanos era relativamente más baja que en células de LLC, tanto en linfocitos T (células CD3<sup>+</sup>) y linfocitos B (células CD19<sup>+</sup>).

40 En pacientes de LLC, los niveles de expresión de las proteínas ZAP-70 y/o CD38 se asocian a una supervivencia global más baja y un tiempo más corto hasta el avance de la enfermedad (Hus et al., Ann. Oncol. 17(4):683-690, 2006). No se observaron diferencias significativas entre la muerte celular inducida por la forodesina en las células de CLL con niveles bajos de ZAP-70 (17 pacientes de LLC:  $58,1\% \pm 11\%$  de citotoxicidad media con respecto al control) y aquellas células de CLL que expresan niveles elevados de ZAP-70 (22 pacientes de LLC:  $57,9\% \pm 12\%$  de la citotoxicidad media), así como con respecto a los niveles de expresión de CD8 (CD38 baja:  $52,3\% \pm 12\%$  vs. CD38 alta:  $62,1\% \pm 12\%$  de la citotoxicidad media). Además, las alteraciones citogenéticas más comunes en las células de LLC, tales como la delección de 13q, la delección de 11q y la delección de 17p asociadas a la resistencia farmacológica in vitro e in vivo y la corta supervivencia de los pacientes de LLC, no se correlacionaba con citotoxicidad inducida por forodesina, alcanzándose también una buena respuesta en estos casos.

50 También se comparó la respuesta citotóxica de las células de CLL tratadas con forodesina frente a la citotoxicidad de la fludarabina o la bendamustina, dos de los principales agentes utilizados en la quimioterapia de la CLL (Aivado et al., Semin. Oncol. 29 (4 supl. 13):19-22, 2002, y Montserrat, Hematol. J. 5, supl. 1:S2-S9, 2004). Se incubaron células de CLL primaria procedentes de 32 pacientes de LLC, 11 de ellos con delecciones de p53, con forodesina 2  $\mu\text{M}$  y dGuo 20  $\mu\text{M}$ , bendamustina 10 a 25  $\mu\text{M}$  y fludarabina 1  $\mu\text{g/ml}$  durante 48 horas solos o en combinación. Como agentes individuales, la citotoxicidad media en la CLL sin delección de 17p era de  $55,3\% \pm 8\%$ ,  $50,6\% \pm 11\%$  y  $49,2\% \pm 18\%$  para la forodesina, la fludarabina y la bendamustina, respectivamente. La adquisición de la delección de 17p, que conduce a alteraciones de p53, se asocia a la resistencia in vitro e in vivo a la fludarabina en los pacientes de LCL (Dohner et al., Blood 85(6):1580-1589, 1995, y Turgut et al., Leuk. Lymphoma 48(2):311-320, 2007). Notablemente, la mayoría de pacientes de CLL con delección de p17 mostraron una elevada respuesta a la forodesina, con una citotoxicidad media a las 48 horas de  $60,1\% \pm 21\%$  (forodesina 2  $\mu\text{M}$  y dGuo 20  $\mu\text{M}$ ). En contraste, dichos casos mostraron una respuesta más baja a la fludarabina ( $25,1\% \pm 13\%$  de la citotoxicidad media) y a la bendamustina ( $36,2\% \pm 17\%$  de la citotoxicidad media). Además, en 12 de 32 muestras analizadas de pacientes de LLC, se observó una respuesta in vitro nula o baja (citotoxicidad inferior a 35% con respecto al control) a la bendamustina 25  $\mu\text{M}$  y/o a la fludarabina 1  $\mu\text{g/ml}$ , aunque mostraron una respuesta elevada a la forodesina. Tres casos con delección de 17p y una respuesta baja o muy baja a la

bendamustina o a la fludarabina mostraron una respuesta elevada a la forodesina (67%  $\pm$  20% de la citotoxicidad media) y sólo dos pacientes de CLL mostraron una respuesta baja a la forodesina.

#### Combinaciones de forodesina con fludarabina, bendamustina y rituximab.

5 Se evaluó la combinación de fludarabina con forodesina en el tratamiento. También se evaluó la combinación de forodesina con bendamustina, un agente alquilante y también un análogo similar a la purina. Las combinaciones de forodesina 2  $\mu$ M y dGuo (10 a 20  $\mu$ M) con fludarabina (0,5 a 1  $\mu$ g/ml) no incrementaron el efecto citotóxico de cualquiera de los fármacos como agentes individuales y se observó un efecto negativo sobre la inducción de la muerte celular. Con el fin de evaluar el efecto de combinación entre ambos fármacos, se calculó el índice de combinación o valor CI utilizando el algoritmo de Chou y Talalay (Chou et al., Adv. Enzyme Regul. 22:27-55, 1984) como marcador indicativo del efecto antagónico o sinérgico para la combinación de dos fármacos diferentes. Brevemente, un valor de CI superior a 1 es indicativo de un efecto antagónico mientras que un valor de CI inferior a 1 es indicativo de un efecto sinérgico. Los estudios de combinación realizados con fludarabina y forodesina mostraron valores de CI superiores a 1 en todos los casos de CLL analizados (48 horas), indicando un efecto antagónico entre ambos fármacos. La citotoxicidad media alcanzada con la combinación de forodesina y fludarabina era inferior a la causada por ambos fármacos. La forodesina también resultaba eficaz en aquellos casos de CLL con baja respuesta a la bendamustina, aunque en contraste con la fludarabina, se observó un elevado incremento de la muerte celular con la combinación de bendamustina y forodesina y se observó un potente efecto sinérgico (CI<1). La forodesina claramente potenció la respuesta citotóxica de una dosis baja de bendamustina (10  $\mu$ M, citotoxicidad media de 32,95%), alcanzando un efecto citotóxico medio para la combinación de ambos fármacos de 70,5%.

También se evaluó la combinación según la presente invención de forodesina y rituximab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD20. A las 24 horas, la muerte celular observada con rituximab (25 a 50 11 g/colgajo) en forma de agente individual era baja y la combinación con forodesina mejoró claramente el efecto citotóxico de ambos fármacos. También se demostró un potente efecto sinérgico entre rituximab y forodesina, con valores de CI próximos a 0,5.

#### Correlación entre el incremento de los niveles de dGTP intracelular y de fosforilación de dCK en Ser-74 con la muerte celular inducida por forodesina.

Se analizaron los niveles intracelulares de dGTP en células primarias procedentes de 26 pacientes de CLL tratados con forodesina 2  $\mu$ M y dGuo 10  $\mu$ M. Se observó una correlación directa significativa ( $p < 0,05$ ) entre el factor de incremento de los niveles de dGTP analizados a las 18 horas y la citotoxicidad de la forodesina a las 48 horas. La forodesina indujo un incremento elevado de los niveles de dGTP intracelular (un factor de incremento de hasta 96 veces con respecto a los niveles basales de control, alcanzando valores de entre 6 y 129 pmoles de dGTP/10<sup>6</sup> millones de células). Cuatro casos de CLL mostraron un incremento nulo o bajo de los niveles de dGTP y se observó una respuesta citotóxica baja a la forodesina en estos casos. Con el fin de confirmar que el incremento de los niveles de dGTP tras el tratamiento de forodesina se encontraba mediada por la fosforilación de dGuo por dCK, se analizó la inducción de muerte celular en presencia de desoxicitidina. Debido a que la desoxicitidina es el sustrato principal de la dCK, debería inhibir la fosforilación de dGuo por la dCK, afectando al incremento intracelular de dGTP y la consiguiendo apoptosis inducida por la forodesina. La preincubación de las células con desoxicitidina (5 a 10  $\mu$ M) inhibió la muerte celular inducida por forodesina. Algunos análogos de nucleósido utilizados en la quimioterapia anticancerosa, en particular el análogo de purina fludarabina y el análogo de desoxicitidina gemcitabina, son fosforilados por la dCK para activarse. La desoxicitidina también revertió la pérdida de viabilidad celular inducida por la fludarabina, mientras que no resultó revertida la muerte celular inducida por la bendamustina (fármaco que podría actuar independientemente de la dCK).

El estado de fosforilación de dCK se analizó mediante transferencia western tras el tratamiento de forodesina, ya que recientemente se ha indicado que en las células de CLL la actividad de la dCK se encuentra regulada positivamente por la fosforilación en la Ser-74 (Smal et al., J. Biol. Chem. 281(8):4887-4893, 2006; Smal et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 25(9-11):1141-1146, 2006; Smal et al., Cancer Lett. 253(1):68-73, 2007). Se observó un incremento de la forma fosforilada (en Ser-74) de la dCK en las células de LLC, un incremento no ejercido por la bendamustina. Se llevó a cabo un análisis densitométrico de la proporción fosfo-dCK/dCK después del tratamiento de forodesina y se observó una correlación con la citotoxicidad, ambos a las 24 ( $p = 0,05$ , datos complementarios) y a las 48 horas ( $p = 0,05$ ).

Con el fin de investigar el efecto antagónico observado entre la fludarabina y la forodesina, se observó el incremento de dGTP intracelular tras la incubación de células de CLL con fludarabina (1  $\mu$ g/ml) y forodesina (2  $\mu$ M y dGuo 10  $\mu$ M). La fludarabina por sí sola no indujo un incremento de los niveles de dGTP, mientras que la combinación de fludarabina con forodesina (columnas grises) redujo el factor de incremento de dGTP ejercido por la forodesina sola (columnas negras). Por lo tanto, la reducción del incremento de dGTP observado con la combinación de fludarabina y forodesina explicaría el efecto antagónico observado entre ambos fármacos. Debido a que la fludarabina necesita ser fosforilada por dCK para activarse y la dGuo también resulta fosforilada

por este enzima, ambos fármacos podrían estar compitiendo por el mismo enzima y, por lo tanto, podría reducirse la formación de dGTP o de la forma activa de la fludarabina.

#### Activación inducida por forodesina de la ruta apoptótica mitocondrial independiente de p53.

5 Con el fin de elucidar el mecanismo de acción por el que la forodesina inducía la apoptosis en las células de LCL, se analizaron varias características distintivas de la ruta apoptótica mitocondrial. La forodesina indujo la pérdida de potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) tempranamente. Pueden generarse especies de oxígeno reactivo (ROS) tras el daño mitocondrial y posteriormente mediar en la apoptosis (Villamor et al., Curr. Pharm. Des. 10(8):841-853, 2004). La forodesina también indujo la producción de ROS en células primarias de LLC. La despolarización mitocondrial y la producción de ROS se observó como sucesos tempranos, ya que eran evidentes después de 10 horas de tratamiento de forodesina. El estrés oxidativo desempeña un papel en la regulación de la muerte celular programada, por lo que se analizó el efecto de varios secuestrantes de ROS. La preincubación de las células de CLL con éster de etilo reducido por glutatión (GSH), N-acetilcisteína (NAC) o Tiron redujeron la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  y la producción de ROS inducida por la forodesina. NAC y Tiron (secuestrantes específicos de  $O_2$ ) prácticamente revertieron la producción de ROS, mientras que el efecto de GSH, un secuestrante selectivo de  $H_2O_2$ , resultó moderado.

20 Un estudio *in vitro* anterior en células de CLL informa de que la forodesina resulta en la estabilización de p53 y en la inducción de apoptosis (Balakrishnan et al., Blood 108(7):2392-2398, 2006), resultados que son consistentes con otros fármacos anticancerosos que inducen daños en el ADN y apoptosis mediada por p53. Sin embargo, al contrario que otros análogos de nucleósido purinas, la forodesina no resulta incorporada en el ADN. Notablemente, las características distintivas tempranas de la ruta apoptótica mitocondrial analizada también se observaron en pacientes de CLL con delección de 17p (p53) o delección de 11q (ATM), indicando un mecanismo de inicio de apoptosis independiente de la respuesta de daño en el ADN mediada por p53.

#### La forodesina induce una activación secuencial de la caspasa-9 y de la caspasa-8 y el procesamiento de BID, señalando a una acción de un bucle de amplificación en la ruta apoptótica mitocondrial mediada por la caspasa-8.

30 Con el fin de investigar las rutas de señalización posteriores que conducen a la apoptosis mitocondrial, se investigó el patrón de activación de la caspasa tras la exposición a forodesina. Se observó una activación dependiente de la dosis y del tiempo de las caspasas-9, -8 y -3 y se analizó mediante el procesamiento de su forma proinactiva. Los productos de corte de la procaspasa-8 y la procaspasa-9 se encontraban presentes prácticamente de manera simultánea incluso ya 10 horas después de iniciar el tratamiento de forodesina, siendo la forma cortada p37 de la procaspasa-9 en primer lugar, seguido del incremento de la forma cortada p43/41 de la caspasa-8. El corte de la procaspasa-3 y la presencia de su forma activa se detectaron posteriormente. En relación con la activación de la caspasa-8, la forodesina también indujo una reducción de la proteína BH3-only BID, un sustrato principal de la caspasa-8, proporcionando su forma proapoptótica truncada, que también activa la ruta apoptótica mitocondrial. También se observó una reducción de los inhibidores de apoptosis XIAP y survivina y el corte proteolítico de PARP, un sustrato de la caspasa-8, correlacionados con la inducción de apoptosis. A continuación, se investigó el papel de la activación de la caspasa en la apoptosis inducida por forodesina, ya que la activación de la ruta apoptótica mitocondrial conduce a muerte celular tanto dependiente como también independiente de caspasa. El tratamiento de las células con el inhibidor de caspasa de amplio espectro z-VAD.fmk redujo parcialmente la exposición de la fosfatidilserina después del tratamiento de forodesina durante 24 horas, lo que señala a la participación de ambos mecanismos de acción, el dependiente de caspasa y también el independiente de caspasa.

50 La activación de la caspasa-8/BID podría desempeñar un papel clave durante la inducción de apoptosis inducida por la forodesina o ser un suceso paralelo secundario debido a la activación de la caspasa-9 y, por lo tanto, posterior a las mitocondrias. Notablemente, la inducción de apoptosis, analizada mediante la tinción con anexina V, resultó parcialmente bloqueada por el inhibidor específico de caspasa-8 z-IETD.fmk, mientras que la reversión en la pérdida de Mini observada era más pronunciada. En conjunto dichos resultados indican que la activación de la caspasa-8 y BID desempeña un papel de amplificación temprano durante la ruta apoptótica mitocondrial inducida por forodesina.

#### Análisis de los reguladores proapoptóticos y antiapoptóticos de la muerte celular mediada por las mitocondrias.

60 La ruta apoptótica mitocondrial se encuentra regulada por un estrecho equilibrio entre elementos proapoptóticos y antiapoptóticos que pertenecen a la familia de BCL-2 de proteínas, tales como las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y MCL-1 y las proteínas proapoptóticas BAX, BAK, BID y BIM, entre otras. Las células de CLL expresan niveles elevados de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-2 que se correlacionan inversamente con la respuesta *in vitro* y clínica a la quimioterapia. Se investigó el efecto de la incubación con forodesina sobre los niveles de dichas proteínas antiapoptóticas. Con el tratamiento de forodesina, los niveles de la proteína antiapoptótica MCL-1 se redujeron considerablemente, mientras que los niveles de proteína BCL-2 no resultaron afectados. La proteína BH3-only BIM interactúa con BCL-2 y otros elementos antiapoptóticos de la familia de

BCL-2 para inducir la apoptosis. La forodesina indujo un incremento de los niveles de las proteínas proapoptóticas BIM. Los cambios en los niveles de las proteínas BIM y MCL-1 se confirmaron mediante análisis densitométrico en siete casos de CLL tratados con forodesina. Se observó una correlación directa entre el incremento de los niveles de la proteína proapoptótica BIM EL o la reducción de los niveles de MCL-1 y la respuesta citotóxica a la forodesina, siendo significativa la reducción del nivel de MCL-1 ( $p=0,04$ ). Además, se observó una correlación significativa ( $p=0,04$ ) al representar gráficamente la proporción (con respecto al control) entre la reducción de la inducción de MCL-1 y BIM EL y la citotoxicidad observada tras el tratamiento de forodesina.

Las BCL-2 y MCL-1 actúan como guardianes de la membrana mitocondrial, conservando su integridad frente a la acción de proteínas proapoptóticas efectoras, tales como BAX y BAK. BIM y BID truncado son las únicas proteínas BH3-only que presentan la capacidad de actuar como activadores directos de BAX y BAK, y se analizó la activación de BAX y BAK mediante citometría de flujo tras la incubación de las células de CLL con forodesina. La forodesina indujo el cambio conformacional de BAX y BAK que permite que estas proteínas se inserten en la membrana mitocondrial externa, su oligomerización, la posterior inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial y la activación de la maquinaria de muerte celular.

#### El tratamiento de forodesina desencadenó un incremento de p73 al nivel del ARNm y de proteínas y la inducción de FOXO1 y FOXO3A.

Aunque la forodesina ejerció un efecto citotóxico en todos los casos de CLL con independencia del estado de p53, la forodesina pudo inducir la estabilización de la proteína p53 en los casos de CLL sin delección de p17. La inducción de la proteína TAp73, una proteína relacionada con p53 necesaria para la apoptosis mediada por p53, es capaz de superar la resistencia a la apoptosis de las células de CLL que no presentan p53 funcional (Dicker et al., Blood 108(10):3450-3457, 2006). El tratamiento de forodesina indujo una clara regulación positiva de los niveles de ARNm de p73 y de proteína TAp73 en todos los casos de CLL analizados. La proteína p73 regula la inducción de la proteína proapoptótica BIM mediante la regulación positiva de los factores de transcripción FOXO1 y FOXO3a de un modo dependiente de p53 aunque también de modo independiente de p53 en las células tumorales (Amin et al., Cancer Res. 67(12):5617-5621, 2007), aunque se desconoce cuál es el mecanismo de inducción de FOXO. Se investigaron los niveles de FOXO1 y FOXO3a en las células de CLL tratadas con forodesina. La forodesina indujo un incremento de ambos, FOXO1 y FOXO3a, en correlación con el incremento observado de los niveles de las proteínas p73 y BIM.

#### Materiales y métodos

##### Fármacos y compuestos químicos

La forodesina (BCX-1777/inmucilina H) para el uso de laboratorio fue proporcionada por BioCryst Pharmaceuticals Inc. (Birmingham, USA) y se obtuvo desoxiguanosina (dGuo) de Sigma. Para la cuantificación de la desoxiguanosina trifosfato (dGTP), se obtuvieron los dNTP y [ $^3$ H]dATP de Amersham Biosciences. Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó fludarabina (Shering, Berlin, Alemania), hidrocloreuro de bendamustina (Treanda<sup>TM</sup>, proporcionada por Cephalon, Inc., Frazer, PA), rituximab (Roche, Basel, Suiza) y 2'-desoxiciditina (Sigma).

##### Aislamiento y cultivo de células de CLL primario y células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos

El presente estudio *in vitro* se llevó a cabo en linfocitos leucémicos primarios procedentes de 43 pacientes en los que se había diagnosticado CLL según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante sedimentación Ficoll/Hypaque (Seromed, Berlin, Alemania). Las células se utilizaron directamente o se crioconservaron en nitrógeno líquido en presencia de dimetilsulfóxido al 10% y suero de feto bovino inactivado por calor al 90% (FBS, Gibco Paisley, Escocia, Reino Unido). Tras la descongelación, se cultivaron células mononucleares procedentes de pacientes de CLL ( $2 \times 10^6$  células/ml) en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), complementado con FBS al 10%, glutamina 2 mM y 50  $\mu$ g/ml de penicilina-estreptomina, en una atmósfera humidificada a 37°C que contenía 5% de dióxido de carbono. Se analizó el porcentaje de células tumorales (CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>) y los niveles de expresión de ZAP-70 y CD38 mediante citometría de flujo y se cuantificaron tal como se ha indicado anteriormente (Crespo et al., N. Engl. J. Med. 348(18):1764-1775, 2003). El punto de corte de los elevados niveles de expresión de ZAP-70 era >20% y >30% para CD38 (Hus et al., Ann. Oncol. 17(4):683-690, 2006). Todas las muestras de CLL utilizadas en el presente estudio portaban más de 95% de células tumorales. Se evaluaron las alteraciones citogenéticas mediante hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) utilizando el kit comercial multisonda de Vysis (Downers Grove, IL), que contiene sondas específicas de locus para determinar las delecciones de 17p13.1 (p53), 11q22.3 (ATM) y 13q14.3 (D13S319) y una sonda centromérica para detectar la trisomía 12. Las mutaciones del gen de p53 habitualmente son mutaciones con sentido erróneo y la proteína mutante presenta una semivida prolongada,

que permite su detección mediante transferencia western. Además, se confirmaron mutaciones de p53 mediante secuenciación directa de acuerdo con el consorcio IARC TP53.

#### Inducción de apoptosis

5 Se incubaron células durante diferentes periodos de tiempo con forodesina a dosis comprendidas entre 1 y 12  $\mu\text{M}$  en presencia o en ausencia de 10-20-30  $\mu\text{M}$  de desoxiguanosina (dGuo). Cuando se indica, las células se preincubaron durante 1 hora con el inhibidor de pancaspasa z-VAD-fmk (benciloxi-carbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona; Bachem, Bubendorf, Suiza) a 80  $\mu\text{M}$ , el inhibidor de caspasa-8 z-IETD-fmk a 50  $\mu\text{M}$  (Z-Ile-Glu(OMe)Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, Bachem), 2'-desoxicitidina (5-10-20  $\mu\text{M}$ , Sigma), N-acetil-L-cisteína (NAC, 25 mM), Tiron (5 mM, ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benceno-disulfónico, Sigma) o GSH (2 mM, Sigma). Para los estudios de combinación de fármacos, las células se pretrataron durante 4, 12 o 24 horas con fludarabina o bendamustina, o durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab antes de añadir la forodesina (2  $\mu\text{M}$ ) más dGuo (10 a 20  $\mu\text{M}$ ). Se analizó la viabilidad celular y la inducción de apoptosis a partir de los cambios en la complejidad celular mediante FSC/SSC, la cuantificación de la exposición a fosfatidilserina (PS) mediante doble tinción con anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (PI) (BenderMedsystems, Vienna, Austria). Para el análisis de la apoptosis en las poblaciones CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>, las PBMC se marcaron simultáneamente con anti-CD3-FITC (Immunotech, Marseille, Francia), anti-CD19-PE (Becton Dickinson) y anexina-V-APC. La viabilidad celular y la citotoxicidad se representaron gráficamente como porcentaje con respecto a las células de control. Se evaluó la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) mediante la tinción de las células con 20 nM de DiOC6 (yoduro de 3,3-dioxiloxacarbocianina, Molecular Probes) y se determinó la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) mediante la tinción de las células con dihidroetidina 2  $\mu\text{M}$  (DHE, Molecular Probes) y el análisis de citometría de flujo. La activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak debido al cambio conformacional se analizó mediante el marcaje inmunocitométrico de las células con anticuerpos dirigidos contra el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de las proteínas Bax o Bak tal como se ha indicado anteriormente (Bellosillo et al., Blood 100(5):1810-1816, 2002). Esta región se encuentra ocluida bajo condiciones basales y no se encuentra disponible para la unión de anticuerpos específicos de epítipo NH<sub>2</sub>-terminal. Tras los estímulos apoptóticos, el cambio conformacional de estas proteínas expone el extremo NH<sub>2</sub>-terminal y el extremo COOH-terminal hidrofóbico con diana en las mitocondrias, desempeñando un importante papel en la inducción de maquinaria de muerte celular mediada por mitocondrias. En breve, las células se lavaron una vez en PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con saponina al 0,1% y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5%. Las células se tiñeron con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anticuerpos primarios contra los anticuerpos en conformación activa Bak (Oncogene Research) o Bax (clon 6A7, BD Pharmingen) a temperatura ambiente. Tras varios lavados en tampón de permeabilización, las células se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra antirratón-FITC (DAKO) o de cabra anticonejo-FITC (Supertechs) y se lavaron nuevamente con tampón de permeabilización. A continuación, se analizaron mediante citometría de flujo diez mil células teñidas por cada muestra.

#### Medición de los niveles de dGTP intracelular

40 Se incubaron  $15 \times 10^6$  células primarias de CLL con o sin forodesina (2  $\mu\text{M}$ ) y dGuo (10  $\mu\text{M}$ ) o fludarabina (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 18 horas y se extrajeron los nucleótidos con metanol al 60% y se cuantificaron los niveles de dGTP intracelular mediante ensayo de ADN polimerasa según modificación de Sherman y Fyfe (Sherman et al., Anal. Biochem. 180(2):222-226, 1989). Los datos se expresaron como factor de inducción de los niveles de dGTP intracelular con respecto a las células de control. En paralelo, también se evaluó la viabilidad celular a las 24 y 48 horas.

#### Inmunotransferencia

50 las células se lisaron durante 15 min en tampón RIPA complementado con inhibidores de proteasa y de fosfatasa (leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , apoprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PMSF 1  $\mu\text{M}$ , ortovanadato sódico 1  $\mu\text{M}$ , NaF 1  $\mu\text{M}$ , decahidrato de pirofosfato sódico 2  $\mu\text{M}$  (Sigma)). Se separaron las proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore). Para la detección de las proteínas, se sondearon las membranas con los anticuerpos primarios siguientes: anti-Bim, anti-Bak (Ab1) anti-Caspasa-8 (Ab-3), anti-p53 (Ab-2) (Calbiochem); anti-Bid, anti-Caspasa-9, anti-FoxO1 y anti-XIAP (Cell Signaling Technologies); anti-Bcl-2, anti-dCK, anti-Mcl-1 (S-19) y anti-p73 (clon 5B429) (Santa Cruz Biotechnology); anti-PARP (Roche); anti-Caspasa-3 y anti-Bax (clon 6A7) (BD-Pharmingen); anti-survivina (Abeam); anti- $\beta$ -actina y anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma) y anti-FoxO3A (Upstate). Los anticuerpos de conejo anti-fosfo-dCK (Ser79) y anti-dCK se obtuvieron de Caroline Smal y Françoise Bontemps (Université Catholique de Louvain, Bélgica). Tras la incubación con el anticuerpo primario apropiado, las membranas se revelaron con los anticuerpos antirratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma), anticonejo (Sigma) o anticabra (Dako) mediante la utilización de reactivos de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Pierce). Se confirmó la carga uniforme de proteínas a partir de la expresión de  $\beta$ -actina o  $\alpha$ -tubulina y la cuantificación relativa de las proteínas se llevó a cabo con el software Image Gauge Fujifilm (Fuji).

65

Cuantificación del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real

5 Se extrajo el ARN total a partir de  $10^7$  células utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, un microgramo de ARN total se transcribió inversamente a ADNc utilizando cebadores aleatorios y la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). Se determinaron los niveles de expresión de p73 y Mc1-1 en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un formato prediseñado Assay-on-demand (Applied Biosystems). Se cuantificó la expresión relativa de cada gen mediante el procedimiento del ciclo umbral (Ct) comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) utilizando GUS como control endógeno. Se expresan los niveles de expresión de ARNm como unidades de PCR cuantitativa arbitrarias, utilizando como calibrador la muestra de control (no tratada) de cada caso.

Análisis estadísticos

15 Los datos se representan como medias  $\pm$  desviaciones estándar (SD) de tres experimentos independientes. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Graphpad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Se evaluó la comparación entre dos grupos de muestras mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y se evaluaron los coeficientes de correlación utilizando la prueba de Spearman. Los resultados se consideran estadísticamente significativos en el caso de que el valor de  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ). Con el fin de evaluar el efecto de combinación entre dos fármacos diferentes, se analizó el índice de combinación o el valor de IC utilizando el algoritmo descrito por Chou y Talalay (software Calcsyn v2.0, Biosoft, Cambridge, Reino Unido) (Chou et al., Adv. Enzyme Regul. 22:27-55, 1984). Este valor de IC es un marcador indicativo del efecto antagónico o sinérgico para el efecto de combinación de dos fármacos diferentes. La interacción entre dos fármacos se considera sinérgica en el caso de que el valor de IC sea inferior a 1; aditivo en el caso de que sea igual a 1 y antagónico en el caso de que el IC sea superior a 1.

25 Se han descrito varias formas de realización de la invención. Sin embargo, debe apreciarse que pueden introducirse diversas modificaciones sin apartarse del alcance según la invención reivindicada. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, otras formas de realización se encuentran comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones a continuación.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de la forodesina en combinación con el rituximab en la preparación de un medicamento para tratar un cáncer hematológico.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la forodesina y el rituximab se administran simultánea o secuencialmente.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que el rituximab se administra una o más veces antes de la administración de la forodesina.
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un agente alquilante.
- 15 5. Utilización según la reivindicación 4, en la que el agente alquilante se administra una o más veces antes de la administración de la forodesina.
6. Forodesina en combinación con rituximab, para la utilización en el tratamiento de un cáncer hematológico.
- 20 7. Forodesina en combinación con rituximab, para la utilización según la reivindicación 6, en la que se administran la forodesina y el rituximab simultánea o secuencialmente.
8. Forodesina en combinación con rituximab, para la utilización según la reivindicación 6 o 7, en la que el rituximab se administra una o más veces antes de la administración de la forodesina.
- 25 9. Forodesina en combinación con rituximab para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además un agente alquilante.
10. Forodesina en combinación con rituximab, para la utilización según la reivindicación 9, en la que el agente alquilante se administra una o más veces antes de la administración de la forodesina.
- 30 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o combinación para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que el cáncer hematológico se selecciona de entre leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda y linfoma no hodgkiniano.
- 35 12. Utilización o combinación para la utilización según la reivindicación 11, en la que el cáncer hematológico es la leucemia linfocítica crónica.
13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5 o combinación para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, en la que el agente alquilante se selecciona de entre: un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino y un compuesto imidazol carboxamida.
- 40 14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5 o combinación para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, en la que el agente alquilante es la bendamustina.
- 45 15. Composición farmacéutica que comprende forodesina y rituximab.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 15, que comprende además un agente alquilante.
- 50 17. Kit que comprende forodesina y rituximab.
18. Kit según la reivindicación 17, que comprende además un agente alquilante.
19. Kit según la reivindicación 17 o 18, que comprende además un sistema de suministro para la forodesina, el rituximab, el agente alquilante opcional o cualquier combinación de los mismos, comprendiendo además dicho kit opcionalmente unas instrucciones para tratar a un sujeto.
- 55 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 o kit según la reivindicación 18 o 19, en la/el que el agente alquilante se selecciona de entre: un derivado de mostaza, un derivado de nitrosourea, un compuesto de platino y un compuesto imidazol carboxamida.
- 60 21. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 o kit según la reivindicación 18 o 19, en la/el que el agente alquilante es la bendamustina.

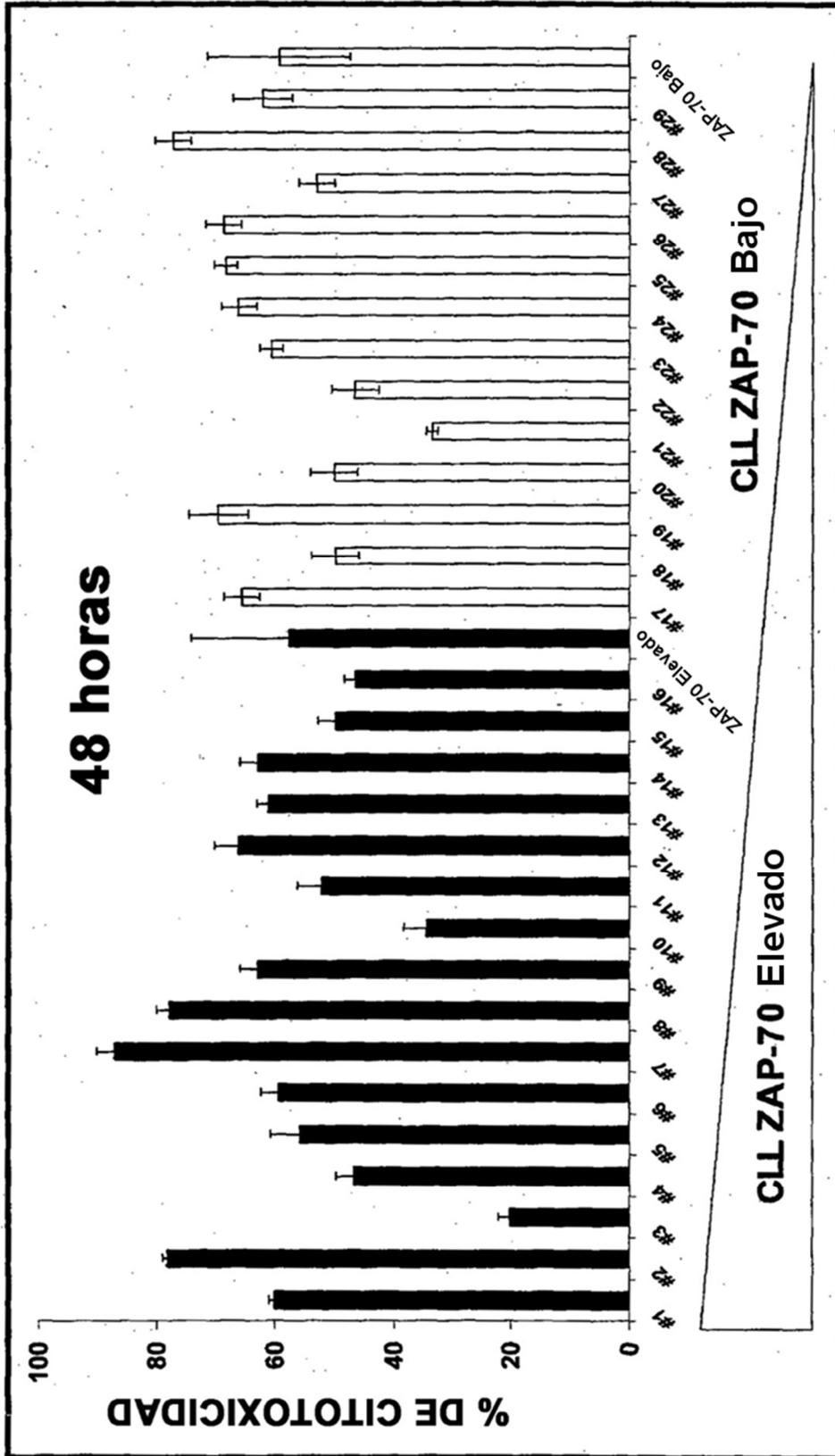


FIG. 1A

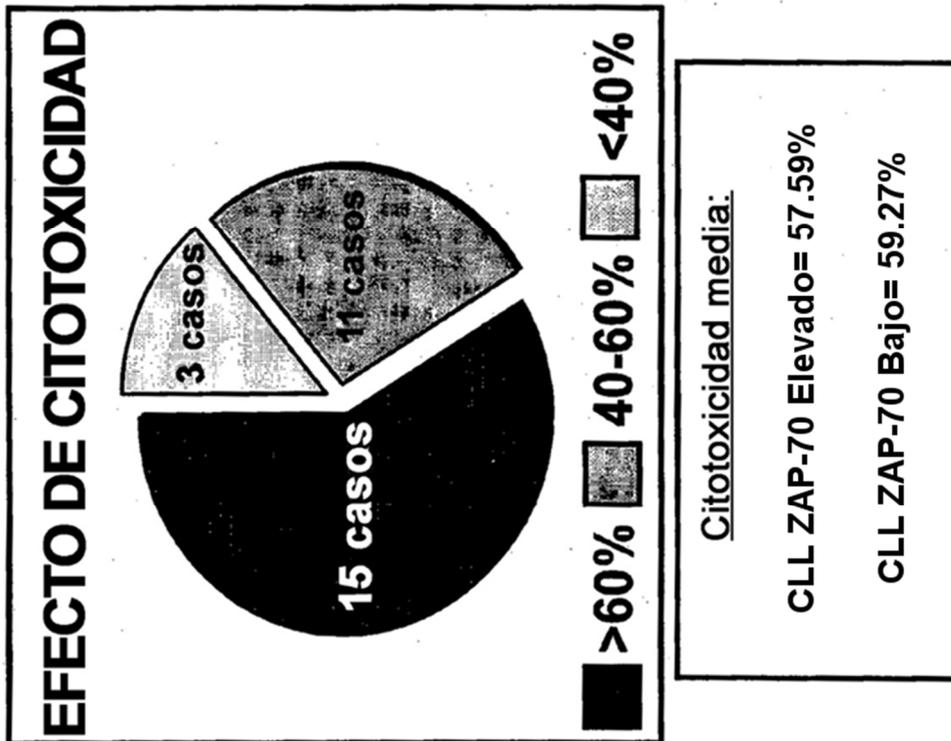


FIG. 1B

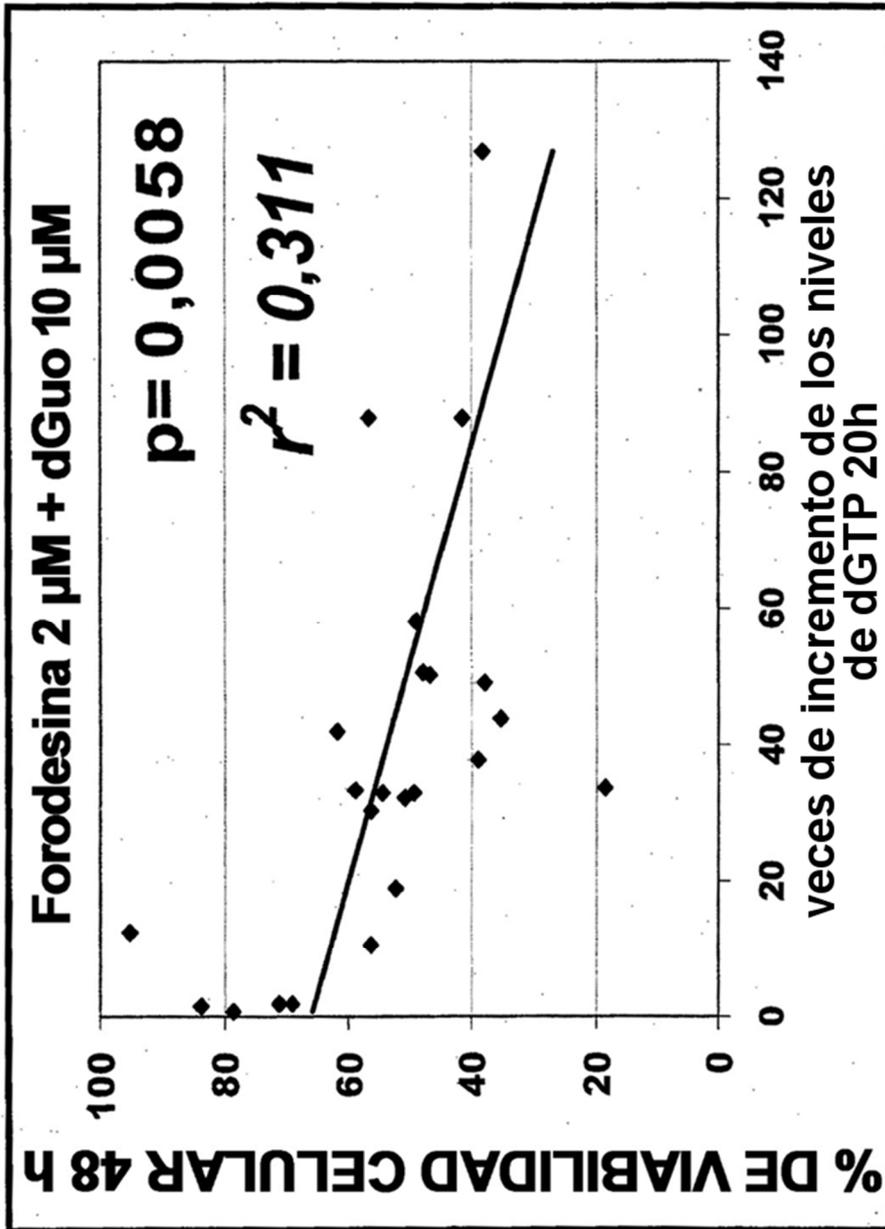


FIG. 2

n° CLL	ESTADO ATM	trisomía 12 (% de céls.)	deleción de 13q (% de céls.)	TRATAMIENTO ANTERIOR		RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTERIOR	CITOTOXICIDAD DE FORODESINA (2µM+dGuo 20 µM)		CITOTOXICIDAD BENDAMUSTINA (25 µM)		CITOTOXICIDAD FLUDARABINA 1 µg/ml (7.5 µM)			
				CdA / FCM	FC / R-F / CHOP		SÍ	NO	87.2±3%	77.1±5%	77.9±2%	40.6±2%	65.2±1%	25.9±3%
#7	60%	Normal	Normal	11.4 %	CdA / FCM	SÍ			12.5±4%		2.1±2%			
#28	1%	Normal	Normal	Normal	FC / R-F / CHOP	NO			41.8±2%		43.3±3%			
#8	53%	Normal	Normal	90%	-	-			40.6±2%		31.1±2%			
#2	91%	Normal	45 %	Normal	FCM	SÍ			65.2±1%		59.2±4%			
#25	3%	Normal	Normal	5%	CLB	NO			25.9±3%		25.9±3%			
#9	50%	Normal	Normal	Normal	R-CHOP	NO		n.d.	n.d.		n.d.			
#12	36%	Normal	Normal	29%	-	-			26.47±5%		42.65±2%			
#4	73%	n.d.	n.d.	n.d.	FCM / CHOP	NO			52.7±4%		50.1±4%			
#22	n.d.	Normal	Normal	Normal	-	-			5.8±3%		1.1±2%			
#21	7%	Normal	30.5 %	Normal	CHOP / R-CHOP	NO			33.4±3% **		40.1±2%			
#3	87%	Normal	Normal	90%	FCM/Camp/PDN	NO			20.1±5% **		19.2±2%			
<b>MEDIA±SD</b>									<b>60.4±21%</b>		<b>32.8±34%</b>	<b>33.3±36%</b>		

FIG. 3

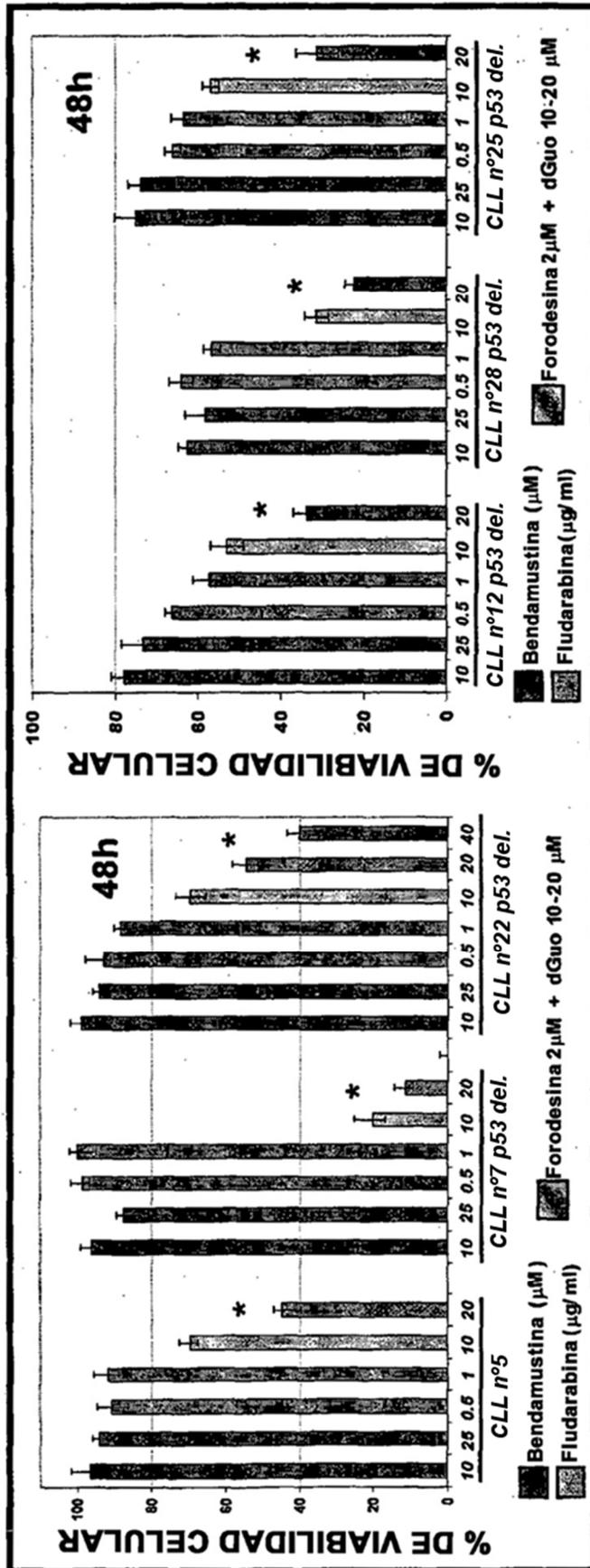
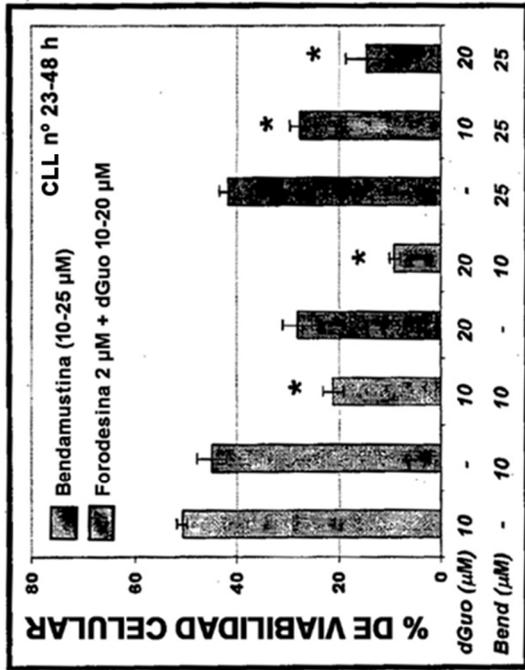


FIG. 4

## Índice de combinación para forodesina/bendamustina

% ZAP-70	For 2+10		For 2+20		For 2+10		For 2+20		For 2+10		For 2+20	
	Bend 10	Bend 25	Bend 10	Bend 25	Bend 10	Bend 25	Bend 10	Bend 25	Bend 10	Bend 25	Bend 10	Bend 25
#24 2%	0.70	1.05	0.52	0.44	#6 30%	1.11	0.36	0.73	0.46			
#19 12%	0.53	0.83	0.36	0.61	#100 100%	0.77	0.82	0.90	0.80			
#23 0.4%	0.94	0.52	0.40	0.50	#74 64%	0.70	0.79	0.76	0.55			
#20 19%	0.54	0.64	0.81	0.82	#42 72%	0.93	0.73	0.71	0.75			
#27 3%	0.56	0.57	0.45	0.46	#18 29%	0.14	0.04	0.1	0.04			
#21 4%	0.26	0.50	0.10	0.24	#17 41%	1.02	1.10	0.98	1.10			
#12 10%	0.65	0.28	0.59	0.34	#10 30%	0.51	0.49	0.27	0.20			
#25 15%	0.63	0.59	0.25	0.19	#36 42%	0.35	0.51	0.29	0.26			
#50 1%	0.31	0.27	0.46	0.43	#16 32%	0.85	0.83	0.30	0.27			
<b>ZAP-70<sup>Baja</sup></b>	<b>0.51</b>	<b>0.52</b>	<b>0.39</b>	<b>0.40</b>	<b>ZAP-70<sup>Elevada</sup></b>	<b>0.63</b>	<b>0.56</b>	<b>0.50</b>	<b>0.44</b>			
<b>CI MEDIA</b>					<b>CI MEDIA</b>							

FIG. 5A



**Combinación fludarabina/forodesina (µM)**

***Ci media = 1,96 (Ci > 1 es indicativo de efecto antagonico)***

Índice de combinación de 6 CLL representativos(48h):

	CLL #5	#23	#13	#11	#12	#27
1. Forod 2 + dGuo10 + Fluda 3.75	→ 1.62	3.09	1.56	1.31	2.31	1.78
2. Forod 2 + dGuo10 + Fluda 7.5	→ 1.81	3.41	1.13	1.52	1.92	2.14
3. Forod 2 + dGuo20 + Fluda 3.75	→ 1.29	1.37	1.31	1.45	1.96	1.51
4. Forod 2 + dGuo20 + Fluda 7.5	→ 1.23	2.62	1.60	1.42	1.76	1.59

FIG. 5B

**Índice de combinación (CI) < 1 es indicativo de sinergia (método de Chou y Talalay)**

<u>Combinaciones analizadas:</u>	CLL	#3	#74	#1	#87	#42	#6	#92
Rituximab 25 + Forod 2 + dGuo10:		0.64	0.73	0.59	0.13	0.88	0.46	0.72
Rituximab 50 + Forod 2 + dGuo10:		0.56	0.72	0.76	0.13	0.52	0.74	0.77
Rituximab 25 + Forod 2 + dGuo20:		0.51	0.55	0.49	0.12	0.63	0.35	0.60
Rituximab 50 + Forod 2 + dGuo20:								

**Índice de combinación**

**CI media = 0,53**

FIG. 6