

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 619**

51 Int. Cl.:

A61K 31/203 (2006.01)

A61K 31/285 (2006.01)

A61K 33/36 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2014 PCT/EP2014/079422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15101618**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2014 E 14824852 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3089743**

54 Título: **Combinación de un compuesto de arsénico y al menos un retinoide para tratar la leucemia mielógena aguda**

30 Prioridad:

30.12.2013 EP 13306891

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

10.10.2018

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (16.7%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (16.7%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (16.7%);
UNIVERSITA DI PERUGIA (16.7%);
AMERICAN UNIVERSITY OF BEIRUT (16.7%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (16.7%)**

72 Inventor/es:

**DE THE, HUGUES;
BAZARBACHI, ALI;
EL HAJJ, HIBA;
MARTELLI, MARIA PAOLA y
FALINI, BRUNANGELO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 619 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de un compuesto de arsénico y al menos un retinoide para tratar la leucemia mielógena aguda

Campo de la invención:

5 La presente divulgación se refiere a procedimientos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda.

Antecedentes de la invención:

10 La leucemia mielógena aguda (LMA) es una enfermedad genéticamente heterogénea, con un pronóstico altamente variable y una tasa de mortalidad global alta. La supervivencia global a 5 años de los enfermos adultos con LMA es inferior a un 50 %, y solo un 20 % de los enfermos ancianos sobreviven más de 2 años (1). Las alteraciones citogenéticas clasifican la LMA en tres categorías basadas en el riesgo: favorable, intermedio y desfavorable (2). Los enfermos con cariotipo normal pertenecen a la categoría de riesgo intermedio y su pronóstico está determinado por alteraciones genéticas específicas, particularmente la mutación de *nucleofosmina 1 (NPM-1)* y la duplicación interna en tándem (DIT) de *tirosina cinasa 3 similar a FMS (FLT-3)* (3).

15 *NPM-1* es un gen esencial (4) que codifica una proteína de transporte nucleolar (5), con múltiples funciones, incluyendo la estabilización de la proteína supresora de tumor p14^{Arf}, la regulación de la biogénesis ribosómica, el control de la duplicación del centrosoma y la activación de P53 (4-5). En la *NPM-1* mutante, los residuos de triptófano críticos en el extremo C se pierden y se crea una señal de exportación nuclear *de novo*. Esto da lugar a la acumulación de *NPM-1* mutante en el citoplasma de las células leucémicas, en lugar de en el nucléolo, junto con la *NPM-1* normal. Las mutaciones de *NPM-1* conducen a la leucemogénesis, ya que se observaron trastornos hematopoyéticos en ratones transgénicos o con inserción génica (6-11).

20 Algunos estudios sugirieron que la adición de ácido retinoico (AR) a la quimioterapia convencional mejora la supervivencia, selectivamente en enfermos con LMA que albergan la mutación de *NPM-1* pero no FLT3-DIT (12). El trióxido de arsénico (arsénico) y el AR son tratamientos muy eficaces para la leucemia promielocítica aguda (LPA), un subtipo de LMA distinto caracterizado por la expresión de la proteína de fusión de la leucemia promielocítica/receptor alfa del AR (LPM/RAAR) (13-14). La LPM/RAAR deslocaliza la LPM, una proteína implicada en el control de la senescencia impulsada por P53, y los procariones (NB) de LPM están implicados tanto en la patogénesis de la LPA como en la respuesta al tratamiento (15). Tanto el AR como el arsénico inducen la degradación de la LPM/RAAR, y su combinación cura definitivamente la LPA en ratones (15-17) y enfermos (18-20). Sin embargo, en las LMA mutantes en *NPM-1*, el fundamento de la respuesta clínica propuesta al AR permanece oculto.

30 El documento WO9924029 divulga la combinación de trióxido de arsénico y ATRA para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda.

Sumario de la invención:

La presente divulgación se refiere a procedimientos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda. En particular, la presente invención está definida por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención:

35 La *nucleofosmina 1 (NPM-1)* es el gen mutado con más frecuencia en la leucemia mielógena aguda (LMA). La adición de ácido retinoico (AR) a la quimioterapia se propuso para mejorar la supervivencia de estos enfermos. En este caso, los inventores observaron que en las líneas celulares de LMA o muestras primarias, el AR o el trióxido de arsénico inducen la degradación proteosómica de la *NPM-1* mutante, lo que da lugar a la apoptosis. La mutación de *NPM-1* deslocaliza la *NPM-1* del nucléolo, pero también desorganiza los procariones de la leucemia promielocítica (LPM). El tratamiento combinado de AR/arsénico redujo significativamente los mieloblastos en tres enfermos y corrigió la localización subnuclear de la *NPM-1* y la LPM. Estos hallazgos, que recuerdan mucho al tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, podrían explicar el beneficio propuesto de añadir AR a la quimioterapia en las LMA mutantes en *NPM-1*, y justifican una evaluación clínica más amplia de la combinación de AR/arsénico.

45 Por consiguiente, un primer aspecto de la divulgación se refiere a una combinación de al menos un compuesto de arsénico con al menos un retinoide para su uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (LMA) impulsada por *NPM-1* en un sujeto que lo necesite.

50 Como se usa en el presente documento, el término "*NPM-1*" tiene su significado general en la técnica y se refiere a nucleofosmina 1 (que también se puede denominar o también se conoce como N038, fosfoproteína nucleolar B23, numatrina o *NPM-1*). Como se usa en el presente documento, el término "mutación de *NPM-1*" se refiere a cualquier mutación que se podría producir en *NPM-1* y que está asociada con la progresión de la LMA. Las mutaciones están presentes en las regiones de codificación. Cualquier mutación de *NPM-1* está abarcada por la divulgación, incluyendo mutaciones puntuales, inversión, translocaciones, deleciones, cambios del marco de lectura... Las mutaciones ejemplares se describen en la literatura (por ejemplo, B. Falini, C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L.

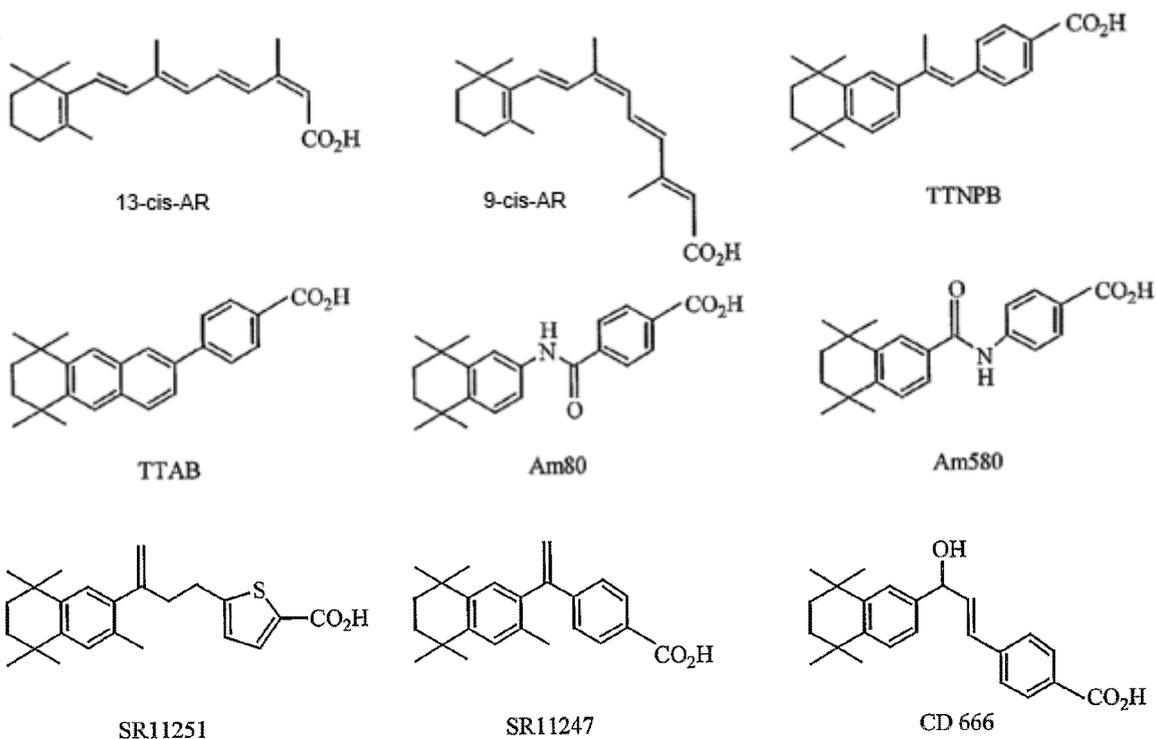
Pasqualucci *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype *N Engl J Med*, 352 (2005), pp. 254-266) y están abarcadas en la divulgación. Las mutaciones en NPM-1 se pueden identificar mediante cualquier procedimiento adecuado en la técnica, pero en determinados modos de realización las mutaciones se identifican por una o más de reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación, tinción histoquímica para localización de NPM-1, así como el procedimiento de inmunotinción usando anticuerpo anti-NPM-1 mutante.

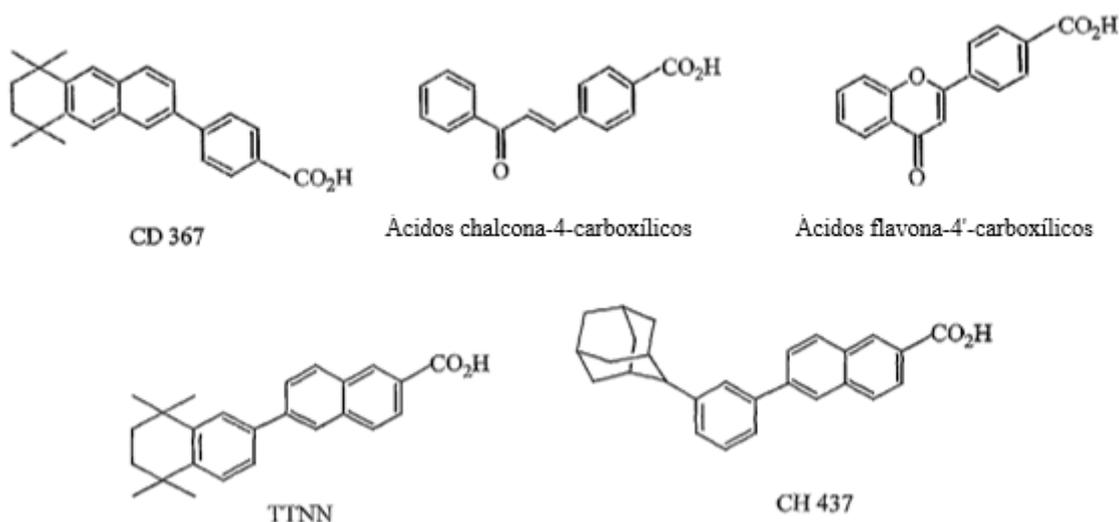
En su sentido más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. En particular, el procedimiento de la presente divulgación es particularmente adecuado para inducir la detención del crecimiento de células de LMA con NPM-1 mutante, reduciendo los mieloblastos en enfermos con LMA mutante en NPM-1 y/o corregir los defectos en la organización y función nucleolar impuestos por la mutación de NPM-1.

Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de arsénico" pretende incluir arsénico y cualquier compuesto que tenga las mismas propiedades biológicas que el arsénico. La expresión "compuesto que tenga las mismas propiedades biológicas que el arsénico" se entiende que significa cualquier compuesto que, como el arsénico, es un inhibidor de fosfatasa y/o puede crear aductos covalentes uniéndose a grupos ditiol.

En algunos modos de realización, el compuesto de arsénico se selecciona del grupo que consiste en arsénico, trióxido de arsénico (As₂O₃), hexóxido de arsénico (As₄O₆), melarsoprol y derivado de azufre y arsénico.

Como se usa en el presente documento, el término "retinoide" se refiere a una clase de derivados de vitamina A que consisten en cuatro unidades isoprenoides unidas de manera cabeza con cola. Los ejemplos de retinoides útiles en el presente proceso incluyen ácido retinoico (AR), ácido retinoico todo trans (ATRA), ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, ácido 9,13-di-cis-retinoico, retinoides terminados en ácido benzoico y sus análogos heterocíclicos tales como TTNPB, TTAB, AM80, AM580, SRI 1251, SRI 1247, CD666, CD367, ácidos chalcona-4-carboxílicos, ácidos flavona-4'-carboxílicos, etc. (Loeliger *et al.*, 1980, *Eur. J. Med. Chem-Dhim. Ther.* 15:9), (Kagechika *et al.*, 1989, *J. Med. Chem.* 32:834), (Dawson, *et al.* 1995, *J. Med. Chem.* 38:3368) así como los retinoides terminados en ácido naftalenocarboxílico tales como TTNN, CD437, CD417 o adapaleno (Dawson *et al.*, 1983, *J. Med. Chem.* 26:1653), (Dhar *et al.*, 1999, *J. Med. Chem.* 42:3602) y muchos otros retinoides de ácido carboxílico (AGN 190299 o ácido tazaroténico y RQ 10-9359 o acitretina). Algunos retinoides se ilustran a continuación:





Los retinoides sintéticos adicionales útiles en el presente procedimiento se describen e ilustran a continuación, así como en Dawson *et al.*, "Synthetic Retinoids and their Usefulness In Biology and Medicine", Vitamin A and Retinoids, M.A. Livrea (ed.), pp, 161-196. (2000). Véanse también: los retinoides listados en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/rct.html> así como en Arch. Biochem. Biophys., 1983, 224, 728-731; Eur. J. Biochem, 1982, 129, 1-5; J. Biol. Chem, 1983, 258, 5329-5333; Pure Appl. Chem, 1983, 55, 721-726; Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2.^a edición, Portland Press, 1992, páginas 247-251.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad suficiente de los ingredientes activos de la divulgación para tratar la LMA a una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los ingredientes activos de la divulgación lo decidirá el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción de los ingredientes activos específicos empleados; la duración del tratamiento; medicamentos usados en combinación o coincidentes con los ingredientes activos específicos empleados; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia de la técnica comenzar las dosis de los ingredientes activos a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

Típicamente, el compuesto de arsénico se administra por vía intravenosa o por vía oral (por ejemplo, para el derivado de azufre y arsénico) y el retinoide se administra por vía oral.

De acuerdo con la divulgación, los ingredientes activos de la divulgación se pueden administrar como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la LMA.

Los ingredientes activos de la divulgación se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otro efecto indeseable cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o adyuvante de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. Típicamente, el vehículo es un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, glúcidos o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

La presente divulgación también se refiere a un kit de partes que comprende al menos un compuesto de arsénico y al menos un retinoide para su uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (LMA) impulsada por NPM-1 en un sujeto que lo necesita.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente divulgación.

Figuras:

Figura 1: el AR y el arsénico inducen la inhibición del crecimiento y la apoptosis en la LMA mutada en *NPM-1*.

5 A) Las líneas celulares de LMA con *NPM-1* normal (ML-2, KG1a y THP-1) o *NPM-1* mutada (OCI-AML3) se trataron con arsénico (1 μ M o 0,1 μ M), AR (1 μ M o 0,3 μ M) o una combinación de ambos. El crecimiento celular (% de control) se sometió a ensayo en pocillos por triplicado. Los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos independientes. B) Tinción con anexina V de células THP-1 u OCI-AML3 tratadas durante 48 h como se describe. C) Ensayo TUNEL de células THP-1 u OCI-AML3 tratadas durante 48 h como se describe. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. D) Las células de LMA primarias de tres enfermos con LMA diferentes se trataron con arsénico (1 μ M), AR (1 μ M) o una combinación de ambos. El crecimiento celular (% de control) se sometió a ensayo en pocillos por duplicado. E) Porcentaje de mieloblastos de BM en tres enfermos con LMA mutada en *NPM-1* tratados como se indica. F) Porcentaje de mieloblastos en aspirados de BM semanales de un enfermo con LMA mutada en *NPM-1* tratado con AR y arsénico. Se indica el programa de tratamiento.

Figura 2: el AR y el arsénico inducen la degradación proteosómica de la *NPM-1* mutante y restablecen la localización nucleolar de la *NPM-1*.

15 Análisis de inmunoelectrotransferencia para *NPM-1*, *NPM-1* mutada, actina o GAPDH en células THP-1 y OCI-AML3 (A, C), y para *NPM-1* y GAPDH en células leucémicas primarias derivadas de enfermos con LMA (B). Se muestra un representante de tres experimentos independientes. D) Crecimiento (% de control) de células OCI-AML3 y THP-1 tratadas con arsénico (1 μ M), AR (1 μ M), PS-341 (10 nM) solos o bien en combinación, durante hasta 48 h. El crecimiento celular (% de control) se sometió a ensayo en pocillos por triplicado. Los resultados representan un experimento representativo entre tres independientes. E) Perfil de *NPM-1* después del tratamiento con AR/arsénico durante 48 h. Los gráficos muestran la cuantificación de *NPM-1* nucleolar como promedios de una serie Z/célula de 30 células diferentes de tres experimentos independientes. Los valores de *p* significativos se indican mediante asteriscos.

Figura 3: la combinación de AR y arsénico restaura la formación de procariones de LPM y SUMO-1.

25 A) Leucoblastos primarios de un enfermo con LMA mutada en *NPM-1* en los días 0 y 8 después del tratamiento *in vivo* con AR/arsénico. La *NPM-1* se tiñó con anticuerpo anti-*NPM-1* (verde), la LPM se tiñó con anticuerpo anti-LPM (rojo) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestra el mayor aumento en el panel derecho. (B-C) Células THP-1 (paneles izquierdos) y células OCI-AML3 (paneles derechos) tratadas con AR/arsénico durante hasta 48 h. (B) Igual que A) en células OCI-AML3 no tratadas. (C) El tratamiento de las células OCI-AML3 con AR/arsénico da lugar a la formación del procarion de SUMO-1. Los resultados (B-C) representan un representante de tres experimentos independientes. Los gráficos muestran la cuantificación de los NB de LPM y SUMO-1, como promedios de una serie Z/célula de 30 células diferentes. Los valores de *p* significativos se indican mediante asteriscos.

Ejemplo:

Materiales y procedimientos:

Enfermos, células y tratamientos

Las líneas celulares de LMA KG1a, ML-2 y THP-1 (obsequio de F. Mazurier) con *NPM-1* wt, se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10 % de suero bovino fetal (SBF) y antibióticos. Las células de LMA OCI-AML3 (obsequio de D. Bouscary) que albergan la mutación de *NPM-1* sin *FLT3-DIT* se cultivaron en MEM que contenía 20 % de LBS y antibióticos. Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 /ml. Las células de LMA primarias (de sangre periférica o bien BM) se extrajeron después de la separación de Ficoll y se cultivaron en MEM- α enriquecido con 20 % de LBS y antibióticos. Estas muestras se recogieron después de la aprobación de la Junta de Revisión Institucional y después de que los enfermos proporcionaran su consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El arsénico se usó a 0,1 o 1 μ M, el AR a 0,3 o 1 μ M y el inhibidor del proteasoma PS-341, a 10 nM. El crecimiento celular se evaluó usando el kit de ensayo de proliferación celular CellTiter 96[®] (Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.) o mediante un ensayo de colorante azul de tripano. Los enfermos con LMA ancianos con mutación de *NPM-1* que se consideraron no aptos para recibir quimioterapia, recibieron AR compasivo (Vesanoid[®], ROCHE) (45 mg/m²/día v.o.) y trióxido de arsénico (Trisenox[®], TEVA), por vía intravenosa (0,1 mg/kg/día).

Análisis FACS

50 *Tinción de anexina V*: la exposición a fosfatidilserina (PS) en células de LMA tratadas se evaluó usando Annexin V-FITC (Sigma). *Ensayo TUNEL*: el dUTP conjugado con fluoresceína incorporado en polímeros nucleotídicos se detectó y cuantificó usando citometría de flujo. Para los ensayos tanto de anexina como TUNEL, se adquirieron y analizaron aproximadamente 10000 células por muestra usando el programa informático CellQuest.

Análisis de inmunotransferencia

55 Las células se solubilizaron a 4 °C en tampón de lisis. Se cargaron 50 μ g de proteínas en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 %, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las transferencias se

incubaron con anticuerpos específicos, se lavaron y las proteínas se visualizaron usando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Santa Cruz, Alemania). Se usaron los siguientes anticuerpos; anti-NPM-1 wt monoclonal (Abnova, Abcam), anti-NPM-1 mutado policlonal (Abnova), antiactina (Santa-cruz, Alemania) y anti-GAPDH (Abnova).

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

5 Las células OCI-AML3 y THP-1 se prepararon mediante centrifugado celular en portaobjetos de vidrio (5 min, 800 rpm) y se fijaron con metanol a -20°C . Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron usando anticuerpos primarios anti-NPM-1, anti-SUMO1 o anti-LPM. Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite de apertura numérica Plan Aplanachromat 63/1.4, usando Zen 2009 (Carl Zeiss).

10 Estudios de sinergia y análisis estadístico

Los experimentos de proliferación en líneas celulares se repitieron al menos tres veces. Los datos se informan como la media \pm error estándar. El índice de combinación (IC) computarizado se generó automáticamente usando el programa informático CompuSyn basado en el procedimiento CI-isobol de Chou-Talalay *et al.*, 2010. Se usó el IC para evaluar los efectos sinérgicos ($\text{IC} < 1$), efectos aditivos ($\text{IC} = 1$) o efectos antagónicos ($\text{IC} > 1$). Se realizaron dos pruebas estadísticas para validar la significación: la prueba t y la prueba de análisis de varianza unidireccional (ANOVA). *, ** y *** indican valores de $p \leq 0,05$; 0,01 y 0,001, respectivamente valores de p menores que 0,05 se consideraron significativos.

Resultados:

La combinación de AR/arsénico induce la apoptosis en las células de LMA mutadas en *NPM-1*

20 Las líneas celulares de LMA con *NPM-1* mutado (OCI-AML3) o *NPM-1* natural (wt) (KG1a, ML-2, THP-1) se trataron con AR y/o arsénico hasta 48 h. Las células OCI-AML3 eran mucho más sensibles al AR que las células KG1a, ML-2 y THP-1 para la supresión del crecimiento y/o la muerte celular (figura 1A). Las células OCI-AML3 también eran considerablemente más sensibles al arsénico que las células de control (figura 1A). Los estudios de sinergia, analizados usando un índice de combinación (IC) computarizado (21), revelaron un fuerte efecto sinérgico de arsénico y AR para detener el crecimiento en células OCI-AML3 a las 24 h ($\text{IC} = 0,46$ y $0,035$, para concentración baja o alta de arsénico respectivamente) (figura 1A). De forma similar, solo se observó un aumento en la positividad de anexina V y TUNEL en células OCI-AML3 tratadas con arsénico o AR. Por tanto, esta combinación produjo sinergia para la inducción de apoptosis, alcanzando un 75 % después de 48 h de tratamiento, exclusivamente en células OCI-AML3 (figura 1B y 1C).

30 Las células leucémicas primarias derivadas de células mononucleares de sangre periférica o BM de tres enfermos con LMA, se trataron con AR y/o arsénico, como anteriormente. El enfermo 1 tenía LPA con reordenamiento de LPM/RAAR, el enfermo 2 albergaba una mutación de *NPM-1* sin DIT de *Fit-3* y el enfermo 3 tenía LMA-M6 con *NPM-1* wt. Las células de los enfermos 1 y 2 eran más sensibles al tratamiento con AR y arsénico que las derivadas del enfermo 3 (figura 1D). De nuevo, se observó una fuerte sinergia entre el AR y el arsénico, exclusivamente en los enfermos 1 y 2 en cualquier punto de tiempo y dosis (figura 1D y no se muestra). En conjunto, el AR y el arsénico ejercen una apoptosis selectiva sobre las LMA mutantes en *NPM-1 ex vivo*.

El AR/arsénico reducen los mieloblastos en enfermos con LMA mutante en *NPM-1*

40 El uso compasivo del AR y el arsénico se inició en cinco enfermos con LMA ancianos con recidiva o sin tratamiento previo, con cariotipo normal y *NPM-1* mutada que se consideraron no aptos para la quimioterapia. Como era de esperar de los enfermos con LPA, este tratamiento fue muy bien tolerado (22). Los mieloblastos de BM disminuyeron significativamente en tres enfermos el día 15 después del tratamiento (figura 1E y no se muestra). Los mieloblastos de BM permanecieron bajos durante el tratamiento, pero aumentaron después de su interrupción (figura 1E). En el enfermo 4, el análisis de aspirados de BM semanales reveló que los mieloblastos de BM aumentaron inicialmente del día 1 al día 15 del tratamiento con AR (día 8 de AR/arsénico) (de un 15 % a un 38 %, respectivamente) y posteriormente se normalizaron el día 23 del tratamiento con AR (día 16 de AR/arsénico) (un 5 %), en una médula normocelular. Los mieloblastos de BM permanecieron bajos el día 39 durante el tratamiento (un 6 %), pero volvieron a aumentar el día 63 (un 33 %), dos semanas después de que se interrumpiera el tratamiento (figura 1F). Es importante destacar que, durante todo el período de tratamiento, el enfermo se volvió independiente de transfusiones. Por tanto, el AR y el arsénico ejercieron un efecto antileucémico *in vivo*, con eliminación de los mieloblastos en este subconjunto de enfermos con LMA.

La degradación de *NPM-1* mutante impulsa la inhibición del crecimiento inducido por AR/arsénico

55 Debido a las sorprendentes similitudes entre los efectos de AR/arsénico sobre las células de LMA mutantes en *NPM-1* y las células de LPA, se investigó la capacidad de esta combinación para inducir la degradación de la oncoproteína *NPM-1* mutante. No se observó ningún efecto de AR o arsénico sobre la expresión de *NPM-1* en células THP-1 y ML-2 (figura 2A y no se muestra). Por el contrario, el AR o el arsénico desencadenaron la degradación de *NPM-1* en células OCI-AML3, según se evaluó con un anticuerpo que detecta proteínas tanto wt como mutantes (figura 2A).

Usando un anticuerpo selectivo para la proteína mutante NPM-1, la amplitud de la degradación era considerablemente mayor. Colectivamente, esto sugiere que la NPM-1 mutante es la diana primaria del AR y el arsénico, y que la proteína wt oligomerizada se degrada conjuntamente (figura 2A). Se observaron hallazgos similares en las células primarias del enfermo (figura 2B). Críticamente, tanto la degradación de NPM-1 como la detención del crecimiento se invirtieron después de la adición del inhibidor del proteasoma PS-341 (figuras 2C y 2D) (IC de 4,58 a las 24 h). Estos resultados sugieren fuertemente que la detención del crecimiento inducida por AR/arsénico de las células de LMA con NPM-1 mutante es provocada por la degradación proteosómica de la oncoproteína mutada.

El AR y el arsénico restablecen la localización normal tanto de NPM-1 como de LPM

En las LMA mutantes en NPM-1, la NPM-1 se deslocaliza al citoplasma (figura 2E). Es importante destacar que el tratamiento con AR/arsénico restauró la localización nucleolar de la proteína de NPM-1 restante (figura 2E). Esto sugiere que la degradación de NPM-1 mutada desencadenada por el AR/arsénico libera NPM-1 wt y por tanto corrige los defectos en la organización nucleolar. Sorprendentemente, el tratamiento con AR/arsénico *in vivo* dio como resultado la relocalización nucleolar completa de NPM-1 en los blastocitos de un enfermo (figura 3A), aunque la NPM-1 mutante no se degradaba en su totalidad (datos no mostrados). Por tanto, el tratamiento corrige rápidamente los defectos en la organización nucleolar (y presumiblemente en la función) impuestos por la mutación de NPM-1.

Los NB de la LPM constituyen plataformas para modificaciones postraduccionales, notablemente la sumoilación, que se han implicado repetidamente en la transformación. No obstante, las alteraciones en los NB de la LPM no se describieron previamente en las LMA mutantes en NPM-1. Inesperadamente, en las células OCI-AML3, los NB de la LPM eran significativamente más pequeños y mucho menos numerosos que en las células THP-1. La misma conclusión se alcanzó usando anticuerpos SUMO-1 (figura 3B-C). Además, en las células de LMA primarias mutadas en NPM-1, se observaron pequeños NB de la LPM y un solapamiento significativo entre NPM-1 y LPM nucleares, pero extranucleolares (figura 3A). Como era de esperar, el tratamiento con AR/arsénico potenció la formación de NB de la LPM en células OCI-AML3 como THP-1, sin embargo este efecto era más pronunciado en células mutadas en NPM-1 y se acompañó de una formación potenciada de NB de SUMO-1 en células OCI-AML3 (figura 3B-C). Estos resultados demuestran la desorganización de los NB de LPM/SUMO-1 en la LMA mutante en NPM-1, y podrían sugerir que su restauración contribuye a la eficacia terapéutica del AR/arsénico, como en la LPA (15, 23).

Análisis:

Los autores de la presente invención y otros han demostrado que, en la LPA, la degradación de LPM/RAAR por arsénico o AR desencadena la diferenciación y activa un punto de control de senescencia de P53 que culmina en la erradicación de la LPA (13, 24-25). Las dos vías de degradación se han caracterizado ampliamente y reflejan la unión directa del arsénico a la LPM y del AR a su receptor, RAAR (26). La senescencia inducida por el tratamiento se vinculó con la restauración de los NB de la LPM previamente alterados por la expresión de LPM/RAAR (15). Los resultados obtenidos en este caso con la LMA mutante en NPM-1 tienen similitudes inesperadas con la LPA. En primer lugar, la NPM-1 mutante se degrada tras la exposición al AR o al arsénico. En segundo lugar, la NPM-1 mutante desorganiza los procariones de LPM y el AR/arsénico restaura la organización nuclear (NPM-1 nucleolar con procariones normales de LPM/SUMO) *ex vivo* e *in vivo*. Por último, los mieloblastos de BM se reducen significativamente en algunos enfermos tratados. Estas LMA son adictas a la expresión continua de la proteína mutante (27), por lo que la degradación de NPM-1 mutante probablemente desencadena la apoptosis. Al igual que en la LPA, la reformación de los procariones de LPM también podría contribuir a la respuesta terapéutica (15, 28). Cómo el AR o el arsénico seleccionan como diana a la proteína NPM-1 mutante permanece oculto. Los NB de LPM son fábricas de degradación dependientes de SUMO activadas por interferones y estrés oxidativo (29). El arsénico potencia drásticamente la formación de los NB de LPM y promueve la degradación de algunas proteínas asociadas a la LPM. Ese pretratamiento con interferón alfa aceleró significativamente la degradación inducida por arsénico de NPM-1 mutante (datos no mostrados) y podría sugerir un papel de la LPM y/o las SUMO en el proceso de degradación. Por otra parte, la biogénesis modificada de los NB de LPM en las LMA mutantes en NPM-1 podría reflejar una interacción física entre la LPM y la NPM-1 mutante, que está masivamente sumoilado (30). Existen otras similitudes entre la LPM y la NPM-1, incluyendo la sumoilación, el enlace al control de P53, la señalización del interferón o el estrés oxidativo (31). Cómo el AR promueve la degradación selectiva de NPM-1 mutante no está claro, y los estudios futuros deberían investigar las vías catabólicas implicadas.

Debido a que los enfermos con LMA ancianos con mutaciones de NPM-1 no son elegibles para el tratamiento con quimioterapia, algunos enfermos se trataron de forma compasiva con la combinación de AR/arsénico usada en la LPA. Si bien no se observaron remisiones completas, la leucemia claramente retrocedió en varios enfermos. Sorprendentemente, se pudo demostrar la relocalización de NPM-1 al nucléolo y la reformación de procariones de LPM en blastocitos primarios de LMA, demostrando la restauración inducida por el tratamiento de la organización nuclear. Sin embargo, no se pudo obtener la degradación completa de NPM-1 mutante en enfermos con LMA *in vivo*. En LPA, la respuesta clínica refleja el grado de degradación de LPM/RAAR y solo el catabolismo completo de la oncoproteína produce remisiones (15, 17). Algunas diferencias *in vivo/ex vivo* pueden ser responsables de esta respuesta mitigada *in vivo* a la combinación de AR/arsénico. Por ejemplo, el estrés oxidativo inducido por arsénico requerido para la completa degradación de NPM-1 que no se puede alcanzar en los enfermos. La optimización preclínica, por ejemplo, usando modelos de ratón, debería abordar este punto.

Estos hallazgos inesperados constituyen un sorprendente paralelo a la degradación mediada por AR/arsénico de LPM/RAAR en LPA. Las observaciones de los autores de la presente invención podrían explicar el beneficio de supervivencia de añadir AR a la quimioterapia en este subgrupo de enfermos, y justifica la evaluación clínica de la combinación de AR/arsénico de primera línea en los ancianos.

5 Referencias:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

1. Ferrara F. Conventional chemotherapy or hypomethylating agents for older patients with acute myeloid leukaemia? *Hematol Oncol.* 2014;32(1):1-9.
- 10 2. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010; 116(3):354-65.
3. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood.* 2002;100(13):4372-80.
- 15 4. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, *et al.* Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature.* 2005;437(7055):147-53.
5. Falini B, Bolli N, Liso A, *et al.* Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia.* 2009;23(10):1731-43.
- 20 6. Cheng K, Sportoletti P, Ito K, *et al.* The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model. *Blood.* 2010;115(16):3341-5.
7. Chou SH, Ko BS, Chiou JS, *et al.* A knock-in Npm1 mutation in mice results in myeloproliferation and implies a perturbation in hematopoietic microenvironment. *PLoS One.* 2012;7(11):e49769.
8. Mallardo M, Caronno A, Pruneri G, *et al.* NPMc+ and FLT3_ITD mutations cooperate in inducing acute leukaemia in a novel mouse model. *Leukemia.* 2013;27(11):2248-51.
- 25 9. Mupo A, Celani L, Dovey O, *et al.* A powerful molecular synergy between mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD drives acute myeloid leukemia in mice. *Leukemia.* 2013;27(9):1917-20.
10. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, *et al.* Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-33.
- 30 11. Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R, *et al.* Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nat Genet.* 2011;43(5):470-5.
12. Schlenk RF, Dohner K, Kneba M, *et al.* Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica.* 2009;94(1):54-60.
- 35 13. Dos Santos GA, Kats L, Pandolfi PP. Synergy against PML-RARa: targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med.* 2013;210(13):2793-802.
14. de The H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(11):775-83.
15. Ablain J, Rice K, Soilihi H, *et al.* Activation of a promyelocytic leukemia-tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nat Med.* 2014;20(2):167-74.
- 40 16. Lallemand-Breitenbach V, Guillemin MC, Janin A, *et al.* Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med.* 1999;189(7):1043-52.
17. Nasr R, Guillemin MC, Ferhi O, *et al.* Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med.* 2008;14(12):1333-42.
- 45 18. Ravandi F, Estey E, Jones D, *et al.* Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin. *J Clin Oncol.* 2009;27(4):504-10.
19. Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, *et al.* All-trans retinoic acid/As2O3 combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(15):5328-35.

20. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, *et al.* Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013;369(2):111-21.
21. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440-6.
- 5 22. Efficace F, Mandelli F, Avvisati G, *et al.* Randomized Phase III Trial of Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Versus Retinoic Acid and Chemotherapy in Patients With Acute Promyelocytic Leukemia: Health-Related Quality-of-Life Outcomes. *J Clin Oncol.* 2014.
23. Lehmann-Che J, Bally C, de The H. Resistance to therapy in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(12):1170-2.
- 10 24. Ablain J, Leiva M, Peres L, *et al.* Uncoupling RARA transcriptional activation and degradation clarifies the bases for APL response to therapies. *J Exp Med.* 2013;210(4):647-53.
25. Vitaliano-Prunier A, Halftermeyer J, Ablain J, *et al.* Clearance of PML/RARA-bound promoters suffice to initiate APL differentiation. *Blood.* 2014 (en línea)
- 15 26. Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, *et al.* PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. *Cancer Cell.* 2010;18(1):88-98.
27. Balusu R, Fiskus W, Rao R, *et al.* Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1. *Blood.* 2011;118(11):3096-106.
28. Lallemand-Breitenbach V, de The H. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000661.
- 20 29. Sahin U, Lallemand-Breitenbach V, de The H. In Brief: PML Nuclear Bodies: Regulation, function and therapeutic perspectives. *J Pathol.* 2014.
30. Haindl M, Harasim T, Eick D, *et al.* The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep.* 2008;9(3):273-9.
31. Lindstrom MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int.* 2011;2011:195209.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de al menos un compuesto de arsénico con al menos un compuesto retinoide para su uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (LMA) impulsada por NPM-1 en un sujeto que lo necesita.
- 5 2. La combinación de al menos un compuesto de arsénico con al menos un compuesto retinoide para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el compuesto de arsénico se selecciona del grupo que consiste en arsénico, trióxido de arsénico (As_2O_3), hexóxido de arsénico (As_4O_6), melarsoprol y derivado de arsénico y azufre.
- 10 3. La combinación de al menos un compuesto de arsénico con al menos un compuesto retinoide para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el retinoide se selecciona del grupo que consiste en ácido retinoico (AR), ácido retinoico todo trans (ATRA), ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, ácido 9,13-di-cis-retinoico, retinoides terminados en ácido benzoico y sus análogos heterocíclicos tales como TTNPB, TTAB, AM80, AM580, SR11251, SR11247, CD666, CD367, ácidos chalcona-4-carboxílicos, ácidos flavona-4'-carboxílicos, retinoides terminados en ácido naftalenocarboxílico tales como TTNN, CD437, CD417 o adapaleno, y retinoides de ácido carboxílico tales como AGN 190299 o ácido tazaroténico y RQ 10-9359 y acitretina.
- 15 4. Un kit de partes que comprende al menos un compuesto de arsénico y al menos un compuesto retinoide para su uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (LMA) impulsada por NPM-1 en un sujeto que lo necesita.

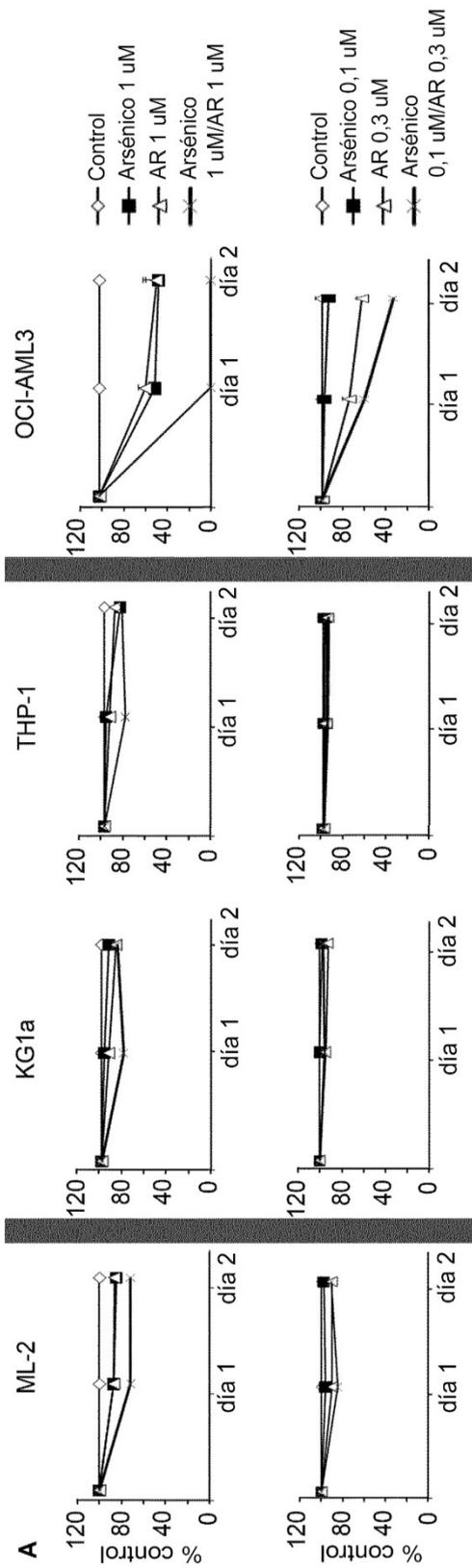


Figura 1A

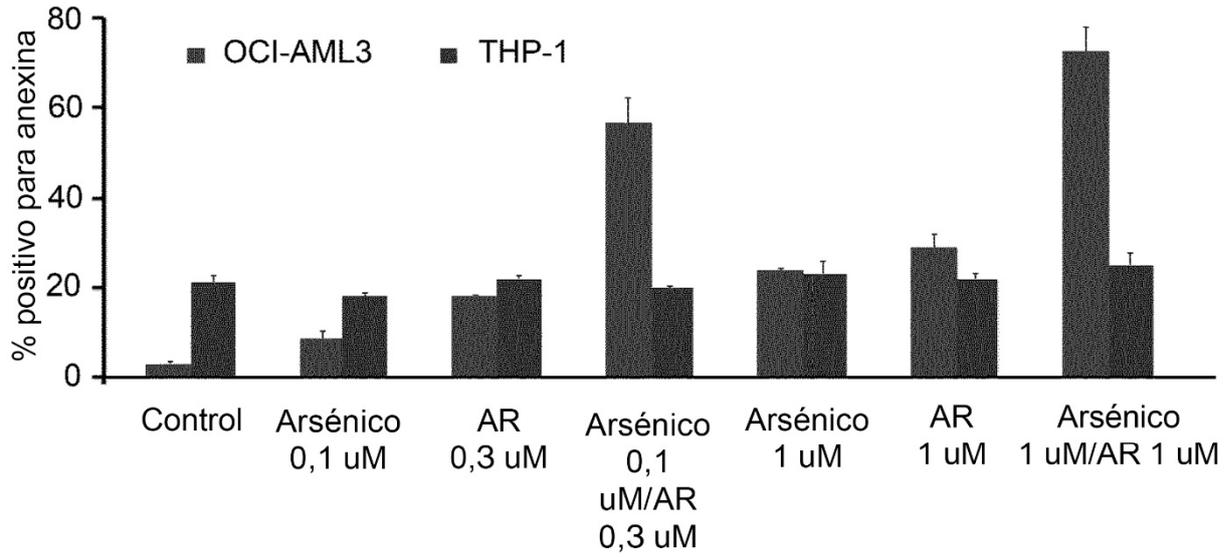


Figura 1B

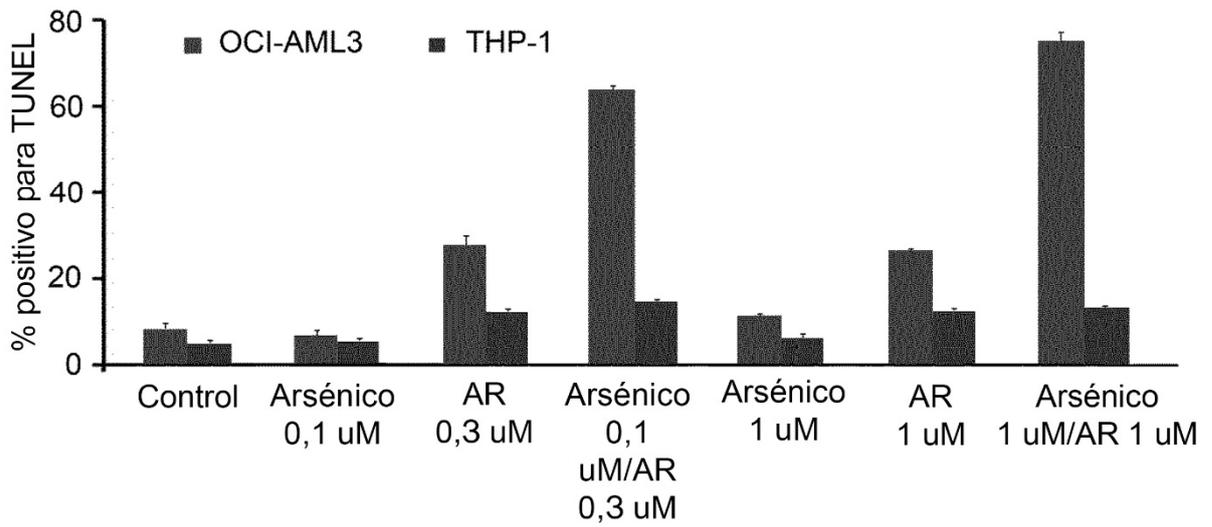


Figura 1C

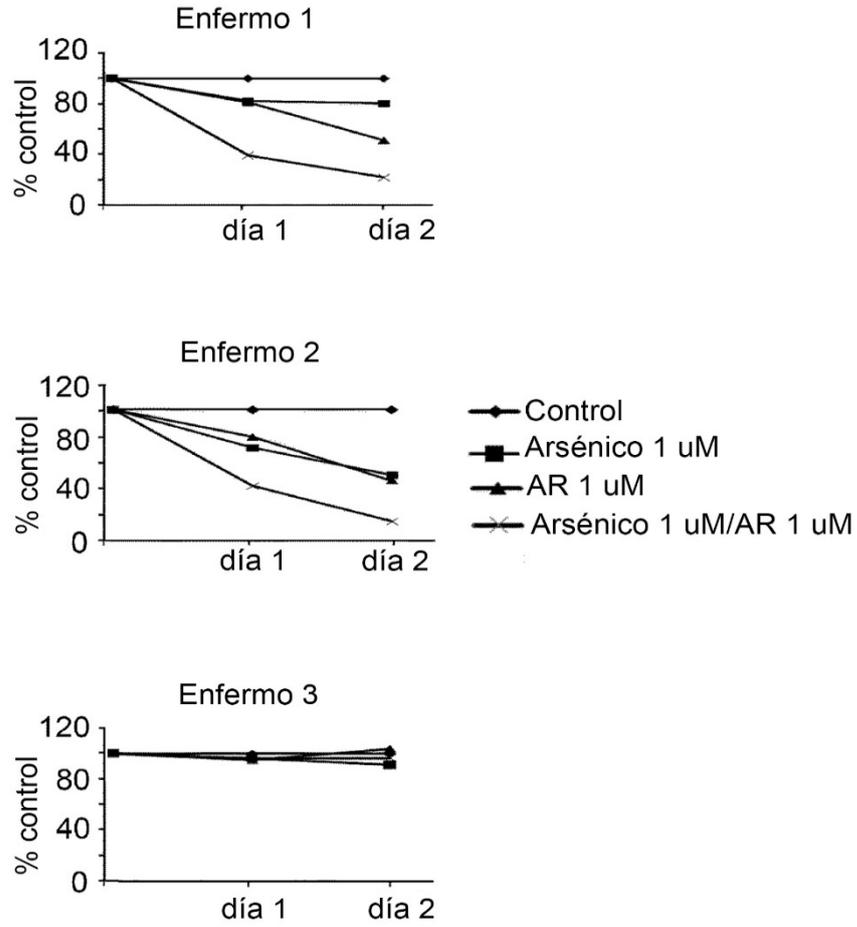


Figura 1D

	Mieloblastos (%)		
	Día 0	Día 15	Después de detener
Enfermo 4	20%	5%	33%
Enfermo 5	27%	3%	9%
Enfermo 6	55%	14%	79%

Figura 1E

Enfermo 4

Días	d1	d8	d15	d23	d28	d35	d39	d46	d48	d63
AR										
Arsénico										
Mieloblastos en BM (%)	15	20	38	5			6			33

Figura 1F

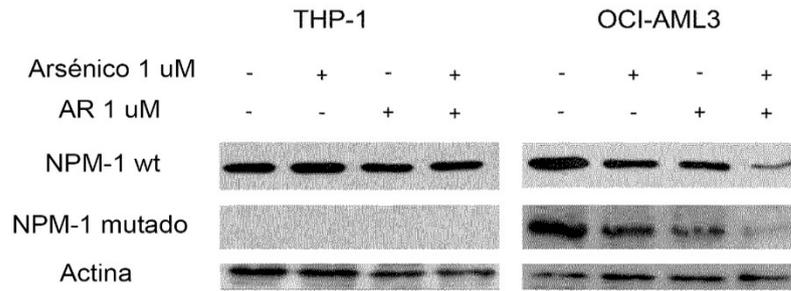


Figura 2A

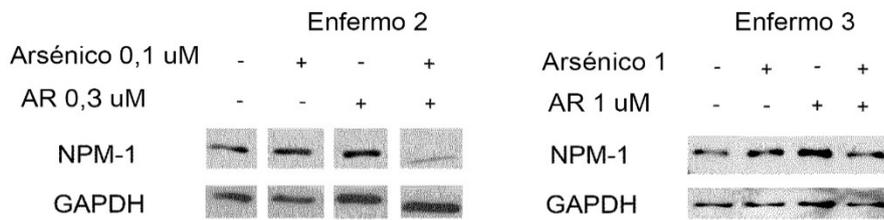


Figura 2B

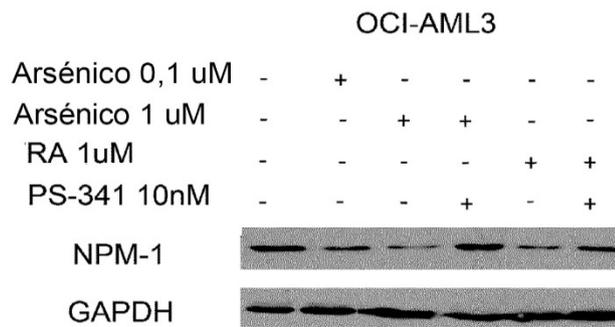


Figura 2C

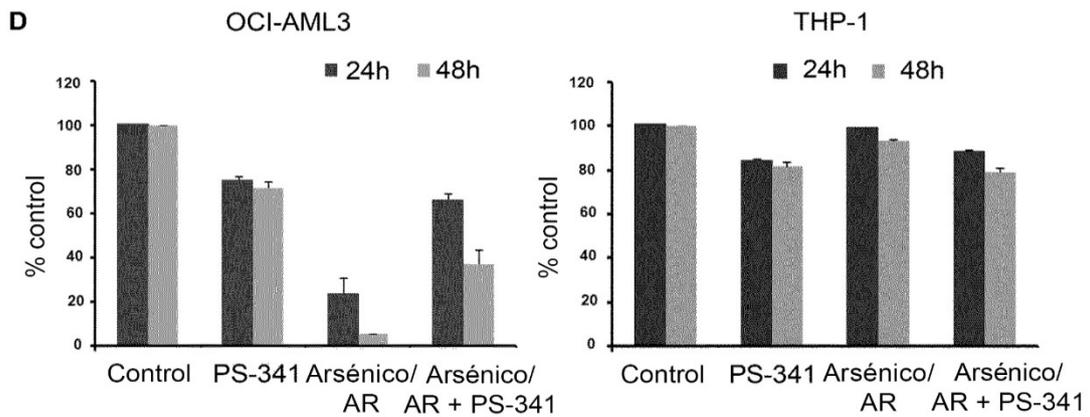


Figura 2D

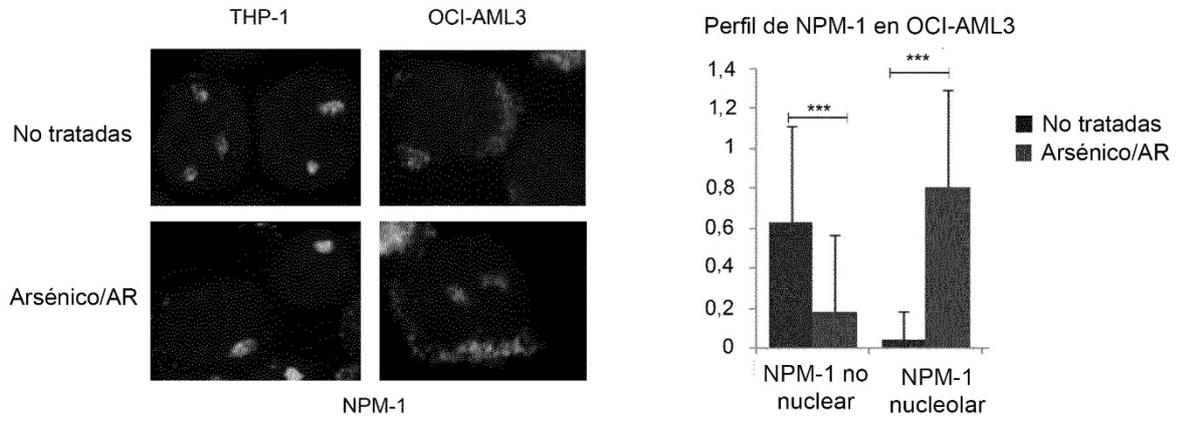


Figura 2E

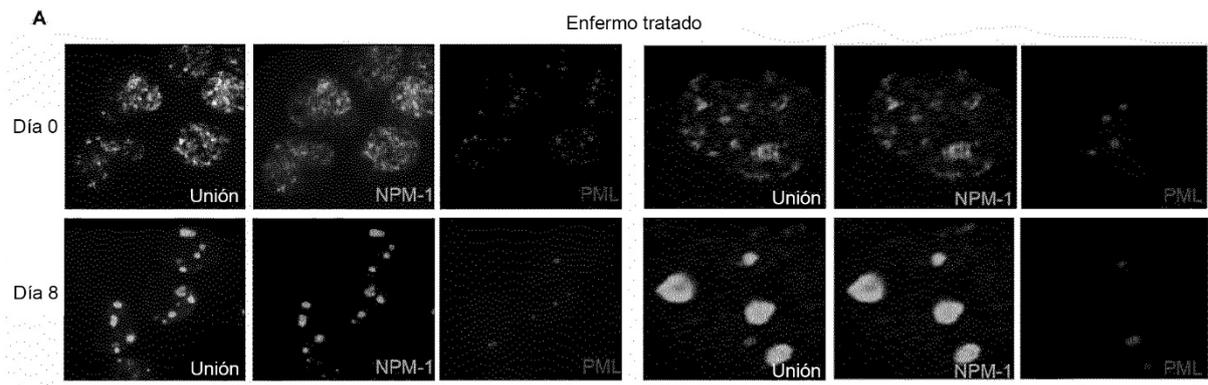


Figura 3A

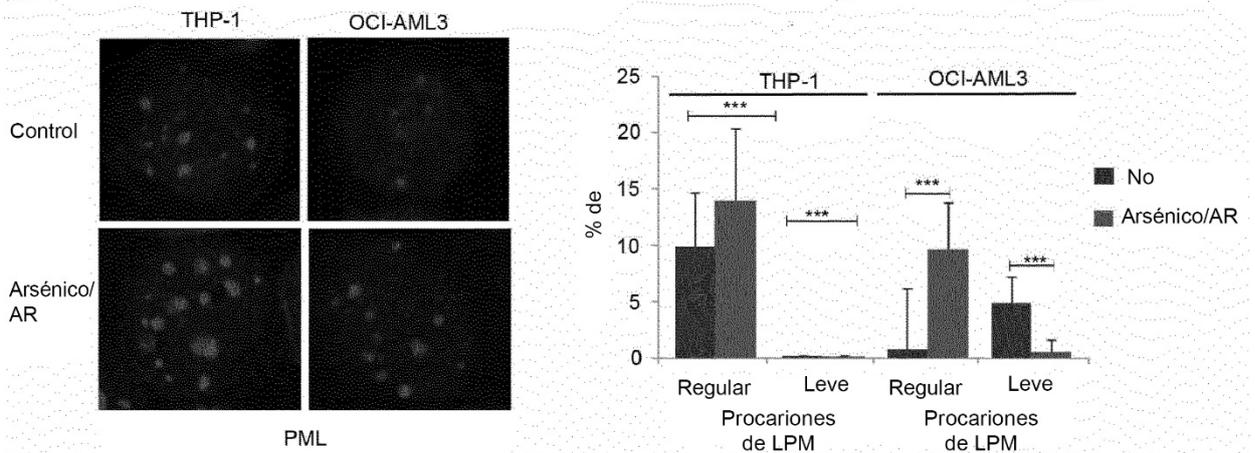


Figura 3B

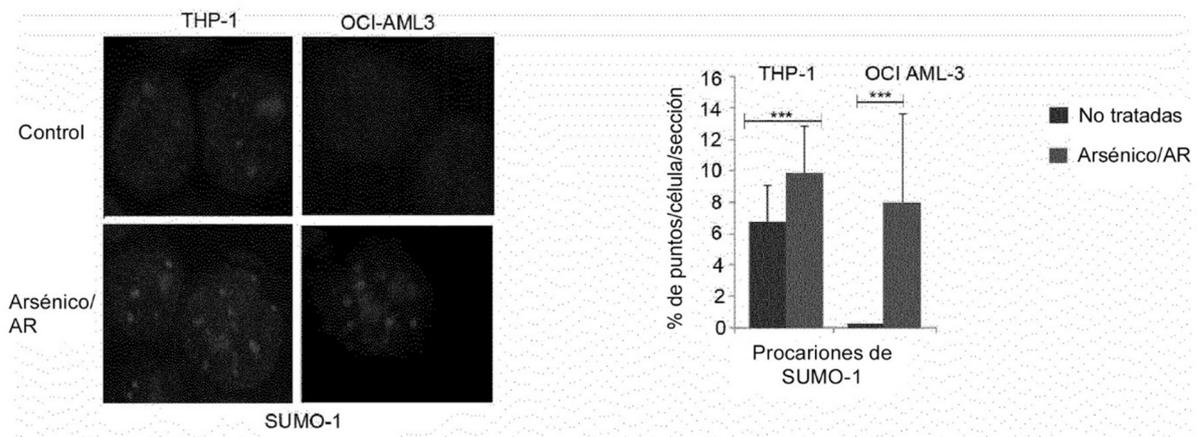


Figura 3C