

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 441**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7056 (2006.01)

A61K 31/4402 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/CA2012/000831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13037043**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12832430 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2755662**

54 Título: **Combinaciones de ribavirina y GDC-0449 para el tratamiento de la leucemia**

30 Prioridad:

13.09.2011 CA 2752008

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE MONTREAL (100.0%)
2900, Boulevard Edouard-Monpetit
Montreal, Quebec H3T 1J4, CA**

72 Inventor/es:

**BORDEN, KATHERINE;
ZAHREDDINE, HIBA y
CULJKOVIC KRALJACIC, BILJANA**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 742 441 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

Combinaciones de ribavirina y GDC-0449 para el tratamiento de la leucemia

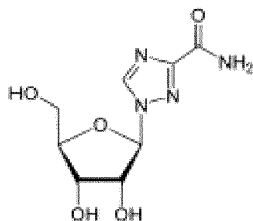
La presente invención se refiere al uso de una politerapia para tratar la leucemia, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, una cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 y un vehículo farmacéutico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer, los trastornos relacionados con tumores y los estados de enfermedad neoplásica son graves y, a menudo, afecciones potencialmente mortales. Estas enfermedades y trastornos, que se caracterizan por un crecimiento celular de rápida proliferación, continúan siendo objeto de esfuerzos de investigación dirigidos hacia la identificación de agentes terapéuticos que son eficaces en el tratamiento de los mismos. Dichos agentes prolongan la supervivencia del paciente, inhiben el crecimiento celular de proliferación rápida asociado con la neoplasia o provocan una regresión de la neoplasia. Una clase de cáncer es la leucemia, que consiste en neoplasias malignas derivadas de células hematopoyéticas (formadoras de sangre). Parte de esta clase de cánceres es la leucemia mielógena aguda (LMA), también conocida como leucemia mielógena aguda, que es un cáncer de la línea mielóide de las células sanguíneas, caracterizada por el rápido crecimiento de glóbulos blancos anómalos que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de glóbulos sanguíneos normales. La LMA es la leucemia aguda más frecuente que afecta a los adultos y su incidencia aumenta con la edad.

Para tratar a los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer, investigadores científicos de todo el mundo han investigado una multitud de células cancerosas mutantes, mutaciones genéticas, mutagénesis específica del sitio, ADN, ARN, expresión de ARN y proteínas, transportadores, secuenciación genética, para asignar vías bioquímicas en las células cancerosas a nivel molecular y encontrar la "cura" para diversos tipos de cáncer y/o la capacidad de controlar estos como enfermedades crónicas. Uno de los campos de investigación del cáncer más reciente consiste en la investigación de la desregulación del metabolismo del ARN que contribuye a que las células se vuelvan cancerosas, y aún más específicamente, la inhibición de un factor específico, el factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E (eIF4E), por un fármaco antivirico conocido, la ribavirina, que impide la capacidad de eIF4E para producir células cancerosas sin afectar significativamente a las células normales. Por ejemplo, el uso de composiciones que comprenden ribavirina en el tratamiento de la leucemia se describe en Assouline, Blood (ASH Annual Meetings), vol. 118, Abstract 3606, y Borden, Leuk Lymphoma, vol. 51, p. 1805. El documento WO 2012/019284 describe una composición que comprende un inhibidor de eIF4E junto con un inhibidor de la metiltransferasa.

La ribavirina se designa químicamente como: 1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida, y tiene la siguiente estructura química:



La preparación de ribavirina se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 3.798.209. La farmacología clínica de la ribavirina también se divulga en Glue, "The clinical pharmacology of ribavirin" Seminars in Liver Disease, vol. 19, suppl. 1, 1999, p. 17-24, 1999. La ribavirina como modulador de la acción biológica de la arabinosilcitosina y el metotrexato se describe en Lobova, Eksp. Oncol, Vol. 7, No. 3, p. 63.

Las patentes canadienses n.º 2.287.056 y 2.323.849 divulgan una forma farmacéutica sólida administrable por vía oral que contiene una composición de ribavirina compactada, así como un procedimiento para preparar dichas formas farmacéuticas sólidas.

Se puede encontrar un análisis adicional sobre la interacción de ribavirina con eIF4E en: Assouline *et al.*, "Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin" Blood, Vol. 114, n.º 2 (2009); Borden, "Tissue Targeting in Cancer: eIF4E's Tale" Clin. Cancer Res., 2009; Borden *et al.*, "Ribavirin targets eIF4E dependent Akt survival signalling", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 375(3): 341-345 (24 de octubre de 2008); Kraljacic, *et al.*, "Inhibition of eIF4E with ribavirin cooperates with common chemotherapies in primary acute myeloid leukemia specimens" Leukemia 25, 1197-1200 (julio de 2011) y otras referencias conocidas en la técnica anterior.

La solicitud de patente canadiense n.º 2.685.520 divulga compuestos que son útiles para tratar infecciones víricas y cáncer, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y procedimientos sintéticos e intermedios

que son útiles para preparar los compuestos. Los compuestos que son útiles como agentes antivíricos y/o agentes antineoplásicos incluyen ribavirina.

La solicitud de patente canadiense n.º 2.715.885 divulga novedosos compuestos proporcionados para su uso en el tratamiento de tumores y la profilaxis o tratamiento de infecciones víricas, en el que uno de los agentes antivíricos es ribavirina.

La solicitud de patente canadiense n.º 2.674.589 divulga compuestos, así como composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos que son útiles como agentes antivíricos y/o como agentes antineoplásicos, en las que el agente antivírico es ribavirina.

La solicitud de patente canadiense n.º 2.430.966 divulga derivados de anilino pirimidina como inhibidores de la vía de JNK y composiciones que comprenden administrar una cantidad eficaz de un agente antineoplásico, en las que uno de los agentes antineoplásicos propuestos es ribavirina o citarabina.

El factor de traducción eucariótico, eIF4E, se encuentra en todas las células y es importante para crear nuevas proteínas. En pacientes con cáncer, la cantidad de eIF4E está sob reexpresada en la LMA, y es alta de forma anómala en un 30 % de los cánceres, incluidos los subtipos infiltrantes en particular de leucemia mielógena denominados M4 y M5. La función de eIF4E para elaborar nuevas proteínas depende de su capacidad para unirse a la parte frontal de ARN conocida como caperuza m⁷G (7-metil guanosina) (localizada en el extremo 5' del ARNm), que a continuación permite que la célula "traduzca" o convierta este ARN en proteína. También tiene un papel en la exportación del ARNm al citoplasma, que debe preceder a la etapa de traducción. Es conocido en la técnica que las células cancerosas con concentraciones elevadas de eIF4E parecen haber desarrollado una adicción oncogénica a eIF4E.

Se pueden ver ejemplos y referencias en la técnica anterior como sigue: Publicaciones internacionales abiertas a inspección pública n.º WO 2007/123579 y WO 2008/060369 (Translational Therapeutics); publicación internacional abierta a inspección pública n.º 2010/006291 (Nodality Inc.), y las patentes de EE. UU. n.º 7.425.544 y 7.601.700, y la publicación internacional de publicación abierta a inspección pública n.º WO 2005/028628 (Eli Lilly and Co. e ISIS Pharmaceuticals Inc.), así como la solicitud de patente canadiense n.º 2.632.903 (Nabil-Habib Lab y Vianova Labs Inc.) y algunas otras.

Por lo tanto, debido a sus propiedades, el factor de traducción eucariótico, eIF4E, se ha convertido en una atractiva diana clínica para tratar a los pacientes con diagnóstico de cáncer, en particular LMA. A este respecto, dirigirse a la actividad de unión eIF4E-caperuza m⁷G se ha estudiado en un ensayo de fase II, en pacientes con leucemia, y se ha informado en Assouline *et al.*, "Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin" *Blood*, Vol. 114, N.º 2 (9 de julio de 2009, publicación electrónica 11 de mayo de 2009). En este ensayo, se descubrió que el fármaco antivírico de uso frecuente, ribavirina, disminuye la función de eIF4E porque imita la caperuza m⁷G, inhibiendo por tanto la exportación y traducción inducida por eIF4E de transcritos sensibles. En experimentos en cultivo celular, la ribavirina no modula las concentraciones de proteína o los niveles de ARN de eIF4E. Sin embargo, en los pacientes, la ribavirina no solo inhibe eIF4E, sino que también puede dar lugar a la regulación por disminución de las concentraciones de proteína (y niveles de ARN) de eIF4E como se observó en pacientes en un ensayo clínico de fase II que usaba monoterapia con ribavirina. Por último, en células vivas, se demostró que eIF4E se une a ³H ribavirina, lo que respalda aún más la idea de que eIF4E une a la ribavirina directamente *in vitro* e *in vivo*.

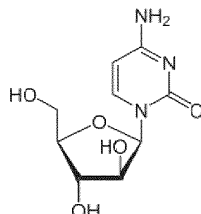
Se han divulgado varias ventajas en la técnica anterior y, a partir de estas divulgaciones, se puede entender que la imitación física del ligando natural de eIF4E, la ribavirina, inhibe preferentemente el crecimiento de muestras de AML primaria (LMA M4/M5) con concentraciones elevadas de eIF4E con respecto a muestras con concentraciones normales de eIF4E (p. ej., LMA M1/M2) o controles normales. También se enseña que, cuando se usa la monoterapia con ribavirina, no se observan toxicidades relacionadas con el tratamiento. Otros estudios indican que los inmunoprecipitados (IP) de ³H ribavirina con eIF4E en células vivas respaldan aún más la reivindicación de que la ribavirina se une directamente a eIF4E.

En la realización del ensayo clínico n.º NCT00559091, el solicitante observó que muchos pacientes tenían resistencia antes del inicio del tratamiento con ribavirina debido a los otros tratamientos que habían recibido o *de novo*. También, todos los pacientes que respondieron se volvieron resistentes a la monoterapia con ribavirina. En algunos pacientes, la monoterapia no tuvo ningún impacto, lo que sugiere que eran resistentes antes del inicio del tratamiento. Por tanto, un problema asociado con una monoterapia con ribavirina para su uso en el tratamiento del cáncer es que las células de AML se vuelven resistentes antes del inicio del tratamiento con ribavirina debido a los otros tratamientos o se vuelven resistentes como resultado del tratamiento con ribavirina (resistencia primaria frente a adquirida, respectivamente).

De hecho, las células leucémicas se vuelven resistentes a casi todas las monoterapias en dos (2) a cuatro (4) meses. Para superar este problema de resistencia, no es infrecuente en el campo clínico y, como ocurre con la mayoría de los tratamientos con monoterapia, combinar dicho tratamiento, de forma simultánea o secuencial, con quimioterapia. El uso de agentes quimioterápicos tiene muchos efectos secundarios en los pacientes, incluyendo

daño de las células normales, anemia, hemorragia, estreñimiento, fatiga, pérdida de cabello, infecciones, cambios en la memoria, hinchazón e incluso la muerte, entre muchos otros. La quimioterapia convencional también requiere una estancia en el hospital para administrar el(los) agente(s) quimioterapéutico(s) así como el tratamiento sintomático de los efectos secundarios.

- 5 Uno de los agentes quimioterápicos conocidos para tratar el cáncer es la citarabina, también conocida como Ara-C® (arabinofuranosil citidina o arabinósido de citosina), que se designa químicamente como 4-amino-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidin-2-ona. Tiene la siguiente fórmula química:



- 10 El arabinósido de citosina es un agente antimetabólico de quimioterapia que se usa principalmente en el tratamiento de los cánceres de los glóbulos blancos, tales como la leucemia mielógena aguda (LMA) y el linfoma no Hodgkin. Destruye las células cancerosas al interferir en la síntesis de ADN. Su modo de acción se debe a su rápida conversión en trifosfato de arabinósido de citosina, que daña el ADN cuando el ciclo celular se detiene en la fase S (síntesis del ADN). Las células en rápida división, que requieren la replicación del ADN para la mitosis, son las más afectadas. El arabinósido de citosina también inhibe tanto las ADN y ARN polimerasas como las enzimas nucleótido reductasas necesarias para la síntesis de ADN.

- 15 El arabinósido de citosina combina una base de citosina con un glúcido de arabinosa. La citosina normalmente se combina con un glúcido diferente, la desoxirribosa, para formar desoxicitidina, un componente del ADN. Determinadas esponjas, donde se encontró originalmente, usan glúcidos de arabinósido para formar un compuesto diferente (que no forma parte del ADN). El arabinósido de citosina es lo suficientemente similar a la citosina desoxirribosa (desoxicitidina) humana para incorporarse al ADN humano, pero lo suficientemente diferente como para destruir la célula. Este mecanismo se utiliza para destruir las células cancerosas. La citarabina es la primera de una serie de fármacos antineoplásicos que alteran el componente glucídico de los nucleósidos.

- 20 Se han desarrollado muchas combinaciones de fármacos para tratar a los pacientes con diagnóstico de cáncer, incluyendo, por ejemplo, la LMA. Por ejemplo, Zhu *et al.*, "Novel agents and regime for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights" Journal of Hematology & Oncology 2010, 3:17 (Recapitulación) divulga monoterapias de daunorubicina, voreloxina, ARRY-520, AZD1152, AZD6244 y terameprocol, así como combinaciones de fármacos tales como: citarabina con daunorubicina; fludarabina, citarabina con idarubicina, mitoxantrona con citarabina; clofarabina sola o en combinación con Ara-C® en dosis baja o Ara-C® en dosis baja con el anticuerpo monoclonal GO; politerapia con sorafenib; tipifarnib con bortezomib; azacitidina con botezomib o GO en dosis baja; amonafilo con Ara-C®; lenalidomina, Ara-C® y daunorubicina; así como ribavirina con Ara-C®, en el tratamiento de la LMA en pacientes de edad avanzada o la LMA recidivada o la LMA resistente al tratamiento.

- 25 La combinación de ribavirina y Ara-C® en dosis baja, Ara-C® e idarubicina, y combinaciones de los mismos (es decir, ribavirina, Ara-C® e idarubicina), así como sorafenib con ribavirina, fue divulgada específicamente por Assouline *et al.* en "Targeting the oncogene eIF4E with ribavirin: a novel therapeutic avenue in acute myeloid leukemia" Blood 114, 2009 y por Kraljacic *et al.* en "Inhibition of eIF4E with ribavirin cooperates with common chemotherapies in primary acute myeloid leukemia specimens" Leukemia 25, (2011).

También se han realizado ensayos clínicos con varias combinaciones de fármacos para el tratamiento de la leucemia y/o la LMA, y están disponibles en: clinicaltrials.gov (NCT01056523) y <http://clinicaltrials.gov/ct2/home>.

- 30 Los ejemplos de combinaciones de tratamiento para la LMA incluyen: ABT-348; ABT-888 y topotecán con o sin carboplatino; alemtuzumab, busulfano, y ciclofosfamida; alemtuzumab, busulfano y melfalán; alemtuzumab con fosfato de fludarabina; ácido retinoico todo-*trans* con briostatina 1; trihidrato de amifostina, citarabina con clorhidrato de mitoxantrona; trióxido de arsénico; azacitidina con arabinósido de citarabina (también conocido como Ara-C®); azacitidina, asparaginasa, citarabina, clorhidrato de aunorubicina, etopósido, lintuzumab con tioguanina; azacitidina con trióxido de arsénico; azacitidina con belinostat; azacitidina con entinostat; azacitidina con gemtuzumab ozogamicina; azacitidina con lenalidomida; azacitidina con midostaurina; 5-azacitidina (Vidaza®) con panobinostat (Ibh589); 5-azacitidina (5-aza), ácido valproico con ácido retinoico todo-*trans* (atra); azacitidina con ácido valproico; azacitidina con butirato de fenilo; basiliximab; becatecarina; belinostat; bendamustina; bevacizumab, citarabina con clorhidrato de mitoxantrona; bexaroteno y gm-csf; BMS-214662; bortezomib con belinostat; bortezomib con melfalán; bortezomib y vorinostat; briostatina 1; busulfan, filgrastim con etopósido; busulfán con fludarabina; busulfano, ciclofosfamida, micofenolato mofetilo con tacrólimus; carboplatino, docetaxel con ifosfamida; maleato de cediranib; clofarabina; clofarabina con ciclofosfamida; clofarabina, citarabina con idarubicina; clofarabina, filgrastim con citarabina; clofarabina y melfalán en dosis altas; clofarabina, melfalán y tiotepa; cilengitida; cixutumumab con temsirólimus; CPX-151; CT53518; citarabina y daunorubicina con o sin gemtuzumab ozogamicina; citarabina y

daunorubicina con o sin triclorhidrato de zosuquidar; citarabina, idarubicina con tipifarnib; citarabina con 7-hidroxiestaurosporina; citarabina con laromustina; citarabina con tanespimicina; citarabina con triapina; ciclofosfamida; ciclosporina y administración i.v. con micofenolato mofetilo; ciclosporina, micofenolato mofetilo y pentostatina; ciclosporina, metotrexato, metoxsaleno, micofenolato mofetilo con pentostatina; decitabina; decitabina con lenalidomida; decitabina con romidepsina; decitabina con tretinoína; decitabina con ácido valproico; decitabina con vorinostat (secuencial); deferasirox; dolastatina; eltrombopag olamina; entinostat; everólimus; mesilato de exatecán; citrato de fentanilo; flavopiridol y vorinostat; fludarabina y ciclofosfamida, así como irradiación de cuerpo entero, seguida de ciclosporina y micofenolato mofetilo; fosfato de fludarabina con administración i.v.; fosfato de fludarabina con tretinoína; fludarabina, carboplatino y topotecán; fludarabina, carboplatino, topotecán con talidomida; fludarabina con melfalán; fludarabina con tiotepa; fludarabina con treosulfano; gimatecán; 7-hidroxiestaurosporina con perifosina; hidroxiourea con laromustina; idarubicina con saha (vorinostat); ipilimumab; mesilato de imatinib; interleucina-12 seguida de interferón alfa; irofulveno itraconazol con midostaurina; ispinesib; JNJ-26481585; KW-2449; laromustina; lintuzumab; lonafarnib; Inhibidor de MEK AZD6244; MS-275 y gm-csf; MGCD0103; MLN8237; micofenolato mofetilo, tacrólimus con daclizumab; ON 0191 O.na; OX14503; palivizumab con o sin ribavirina; paricalcitol; butirato de fenilo y tretinoína; procrít; piroxamida; fluorouracilo, ácido folínico cálcica y clorhidrato de topotecán; rasburicasa; revlimid; romidepsina; sargramostim, amifostina trihidrato, carboplatino con ciclofosfamida; S81518; SJG-136; STA-9090; sirólimus con tacrólimus; salicilato de sodio; tosilato de sorafenib; sorafenib con vorinostat; tacrólimus y micofenolato mofetilo con o sin sirólimus; tacrólimus y micofenolato mofetilo; acetato de tetradecanoilforbol; temsirólimus; tipifarnib; triapina con fosfato de fludarabina; vorinostat; e itrio y 90 anticuerpo monoclonal anti-cd45 ahn-12, entre otros.

Como se señala en la técnica anterior, la población con LMA avanzada tenía dificultades para recibir más de un ciclo de tratamiento. Se pudo observar actividad contra la leucemia con enfermedad recidivada/resistente al tratamiento. Otro problema asociado con los tratamientos farmacológicos de la LMA es el silenciamiento epigenético; un fenómeno por el cual un incremento de la metilación inducida por el fármaco permite la resistencia adquirida al fármaco. La contribución de los mecanismos epigenéticos para la función celular correcta se destaca por los efectos de su desregulación que, en colaboración con las alteraciones genéticas, dan lugar al establecimiento y progresión de tumores (véase Fazi *et al.*, en "Heterochromatic gene repression of the retinoic acid pathway in acute myeloid leukemia", Blood, May 2007, vol. 109(10), p. 4432-4440).

Otros problemas con el tratamiento farmacológico concomitante es que los fármacos pueden producir efectos antagónicos, puede producirse sensibilidad/resistencia colateral a otros fármacos, puede ser difícil determinar la pauta de dosificación correcta, puede tener problemas de toxicidad; y puede crear multiresistencia. De lo anterior, resulta evidente que el tratamiento de los síndromes mielodiplásticos (SMD) y/o la LMA sigue siendo un desafío para el médico a pesar de los avances recientes. Muchos pacientes no responderán o tendrán solo respuestas limitadas y/o breves al tratamiento con un solo agente o incluso al tratamiento concomitante.

Incluso en la fase inicial de los ensayos clínicos, se han observado algunos efectos secundarios, que se debieron a Ara-C® a dosis baja. También se ha observado hemólisis en un paciente tratado con la combinación de ribavirina y Ara-C®. Este fenómeno se puede atribuir a la ribavirina, pero dichos efectos secundarios no se observaron en el ensayo de monoterapia con ribavirina (NCT NCT00559091). Es posible que Ara-C® potencie de alguna manera este efecto secundario. No se observaron efectos secundarios relacionados con el tratamiento con ribavirina sola.

La mayoría de los estudios de virus se han centrado principalmente en los efectos de la ribavirina en el virus, por ejemplo: mutaciones en polimerasas víricas, lo que no sucede en el contexto de la presente invención. En el contexto vírico, la ribavirina impide el crecimiento del virus y se produce resistencia cuando el virus continúa replicándose incluso en presencia de ribavirina. En el contexto del cáncer, es una medida de las células que se vuelven resistentes a los efectos antiproliferativos de la ribavirina, es decir, que eIF4E media la proliferación, la ribavirina impide este efecto y a continuación, finalmente, las células continúan proliferando incluso en presencia de ribavirina. Además, podría haber diferentes vías bioquímicas moduladas. Por tanto, no es posible comparar las infecciones víricas, tales como la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) o el poliovirus, con células de tipo canceroso o el crecimiento celular, ya que los mecanismos de acción y resistencia son completamente diferentes.

La resistencia farmacológica es un obstáculo importante en la investigación del cáncer, en particular para el CPM debido a las recientes innovaciones limitadas en los procedimientos de tratamiento. Una posible explicación de la quimiorresistencia es la activación de la vía de señalización de Hedgehog, que promueve la proliferación y diferenciación celulares y se ha relacionado con la quimiorresistencia. Su expresión génica se examinó en líneas celulares de CPM resistente y se informó de una expresión aberrante de los genes relacionados con la vía de Hedgehog, entre los cuales GLI1 fue significativo en particular. GLI1 es un factor de transcripción implicado en la determinación del destino celular, la proliferación, la oncogénesis y la progresión del cáncer. Los documentos que analizan la inhibición de la vía de Hedgehog y el uso de inhibidores de la vía de Hedgehog incluyen los documentos WO 2010/085654, WO 2012/006584 y US 2009/0181997 .

Con el uso de nuevos agentes eficaces de quimioterapia, tratamiento hormonal y biológicos, y con información con respecto a formas más eficaces de integrar el tratamiento sistémico, la cirugía y la radioterapia, elaborar un plan de tratamiento adecuado es cada vez más complejo. Para ofrecer un mejor tratamiento con una eficacia incrementada y

una baja toxicidad, es necesario seleccionar tratamientos basadas en el paciente y las características clínicas y moleculares del tumor.

Por lo tanto, en consecuencia, existe una necesidad de superar los inconvenientes mencionados anteriormente mediante una politerapia.

5 **SUMARIO DE LA INVENCION**

Se ha descubierto que una combinación particular de ribavirina (RBV) con una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la vía de Hedgehog GDC-0449 y opcionalmente arabinósido de citarabina (Ara-C®), o algún otro agente quimioterápico, supera, en su mayor parte, los inconvenientes mencionados anteriormente.

10 En un aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende ribavirina, GDC-0449, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un procedimiento para tratar la leucemia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La figura 1 es un análisis por inmunoelectrotransferencia de células CD34+ aisladas de muestras normales (normal), de LMA M5 o de dos de LMC con crisis hemoblástica (bc). Se muestra la actina para la carga. Los resultados son representativos de >100 muestras primarias. Se ha demostrado que eIF4E está sustancialmente regulado por incremento y forma cuerpos nucleares grandes de forma anómala en un subconjunto de muestras primarias de LMA (subtipo FAB M4/M5) y de LMC con crisis hemoblástica. Además, la exportación por ARNm dependiente de eIF4E de dianas tales como la ciclina D1 está sustancialmente regulada por incremento, dando lugar a concentraciones de proteína incrementadas para estas dianas.

20 La figura 2 es un diagrama que muestra los niveles de ARN de ENT1 y ADK como función del tratamiento con ribavirina en pacientes. CT es el número de ciclos de 28 días de ribavirina; lo normal se deriva de las células CD34+ normales de la médula ósea. No había más ARN antes del tratamiento disponible para el paciente 11, pero estaba respondiendo en los ciclos 3 y 4 y se produjo una recidiva clínica y molecular en el ciclo 9. Por ejemplo, en el paciente 11 (RC), observamos una reducción en 20 veces de ENT1 y una reducción en 5 veces de los niveles de ARN de ADK en la recidiva con respecto a durante la respuesta (después de 9 ciclos de tratamiento).

25 La figura 3 es una inmunoelectrotransferencia de tres muestras primarias de mieloma múltiple frente a células CD34+ aisladas de médula ósea normal. Se determinó que las concentraciones de eIF4E están elevadas en 3/3 muestras de mieloma múltiple (MM) (fig. 3) y en 2/2 de SMD. Solo 1/8 de las muestras de LLA-B presentaron eIF4E elevada. Sin embargo, la única muestra que tenía eIF4E elevada contenía una translocación t4;11.

30 La figura 4 es un diagrama que muestra la resistencia de Tipo II: Absorción normal, pérdida de la interacción eIF4E-ribavirina. Enriquecimiento en un factor de multiplicación de ¹⁴C ribavirina respecto al control negativo (IgG de IP).

35 La figura 5 es una demostración gráfica de la absorción de ³H-ribavirina como un mecanismo potencial para la resistencia a la ribavirina.

La figura 6 es un diagrama que muestra cómo la atenuación génica de Gli-1 revierte la resistencia y la sobreexpresión de Gli-1 la confiere. Con el objetivo de lograr una reducción de un 50 % en la respuesta, el experimento se realiza en la CI₅₀ de esta línea celular.

40 La figura 7 es un diagrama que muestra que el inhibidor de la vía de Hedgehog de Gli-1 GDC-0449 (Roche) revierte parcialmente la resistencia a la ribavirina. Un tratamiento con GDC-0449 3 nM siguió 48 horas después con ribavirina.

45 La figura 8 es un análisis por inmunoelectrotransferencia de las enzimas de la vía de glucuronidación (UGT1A) que están elevadas en las células resistentes a F10R con una absorción normal con respecto a las líneas celulares originales u otras resistentes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la industria farmacéutica, y especialmente a una combinación que comprende ribavirina, GDC-0449, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un procedimiento para tratar la leucemia.

50 **1. 1. DEFINICIONES**

La abreviatura "eIF4E" significa factor de inicio de la traducción eucariótica 4E, que es una proteína que en los humanos está codificada por el producto génico eIF4E.

Por "inhibidor de eIF4E" como se usa en el presente documento se entiende cualquier compuesto que inhibe la actividad bioquímica del producto génico eIF4E, incluyendo su papel en la traducción de ARNm y la exportación de ARNm o las concentraciones de eIF4E (ARN o proteína 25). Un ejemplo de los inhibidores de eIF4E es ribavirina (1-13,0-ribofuranosil-1H-1,2,4-tiazol-3-carboxamida) y sus derivados. Preferentemente, un "inhibidor de eIF4E" da como resultado una reducción del cáncer o la diseminación de, por ejemplo, al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 % o un 50 %. En modos de realización más preferentes, un "inhibidor de eIF4E" reduce la replicación o diseminación, por ejemplo, en al menos un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o incluso un 99 %, de las células cancerosas.

El término "GDC-0449" significa el inhibidor de la vía de Hedgehog-Gli que se desarrolla para su uso potencial en el tratamiento del cáncer. GDC-0449 es un inhibidor de molécula pequeña diseñado para inhibir específicamente SMO, un mediador clave de la vía de señalización de Hh. GDC-0449 fue descubierto por Genentech y fue validado conjuntamente con Curis, Inc. a través de una serie de estudios preclínicos.

El término "agente quimioterápico", como se usa en el presente documento, significa un fármaco usado en el tratamiento del cáncer, normalmente un fármaco antineoplásico o con una combinación de dichos fármacos en una pauta de tratamiento estandarizada. La mayoría de los agentes y medicamentos de quimioterapia actúan interfiriendo en la síntesis o función del ADN. En base a su acción química a nivel celular, los agentes de quimioterapia se pueden clasificar como agentes específicos del ciclo celular (eficaces durante determinadas fases del ciclo celular) y agentes no específicos del ciclo celular (eficaces durante todas las fases del ciclo celular). Dependiendo de sus características y la naturaleza del tratamiento, los agentes de quimioterapia se pueden clasificar como agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, antibióticos antitumorales, anticuerpos monoclonales, platinos o alcaloides vegetales.

El término "dosis baja" como se menciona en el presente documento significa una cantidad de Ara-C® para reprimir la tumorigenicidad de las células.

Los términos "cáncer", "canceroso" o "neoplasia" o "células neoplásicas" comprenden neoplasias, cánceres o células neoplásicas localizadas en el sitio original de proliferación ("tumor o cáncer primario") y su infiltración de otros tejidos u órganos. También se refieren o describen el estado fisiológico en los mamíferos en los que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado.

Por "inhibe el crecimiento de una neoplasia" se entiende que ralentiza, detiene o invierte de forma mensurable la tasa de crecimiento de la neoplasia o células neoplásicas *in vitro* o *in vivo*. Preferentemente, se logra una ralentización de la tasa de crecimiento en al menos un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 % o incluso un 70 %, durante un período de tratamiento de seis meses como se determina usando un ensayo adecuado para la determinación de tasas de crecimiento celular (por ejemplo, un ensayo de crecimiento celular descrito en el presente documento). Típicamente, se logra una inversión de la tasa de crecimiento iniciando o acelerando mecanismos necróticos o apoptóticos de muerte celular en las células neoplásicas, dando como resultado una reducción del tamaño de la neoplasia.

El término "respuesta molecular completa" significa la respuesta molecular a medida que el producto génico eIF4E se mueve y disminuye (al menos en la leucemia, las respuestas pueden ser diferentes en otros cánceres, es decir, los cánceres con menos eIF4E nuclear pueden no tener un movimiento pronunciado hacia el citoplasma). Dirigirse a la actividad de eIF4E también debería estar allí (teniendo en cuenta las dianas de exportación y traducción); en la leucemia como se menciona en el presente documento, significa la respuesta molecular completa a medida que eIF4E se mueve, eIF4E disminuye y se dirige a la función del producto génico eIF4E.

Por "una cantidad eficaz", "una cantidad para el tratamiento de una neoplasia", "una cantidad para el tratamiento de una preneoplasia", "una cantidad para el tratamiento de trastornos proliferativos" o por "una cantidad para el tratamiento de lesiones precancerosas" se entiende la cantidad de un compuesto o una combinación de compuestos requerida para tratar o evitar una enfermedad de una manera clínicamente pertinente. Una cantidad eficaz o una cantidad para tratamiento de un compuesto varía según la enfermedad que se esté tratando, la forma de administración y la edad, el peso corporal y la salud general del paciente. En última instancia, los médicos prescriptores decidirán la cantidad adecuada y la pauta posológica de acuerdo con la buena práctica médica.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende describir concentraciones o cantidades de compuestos de acuerdo con la presente invención que son terapéuticamente eficaces en el tratamiento de neoplasias (es decir, tumores, cánceres), preneoplasias, trastornos proliferativos y/o lesiones precancerosas o las diversas afecciones. o estados de enfermedad incluyendo un crecimiento celular hiperproliferativo.

El término "cantidad eficaz" significará una cantidad o concentración de un compuesto o composición de acuerdo con la presente invención que sea eficaz dentro del contexto de su administración, que puede ser inhibitoria, profiláctica y/o terapéutica. Los compuestos de acuerdo con la presente invención son útiles en particular para proporcionar un cambio favorable en la enfermedad o afección tratada, con independencia de que ese cambio sea una remisión, una disminución del crecimiento o tamaño del cáncer o un tumor u otro efecto en la afección o

enfermedad que se va a tratar, un resultado fisiológico favorable o una reducción de la sintomatología asociada con la enfermedad o afección tratada.

El término "administrar" se refiere a un procedimiento para dar una composición de la invención a un paciente, por una ruta tal como inhalación, administración ocular, instilación nasal, administración parenteral, administración dérmica, administración transdérmica, administración bucal, administración rectal, administración sublingual., administración perilingual, administración nasal, administración tópica y administración oral. La administración parenteral incluye administración intratecal, intraarticular, intratumoral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular. El procedimiento óptimo de administración de un fármaco o combinación de fármacos para tratar una enfermedad particular puede variar dependiendo de varios factores, por ejemplo, la biodisponibilidad oral del(de los) fármaco(s), la localización anatómica del tejido de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad.

La vía de señalización de Hedgehog (Hh) desempeña un papel importante en la embriogénesis en múltiples especies. Su actividad es reducida o ausente en organismos adultos. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de la vía es un factor en el desarrollo de una serie de neoplasias malignas en humanos y se está investigando la inhibición de la vía como un tratamiento potencial para múltiples cánceres.

El término "inmunoelctrotransferencia" se refiere al análisis de proteína(s) (o polipéptidos) inmovilizados en un soporte tal como nitrocelulosa o una membrana. Las proteínas se ejecutan en geles de poliácridamida para separar las proteínas, seguido de la transferencia de la proteína del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF) o una membrana similar. Las proteínas inmovilizadas se exponen a continuación a anticuerpos con reactividad contra un antígeno de interés. La unión de los anticuerpos se puede detectar mediante diversos procedimientos, incluyendo el uso de anticuerpos radiomarcados o quimioluminiscencia.

Otros rasgos característicos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

2. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE eIF4E POR LA RIBAVIRINA

Se ha descubierto que la ribavirina actúa como un inhibidor competitivo de la caperuza m⁷G y, de este modo, inhibe las funciones de eIF4E tanto en la exportación como en la traducción de transcritos sensibles. Los estudios de RMN, fluorescencia y espectrometría de masas indican que la ribavirina se une directamente a eIF4E. La ³H ribavirina se une a eIF4E en células vivas, como se muestra por el enriquecimiento por un factor de 14 de ³H ribavirina en inmunoprecipitaciones de eIF4E con respecto a controles. El metabolito activo de la ribavirina, el trifosfato de ribavirina (RTP), se une a eIF4E con una afinidad similar a m⁷GTP y obstaculiza la exportación de ARNm de dianas de eIF4E y la traducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la ornitina descarboxilasa (ODC) pero no la exportación o traducción de transcritos insensibles a eIF4E, tales como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La sensibilidad a la ribavirina es paralela a la sensibilidad a eIF4E e inhibe las funciones tanto nucleares como citoplásmicas de eIF4E. Es importante destacar que la ribavirina afecta a las muestras de LMA primaria con eIF4E elevado más que a las muestras con concentraciones normales de eIF4E. En total, parece que estas muestras de LMA han desarrollado una "adicción oncogénica" a eIF4E, lo que las hace más sensibles a la inhibición de eIF4E que las muestras con concentraciones normales de eIF4E. Se investigó la utilidad clínica del tratamiento con ribavirina en pacientes con LMA M4/M5.

La eficacia de la quimioterapia es limitada en algunos casos porque las células leucémicas se vuelven resistentes a ella o tienen una resistencia debido a tratamientos anteriores o a una resistencia *de novo* (primaria). Como se analiza anteriormente, el solicitante sometió a prueba la eficacia del tratamiento con ribavirina en pacientes en un ensayo clínico en todo Canadá y observó una mejoría sorprendente en los pacientes; sin embargo, finalmente, todos desarrollaron resistencia a la ribavirina (Assouline *et al.*, Blood, 2009).

Normalmente, la quimioterapia se administra en ciclos, con cada período de tratamiento seguido de un período de descanso para permitir que el cuerpo se recupere. Por lo tanto, los investigadores están buscando formas de evitar o revertir esta resistencia usando otros fármacos junto con la quimioterapia.

3. COOPERACIÓN ENTRE EL INHIBIDOR DE eIF4E Y EL INHIBIDOR DE LA VÍA DE HEDGEHOG

El gen del factor de iniciación de la traducción eucariótica eIF4E está elevado en la leucemia mielógena aguda (LMA) M4 y M5. El potencial oncogénico de eIF4E depende de su capacidad para unirse a la caperuza m⁷G en el extremo 5' de los ARNm. El solicitante descubrió que la ribavirina actúa como un inhibidor competitivo de la caperuza, inhibiendo de este modo las actividades de eIF4E. El ensayo de fase II de monoterapia con ribavirina en pacientes con LMA con pronóstico desfavorable demostró que el tratamiento con ribavirina se dirigía a la actividad del producto génico eIF4E y esto se correlacionó con el beneficio clínico, incluyendo las remisiones. Para mejorar los resultados clínicos, se examinaron los rasgos característicos que dan lugar a una resistencia primaria y adquirida a la ribavirina, así como la heterogeneidad en la respuesta de los pacientes, evaluando nuevos contextos para el uso de la ribavirina y determinando la eficacia de la combinación de la ribavirina con un inhibidor de la vía de Hedgehog y/o con citarabina a dosis bajas (Ara-C®) en pacientes.

Para superar el problema de resistencia debido a tratamientos antineoplásicos anteriores o a una resistencia *de novo* en el tratamiento con ribavirina, y de acuerdo con la presente invención, se proporciona una politerapia para el tratamiento.

5 Para mejorar los resultados clínicos mediante la resistencia adquirida a la ribavirina, se exploró la heterogeneidad en la respuesta y la resistencia de los pacientes en muestras de pacientes. Los autores de la invención evaluaron nuevos contextos para el uso de la ribavirina, incluyendo la eficacia de la combinación de un inhibidor del producto génico eIF4E con un inhibidor de la vía de Hedgehog y/o un agente quimioterápico en pacientes.

10 Se identificaron dos mecanismos distintos de resistencia subyacente. En primer lugar, la absorción de la ribavirina se ve afectada por la pérdida de su transportador de nucleósidos y/o adenosina cinasa. En segundo lugar, la elevación del factor de transcripción de Sonic Hedgehog Gli-1 da lugar a la activación de las enzimas UGT1A y la posterior glucuronidación de la ribavirina, evitando de este modo su asociación con eIF4E. La sobreexpresión de Gli-1 es suficiente para conferir resistencia. La atenuación génica de Gli-1, o la inhibición farmacológica de Gli-1 con GDC-0449, revierte la resistencia, correlacionándose con la reaparición de complejos de ribavirina-eIF4E.

15 En muestras de pacientes, la resistencia clínica se correlacionó con concentraciones elevadas de Gli-1. Por tanto, la resistencia a un tratamiento dirigido se puede estimular por la modificación química del fármaco en lugar de únicamente por la mutación de la proteína diana. Gli-1 también tiene capacidad de proliferación y podría estimular la oncogénesis independientemente de eIF4E en células resistentes debido a un nuevo cableado genético.

20 La politerapia de acuerdo con la presente invención que comprende un inhibidor de eIF4E (ribavirina), un inhibidor de la vía de Hedgehog (GDC-0449) y opcionalmente un agente quimioterápico (tal como la citarabina) supera la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico.

Se examinaron los efectos del tratamiento combinado de un inhibidor de eIF4E, preferentemente ribavirina con un inhibidor de la ruta de Hedgehog, preferentemente GDC-0449. GDC-0449 es un inhibidor de molécula pequeña de la vía de Hedgehog-Gli que se está desarrollando para su uso potencial en el tratamiento del cáncer.

25 Como se analiza anteriormente, Gli-1 da lugar a la pérdida de la interacción ribavirina-eIF4E y, por tanto, a resistencia en células F10R, que la familia de proteínas UGT1A estaba altamente elevada. El solicitante ha examinado que existe un vínculo entre Gli-1 y UGT y que esto da lugar a la glucuronidación de la ribavirina, perdiéndose la interacción. El solicitante ha examinado el pretratamiento de las células F10R con GDC-0449 y, a continuación, la adición de ribavirina.

30 El solicitante ha examinado si el inhibidor de eIF4E, preferentemente ribavirina y un inhibidor de la vía de Hedgehog, preferentemente GDC-0449, cooperaron en muestras de pacientes con LMA de pronóstico desfavorable.

De acuerdo con la presente invención, el nuevo tratamiento farmacológica combinatorio es útil debido a la cooperación entre el inhibidor de eIF4E (ribavirina), el inhibidor de la vía de Hedgehog (GDC-0449) y, si es necesario, el agente quimioterápico (tal como la citarabina), que destruye las células cancerosas al interferir en la síntesis del ADN.

35 **4. COOPERACIÓN ENTRE EL INHIBIDOR DE eIF4E Y EL AGENTE QUIMIOTERÁPICO**

Se determinaron varios modelos de colaboración entre estos fármacos, a saber:

- La ribavirina inhibe las funciones de eIF4E y la citarabina (Ara-C®) interfiere EN la síntesis de ácidos nucleicos o la síntesis de nucleótidos, siendo un inhibidor de la ADN polimerasa y bloqueando la síntesis del ADN, pero sin tener ningún efecto sobre la síntesis de ARN o proteínas;
- 40 • -Citarabina incorporada en ARN y ADN que interfiere con el alargamiento de la cadena; la ribavirina actúa como un inhibidor competitivo de la caperuza m⁷G;
- La citarabina (Ara-C®) es citotóxica y es altamente específica para la fase S del ciclo celular, mientras que la ribavirina es citostática;
- 45 • La citarabina (Ara-C®) puede incrementar la inhibición por la ribavirina de sus dianas, ya sea bloqueando la formación apropiada de la caperuza en 5' en estos ARNm y/o incorporándola a los ARN celulares e inhibiendo aún más su traducción o exportación;
- La citarabina (Ara-C®) muestra especificidad por las fases celular, destruyendo principalmente células que experimentan síntesis del ADN (fase S) y, en determinadas condiciones, bloqueando la progresión de las células de la fase G1 a la fase S (The Extra Pharmacopoeia, 30.^a ed.); y
- 50 • La ribavirina induce una detención de G1/S en muchos tipos de células (Kentsis *et al.*, 2004). Por tanto, la ribavirina puede colaborar de esta manera con la citarabina (Ara-C®).

Se han examinado los efectos del tratamiento combinado de un inhibidor de eIF4E, preferentemente la ribavirina con un antimetabolito, preferentemente la citarabina (Ara-C®). La citarabina (Ara-C®) es un análogo nucleosídico pirimidínico que inhibe la síntesis del ADN, y ha mostrado especificidad por la fase S del ciclo celular. Se metaboliza intracelularmente en su forma activa de trifosfato (trifosfato de arabinósido de citosina). Además, este metabolito daña el ADN por múltiples mecanismos, incluyendo la inhibición de la alfa-ADN polimerasa, la inhibición de la reparación del ADN a través de un efecto sobre la beta-ADN polimerasa y la incorporación al ADN.

El solicitante ha examinado si el inhibidor de eIF4E, preferentemente la ribavirina y un agente quimioterápico, preferentemente la citarabina (Ara-C®), cooperaron en la LMA de pronóstico desfavorable.

No es infrecuente en los tratamientos del cáncer tener mezclas de tres o más fármacos. A este respecto, se pueden usar otros agentes junto con la combinación de inhibidor de eIF4E y el inhibidor de la vía de Hedgehog. Por ejemplo, la composición de acuerdo con la presente invención puede comprender además al menos otra sustancia farmacéuticamente activa. Otras sustancias farmacéuticamente activas incluyen: inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de NFκB, inhibidores de la vía de Hedgehog e inhibidores de la metiltransferasa.

El inhibidor de eIF4E es ribavirina, el inhibidor de la vía de Hedgehog es GDC-0449 y el agente quimioterápico se selecciona de la categoría de antimetabolitos, más preferentemente, de la clase de antagonistas de la pirimidina, y más preferentemente, es arabinósido de citarabina (Ara-C®).

5. INDICACIONES PARA EL TRATAMIENTO

Las composiciones de la presente invención son para su uso en un procedimiento para tratar la leucemia.

Preferentemente, la leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica y síndromes mielodisplásicos (SMD).

De acuerdo con la presente invención, la leucemia mielógena aguda es la leucemia mielógena aguda M4 o la leucemia mielógena aguda M5 u otro subtipo de LMA caracterizado por una elevación atípica del producto génico eIF4E.

Los trastornos hematológicos incluyen un crecimiento anómalo de los glóbulos sanguíneos, que puede dar lugar a cambios displásicos en los glóbulos sanguíneos y neoplasias malignas hematológicas, tales como diversas leucemias. Los ejemplos de trastornos hematológicos incluyen leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, síndromes mielodisplásicos (MDS), mieloma múltiple y anemia de células falciformes.

La leucemia mielógena aguda (LMA) es el tipo más frecuente de leucemia aguda que se produce en adultos. Varios trastornos genéticos hereditarios y estados de inmunodeficiencia se asocian con un mayor riesgo de LMA. Estos incluyen trastornos con defectos en la estabilidad del ADN, que dan lugar a una rotura cromosómica aleatoria, tal como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi, las familias con síndrome de Li-Fraumeni, la ataxia-telangiectasia y la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.

La leucemia promielocítica aguda (LPMA) representa un subgrupo diferenciado de la LMA. Este subtipo se caracteriza por hemoblastos promielocíticos que contienen la translocación cromosómica 15; 17. Esta translocación da lugar a la generación del transcrito de fusión compuesto del receptor de ácido retinoico y el producto génico PML.

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una enfermedad heterogénea con rasgos clínicos característicos diferenciados que presentan diversos subtipos. Se han demostrado anomalías citogenéticas recurrentes en la LLA. La anomalía citogenética más frecuente es la translocación 9; 22. El cromosoma Filadelfia resultante supone un pronóstico desfavorable para el paciente. La leucemia mielógena crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo clonal de una célula madre pluripotente. La LMC se caracteriza por una anomalía cromosómica específica que implica la translocación de los cromosomas 9 y 22, creando el cromosoma Filadelfia. La radiación ionizante está asociada con el desarrollo de LMC. La fase crónica de la LMC a menudo se trata con éxito con Gleevec®. Sin embargo, cuando se convierte en LMC con crisis hemoblástica, Gleevec® no es eficaz. Nuestros estudios previos indican que las concentraciones de eIF4E están elevadas en LMC con crisis hemoblástica, pero no en la fase crónica. Esto significa que los pacientes con LMC con crisis hemoblástica podrían ser candidatos para la politerapia de acuerdo con la presente invención.

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos de las células madre hematopoyéticas clonales heterogéneas agrupados juntos debido a la presencia de cambios displásicos en uno o más de los linajes hematopoyéticos, incluyendo cambios displásicos en las series mieloide, eritroide y megacariocítica. Estos cambios dan como resultado citopenias en uno o más de los tres linajes. Los pacientes afectados por SMD típicamente desarrollan complicaciones relacionadas con anemia, neutropenia (infecciones) o trombocitopenia (hemorragia). En general, de aproximadamente un 10 % hasta aproximadamente un 70 % de los pacientes con SMD desarrollan leucemia aguda. Los pacientes con SMD podrían ser candidatos para este tratamiento.

6. RUTAS DE ADMINISTRACIÓN Y PAUTA DE DOSIFICACIÓN

Se pueden usar varias rutas de administración y formulaciones para administrar las combinaciones de la presente invención. La combinación de acuerdo con la presente invención se puede administrar en combinación con uno o más agentes farmacéuticos convencionales.

- 5 Estos agentes adicionales pueden incluir compuestos adicionales de acuerdo con la invención, o uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos.

10 El compuesto se puede administrar o coadministrar por vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomalmente, por medio de inhalación, por vía vaginal, intraocular, por medio de administración local (por ejemplo, por catéter o stent), por vía subcutánea, intraadiposa, intraarticular o intratecal. Más en particular, otras formas de administración incluyen, por ejemplo: inhalación, administración ocular, instilación nasal, administración parenteral, administración dérmica, administración transdérmica, administración bucal, administración rectal, administración sublingual, administración perilingual, administración nasal, administración tópica y administración oral..

15 Los compuestos de acuerdo con la presente invención también se pueden administrar o coadministrar, secuencial o simultáneamente, en formas farmacéuticas de liberación inmediata, liberación retardada o incluso de liberación lenta.

La ribavirina, GDC-0449, y opcionalmente la citarabina, de acuerdo con la presente invención, se administran secuencial o simultáneamente. La combinación de acuerdo con la presente invención se puede administrar por una variedad de rutas, y se puede administrar o coadministrar en cualquier forma farmacéutica convencional.

20 La combinación de acuerdo con la presente invención, está en una forma de dosificación unitaria. La coadministración en el contexto de la presente invención se define como la administración de más de un agente terapéutico en el transcurso de un tratamiento coordinado para lograr un mejor resultado clínico. Dicha coadministración también puede ser coextensiva, es decir, que se produzca durante períodos de tiempo que se superponen. Por ejemplo, el agente quimioterápico se puede administrar a un paciente antes, concomitantemente, o después de que se administre la ribavirina. En un modo de realización preferente, se puede tratar previamente al paciente con GDC-0449 y, a continuación, tratarlo con ribavirina.

25 Las cantidades de los agentes terapéuticos presentes en las combinaciones pueden variar, de acuerdo con las determinaciones realizadas por un experto en la técnica, pero preferentemente están en cantidades eficaces para crear un efecto citotóxico o citostático en el sitio deseado. Preferentemente, estas cantidades totales son menos que la cantidad total que resulta de sumar la dosis máxima tolerada para cada uno de Ara-C®, ribavirina y GDC-0449, y más preferentemente menos que la cantidad total que resulta de la suma para la administración individual de cada uno de estos inhibidores. En un modo de realización preferente, la cantidad del(de los) agente(s) terapéutico(s), es decir, ribavirina, GDC-0449 y, opcionalmente, Ara-C® se considera que está en una cantidad eficaz para tratar la indicación, es decir, la leucemia. Preferentemente, para la forma farmacéutica, los tiempos de liberación apropiados pueden variar, pero preferentemente deben durar de 1 hora a 6 meses y, lo más preferentemente, de 1 semana a 4 semanas. Las formulaciones que incluyen las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden variar, según lo determine una persona experta en la técnica, de acuerdo con la situación particular, y como se enseña en general en el presente documento.

30 En un modo de realización preferente, la ribavirina se administra en una cantidad entre 500 mg y 4400 mg al día, y más preferentemente, en el intervalo entre 1000 mg y 4400 mg al día. GDC-0449 se administra preferentemente a 3 nM durante 2 días antes del inicio del tratamiento con ribavirina. Ara-C® se administra preferentemente en una cantidad de hasta 100 mg/m². Esta administración puede durar preferentemente hasta 7 días cada 4 semanas, de manera repetitiva si es necesario. Preferentemente, Ara-C® se administra en una cantidad suficiente para reprimir la tumorigenicidad de las células. Más preferentemente, Ara-C® se administra en una dosis baja. A este respecto, una dosis baja de Ara-C® varía preferentemente de 5 mg/día a 20 mg dos veces al día.

También de acuerdo con un modo de realización de la presente invención, después del tratamiento con GDC-0449 y ribavirina, se puede tratar además al paciente con Ara-C® y diversos agentes antineoplásicos descritos anteriormente.

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, una cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 y, opcionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico tal como citarabina, para su uso en un procedimiento para tratar la leucemia.

El inhibidor de la vía de Hedgehog es GDC-0449, usando 3 nM, que, según se informó, eran las concentraciones plasmáticas de acuerdo con Roche.

40 Más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina y la cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 se administran simultánea o secuencialmente en líneas celulares resistentes.

La combinación puede ser para su uso en un procedimiento para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina y la cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 antes de iniciar la administración del agente quimioterápico. Preferentemente, la ribavirina y GDC-0449 se administran simultáneamente con el agente quimioterápico. También preferentemente, la ribavirina y GDC-0449 se administran secuencialmente con el agente quimioterápico.

La combinación puede ser para su uso en un procedimiento para tratar a pacientes que tienen una leucemia, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 en presencia de una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina en el que dicha politerapia revierte la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico o en pacientes con resistencia primaria.

Debido a los efectos sensibilizantes de la politerapia en las células a la muerte o senescencia de las células o a algún estado de ciclo celular permanente detenido, la dosificación de los agentes antineoplásicos usados para el tratamiento puede ser más baja que la usada en una pauta de tratamiento del cáncer convencional. Por tanto, se puede lograr un mejor resultado clínico usando las composiciones y procedimientos de la presente invención.

La presente invención proporciona:

- una politerapia para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen leucemia, que comprende ribavirina, GDC-0449 y un agente quimioterápico tal como citarabina, en la que dicha politerapia supera la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico;
- una politerapia para su uso en el tratamiento de la leucemia que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, una cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 con o sin una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico tal como citarabina;
- una politerapia para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen leucemia, que comprende ribavirina, GDC-0449 y el agente quimioterápico como la citarabina, en la que dicha politerapia supera la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico;
- una politerapia para su uso en el tratamiento de una leucemia, en la que dicho uso comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, una cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico tal como citarabina, en la que dicha politerapia supera la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico con tratamientos previos, con el tratamiento con ribavirina o *de novo*;
- una politerapia para su uso en el tratamiento de pacientes con leucemia, que comprende ribavirina, GDC-0449 y un agente quimioterápico tal como citarabina, en la que dicha politerapia minimiza o evita el crecimiento de células resistentes desarrolladas en pacientes durante el tratamiento antineoplásico; inhibición de la vía de Hedgehog para revertir la resistencia y/o disminuir la proliferación; y
- una politerapia para su uso en el tratamiento de una leucemia, en la que dicho uso comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, una cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0449 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico tal como citarabina, en la que dicha politerapia supera la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico con tratamientos previos, con el tratamiento con ribavirina o *de novo*.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención.

EJEMPLOS

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una politerapia para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen una leucemia, que comprende ribavirina, GDC-0449, y opcionalmente un agente quimioterápico tal como citarabina, en la que dicha politerapia supera la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico con tratamientos previos, con tratamiento con ribavirina o *de novo*.

El tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, como inhibidor del producto génico eIF4E; administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la vía de Hedgehog, que es GDC-0449; y opcionalmente administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de agente quimioterápico, que es el arabinósido de citarabina (Ara-C®).

Los pacientes pueden recibir al menos entre 500 mg/día y 4400 mg/día de ribavirina y al menos entre 50 mg/m² y 150 mg/m² de citarabina. Más preferentemente, a un paciente se le puede administrar al menos entre 1000 y 2800 mg/día de ribavirina y hasta 100 mg/m² de citarabina. Incluso en un modo de realización más preferente, el inhibidor de eIF4E se administra en una cantidad entre 1000 y 4400 mg al día y el arabinósido de citarabina (Ara-C®) se administra en una cantidad de 10 mg/día a 20 mg dos veces al día.

Los efectos del tratamiento los fármacos solos o en combinación, para muestras de LMA, se divulgan anteriormente en el presente documento, así como en la figura 1. El producto génico eIF4E está sustancialmente regulado or incremento y forma cuerpos nucleares grandes de forma anómala en un subconjunto de muestras primarias de LMA (subtipo FAB M4/M5) y de LMC con crisis hemoblástica (fig. 1).

- 5 Además, la exportación por ARNm dependiente de eIF4E de dianas tales como la ciclina D1 está sustancialmente regulada por incremento, dando lugar a concentraciones de proteína incrementadas para estas dianas y la proliferación subsiguiente.

ENSAYO DE FASE II DE MONOTERAPIA CON RIBAVIRINA EN PACIENTES DE LMA CON PRONÓSTICO DESFAVORABLE

- 10 El tratamiento con ribavirina se dirigió a la actividad del producto génico eIF4E en pacientes con LMA M4/M5 recidivada/refractaria o a los que se consideró incapaces de someterse a quimioterapia estándar.

En términos de respuesta clínica, se observaron 1 RC (remisión completa), 2 RP (remisión parcial), 3 RH (respuesta hemoblástica), 6 EE (enfermedad estable), 3EP (enfermedad progresiva) en 15 pacientes evaluables. No se observó toxicidad relacionada con el fármaco en ninguno de los pacientes. Los análisis moleculares indicaron que el tratamiento con ribavirina se dirigía a la actividad del producto génico eIF4E y esto se correlacionaba con la respuesta. Por ejemplo, la actividad de exportación por el ARNm del producto génico eIF4E se vigiló directamente y se demostró que, después de 28 días de ribavirina oral, se redujo sustancialmente. Se observó una respuesta molecular bifásica, en la que inicialmente el producto génico eIF4E se redistribuyó espectacularmente al citoplasma en los pacientes que respondieron. Esto fue seguido de una caída en los niveles de ARN y las concentraciones de proteínas de eIF4E (hasta un ciclo de 28 días). Esto respalda de manera concluyente que la ribavirina se dirige directamente a la actividad del producto génico eIF4E en pacientes y esto se correlacionaba con el beneficio clínico. Sin embargo, todos los pacientes que respondieron se volvieron finalmente resistentes a la ribavirina.

ENSAYO DE FASE I CON RIBAVIRINA Y ARA-C® EN DOSIS BAJA EN LA LMA CON PRONÓSTICO DESFAVORABLE

- 25 El ensayo de fase I se llevó a cabo para establecer la seguridad de una combinación de ribavirina oral y Ara-C® en dosis bajas subcutáneas en la misma población de pacientes. Estos compuestos cooperaron en ensayos de crecimiento de colonias de muestras primarias. Ara-C® se mantuvo constante (excepto en caso de toxicidad) y las dosis de ribavirina se elevaron en un diseño de ensayo 3+3 para el grupo de fase I. En el primer nivel de dosis, se observó que las concentraciones plasmáticas de ribavirina eran sustancialmente más bajas que las observados en el ensayo de la monoterapia. Como se conoce por la técnica anterior, otros compuestos orales también veían reducida su absorción por Ara-C® subcutáneo, incluyendo la digoxina.

En el ensayo de la monoterapia con 2000 mg/día de ribavirina, se alcanzaron concentraciones plasmáticas de ribavirina de alrededor de 20-30 µM (determinadas por espectrometría de masas), que correspondieron a un intervalo terapéutico, mientras que en el ensayo de la combinación las concentraciones plasmáticas de ribavirina variaron de solo 4-10 µM. En el ensayo de la monoterapia con 2800 mg/día, se alcanzaron concentraciones plasmáticas de ribavirina 20 µM.

- En el ensayo de combinación de fase I, 5 pacientes alcanzaron concentraciones plasmáticas de ribavirina de 20 µM o más altas. De estos, se ha observado una respuesta molecular completa para RC, RH, EE y ninguna para las 2 EP, lo que indica que las concentraciones de ribavirina fueron suficientes para afectar a la localización y las concentraciones del producto génico eIF4E. La RC tenía LMA secundaria debido a un tratamiento de un cáncer de mama y tenía algunas toxicidades debidas a Ara-C®, y, por tanto, las concentraciones de Ara-C® se redujeron a 10 mg/día. Esto se correlacionó con una casi duplicación de las concentraciones plasmáticas de ribavirina y la consecución de una RC. Después de 6 ciclos, Ara-C® se suspendió y el paciente permanece en CR con ribavirina sola durante los últimos doce ciclos (un total de 18 ciclos).

45 HETEROGENEIDAD EN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES

Se observó que los pacientes de ambos ensayos que tuvieron una respuesta molecular completa a la ribavirina (disminución de las concentraciones de eIF4E después de una relocalización inicial del producto génico eIF4E) lograron RC, RP, RH o EE (pero NO EP). Esta heterogeneidad sugiere que eIF4E es más importante para influir en la leucemia de los pacientes que responden mejor que otros. Esto es consecuente con la teoría de que toda la población de células leucémicas no ha acoplado su supervivencia a las mismas vías de señalización. Cabría esperar que los pacientes con un mayor número de células leucémicas dependientes de eIF4E respondieran mejor. Existe la clara posibilidad de que se necesiten otras vías para cooperar con el producto génico eIF4E para transformar las células y la naturaleza de estas vías puede ser heterogénea y afectar de manera diferente a la respuesta de la ribavirina. La vía de Sonic Hedgehog es una de esas vías.

- 55 También se observó que no había correlación entre el estado y la respuesta de Flt3 o NPM. De forma alternativa o además, algunos pacientes (que en su mayoría habían recibido varios tratamientos con anterioridad) pueden estar a borde la resistencia cuando entran en el ensayo y ese tratamiento con ribavirina da lugar a una selección final de

una población resistente en términos del transportador de nucleósidos ENT1, usado tanto por la ribavirina como por Ara-C®.

HETEROGENEIDAD CON LA RIBAVIRINA

5 Para comprender la heterogeneidad en la respuesta clínica, es fundamental estudiar muestras de pacientes para vigilar los cambios en la expresión génica como función del tratamiento, la respuesta y la resistencia.

Se exploró la heterogeneidad en la respuesta y la resistencia en muestras de pacientes. El perfil de expresión génica de una variedad de muestras de pacientes se examinó mediante una secuenciación profunda para evaluar las diferencias antes del tratamiento, durante la respuesta y en la recidiva, así como para comparar los pacientes con respuesta con los que pacientes sin respuesta.

10 Se examinaron los factores que contribuyen a la resistencia en las líneas celulares resistentes y los candidatos de estos estudios se vigilaron en muestras de pacientes. Dichos marcadores deberían ayudar a pronosticar qué pacientes tienen más/menos probabilidades de beneficiarse del tratamiento con ribavirina. El análisis de secuenciación profunda reveló que Gli-1, el factor de transcripción de Sonic Hedgehog, estaba muy elevado en líneas celulares que tenían una absorción normal de ribavirina, pero no tenía respuesta a la ribavirina en términos de crecimiento o actividad del producto génico eIF4E. De hecho, en estas células, la interacción ribavirina-eIF4E se perdió a pesar del hecho de que el producto génico eIF4E no estaba mutado.

LA RESISTENCIA A LA RIBAVIRINA SE CORRELACIONA CON LA PÉRDIDA DEL DIRECCIONAMIENTO A EIF4E

20 Se evaluó si la ribavirina se sigue dirigiendo todavía a la actividad de eIF4E en células resistentes (figura 4). Las concentraciones de proteína de dianas bien establecidas de la exportación y traducción por el ARNm de eIF4E, incluidas la ciclina D1 y el VEGF, se vigilaron como función del tratamiento con ribavirina. En las líneas celulares originales, el tratamiento con ribavirina reduce las concentraciones de estas proteínas, mientras que en las líneas celulares resistentes, el tratamiento con ribavirina ya no las afecta. No hubo cambios en las concentraciones totales de eIF4E entre líneas celulares resistentes y originales, como se observó en otros sistemas de líneas celulares.

25 Se determinó si ¹⁴C-ribavirina podía inmunoprecipitarse con eIF4E en las líneas celulares resistentes F10R y F100R. Caber señalar que el marcador ¹⁴C o ³H está en la posición 5 del anillo de triazol, es decir, el resto activo de ribavirina. En las líneas celulares originales, la ribavirina ¹⁴C está enriquecida en la fracción inmunoprecipitada de eIF4E en aproximadamente 20 veces con respecto al control de IgG, mientras que la ribavirina ¹⁴C no se inmunoprecipita con eIF4E en las líneas celulares F10R o F100R (figura 4). El análisis de secuenciación indicó que no había mutaciones en la región codificante de eIF4E en células F10R y F100R.

DEFECTOS EN LA ABSORCIÓN Y EL METABOLISMO DE LA RIBAVIRINA

35 Se examinó la absorción de ³H-ribavirina como un mecanismo potencial para la resistencia a la ribavirina (figura 5). Estudios previos indican que la absorción máxima es alrededor de 8-10 horas después del tratamiento con ribavirina. Se vigiló la absorción de las 0 a 16 horas con diferentes concentraciones de ribavirina. Las células FaDu y THP1 originales mostraron perfiles de absorción similares a aquellos de los que se informó previamente. Las líneas celulares F100R, T10R y T20R mostraron defectos graves en la absorción de ribavirina. De forma interesante, las células F10R, aunque con resistencia a la ribavirina, tenían una absorción que no se podía distinguir de la observada con las células FaDu originales. Por tanto, hay, al menos, dos formas principales de resistencia a la ribavirina, el tipo I, que tiene un defecto en la absorción neta, y el tipo II que se caracteriza por la absorción normal pero una pérdida de la interacción de la ribavirina con eIF4E.

45 La ribavirina es absorbida por todas las células por medio del transportador de nucleósidos en equilibrio ENT1 y, una vez en la célula, se fosforila a monofosfato de ribavirina usando la adenosina cinasa (ADK). La fosforilación posterior a su metabolito activo, el trifosfato de ribavirina (RTP), se produce por medio de una amplia variedad de cinasas celulares. Los procedimientos de PCR cuantitativa sincronizada (RT-qPCR) y los análisis de inmunoelectrotransferencia revelaron que ADK y ENT1 estaban alterados en las células THP resistentes, pero solo ADK estaba alterado en las células F100R. En las células F100R, los niveles de ARN de ADK se reducen 30 veces según lo evaluado por RT-qPCR mientras que los niveles de ARN de ENT1 no se modifican. A nivel de proteína, las concentraciones de proteína ADK se reducen sustancialmente con respecto a las células originales, lo que indica que ADK se reduce a nivel de transcrito, mientras que ENT1 se regula por disminución de manera postranscripcional. En las células THP1, donde ADK estaba regulado por disminución a nivel de transcrito, mientras que ENT1 se reduce de manera postranscripcional en células resistentes a THP1, con la excepción de las células T2x20R. Las células T2x20R y F100R tienen niveles normales de proteína y de ARN de ENT1 (en comparación con las líneas celulares originales) pero tienen niveles muy bajos de ARN de ADK y proteína. Los defectos de ADK solo son suficientes para reducir la absorción neta de ribavirina porque la ribavirina no fosforilada se puede exportar fácilmente.

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE SONIC HEDGEHOG GLI1 SUBYACE A LA RESISTENCIA DE TIPO II

Las células F10R no tenían defectos en la absorción de ribavirina y tenían niveles normales de ARN de ADK y ENT1 y las proteínas La ribavirina no se asoció con eIF4E en estas células, ni la actividad de eIF4E diana. (Fig. 6) Para determinar los fundamentos moleculares de esta forma de resistencia, se usó la secuenciación profunda para comparar los niveles de transcritos de F10R con los de las células F100R y con las células FaDu originales de paso

5

La comparación cruzada de F10R frente a todos los otros grupos indicó que menos de 30 transcritos fueron diferentes usando un valor de corte p_{adj} de 0,01. (Tabla 1). La diferencia estadísticamente más significativa fue la proteína asociada al glioma, Gli-1, que estaba elevada 20 veces en las células F10R en comparación con las demás. Se demostró que Gli-1 estaba elevada en los niveles de ARN y proteína en las células F10R usando PCR sincronizada y análisis por inmunoelectrotransferencia (figura 7). La elevación de Gli-1, el factor de transcripción posterior para la señalización por medio de la vía de Sonic Hedgehog, se asocia con la estimulación de la proliferación y la resistencia en otros sistemas. El mecanismo para esta última se atribuye normalmente a la capacidad proliferativa de esta vía de señalización.

10

Tabla 1. Niveles de ARNm de Gli-1 con respecto a múltiples voluntarios sanos

N.º paciente	de Respuesta	Antes	Durante la respuesta	Recidiva/FdT
17	RH	20	5,8	26
10	RH	1,3	1,6	3,6
6	RH	2,0	n/a	15
8	PR	n/a	0,1	2,0
11	RC	n/a	0,5	1,5
18	DE	6,4	2,7*20 % de caída en hemoblastos	n/a
13	DE	1,4	2,6* hemoblastos elevados pero aún EE	5,3
3	DE	7	12* los hemoblastos permanecían iguales	23
9	EP	800	---	n/a
19	EP	19	---	36

15 Resultados preliminares del ensayo de monoterapia para pacientes que terminaron un ciclo.

Se examinó si la sobreexpresión de Gli-1 sola era suficiente para conferir resistencia a la ribavirina en células FaDu. Las células con sobreexpresión de Gli-1 prácticamente no se vieron afectadas por la adición de ribavirina 20 μ M (un 95 % de las células que sobreexpresaban Gli-1 no tratadas) a diferencia de las células originales donde el tratamiento con ribavirina 20 μ M redujo el número de células en un 50 %. (Fig. 6). Los experimentos de atenuación génica de Gli-1 se realizaron en paralelo. Tras el tratamiento con ribavirina 20 μ M, el crecimiento de las células F10R tratadas con luciferasa de ARNip no se vio afectado. Por el contrario, la atenuación génica mediada por RNAi de Gli-1 vuelve a sensibilizar las células F10R a la ribavirina, con un número de células que es aproximadamente un 50 % de estas mismas células sin ribavirina. La atenuación medicada por el ARNip de Gli-1 sola no tuvo ningún efecto sobre el número de células para las células F10R no tratadas con respecto a los ARNip de control, lo que indica que estos efectos se debieron a ambos tratamientos (siGli + ribavirina) y no a los efectos de Gli-1 sola. El análisis por inmunoelectrotransferencia confirmó la sobreexpresión o atenuación de Gli-1. Además, las concentraciones de eIF4E no se alteraron en estas condiciones.

20

25

Se ha desarrollado una variedad de inhibidores de la vía de Sonic Hedgehog que se han usado con éxito para dirigirse a Smoothed, el receptor extracelular para la señalización de Sonic Hedgehog. Uno de estos, GDC-0449, se ha usado en ensayos clínicos para una variedad de neoplasias malignas. Para determinar si la resistencia de tipo II a la ribavirina era sensible a la intervención farmacológica, se evaluó la capacidad de GDC-0449 para revertir la resistencia en células F10R (figura 7). Se pretrataron células FaDu originales o células F10R con GDC-0449 3 nM o

30

se trataron de forma simulada y, después de 48 horas, se trataron de forma simulada o se trataron con ribavirina 10 μ M. En las células originales, ribavirina 10 μ M durante 96 horas dio lugar a una disminución del número de células en aproximadamente un 50 %, mientras que ribavirina 10 μ M no afectó al crecimiento de las células F10R con respecto a las células F10R no tratadas. Sorprendentemente, la combinación de ribavirina y células GDC-0449 dio lugar a una caída de un 40 % en el número de células con respecto a los otros tratamientos o controles no tratados en células F10R. Aunque esta no es la caída total de un 50 % observada en las células originales tratadas con ribavirina, indica claramente que la adición de GDC-0449 a la ribavirina vuelve a sensibilizar las células a la ribavirina. Esto es paralelo al experimento de atenuación de Gli-1 descrito anteriormente. A diferencia de las células originales, esta combinación no redujo el número de células por debajo de las células tratadas solo con ribavirina. Además, GDC-0449 solo dio lugar a una reducción de un 25 % en el crecimiento de las células originales, mientras que GDC-0449 solo no afectó a las células F10R. Finalmente, GDC-0449 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de células F100R resistentes de tipo 1, que no tienen Gli-1 elevada. Tomados en conjunto con los resultados anteriores, estos estudios sugieren claramente que la resistencia de tipo II a la ribavirina se puede revertir, al menos en gran parte, mediante la inhibición de la vía de Sonic Hedgehog. Además, las células F10R han desarrollado una codependencia de las vías de Gli-1 y eIF4E como se observa por la necesidad tanto de ribavirina como de GDC-0449 de reducir el crecimiento. De acuerdo con la presente invención, la atenuación de Gli-1 no afectó el crecimiento de las células F10R sola, pero sí lo hizo en combinación con ribavirina.

Se observó que la vía del metabolismo del fármaco de la fase II en forma de la vía de glucuronidación de UGT estaba altamente elevada en las células F10R, lo que sugiere claramente que la ribavirina está siendo glucuronidada en estas células como una novedosa forma de resistencia. El inhibidor de molécula pequeña de la vía de Sonic Hedgehog, GDC-0049, revierte la resistencia a la ribavirina. Fortaleciendo la relación entre Gli-1 y la resistencia está el hecho de que la atenuación génica de Gli-1 también revierte la resistencia y la sobreexpresión de Gli-1 en células sensibles a la ribavirina confiere resistencia.

Los niveles de ARNm de Gli-1 se vigilaron en pacientes antes, durante y después de la respuesta en pacientes que recibieron monoterapia con ribavirina. Hasta la fecha, los pacientes que no respondieron antes del tratamiento tenían concentraciones de ribavirina elevadas en más de 20 veces. Estas concentraciones no se redujeron durante el tratamiento con ribavirina; de hecho, en un caso en el que hay datos disponibles, las concentraciones de Gli-1 casi se duplicaron. Para los pacientes que respondieron, en todos los casos, los niveles de ARNm de Gli-1 fueron más altos en resistencia que durante la respuesta. En algunos casos, las concentraciones de ribavirina comenzaron altas en la muestra antes del tratamiento y a continuación se redujeron (por ejemplo, el paciente 17 tenía 20X ARNm de Gli antes del tratamiento, 5,8 durante la respuesta hemoblástica y 26X en la recidiva), mientras que en otros casos, los niveles de ARNm de Gli-1 empezaron bajos y a continuación se elevaron en la recidiva (por ejemplo, el paciente 10 tenía 1,3x ARNm de Gli-1 antes del tratamiento con respecto a lo normal, 1,6x durante la respuesta y 3,6x en la recidiva).

RESISTENCIA A LA RIBAVIRINA

Alteraciones en el proteoma y la expresión génica de líneas celulares resistentes como función del tratamiento con ribavirina

Se llevó a cabo una secuenciación profunda en células 10R durante el tratamiento con ribavirina a fin de controlar cambios inducibles y compararlos con cambios en las líneas celulares originales. Toda la secuenciación profunda en células resistentes se realiza en ausencia de ribavirina. La adición de ribavirina no alteró las concentraciones de ENT1, ADK o Gli-1.

Se estudiaron fármacos aprobados para determinar las modalidades para superar la resistencia o la aparición de nuevas sensibilidades que se producen tras la aparición de resistencia como se observa para otros fármacos. También se estudió si la resistencia adquirida era reversible. Después de 6 meses de crecimiento de células resistentes en ausencia de ribavirina, estas células conservaron su resistencia, lo que sugiere que haya cambios genéticos subyacentes.

Los fundamentos moleculares de la resistencia primaria y adquirida a la ribavirina se evaluaron mediante dos estrategias:

- generar líneas celulares resistentes; y
- analizar muestras de pacientes para la expresión de genes implicados en el metabolismo de la ribavirina.

Se ha observado que los pacientes que solo lograron EP en cualquiera de los ensayos no tuvieron una respuesta molecular. Por tanto, se consideró la posibilidad de que los pacientes sin respuesta molecular tuvieran problemas con la absorción o el metabolismo de la ribavirina, o surgiera resistencia debido a una Gli-1 elevada.

El solicitante estudió múltiples líneas celulares resistentes a la ribavirina. Las líneas celulares resistentes se generaron aumentando lentamente las concentraciones de ribavirina o mediante cultivo a concentraciones constantes de ribavirina en dosis clínicamente alcanzables. Durante el estudio, no se observaron mutaciones en el producto génico eIF4E en líneas celulares y están en el proceso de secuenciación del producto génico eIF4E en

muestras de pacientes. No se observaron concentraciones de producto génico eIF4E reducidas/elevadas como función de la resistencia en líneas celulares siquiera después del cultivo en ribavirina durante más de 200 días. En todas las líneas celulares resistentes estudiadas, se observó una pérdida de inhibición del crecimiento mediada por ribavirina y una pérdida de respuesta de dianas de eIF4E a ribavirina. De forma consecuente, el producto génico eIF4E ya no puede inmunoprecipitar ³H ribavirina en células resistentes, a diferencia de los controles.

Se usaron un enfoque de candidatos y una secuenciación profunda para caracterizar líneas celulares resistentes a la ribavirina. En dos de las líneas celulares cultivadas en ribavirina 100 μ M o 20 μ M (100R y 20R), las células tenían una alteración grave de la absorción neta de ³H-ribavirina. Los niveles de ARN de adenosina cinasa (ADK) se redujeron 40 veces en las células 100R y tanto ADK como ENT1 se redujeron de manera similar en las células 20R. ADK fosforila la ribavirina para producir monofosfato de ribavirina (RMP) como la primera etapa para formar su metabolito activo RTP. La ribavirina solo se exporta a través del transportador de nucleósidos ENT1 cuando no está fosforilada. Por tanto, la reducción de ADK aumenta la mezcla de ribavirina exportable. El solicitante observó que las células 10R no mostraron diferencias en ADK o ENT1 con respecto a las células originales ni tenían una alteración de la absorción neta de ribavirina-IP de ³H ribavirina. Los estudios de crecimiento y el seguimiento de las dianas del producto génico eIF4E indican que las células 10R son resistentes a los efectos de la ribavirina.

Se evaluaron los cambios en la expresión génica usando secuenciación profunda. Los estudios realizados revelan un aumento drástico de los niveles de ARN de Gli-1 (17X) y PDEA2 (22X), habiéndose relacionado ambos con el establecimiento de resistencia en células F10R. Por tanto, las células F10R pueden haber sufrido un nuevo cableado genético y es probable que hayan perdido su adicción a eIF4E. El solicitante ha observado, en vista de los estudios realizados, que la resistencia a la ribavirina puede surgir debido a múltiples mecanismos. Se evaluó si estos mecanismos eran pertinentes o no en pacientes del ensayo de la monoterapia. El paciente 11 (RC), mostró una reducción en 20 veces de ENT1 y una reducción en 5 veces de los niveles de ARN de ADK en la recidiva con respecto a durante la respuesta (después de 9 ciclos de tratamiento) (véase la figura 2). Concentraciones de Gli-1 cambiadas (véase la tabla).

CT es el número de ciclos de 28 días de ribavirina; lo normal se deriva de las células CD34+ normales de la médula ósea. Los resultados de RT-qPCR se normalizan frente a múltiples genes para garantizar que no se produzcan cambios en los normalizados como se describe. No había más ARN antes del tratamiento disponible para el paciente 11, pero estaba respondiendo en los ciclos 3 y 4 y se produjo una recidiva clínica y molecular en el ciclo 9.

En una EP, se observaron concentraciones de ADK 5 veces más bajas antes del tratamiento en comparación con los controles normales, pero tenía concentraciones normales de ENT1. El paciente 10 (RH, LMA secundaria a cáncer de mama) tuvo una reducción en 3 veces de las concentraciones de ENT1 y un aumento concomitante en 17 veces de MDR1 en la recidiva a los cuatro ciclos. En otros pacientes, ninguno de estos factores explicó la resistencia primaria o la aparición de resistencia adquirida subyacente a la importancia de los estudios en células F10R y análisis de muestras de más pacientes. Claramente, en el fondo heterogéneo de estos pacientes, la resistencia surge a través de múltiples medios.

No se observó competencia por la absorción de ribavirina y Ara-C® en muestras de pacientes o líneas celulares. Tanto Ara-C® como ribavirina son absorbidos por casi todos los tipos de células que usan el transportador ENT1 y los problemas de absorción oral se han identificado en la fase I del ensayo y se ha examinado la absorción de ribavirina y Ara-C®. Usando ribavirina y ³H-Ara-C®, no se observó competencia en términos de absorción de ninguno de los fármacos en concentraciones clínicamente relevantes (y más altas) en muestras de pacientes o líneas celulares.

LAS ENZIMAS DE GLUCURONIDACIÓN ESTÁN ELEVADAS EN CÉLULAS RESISTENTES DEL TIPO II

Un estudio de secuenciación profunda también reveló un cambio sorprendente en las enzimas en la vía de glucuronidación en las células F10R. La familia de enzimas UDP glucuronosiltransferasa de tipo 1A (UGT1A) desempeña un papel clave en la desintoxicación de fase II y el metabolismo de los fármacos. Aunque estas actividades se consideraron inicialmente limitadas al hígado, ahora se sabe que la mayoría de los tipos celulares tienen actividad UGT. Sorprendentemente, hubo una disminución en 14 veces en los niveles de ARN de casi toda la familia de enzimas UGT1A, incluidas A1, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 y A10 (valores p_{adj} de 5×10^{-8} a 1×10^{-9}). Esta disminución se confirmó mediante qRT-PCR en células F10R. Téngase en cuenta que el ARN de UGT1A2 no se detectó en ninguna de las líneas celulares examinadas, incluidas las células originales. Es importante destacar que no se observaron cambios en la clase UGT2 de estas enzimas. Las enzimas UGT1A se transcriben desde un locus génico común a través de un mecanismo de intercambio de exones y, por tanto, tienen un extremo carboxílico común, y todas tienen aproximadamente el mismo peso molecular. Por tanto, se usó un anticuerpo que reconoce la familia UGT1A para evaluar las concentraciones de proteína (figura 8). En contraste directo con los niveles de ARN, las concentraciones de proteína de la familia UGT1A estaban altamente elevadas (3-4 veces) en las células F10R con respecto a las líneas celulares originales o F100Rs. Esto es prueba de un complejo mecanismo regulador que rige la vía de UGT en las células F10R.

Se examinó si existía un vínculo entre la elevación de Gli-1 y el aumento de la expresión de proteínas de UGT. Las células FaDu originales que sobreexpresan Gli-1 tenían concentraciones más altas de UGT con respecto a los

controles vectoriales. La atenuación de Gli-1 mediada por RNAi dio lugar a una reducción sustancial (más de 10 veces) de las concentraciones de proteína UGT1A en comparación con la atenuación del ARN de luciferasa y los controles no tratados. De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con GDC-0449 dio lugar a una disminución similar en las concentraciones de UGT1A. Tomados conjuntamente, estos resultados proporcionan un fuerte vínculo entre las concentraciones de Gli-1 y la expresión de proteínas de UGT. Los controles confirmaron esa sobreexpresión o reducción de Gli-1 en las células con atenuación génica. Además, ninguno de estos tratamientos moduló las concentraciones de eIF4E. La expresión de la proteína UGT1A se correlaciona estrechamente con su actividad enzimática. Por tanto, se planteó la hipótesis de que la actividad de glucuronidación, al menos para algunos sustratos, estaba elevada en las células F10R con respecto a los controles originales.

LA GLUCURONIDACIÓN DE RIBAVIRINA SE ELEVA EN CÉLULAS RESISTENTES Y ALTERA LA INTERACCIÓN CON EIF4E

La familia UGT1A cataliza la adición de UDP-ácido glucurónico (UDPGA) a una gran cantidad de sustratos, incluyendo los triazoles, la misma clase química que la ribavirina. Es importante destacar que diferentes enzimas UGT tienen diferentes especificidades diana y, por lo tanto, los sustratos se pueden glucuronidar en un tejido y tipo celular de una manera específica. Se vigiló si había glucuronidación diferencial de ribavirina en células FaDu frente a células F10R. Usando lisados celulares/microsomales, se monitorizó la glucuronidación de ¹⁴C-UDPGA y ribavirina usando cromatografía de capa fina. También se llevó a cabo el experimento inverso con UDPGA sin marcar y ¹⁴C-ribavirina. Como control positivo, se monitorizó la glucuronidación de benzo(a)pireno, una diana común de esta vía que es uno de los principales carcinógenos en el humo de los cigarrillos.

Se planteó la hipótesis de que la glucuronidación de ribavirina altera su asociación con eIF4E. Se vigiló la capacidad de eIF4E para inmunoprecipitar con ¹⁴C-ribavirina en condiciones que variaban en la actividad de Gli-1 y UGT para determinar si la reversión de resistencia se correlacionaba con la reasociación de ribavirina con eIF4E. Se trataron células durante 24 horas con ¹⁴C-ribavirina seguido de reticulación e inmunoprecipitación, y se evaluaron con respecto a controles de IgG. Esto demostró que en las células F10R, eIF4E no se inmunoprecipitó con ribavirina mientras que lo hizo en las células originales.

El tratamiento con GDC-0449 o la atenuación génica de Gli-1 en células F10R dio lugar a un aumento en la unión de ribavirina a eIF4E, que se correlacionó con la disminución de las concentraciones de UGT. En las células originales que sobreexpresan Gli-1, hubo una pérdida en la asociación de ribavirina a eIF4E. Esto indica una correlación entre una actividad más baja de Gli-1, concentraciones más bajas de UGT y la capacidad de eIF4E para asociarse con ribavirina no modificada y resistencia.

ELEVACIÓN DE GLI-1 EN MUESTRAS CLÍNICAS DEL ENSAYO DE MONOTERAPIA DE RIBAVIRINA EN LA LMA

Las características moleculares identificadas en los estudios actuales se examinaron para determinar si eran pertinentes para muestras de pacientes que recibieron monoterapia con ribavirina en el ensayo de fase II multicéntrico de la LMA. Para los pacientes que respondieron, se vigilaron todas las muestras disponibles antes del tratamiento, durante la respuesta clínica, tras la aparición de recidiva y, en los pacientes que no respondieron, cuando fue posible. Se examinaron un total de diez muestras, incluidas las de pacientes que se incluyeron en el ensayo de monoterapia. Los resultados del ensayo, cuando se cerró, fueron 1 RC, 2 RP, 3 RH, 6 EE, 3 EP con 15 pacientes evaluables (Clinicaltrials.gov). De estos, estuvieron disponibles muestras de 10 pacientes para la evaluación de la respuesta molecular. Los resultados de las pruebas llevadas a cabo sugieren que se observa resistencia de tipo II en muchos de estos pacientes. Los niveles de ARNm de Gli-1 se vigilaron usando qRT-PCR. De los 6 pacientes que respondieron que tenían muestras en recidiva, todos mostraron niveles elevados de ARNm de Gli-1, hasta 26 veces, tras resistencia con respecto a los controles normales o sus niveles durante la respuesta. Algunos pacientes tienen una concentración elevada de Gli-1 antes de la monoterapia con ribavirina, que cae durante la respuesta y reaparecer al perderla. Para los dos pacientes examinados que no respondieron (EP), ambos tenían concentraciones de Gli-1 muy elevadas antes del tratamiento (19 y 800 veces), que no se redujeron después de 28 días de ribavirina. Tomados conjuntamente, parece que la Gli-1 elevada se asocia con resistencia primaria y adquirida en pacientes en el ensayo de monoterapia con ribavirina. (Véase la tabla anterior).

En términos de resistencia de tipo I, se observó que un paciente sin respuesta (paciente 9) tenía concentraciones de ADK cinco veces más bajas que las muestras de voluntarios sanos antes del tratamiento. En el paciente que logró una RC (paciente 11), se observó que, durante la respuesta, los niveles de ARN de ENT1 y ADK cayeron 15 y 5 veces, respectivamente, tras la recidiva con respecto a la respuesta. Por tanto, existen pruebas de que la resistencia de tipo I desempeña un papel en los pacientes. Sin embargo, los pacientes restantes no tenían niveles más bajos de ARN de ADK o alteraciones marcadas en ENT (a nivel de ARN). Estos resultados sugieren que la resistencia de tipo I también puede contribuir a la resistencia primaria y adquirida en al menos algunos pacientes. Además, el paciente 11 tenía concentraciones de ADK más bajas y concentraciones de Gli-1 altamente elevadas, lo que sugiere que estas formas de resistencia pueden surgir conjuntamente.

A diferencia de la resistencia de tipo I, el tipo II se caracteriza por un defecto en la absorción de ribavirina, pero por una pérdida de la interacción eIF4E-ribavirina que se correlaciona con la elevación del ARNm de Gli-1 y las

concentraciones de proteína. Sorprendentemente, la sobreexpresión de Gli-1 sola fue suficiente para hacer que las células originales fueran resistentes a la ribavirina y fue suficiente para anular la interacción eIF4E-ribavirina. Por el contrario, la inhibición farmacológica usando GDC-0049 o la atenuación génica de Gli-1 revierten la resistencia a la ribavirina en las células F10R y esto se correlaciona con un restablecimiento de la interacción eIF4E-ribavirina. Es importante destacar que la resistencia primaria y adquirida en las diez muestras de pacientes examinadas indicó que las concentraciones de Gli-1 eran altas antes del tratamiento y/o se elevaron en el momento de la aparición de resistencia, lo que sugiere que dirigirse a Gli-1 con GDC0049 o fármacos relacionados en pacientes podría ayudar a superar la resistencia primaria y quizá prolongar las respuestas clínicas.

Los estudios con carcinógenos químicos relacionan la disminución de las concentraciones de UGT1A con un incremento de la carcinogénesis debido a la pérdida de esta importante vía de desintoxicación. Los síndromes de Gilbert y Crigler-Najjar, enfermedades genéticas caracterizadas por la mutación de UGT1A1, dan lugar a una disminución de la glucuronidación de la bilirrubina y una intensidad variable de la toxicidad asociada. Los autores de la presente invención han determinado que el aumento de la actividad de UGT1A muestra una correlación con la resistencia farmacológica. De esta manera, la célula cancerosa puede subvertir los procesos normales de desintoxicación a fin de modificar el fármaco y volverse resistente. Los autores de la presente invención han identificado un fármaco, GDC-0449, que puede modular la glucuronidación, aunque de manera indirecta.

Normalmente se considera que la resistencia farmacológica se produce por uno de dos mecanismos. En primer lugar, como se observa en la resistencia de tipo I, hay una pérdida o mutación de transportadores de fármacos pertinentes o en las enzimas que convierten los profármacos en sus formas activas. De forma alternativa, hay mutación/modificación de la diana/vía de la proteína. Sin embargo, no se observó mutación en el gen eIF4E en las líneas celulares estudiadas. Por el contrario, el tratamiento con Gleevec® o ATRA puede dar lugar a mutaciones en las proteínas de fusión Bcr-Abl y PML-RARA, respectivamente, que favorecen la resistencia. Si bien no se requieren ni Bcr-Abl ni PML-RARA para la supervivencia de las células normales, eIF4E es esencial en levaduras, su atenuación es letal. Por tanto, es probable que los mecanismos estocásticos que impulsan la resistencia por medio de mutación en el sitio de unión a cap de eIF4E terminen con poblaciones de células de crecimiento lento o moribundas y, por tanto, otras formas de células resistentes puedan competir fácilmente con ellas. De esta manera, los mecanismos resistentes dirigidos a proteínas que se requieren para la supervivencia celular pueden ser distintos de aquellos dirigidos a proteínas que son prescindibles para una función celular normal. En estas situaciones, la resistencia puede estar impulsada por la modificación química del fármaco en lugar de solo por la mutación o modificación de la proteína diana.

La secuenciación profunda revela que las células también se han vuelto más cancerosas ante la resistencia a la ribavirina, y las concentraciones de las dianas de eIF4E, como el VEGF, se elevan incluso después del tratamiento con ribavirina.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende ribavirina, GDC-0449 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un procedimiento para tratar la leucemia.
2. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además citarabina.
- 5 3. La combinación para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el procedimiento comprende administrar ribavirina en una cantidad que varía de 500 mg a 4400 mg al día.
4. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el procedimiento comprende coadministrar secuencial o simultáneamente ribavirina y GDC-0449, opcionalmente antes de administrar citarabina.
- 10 5. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el procedimiento comprende administrar simultánea o secuencialmente GDC-0449 y la citarabina.
6. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el procedimiento comprende administrar la citarabina en una dosis que varía de 5 mg al día a 20 mg dos veces al día, o de 10 mg al día a 20 mg dos veces al día.
- 15 7. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el procedimiento comprende administrar citarabina en una cantidad de 50 mg/m² a 150 mg/m² al día, preferentemente hasta 100 mg/m² al día, durante hasta 7 días cada 4 semanas.
- 20 8. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la leucemia se selecciona del grupo que consiste en: leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, síndromes mielodisplásicos y, preferentemente, en la que la leucemia mielógena aguda se selecciona del grupo que consiste en: leucemia mielógena aguda M4, leucemia mielógena aguda M5 y subtipos de LMA **caracterizados por** una elevación atípica producto génico elF4E.
- 25 9. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha combinación es:
 - (a) adecuada para inhalación, administración ocular, instilación nasal, administración parenteral, administración dérmica, administración transdérmica, administración bucal, administración rectal, administración sublingual, administración perilingual, administración nasal, administración tópica y administración oral; y/o
 - 30 (b) en una forma de dosificación unitaria.
10. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el procedimiento comprende coadministrar ribavirina, en una cantidad que varía de 500 mg a 4400 al día, y GDC-0449 para superar la resistencia desarrollada en pacientes durante el tratamiento antineoplásico con tratamientos previas, con el tratamiento con ribavirina, o *de novo*.
- 35 11. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en la que el procedimiento comprende administrar GDC-0449 en una dosis que proporciona concentraciones plasmáticas de 3 nM durante dos días antes del inicio del tratamiento con ribavirina, y administrar además la ribavirina en una cantidad que varía de 500 mg a 4400 mg al día.
- 40 12. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el procedimiento comprende además administrar la citarabina en una dosis que varía de 5 mg al día a 20 mg dos veces por día.
13. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el procedimiento comprende administrar la ribavirina en una cantidad que varía entre 1000 mg y 2800 mg al día.
14. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que el procedimiento comprende coadministrar simultánea o secuencialmente ribavirina y citarabina.

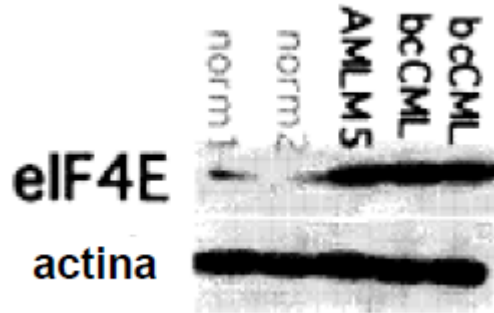


Fig. 1. Un análisis por inmunoelectrotransferencia de células CD34+ aisladas de muestras normales (normal), de LMA M5 o de dos de LMC con crisis hemoblástica (bc). Se muestra la actina para la carga. Los resultados son representativos de >100 muestras primarias.

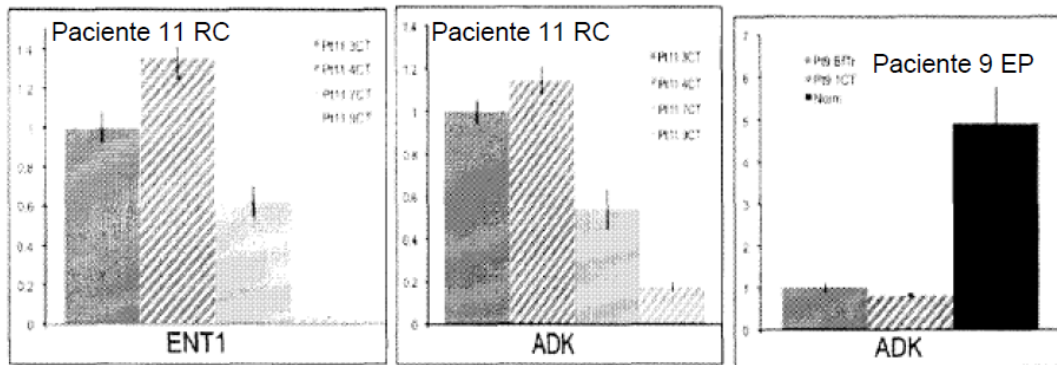


Fig. 2. Un diagrama que muestra los niveles de ARN de ENT1 y ADK como función del tratamiento con ribavirina en pacientes.

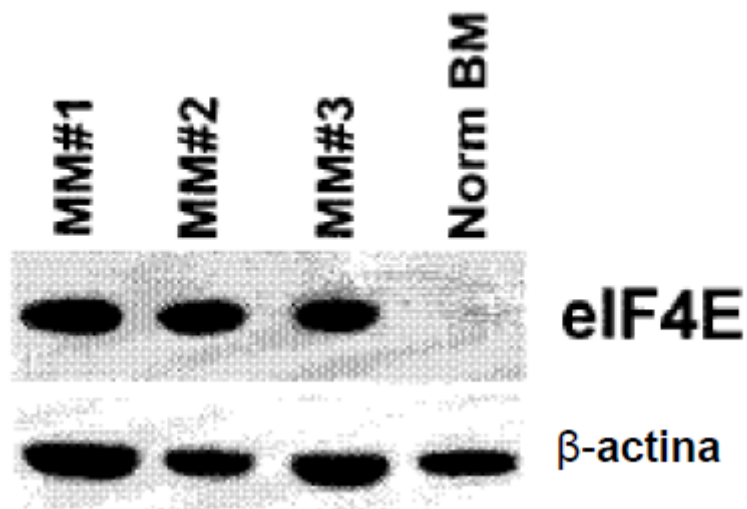


Fig. 3. Una inmunoelectrotransferencia de tres muestras primarias de mieloma múltiple frente a células CD34+ aisladas de médula ósea normal.

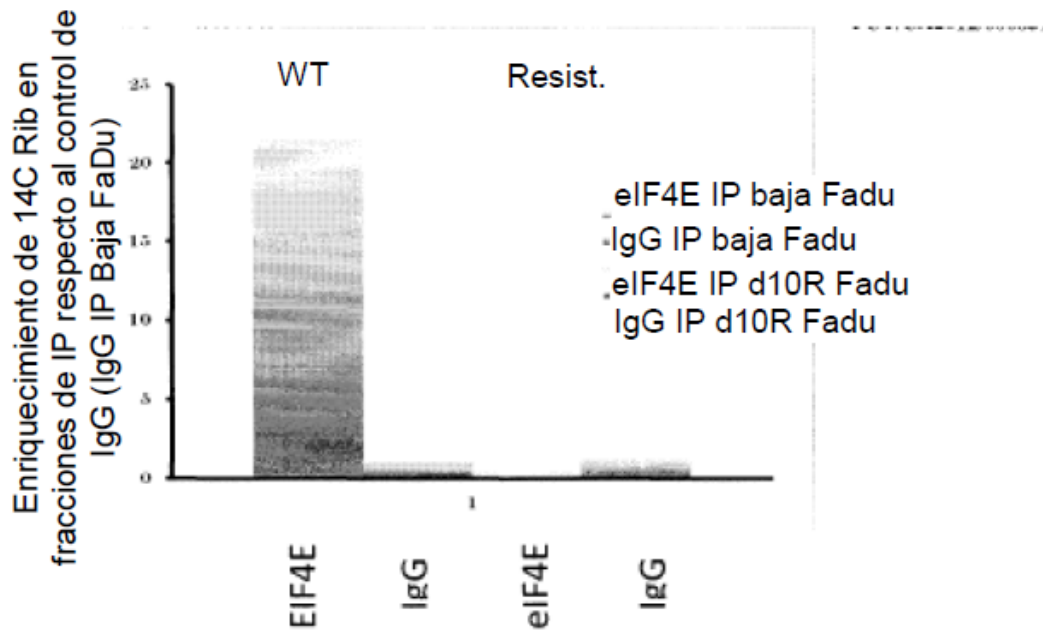


Fig. 4. Resistencia de Tipo II: absorción normal, pérdida de la interacción eIF4E-ribavirina. Enriquecimiento en un factor de multiplicación de 14C ribavirina respecto al control negativo (IgG de IP). FaDu baja indica células FaDu originales de pase bajo y d10R se refiere a células resistentes a F10R.

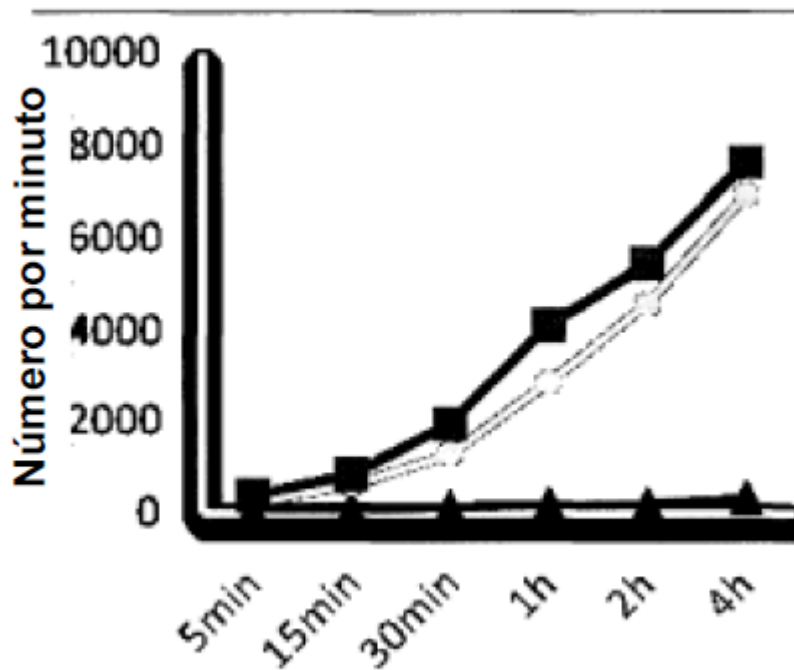


Fig. 5. Absorción de 3H-ribavirina. Los azul oscuro (triángulos) son células F100R con una absorción de ribavirina gravemente alterada. Tanto las células FaDu originales como las células F10R tienen una absorción normal de ribavirina (rosa (cuadrado) y azul claro (círculo)).

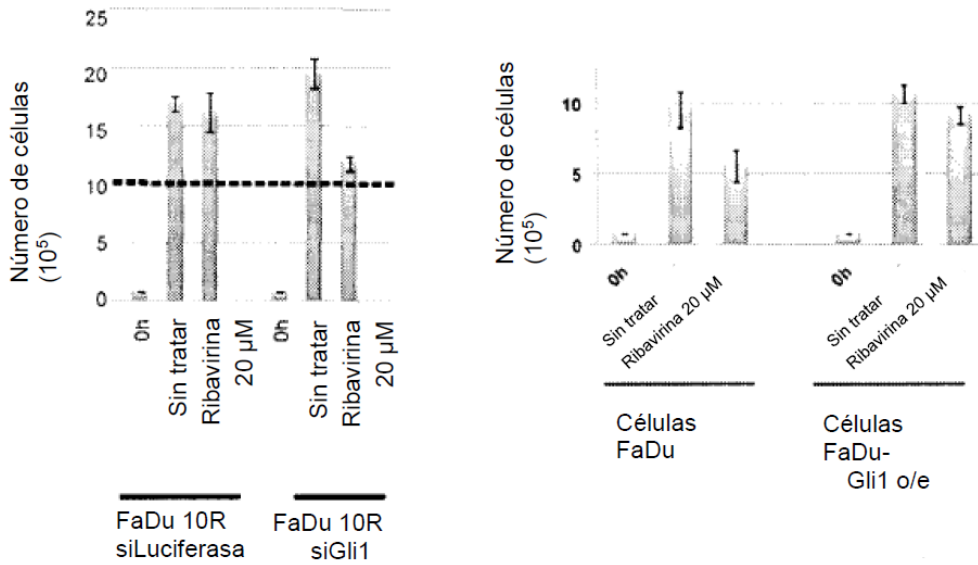


Fig. 6. La atenuación génica de Gli-1 revierte la resistencia y la sobreexpresión de Gli-1 la confiere. La barra refleja la CI50 de ribavirina en este momento y la concentración en las células originales.

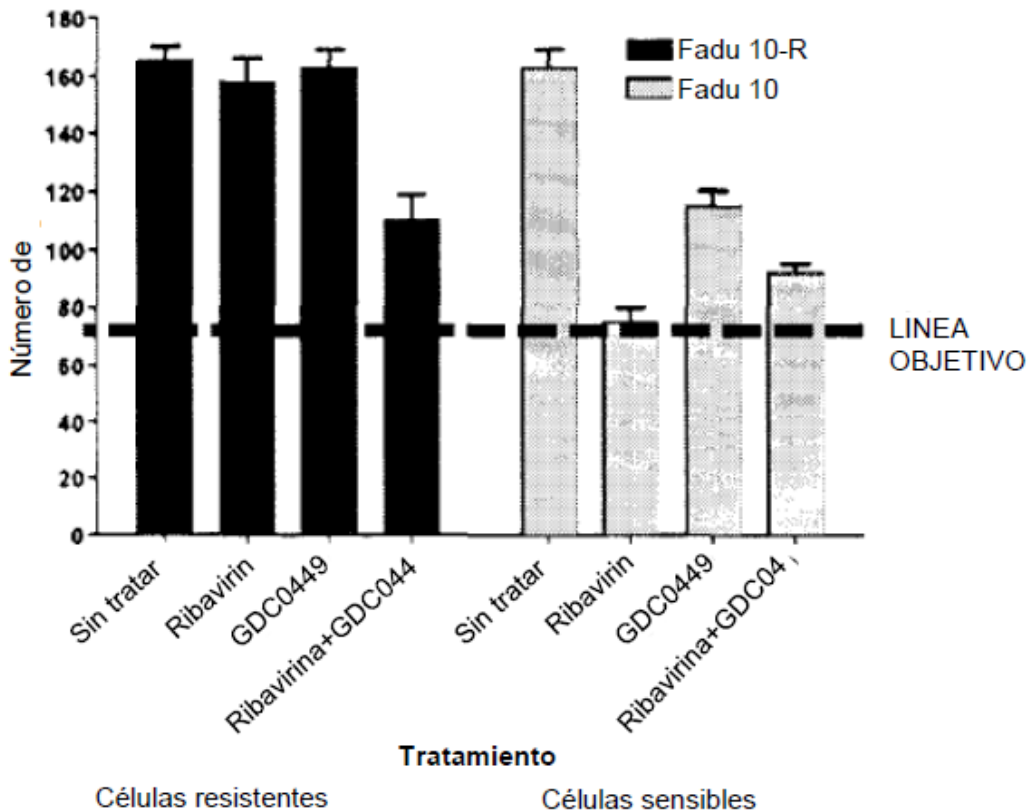
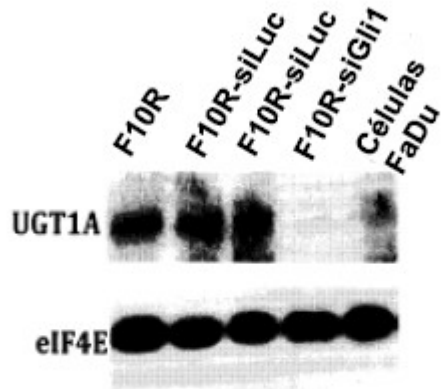


Fig. 7. El inhibidor de la vía de Gli-1 GDC-0449 (Roche) revierte parcialmente la resistencia a la ribavirina. La barra refleja la CI50 de ribavirina en este momento y la concentración en las células originales.



Actina

Fig. 8. La modulación de Gli-1 da lugar a la modulación de UGT1A. Las enzimas de la vía de glucuronidación (UGT1A) están elevadas en las células resistentes a F10R con una absorción normal con respecto a las líneas celulares originales u otras resistentes. Si Luc se refiere a atenuación de control negativo para el gen de la luciferasa. si-Gli-1 es la atenuación para Gli-1. Las células FaDu son células originales, que tienen concentraciones de UGT1A más bajas que las células resistentes F10R.