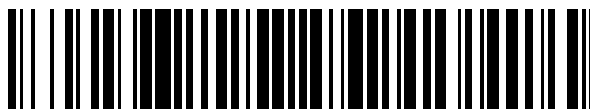


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 213**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2014** **PCT/FI2014/050788**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015** **WO15055898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2014** **E 14795846 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019** **EP 3057581**

54 Título: **Composiciones que comprenden inhibidores de la fosfodiesterasa para su uso en el tratamiento de un tumor sólido en un paciente humano**

30 Prioridad:

17.10.2013 FI 20136029

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

13.03.2020

73 Titular/es:

SARTAR THERAPEUTICS LTD (100.0%)
Haartman Institute, Room C311.1,
Haartmaninkatu 3
00290 Helsinki , FI

72 Inventor/es:

SIHTO, HARRI;
PULKKA, OLLI-PEKKA;
KALLIONIEMI, OLLI y
JOENSUU, HEIKKI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 748 213 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden inhibidores de la fosfodiesterasa para su uso en el tratamiento de un tumor sólido en un paciente humano

Campo de la invención

- 5 El campo de la invención se refiere a la biología del cáncer. La presente invención se refiere además a composiciones y combinaciones politerapéuticas para su uso en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

- 10 Aproximadamente el 1% de todos los cánceres humanos son sarcomas de tejidos blandos, que consisten en más de 50 tipos de tumores diferentes. Los sarcomas de tejidos blandos a menudo son malignos, hasta el 50% de ellos tienen recaídas o hacen metástasis después de la manifestación (Wibmer, C. 2010). El liposarcoma es el segundo tipo frecuente de sarcoma de tejidos blandos y, según el subtipo de liposarcoma, como los liposarcomas desdiferenciados, puede presentar un curso de enfermedad muy agresivo (Dalal, K.M. 2006). Actualmente, la extirpación quirúrgica del tumor y la radioterapia se usan para tratar la enfermedad local. La quimioterapia se incluye en los tratamientos para la enfermedad metastásica, pero rara vez se consiguen respuestas (D'Angelo, S.P. 2014).

- 15 El tumor del estroma gastrointestinal (GIST) es el tumor mesenquimatoso más frecuente del tubo digestivo (GI) y se ha propuesto que se origina a partir de las células progenitoras de las células intersticiales de Cajal (Sircar, K. 1999). La fuerte expresión de la tirosina cinasa del receptor KIT (RTK) es típica de los GIST y aproximadamente el 80% de estos tumores tienen una mutación de ganancia de función en el protooncogén KIT (Hirota, S. 1998). Muchos GIST que carecen de la mutación KIT tienen mutaciones activadoras en el receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA) (Heinrich, M.C. 2003). PDGFRA está estructuralmente relacionado con KIT y ambos receptores pertenecen a la misma familia RTK (Yarden, Y. 1987). Se sabe que el mesilato de imatinib, un inhibidor de la cinasa, inhibe significativamente los GIST, supuestamente mediante la inhibición del KIT y PDGFRA (Heinrich, M.C. 2003). Otros inhibidores eficaces de la cinasa, utilizados para el tratamiento de GIST, son inhibidores de multikinasa sunitinib y regorafenib que se utilizan para el tratamiento de pacientes en los que imatinib no tiene efecto o que han dejado de responder a imatinib (Demetri, G.D. 2006; Demetri, G.D. 2013). Algunos de los GIST no responden a los inhibidores de la cinasa o desarrollan resistencia con el tiempo, por lo que es necesario encontrar nuevos objetivos farmacológicos para los pacientes con GIST (Heinrich, M.C. 2006; Maleddu, A. 2009).

- 20 Los marcadores inmunohistoquímicos son cruciales para el diagnóstico de GIST. El anticuerpo CD117 que está dirigido contra un antígeno en el receptor KIT es el marcador de diagnóstico más tradicional para los GIST (Kindblom, L.G. 1998). El alto nivel de expresión de KIT es típico para los GIST que frecuentemente albergan una mutación del gen KIT en el exón 9, 11, 13 o 17 (Heinrich, M.C. 2002). Uno de los marcadores más sensibles de GIST es anoctamina 1 (ANO1; también conocido como DOG1) y se considera que es un marcador aún más específico de GIST que KIT (West, R.B., 2004; Espinosa I. 2008; Liegl, B. 2009). La proteína cinasa C theta (PKC θ) se presenta en la mayoría de los GIST y se sugiere como un marcador útil de GIST (Duensing, A. 2004). Sin embargo, la especificidad de PKC θ para GIST es relativamente baja (Novelli, M. 2010). Otro marcador utilizado para evaluar los GIST es el antígeno de células madre hematopoyéticas CD34, mientras que los antígenos del músculo liso, como la actina del músculo liso, la desmina, la miosina embrionaria y el caldesmon pesado no se expresan a menudo en los GIST (Miettinen, M. 1995; Miettinen, M. 2006).

- 25 Las fosfodiesterasas (PDE) catalizan selectivamente la hidrólisis del enlace 3'-fosfoéster de los monofosfatos cíclicos cAMP y cGMP de 3',5'-purina ribosa. Las PDE regulan las concentraciones celulares, la localización y la señalización de cAMP y/o cGMP controlando su degradación (Beavo J.A. 1995). Hay en total 11 familias diferentes de PDE y muchas de estas familias tienen múltiples variantes de transcripción (Conti, M. 2007). La familia PDE3 incluye dos proteínas, PDE3A y PDE3B, que muestran similitud estructural (Degerman, E. 1997). PDE3A es abundante en miocitos cardíacos, células vasculares del músculo liso y plaquetas (Shakur, Y. 2001). Se ha informado que los inhibidores de PDE3 mejoran la contractilidad miocárdica e inducen la relajación del músculo liso vascular y de las vías respiratorias (Halpin, D.M. 2008). Se han utilizado diferentes inhibidores de PDE3 para tratar la insuficiencia cardíaca y la claudicación intermitente (Dawson, D.L. 1998; Liu, Y. 2001). PDE3B se expresa en células beta pancreáticas, hepatocitos y adipocitos, en los que regula procesos metabólicos como la secreción de insulina de las células beta, la glucogenólisis de las células hepáticas y la lipólisis en los adipocitos (Resjö, S. 1999). En ratones diabéticos obesos, se ha demostrado que el inhibidor de PDE3 clotazol mejora la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina al suprimir la inflamación inducida por TNF α segregada por macrófagos en el tejido adiposo (Wada, T. 2013).

- 30 PDE3A es fosforilada y activada por AKT en la maduración de ovocitos de mamíferos. (Han, S.J. 2006). De manera similar, se demuestra que PDE3B es fosforilada y activada por AKT después de la estimulación con insulina en adipocitos (Degerman, E. 1998). La vía de fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3-K)/AKT también es activada por receptores KIT y PDGFRA mutados en los GIST (Duensing, A. 2004). En las plaquetas, PKC participa en la regulación de la actividad de PDE3A (Hunter, R.W. 2009). Se ha demostrado que PDE3A se expresa en el músculo liso gástrico, donde la proteína cinasa A fosforila PDE3A (Murthy, K.S. 2002). Además, PDE3A mostró una fuerte expresión en el

antro pilórico de un modelo murino de GIST (ratón KIT^{K641E}), y se asoció con el perfil de expresión génica de las células intersticiales de Cajal (Gromova, P. 2009).

El clorhidrato de anagrelida es una molécula que se dirige a las enzimas PDE3 y puede reducir la cantidad de plaquetas. Se ha utilizado en pacientes con trastornos mieloproliferativos y especialmente para el tratamiento de la trombocitosis esencial (Fruchtman, S.M. 2005; Harrison, C.N. 2005). El clorhidrato de anagrelida inhibe la actividad de la AMP fosfodiesterasa cíclica en las plaquetas, lo que eleva aún más las concentraciones de AMPc en estas células (Gillespie, E. 1988; Seiler, S. 1987).

En la presente descripción, demostraremos que PDE3A y PDE3B son marcadores específicos para GIST. Las proteínas PDE3 también se expresan a menudo en liposarcomas y con menos frecuencia en otros tipos de cáncer. La inhibición de la actividad de PDE3 con clorhidrato de anagrelida detiene la proliferación celular en las estirpes celulares GIST y disminuye significativamente la proliferación celular en la estirpe celular de liposarcomas. Cuando se usó clorhidrato de anagrelida, un inhibidor específico de PDE3, en combinación con el mesilato de imatinib en las estirpes celulares GIST, se pudo observar un efecto sinérgico. Las células GIST fueron más apoptóticas y la proliferación celular disminuyó más que el uso de cualquiera de los fármacos solos. Nuestros resultados en la presente memoria demuestran que PDE3A y PDE3B pueden considerarse nuevos inmunomarcadores y objetivos farmacológicos, y el inhibidor de PDE3 clorhidrato de anagrelida tiene un gran potencial terapéutico para el tratamiento de PDE3 que expresa tumores sólidos.

Compendio de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 describe los efectos de los inhibidores de PDE3, clorhidrato de anagrelida, amrinona, milrinona y cilotazol sobre GIST y la proliferación celular de liposarcoma en comparación con el tratamiento con DMSO (A) GIST882 (B) GIST48 (C) LPS141. DMSO se usó como referencia negativa para respuestas a fármacos. El nilotinib se utilizó como referencia positiva para las respuestas a fármacos en las estirpes celulares GIST.

La figura 2 describe los efectos del clorhidrato de anagrelida, imatinib y la combinación de clorhidrato de anagrelida e imatinib sobre la proliferación de células GIST. (A) GIST882 (B) GIST48. Se usó DMSO como referencia negativa para las respuestas a los medicamentos.

Descripción detallada de la presente invención

El nombre químico de la Anagrelida es 6,7-dicloro-1,5-dihidroimidazo[2,1-b]quinazolin-2(3H)-ona. Sin embargo, el término "anagrelida" se usa en el presente documento de modo que abarca las sales de adición de ácido de anagrelida inocuas farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, el término anagrelida abarca todas estas sales, así como el compuesto original. Las sales adecuadas de anagrelida incluyen las sales de clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, alquilsulfatos (inferiores), alquilo (inferiores) y arilsulfonatos, fosfato, sulfato, maleato, fumarato, succinato, tartrato y citrato. El clorhidrato de anagrelida es una sal de adición de ácido particularmente preferida en esta invención. La preparación de anagrelida se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. n° 5.391.737.

La mayoría de los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) se caracterizan por la activación de mutaciones en los genes del receptor de tirosina cinasa KIT o PDGFRA. Los inhibidores de los receptores KIT y PDGFRA son eficaces en la clínica, pero algunos tumores no responden o desarrollan resistencia a las terapias durante el tratamiento. En la presente descripción, los autores investigaron el papel de la fosfodiesterasa 3A y la fosfodiesterasa 3B (PDE3A, ID gen: 5139; PDE3B, ID gen: 5140) en GIST y otras enzimas PDE3 que expresan tumores como un posible nuevo objetivo terapéutico.

Según la base de datos GeneSapiens, el gen PDE3A presentaba una expresión anormalmente alta en los GIST, leiomiomas y liposarcomas, y raramente en otros tipos de tumores en comparación con otros tipos de cáncer. La expresión de PDE3B fue anormalmente alta en liposarcomas y GIST y rara vez en otros tipos de tumores. La expresión de PDE3A y PDE3B en cáncer se siguió investigando en 805 muestras de tejido tumoral humano que consisten en 36 tipos diferentes de cáncer usando inmunohistoquímica. La especificidad de la inmunohistoquímica se confirmó midiendo los niveles de expresión de PDE3A y PDE3B en tejidos tumorales usando PCR cuantitativa. Se investigó la importancia de las enzimas PDE3 para la proliferación y supervivencia de las células tumorales en la estirpe celular de liposarcomas humanos LPS141, y en las estirpes celulares GIST48 y GIST882 humanas al inhibir la actividad de las enzimas PDE3 con varios inhibidores. La mayoría de los GIST (93%) expresaron PDE3A (Tabla 1), mientras que su expresión fue rara en otros tipos de tumores. Además la expresión de PDE3B se encontró más frecuentemente en los GIST (66%). Como se muestra en los ejemplos, el clorhidrato de anagrelida inhibió eficazmente la proliferación celular de GIST y liposarcoma (Figura 1). También aumentó la apoptosis de las células de GIST. Además, el clorhidrato de anagrelida muestra un efecto antitumoral sinérgico en las estirpes celulares GIST cuando se administra con mesilato de imatinib, que es un inhibidor de KIT y PDGFRA.

El clorhidrato de anagrelida es capaz por lo tanto de provocar la muerte celular y detener la proliferación celular en proteínas PDE3 humanas que expresan estirpes celulares. Además, en combinación con el mesilato de imatinib, un fármaco utilizado clínicamente en el tratamiento del GIST, la anagrelida induce una muerte celular de mayor nivel en estirpes celulares de GIST que cualquier fármaco solo. Por lo tanto, la anagrelida y sus sales son fármacos novedosos para tratar pacientes con GIST. Anagrelida podría ser eficaz también en aquellos pacientes cuyo tumor expresa PDE3A y/o PDE3B pero no responde o ha desarrollado resistencia a los inhibidores de la tirosina cinasa. Esta es la primera vez que se demuestra que la anagrelida es eficaz contra un tumor sólido humano.

Por consiguiente, la presente invención se dirige a una composición que comprende anagrelida para su uso en el tratamiento de un tumor sólido que expresa PDE3A y/o PDE3B en un paciente humano. Preferiblemente, dicho tumor sólido es un tumor del estroma gastrointestinal (GIST), liposarcoma u otro tumor que expresa PDE3A y/o PDE3B. Por lo tanto, se da cuenta en esta invención que la anagrelida se puede usar para tratar tumores sólidos detectados que comprenden células que presentan una alta expresión de ARNm o proteína de la enzima fosfodiesterasa 3A (PDE3A) o fosfodiesterasa 3B (PDE3B) cuando el nivel de expresión se compara con el tejido de referencia sano. El término "tumor sólido" se refiere en la presente memoria a una masa anormal de tejido como resultado de un crecimiento anormal o división de células, es decir, una neoplasia.

La composición más preferida comprende clorhidrato de anagrelida. En otras alternativas preferidas, se pueden usar otras sales de anagrelida al formular la composición.

La presente invención también se refiere a composiciones para politerapias. Una composición politerapéutica de la presente invención comprende anagrelida e imatinib o mesilato de imatinib. En una realización politerapéutica de la presente invención, la composición que comprende anagrelida también se puede administrar a un paciente con cáncer, simultánea o sucesivamente, en combinación con una composición que comprende imatinib o mesilato de imatinib. También se prefieren otros KIT y PDGFR dirigidos a los inhibidores de tirosina cinasa además de imatinib y mesilato de imatinib, como nilotinib, sunitinib, masitinib, dovitinib, ponatinib, pazopanib, sorafenib, dasatinib, crenolanib y regorafenib para su empleo en las composiciones politerapéuticas de la presente descripción.

La composición que comprende un inhibidor de fosfodiesterasa, como anagrelida, puede contener un tampón, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y puede administrarse por vía oral o parenteral. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anagrelida, con tampón, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una alternativa politerapéutica, dicha composición farmacéutica comprende además un inhibidor de tirosina cinasa, tal como imatinib o mesilato de imatinib. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere aquí a composiciones que son fisiológicamente tolerables y que generalmente no producen una reacción alérgica o similar, cuando se administran a un paciente. Dicha composición farmacéutica también puede formularse para liberación prolongada, liberación retardada o liberación programada, o dicha composición farmacéutica es una mezcla de formulaciones de liberación prolongada y liberación inmediata.

La composición o la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral en forma de un producto sólido tal como un comprimido, gránulos, polvo o cápsula. Para la preparación de dicho producto sólido, el inhibidor de la fosfodiesterasa, como la anagrelida, se puede combinar con un aditivo apropiado, como un excipiente (p. ej., lactosa, manitol, almidón de maíz o celulosa cristalina), un aglutinante (p. ej., un derivado de celulosa, goma arábiga o gelatina), un disgregador (p. ej., carboximetilcelulosa cálcica) o un lubricante (p. ej., talco o estearato de magnesio).

Dicho producto sólido puede prepararse en un producto de liberación controlada mediante el uso de un material base de recubrimiento tal como ftalato de hidroximetilcelulosa, succinato acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato acetato de celulosa o copolímero de metacrilato. La composición como se define en las reivindicaciones también puede prepararse en un producto líquido tal como una solución, una suspensión o una emulsión.

La composición que comprende un inhibidor de fosfodiesterasa, tal como anagrelida, puede administrarse por vía parenteral en forma inyectable. Para la preparación de una inyección, la composición se puede combinar, por ejemplo, con agua, etanol, glicerina o un tensioactivo empleado convencionalmente. La composición también se puede preparar en un supositorio mediante el uso de un material de base apropiado.

La composición que comprende un inhibidor de la fosfodiesterasa, como la anagrelida, se puede administrar en combinación con un agente antitumoral empleado en la politerapia politerapéutica o con radioterapia, en la que dicha composición y el agente antitumoral pueden administrarse simultáneamente o por separado a la misma frecuencia de dosificación o diferentes frecuencias a través del mismo método de administración o diferentes métodos de administración. Por lo tanto, el inhibidor de la fosfodiesterasa puede emplearse en combinación con una politerapia o con radioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer. El agente antitumoral preferido en la combinación politerapéutica es un inhibidor de la tirosina cinasa, como el imatinib o el mesilato de imatinib. La preparación de 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-(piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)fenil]-benzamida, también conocido como imatinib, y su uso, especialmente como agente antitumoral, se describe en el documento EP 0 564 409. 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-(piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)fenil]-benzamida, también conocido como mesilato de imatinib o ST1571 y su uso farmacéutico se describen en la patente de EE.UU. nº 6.894.051.

La monodosis preferida para seres humanos de anagrelida es 0,025-2,5 mg, preferiblemente 0,1-1,0 mg, aún más preferiblemente 0,5 mg. Se prefieren dosis diarias de aproximadamente 100-1.000 mg, preferiblemente 300-800 mg, de imatinib o mesilato de imatinib. Sin embargo, el intervalo óptimo y la cantidad de dosis pueden determinarse empíricamente y está dentro de los conocimientos de la técnica.

5 La presente invención también proporciona una composición que comprende un inhibidor de fosfodiesterasa para su uso en el tratamiento de tumores que expresan fosfodiesterasa 3A y/o fosfodiesterasa 3B en un paciente humano (la composición de esta alternativa también puede ser una composición farmacéutica que comprende ingredientes adicionales como se definió anteriormente). Preferiblemente, dicho inhibidor de fosfodiesterasa es un inhibidor de las enzimas fosfodiesterasa 3. Dicho inhibidor de fosfodiesterasa se puede seleccionar del grupo que consiste en
10 inhibidores tales como anagrelida, milrinona, amrinona y cilostazol. Lo más preferiblemente, dicho inhibidor de fosfodiesterasa es clorhidrato de anagrelida. Esta alternativa de la presente invención también se refiere a composiciones para politerapias. Una composición politerapéutica de la presente invención comprende un inhibidor de fosfodiesterasa y un inhibidor de tirosina cinasa seleccionado del grupo que consiste en inhibidores tales como imatinib, mesilato de imatinib, nilotinib, sunitinib, masitinib, dovitinib, ponatinib, pazopanib, sorafenib, dasatinib, crenolanib, vatalanib y regorafenib. En una alternativa politerapéutica, la composición que comprende un inhibidor de fosfodiesterasa también se puede administrar a un paciente con cáncer, simultánea o sucesivamente, en combinación con una composición que comprende un inhibidor de tirosina cinasa, preferiblemente imatinib o mesilato de imatinib.

20 La presente descripción está describiendo una indicación médica adicional para anagrelida y otros inhibidores de fosfodiesterasa 3. Por lo tanto, la presente invención también describe el uso de anagrelida o una sal del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido en un paciente humano. La presente descripción se refiere además a un uso de un inhibidor de fosfodiesterasa para el tratamiento del tumor del estroma gastrointestinal, GIST, liposarcomas y otras proteínas PDE3 que expresan tumores.

25 La frase "cantidad farmacéuticamente eficaz" empleada en la presente memoria significa una cantidad suficiente para suprimir en un grado beneficioso, preferiblemente para reducir en al menos aproximadamente el 5 por ciento, más preferiblemente en al menos el 30 por ciento, lo más preferiblemente en al menos el 50 por ciento el desarrollo de tumores en seres humanos, en especial tumores que expresan enzimas PDE3 tales como GIST y liposarcoma.

30 En una alternativa adicional, la presente descripción proporciona un método para la detección de un tumor maligno relacionado con enzimas PDE3 que expresan tumores, en una muestra de prueba, el método comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a la enzima PDE3A o PDE3B, en donde dicha muestra se toma de un tejido sospechoso de contener tumor del estroma gastrointestinal, GIST, liposarcoma u otro tumor que expresa PDE3A y/o PDE3B; (b) incubar la muestra y el anticuerpo durante un tiempo y en condiciones que sean suficientes para la formación de inmunocomplejos; (c) detectar la presencia o ausencia de formación de inmunocomplejo entre el antígeno y el anticuerpo, y (d) determinar la presencia o ausencia de tumor maligno, en donde la presencia de formación de inmunocomplejo es indicativa de tumor maligno.

35 La detección de antígenos proteicos, tales como enzimas, está dentro de los conocimientos de la técnica, véanse los ejemplos a continuación y, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 8.449.885.

40 En otra alternativa adicional, la presente descripción proporciona un método para detectar y analizar si un paciente que padece un tumor que expresa PDE3A y/o PDE3B responde o no al tratamiento con un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa 3, comprendiendo el método las etapas siguientes:

- determinar en una muestra tumoral obtenida de dicho paciente el nivel de expresión de las enzimas PDE3A y/o PDE3B, y

- seleccionar dicho paciente para el tratamiento con dicho inhibidor de las enzimas fosfodiesterasa 3,

45 si la muestra tumoral de dicho paciente presenta una alta expresión de enzimas fosfodiesterasa 3A y/o fosfodiesterasa 3B en comparación con una muestra de tejido de referencia que consiste en tejido histológicamente normal.

El nivel de expresión de las enzimas PDE3A y/o PDE3B se puede determinar como en los ejemplos a continuación o, p. ej., como en la patente de EE.UU. n.º 8.546.552.

50 También es evidente que un método que comprende las etapas para determinar el nivel de expresión de los ARNm de PDE3A y/o PDE3B, p. ej., por métodos de PCR, en una muestra de tejido extraída de un paciente que se sospecha que padece un tumor sólido, como GIST o liposarcomas u otro tumor que expresa PDE3A y/o PDE3B, y comparando el nivel detectado con el nivel de expresión en una muestra sana correspondiente, puede usarse para detectar células malignas en la muestra, en donde la presencia de un alto nivel de expresión de PDE3A y/o PDE3B es indicativo de tumor maligno de la muestra.

55 La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Material de tejido

5 Se recogieron e identificaron muestras de tejido tumoral fijadas con formalina y empapadas con parafina. La aprobación para usar y analizar las muestras de tejido fue proporcionada por la Autoridad Nacional para Asuntos Médico-Jurídicos de Finlandia y la Junta de Revisión Institucional. En total, se analizaron en el estudio 36 tipos de cáncer histológico y más de 700 tumores, incluidos más de 200 GIST.

Base de datos GeneSapiens

10 La base de datos GeneSapiens (<http://ist.genesapiens.org/>) incluye datos de expresión génica de 9.783 muestras de tejido que consisten en muestras de tejido humano histológicamente normales y muestras de tejido canceroso (Kilpinen, S. 2008).

Inmunohistoquímica y chips de tejidos

15 Se analizaron muestras de tejido embebido en parafina fijadas con formalina para determinar la expresión de PDE3A y PDE3B. Se cortaron secciones de cinco micrómetros en cortes SuperFrost™+ (Menzel-Gläser). Las secciones se desparafinaron en xileno y se hidrataron en una serie graduada de alcohol. Se usó peróxido de hidrógeno al 1% para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. La recuperación de antígenos para inmunohistoquímica se realizó en citrato de sodio (0,01 mol/l, pH 6,0) en un autoclave (a 120°C durante 2 minutos). El anticuerpo primario utilizado para la inmunotinción de PDE3A fue un anticuerpo policlonal anti-PDE3A de conejo (dilución 1:100; SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU.) y el anticuerpo primario utilizado para la inmunotinción de PDE3B fue un anticuerpo policlonal anti-PDE3B de conejo (dilución 1:20; SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU.). El anticuerpo primario se diluyó en una solución de bloqueo de preanticuerpos PowerVision y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La unión de anticuerpos primarios se detectó usando un equipo de histotinción BrightVision+ (Immunologic BV, Duiven, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de la proteína estudiada en las células tumorales se calificó de la manera siguiente: negativa (menos del 10% de las células tumorales teñidas) o positiva [intensidad de tinción débil (+), moderada (++) o fuerte (+++)].

Cuantificación de la expresión génica de *PDE3A* y *PDE3B*

30 Se extrajo el ARNm de los bloques de tejido empapados en parafina fijados con formalina con el uso del kit High Pure RNA Paraffin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) o de las estirpes celulares GIST con el uso del kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH). El ARNm se transcribió inversamente a ADNc con el kit cDNA Synthesis Superscript® VILO™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

35 Los niveles de expresión de PDE3A y PDE3B se cuantificaron a partir de siete muestras de tejido GIST, 32 de leiomioma y muestras de estirpes celulares GIST realizando PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis (es decir, sondas de hibridación marcadas con un tinte indicador y un tinte de apagado) en un instrumento LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH). El ADNc (50 ng) se amplificó en una mezcla de 20 µl por PCR usando reactivos LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH) y las sondas de hidrólisis de ácido nucleico bloqueado (LNA) marcadas con fluoresceína (Sonda 79 para PDE3A y Sonda 10 para PDE3B) o las sondas de hidrólisis de LNA marcadas con LightCycler® Yellow 555 (sonda TBP para PDE3A y sonda G6PD para PDE3B) de un Universal Set (Roche Diagnostics GmbH). La mezcla de PCR contenía 1x tampón de PCR, 100 nmol/l de sonda y 200 nmol/l de cada cebador específico para la región codificadora PDE3A (directo: 5'-AAAGACAAGCTTGCTATTCCAAA-3', SEQ. ID. n°: 1; inverso: 5'-GTGGAAGAACTCGTCTCAACA-3', SEQ ID n°: 2) o para la región codificadora PDE3B (directo: 5'-AACAATGGTATAAGCCTCATTATCAA-3', SEQ ID n°: 5; inverso: 5'-CGAGCCTCATTTAGCACTGA-3', SEQ ID n°: 6) o para *TBP* como ADN de referencia (directo: 5'-TGAATCTTGTTGTAACTTGACC-3', SEQ ID n°: 3; inverso: 5'-CTCATGATTACCGCAGCAAA-3', SEQ ID n°: 4) o G6PD como ADN de referencia (directo: 5'-GAGCCAGATGCACTTCGTG-3', SEQ ID n°: 7; inverso: 5'-GGGCTTCTCCAGCTCAATC-3', SEQ ID n°: 8). Los cebadores y las sondas se diseñaron utilizando el programa ProbeFinder en el Assay Design Center of Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics GmbH).

Los parámetros del ciclo fueron una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 60 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 60°C durante 45 segundos y alargamiento a 72°C durante 45 segundos.

50 Estirpes celulares

GIST882 es una estirpe celular GIST humana primaria con una mutación sin sentido homocigótica en *KIT* exón 13, que codifica una oncoproteína KIT mutante K642E (Tuveson, D.A. 2001). GIST48 es una estirpe celular GIST producida a partir de un GIST que evolucionó después de la respuesta clínica inicial durante el tratamiento con imatinib. GIST48 tiene una mutación primaria sin sentido del exón 11 y una mutación secundaria sin sentido del exón 17 (Bauer, S. 2006). LPS141 es una estirpe celular de liposarcoma que se crea a partir del liposarcoma

desdiferenciado procedente del paciente (Snyder, E.L. 2009). Las estirpes celulares se cultivaron en un medio RPMI 1640 (GIBCO, California, EE.UU.) enriquecido con 20% de suero bovino fetal (FBS) y 2% de penicilina/estreptomicina.

PDE3 e inhibidores de cinasas, un ensayo TUNEL

- 5 Se usaron cuatro inhibidores de PDE3 diferentes para bloquear la actividad de las enzimas PDE3 y dos inhibidores de cinasas para bloquear la actividad de KIT y PDGFRA. Cilostazol, milrinona y amrinona se adquirieron en Sigma (St Louis, MO, EE.UU.) y el clorhidrato de anagrelida se adquirió en Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). Imatinib y nilotinib (inhibidores específicos de KIT, Novartis) se adquirieron en Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EE.UU.). Imatinib se disolvió en agua. Todos los otros inhibidores se disolvieron en DMSO. En un análisis preliminar, se usaron múltiples concentraciones de fármaco (de 0 a 100 $\mu\text{mol/l}$) para identificar dosis eficaces de inhibidor de PDE3 en las estirpes celulares GIST. Los efectos sobre la proliferación se analizaron utilizando el sistema xCELLigence y el instrumento RTCA DP (Acea Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.). Las concentraciones finales de inhibidor utilizadas en los análisis posteriores fueron 0,5 $\mu\text{mol/l}$ para imatinib y nilotinib, y 10 $\mu\text{mol/l}$ para inhibidores de PDE3. La evolución celular a la apoptosis después del tratamiento con clorhidrato de anagrelida se analizó en ocho pocillos duplicados con un ensayo de Click-iT TUNEL Alexa Fluor 488 Imaging Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La evolución a la apoptosis se midió después de 48 horas y después de 96 horas de tratamientos farmacológicos.

Proliferación celular

- 20 Se examinó la proliferación celular mediante el ensayo MTT (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EE.UU.) y el xCELLigence System utilizando el instrumento RTCA DP (Acea Biosciences). Para el ensayo MTT, las células GIST882 se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo, las células GIST48 se sembraron a una densidad de $2,0 \times 10^4$ células/pocillo y las células LPS141 se sembraron a una densidad de $5,0 \times 10^3$ células/pocillo. Al final de la incubación, se analizó la proliferación celular de ocho pozos duplicados agregando 10 μl del reactivo MTT en cada pocillo e incubando a 37°C durante cuatro horas. Las placas se leyeron con un fotómetro de microplacas Multiscan EX (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) a una longitud de onda de 540 nm. Para el ensayo de proliferación xCELLigence, las células GIST48 y GIST882 se sembraron en placas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo. Antes de colocar en placas las células GIST882, los pocillos se recubrieron con una capa fina de Collagen I Rat Tail (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante utilizando una concentración final de colágeno de 7,5 $\mu\text{g/ml}$.

30 Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando el análisis de variancia de Kruskal-Wallis o la prueba U de Mann-Whitney. Los valores P son a dos caras.

Resultados

Base de datos GeneSapiens

- 35 Se identificaron los ARNm de las enzimas fosfodiesterasa 3A y fosfodiesterasa 3B al expresarse fuertemente en GIST y liposarcoma en comparación con otros tipos de tumores usando la base de datos GeneSapiens (<http://ist.genesapiens.org/>).

Expresión de PDE3A y PDE3B en tejidos cancerosos

- 40 La expresión de PDE3 en tejido canceroso se investigó en 805 muestras de pacientes utilizando chips de tejido tumoral. La expresión de PDE3A se detectó en el 93% de los GIST y en el 33% de los liposarcomas, y raramente en otros tipos de tumores (Tabla 1). La intensidad de la inmunotinción PDE3A fue moderada o fuerte en la mayoría de los GIST. En total, menos del 11% de los tumores distintos de GIST presentaban expresión de PDE3A. La expresión de PDE3B se detectó en el 66% de los GIST y en el 19% de los liposarcomas. El 4% de otros tumores además de GIST presentaban expresión de PDE3B. Los tumores investigados además del GIST incluyeron carcinomas de mama, próstata, ovario, colon, útero, páncreas, hígado, vejiga, riñón, pulmón y los conductos biliares; y gliomas, tumores de células germinales, sarcomas, melanomas, schwannomas, menigeomas, linfopiteliomas, neuroblastomas y oncocitomas.

- 50 La especificidad de las inmunotinciones de PDE3 se verificó midiendo la expresión de ARNm de PDE3A y PDE3B con qPCR. El ARNm de PDE3A y PDE3B se expresó abundantemente en los siete GIST (100%) pero solo en una minoría de muestras de tejido de leiomiomasarcoma, verificando los resultados de la tinción inmunohistoquímica. Las expresiones de proteínas y ARNm mostraron una correlación estadísticamente significativa ($P < 0,001$).

Tratamientos inhibidores de PDE3

En un análisis realizado usando el sistema xCELLigence y el instrumento RTCA DP (Acea Biosciences), 10 $\mu\text{mol/l}$ o una concentración más alta de anagrelida y amrinona mostraron algún efecto antiproliferativo en cultivos de células

GIST, mientras que cilostazol y milrinona no influyeron en la proliferación celular. Para examinar más de cerca los efectos de los inhibidores de PDE3 en las estirpes celulares LPS141, GIST882 y GIST48, las células se cultivaron a las concentraciones finales de 10 $\mu\text{mol/l}$ de inhibidores de PDE3 durante 96 horas, y se midieron los efectos del fármaco en la proliferación con el ensayo MTT y se compararon al efecto antiproliferativo de nilotinib (0,5 $\mu\text{mol/l}$). Durante un período de cultivo de cuatro días, el clorhidrato de anagrelida resultó ser el único inhibidor de PDE3 que tuvo un efecto sobre el crecimiento de células GIST882 y LPS141 en comparación con DMSO. Ninguno de los inhibidores de PDE3 influyó significativamente en la proliferación de células GIST48 (Figura 1). A continuación, se investigó el efecto del clorhidrato de anagrelida (10 $\mu\text{mol/l}$) combinado con el tratamiento con imatinib (0,5 $\mu\text{mol/l}$) en las estirpes celulares GIST. De nuevo, durante un cultivo de cuatro días, solo se vio afectada la estirpe celular GIST882, y la combinación de fármacos mostró efectos antiproliferativos sinérgicos en las células (Figura 2).

El efecto del clorhidrato de anagrelida y la combinación de clorhidrato de anagrelida e imatinib sobre la apoptosis de las células tumorales se investigó con un ensayo TUNEL que detecta ADN fragmentado en los núcleos celulares. El 22% de las células GIST882 tratadas con clorhidrato de anagrelida fueron apoptóticas después de 48 horas y el 47% después de 96 horas. En las células GIST48 solo se observó una ligera fragmentación del ADN cuando las células se trataron con clorhidrato de anagrelida. 48 horas después de comenzar el tratamiento con clorhidrato de anagrelida, el 0,6% de las células GIST48 eran apoptóticas, y después del cultivo de 96 horas, el 1%. El 22% y el 1% de las células GIST882 eran apoptóticas después de 48 y 96 horas de tratamiento con imatinib, respectivamente. La tasa de apoptosis en las células GIST48 tratadas con imatinib durante 48 y 96 horas, respectivamente, fue del 34% y 40%. Cuando el clorhidrato de anagrelida e imatinib se usaron en combinación, se detectó un efecto sinérgico en ambas estirpes celulares GIST. Después de 48 y 96 horas, el 32% y el 86% de las células GIST882, y el 39% y el 47% de las células GIST48, respectivamente, fueron apoptóticas en el ensayo.

Exposición

Muchos pacientes con GIST evolucionan a pesar de los tratamientos actuales. El mesilato de imatinib, un inhibidor de varias tirosina cinasas receptoras de tipo III, inhibe la evolución de los GIST avanzados (Demetri, G.D. 2002). La mayoría de los GIST tienen una mutación oncogénica en KIT o PDGFRA (Hirota, S. 1998; Heinrich, M.C. 2003), que se consideran los objetivos principales para la terapia con imatinib. Algunos GIST carecen de respuesta a los inhibidores de tirosina cinasa o desarrollan resistencia a ellos, a menudo debido a mutaciones secundarias. En la presente descripción se demuestra que PDE3A y PDE3B son nuevos inmunomarcadores potenciales y nuevos objetivos terapéuticos de tratamiento para GIST, liposarcomas y otros tumores que expresan enzimas PDE3.

Basándose en la búsqueda en la base de datos GeneSapiens, la expresión de ARNm de PDE3A y PDE3B es alta en GIST y liposarcomas en comparación con otros tipos de cáncer humano. Asimismo, en las muestras clínicas de tejido tumoral, la mayoría de los GIST expresan la proteína PDE3A y PDE3B, mientras que su expresión se encuentra con menos frecuencia en otros tipos de tumores. PDE3A se expresó en el antro pilórico en un modelo murino de GIST (ratón *KIT^{K641E}*), y también está asociado con el perfil de expresión génica de las células intersticiales de Cajal (Gromova, P. 2009), que podría tener las mismas células progenitoras que GIST (Sircar, K. 1999). Por lo tanto, PDE3A podría ser importante para la función de ambas células intersticiales de las células Cajal y GIST.

Debido a que se encontró abundante expresión de PDE3A y PDE3B principalmente en GIST, se planteó la hipótesis de que la expresión y la actividad de estas proteínas podrían ser cruciales para la supervivencia de las células tumorales GIST. Como consecuencia de la inhibición de PDE3 con clorhidrato de anagrelida, se bloqueó la proliferación de células GIST y las células tumorales se volvieron apoptóticas. Asimismo, la proliferación celular de liposarcomas disminuyó debido a la inhibición de PDE3, lo que indica que los tumores que expresan PDE3A y/o PDE3B generalmente son adecuados para tratamientos de inhibición de PDE3.

PDE3A y PDE3B son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace 3'-fosfoéster de cAMP y cGMP, produciendo AMP y GMP (Beavo, J.A. 1995). Los nucleótidos cíclicos, especialmente cAMP, regulan muchos procesos fisiológicos. Uno de los objetivos más importantes de cAMP es PKA, que regula aún más la expresión génica y muchos procesos fisiológicos en las células (Beavo, J.A. 2002). La adicción al mantenimiento de bajas cantidades de AMPc mediante la hidrólisis de PDE4 en los sitios subcelulares apropiados se relacionó con la tasa de proliferación celular y la supervivencia en una estirpe celular de cáncer colorrectal quimiorresistente (McEwan, D.G. 2007). Es posible que algunos tumores sean adictos a la señalización de PDE3 y la adicción celular a cantidades bajas de AMPc sea uno de los actores clave en la regulación de la supervivencia celular, y la influencia farmacológica en esta vía puede proporcionar un beneficio clínico. La expresión de otras fosfodiesterasas específicas de AMPc puede compensar la pérdida de la función PDE3A o PDE3B durante el tratamiento con clorhidrato de anagrelida en estirpes celulares. Se sabe que ocho familias de enzimas fosfodiesterasas regulan la actividad de cAMP dentro de las células, y la mayoría de la actividad de hidrólisis de cAMP proviene de las familias PDE3 y PDE4 (Conti, M. 2007; McEwan, D.G. 2007). El clorhidrato de anagrelida potenció los efectos de imatinib en ambas estirpes celulares GIST. Esto podría deberse al hecho de que los inhibidores se dirigen a diferentes vías de señalización celular en los dianocitos. Por lo tanto, se espera que los efectos sinérgicos de los inhibidores de clorhidrato de anagrelida y los receptores de tirosina cinasa sobre GIST también se encuentren en la clínica.

Anagrelida es un nuevo método potencial para tratar tumores que expresan PDE3. También puede ser una opción para tratar a pacientes con GIST que ya no responden a los inhibidores de la tirosina cinasa o que tienen GIST sin mutación genética en KIT o PDGFRA. La anagrelida también es un posible fármaco para la politerapia con inhibidores de la cinasa.

- 5 En conclusión, PDE3A y PDE3B se expresan en la mayoría de los GIST y con frecuencia en liposarcomas, pero rara vez en otros tumores sólidos humanos. Por lo tanto, PDE3A y PDE3B pueden considerarse como un nuevo biomarcador para GIST y liposarcomas, y los tumores que expresan PDE3 pueden identificarse, por ejemplo, con métodos de inmunohistoquímica o de amplificación de ácido nucleico. Los tumores PDE3 positivos sirven como objetivo para los inhibidores de PDE3, especialmente para anagrelida que puede provocar apoptosis y evitar la proliferación celular de células tumorales. La anagrelida es un nuevo fármaco potencial para tratar los GIST sola o en combinación con otros agentes medicinales.
- 10

Tabla 1. Expresión de la proteína fosfodiesterasa 3A y 3B en muestras de tumores humanos.

Tipo de tumor	N.º de casos	% de expresión	% de expresión
	805	PDE3A	PDE3B
GIST	230	93%	66%
Liposarcoma	42	33%	19%
Tumores de células germinales	23	17%	0%
Otros sarcomas	114	16%	7%
Cáncer de pulmón	53	13%	0%
Tumores cerebrales	94	12%	1%
Otros cánceres	112	9%	3%
Cánceres de riñón	53	0%	2%
Cánceres de pecho	84	0%	0%

Referencias

- 15 Andersson, J., Bumming, P., Meis-Kindblom, J.M., Sihto, H., Nupponen, N., Joensuu, H., Oden, A., Gustavsson, B., Kindblom, L.G. y Nilsson, B. (2006). Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 6, 1573-1581.
- Bauer, S., Yu, L.K., Demetri, G.D. y Fletcher, J.A. (2006). Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res.* 18, 9153-9161.
- 20 Beavo, J.A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 4, 725-748.
- Beavo, J.A. y Brunton, L.L. (2002). Cyclic nucleotide research— still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 710-718.
- Conti, M. y Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 481-511.
- 25 D'Angelo, S.P., Tap, W.D., Schwartz, G.K. y Carvajal, R.D. (2014). Sarcoma immunotherapy: past approaches and future directions. *Sarcoma* 2014: 391967.
- Dalal, K.M., Antonescu, C.R. y Singer, S. (2008). Diagnosis and management of lipomatous tumors. *J. Surg. Oncol.* 97, 298-313.
- 30 Dawson, D.L., Cutler, B.S., Meissner, M.H. y Strandness, D.E.Jr. (1998). Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation* 7, 678-686.
- Degerman, E., Belfrage, P. y Manganiello, V.C. (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J. Biol. Chem.* 11, 6823-6826.

- Degerman, E., Landstrom, T.R., Wijkander, J., Hoist, L.S., Ahmad, F., Belfrage, P. y Manganiello, V. (1998). Phosphorylation and activation of hormone- sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods* 14, 43-53.
- Demetri, G.D., Reichardt, P., Kang, Y.K., Blay, J.Y., Rutkowski, P., Gelderblom, H., Hohenberger, P., Leahy, M., von Mehren, M., Joensuu, H. *et al.* (2013). Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 9863, 295-302.
- Demetri, G.D., van Oosterom, A.T., Garrett, C.R., Blackstein, M.E., Shah, M.H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I.R., Heinrich, M.C., Morgan, J.A. *et al.* (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 9544, 1329-1338.
- Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M. *et al.* (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* 7, 472-480.
- Duensing, A., Joseph, N.E., Medeiros, F., Smith, F., Hornick, J.L., Heinrich, M.C., Corless, C.L., Demetri, G.D., Fletcher, C.D. y Fletcher, J.A. (2004). Protein Kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Cancer Res.* 15, 5127-5131.
- Duensing, A., Medeiros, F., McConarty, B., Joseph, N.E., Panigrahy, D., Singer, S., Fletcher, C.D., Demetri, G.D. y Fletcher, J.A. (2004). Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 22, 3999- 4006.
- Espinosa, I., Lee, C.H., Kim, M.K., Rouse, B.T., Subramanian, S., Montgomery, K., Varma, S., Corless, C.L., Heinrich, M.C., Smith, K.S. *et al.* (2008). A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 2, 210-218.
- Fruchtman, S.M., Pettit, R.M., Gilbert, H.S., Fiddler, G., Lyne, A. y Anagrelide Study Group. (2005). Anagrelide: analysis of long-term efficacy, safety and leukemogenic potential in myeloproliferative disorders. *Leuk. Res.* 5, 481-491.
- Gillespie, E. (1988). Anagrelide: a potent and selective inhibitor of platelet cyclic AMP phosphodiesterase enzyme activity. *Biochem. Pharmacol.* 14, 2866-2868.
- Gromova, P., Ralea, S., Lefort, A., Libert, F., Rubin, B.P., Erneux, C. and Vanderwinden, J.M. (2009). Kit K641E oncogene up-regulates Sprouty homolog 4 and trophoblast glycoprotein in interstitial cells of Cajal in a murine model of gastrointestinal stromal tumours. *J. Cell. Mol. Med.* 8A, 1536-1548.
- Halpin, D.M. (2008). ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct Pulmon Dis.* 4, 543-561.
- Han, S.J., Vaccari, S., Nedachi, T., Andersen, C.B., Kovacina, S., Roth, R.A. y Conti, M. (2006). Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *EMBO J.* 24, 5716-5725.
- Harrison, C.N., Campbell, P.J., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Bareford, D., Wilkins, B.S., van der Walt, J.D., Reilly, J.T., Grigg, A.P. *et al.* (2005). Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* 1, 33-45.
- Heinrich, M.C., Blanke, C.D., Druker, B.J. and Corless, C.L. (2002). Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J. Clin. Oncol.* 6, 1692-1703.
- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C.J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D.J., Haley, A., Town, A. *et al.* (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 5607, 708-710.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Blanke C.D., Demetri G.D., Joensuu H., Roberts PJ, Eisenberg B.L., von Mehren M., Fletcher C.D., Sandau K., *et al.* (2006). Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 24, 4764-4774.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M. *et al.* (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 5350, 577-580.
- Hunter, R.W., Mackintosh, C. y Hers, I. (2009). Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets. *J. Biol. Chem.* 18, 12339-12348.
- Kilpinen, S., Autio, R., Ojala, K., Iljin, K., Bucher, E., Sara, H., Pisto, T., Saarela, M., Skotheim, R.I., Bjorkman, M. *et al.* (2008). Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues. *Genome Biol.* 9, R139-2008-9-9-r139. Epub 19 de septiembre de 2008.

- Kindblom, L.G., Remotti, H.E., Aldenborg, F. y Meis-Kindblom, J.M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 5, 1259-1269.
- 5 Liegl, B., Hornick, J.L., Corless, C.L. y Fletcher, CD. (2009). Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am. J. Surg. Pathol.* 3, 437-446.
- Liu, Y., Shakur, Y., Yoshitake, M. and Kambayashi Ji, J. (2001). Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovasc. Drug Rev.* 4, 369-386.
- 10 Maleddu, A., Pantaleo, M.A., Nannini, M., Di Battista, M., Saponara, M., Lolli, C. y Biasco, G. (2009). Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). *Oncol. Rep.* 6, 1359-1366.
- McEwan, D.G., Brunton, V.G., Baillie, G.S., Leslie, N.R., Houslay, M.D. y Frame, M.C. (2007). Chemoresistant KM12C colon cancer cells are addicted to low cyclic AMP levels in a phosphodiesterase 4-regulated compartment via effects on phosphoinositide 3-kinase. *Cancer Res.* 11, 5248-5257.
- 15 Miettinen, M. y Lasota, J. (2006a). Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin. Diagn. Pathol.* 2, 70-83.
- Miettinen, M. y Lasota, J. (2006b). Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 10, 1466-1478.
- 20 Miettinen, M., Virolainen, M. y Maarit-Sarlomo-Rikala. (1995). Gastrointestinal stromal tumors— value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2, 207-216.
- Murthy, K.S., Zhou, H. y Makhlof, G.M. (2002). PKA-dependent activation of PDE3A and PDE4 and inhibition of adenylyl cyclase V/V1 in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 3, C508-17.
- 25 Novelli, M., Rossi, S., Rodríguez-Justo, M., Taniere, P., Seddon, B., Toffolatti, L., Sartor, C., Hogendoorn, P.C., Sciort, R., Van Glabbeke, M. *et al.* (2010). DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2, 259-270.
- Resjö, S., Oknianska, A., Zolnierowicz, S., Manganiello, V. y Degerman, E. (1999). Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. *Biochem. J.* 341, 839-845.
- 30 Seiler, S., Arnold, A.J., Grove, R.I., Fifer, C.A., Keely, S.L. Jr y Stanton, H.C. (1987). Effects of anagrelide on platelet cAMP levels, cAMP-dependent protein kinase and thrombin-induced Ca⁺⁺ fluxes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2, 767-774.
- Shakur, Y., Hoist, L.S., Landstrom, T.R., Movsesian, M., Degerman, E. y Manganiello, V. (2001). Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 241-277.
- 35 Sircar, K., Hewlett, B.R., Huizinga, J.D., Chorneyko, K., Berezin, I. y Riddell, R.H. (1999). Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 4, 377-389.
- Snyder, E.L., Sandstrom, D.J., Law, K., Fiore, C., Sicinska, E., Brito, J., Bailey, D., Fletcher, J.A., Loda, M., Rodig, S.J., Dal Cin, P. y Fletcher, CD. (2009). C-jun amplification and overexpression are oncogenic in liposarcoma but not always sufficient to inhibit the adipocytic differentiation programme. *J. Pathol.* 218, 292-300.
- 40 Tsimberidou, A.M., Colburn, D.E., Welch, M.A., Cortes, J.E., Verstovsek, S., O'Brien, S.M., Albitar, M., Kantarjian, H.M. and Giles, F.J. (2003). Anagrelide and imatinib mesylate combination therapy in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 3, 229-234.
- Tuveson, D.A., Willis, N.A., Jacks, T., Griffin, J.D., Singer, S., Fletcher, CD., Fletcher, J.A. y Demetri, G.D. (2001). STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 36, 5054-5058.
- 45 Wada, T., Onogi, Y., Kimura, Y., Nakano, T., Fusanobori, H., Ishii, Y., Sasahara, M., Tsuneki, H. y Sasaoka, T. (2013). Cilostazol ameliorates systemic insulin resistance in diabetic db/db mice by suppressing chronic inflammation in adipose tissue via modulation of both adipocyte and macrophage functions. *Eur. J. Pharmacol.* 707, 120-129.
- 50 West R.B., Corless C.L., Chen X., Rubin B.P., Subramanian S., Montgomery K., Zhu S., Ball C.A., Nielsen T.O., Patel R., Goldblum J.R., Brown P.O., Heinrich, M.C. y van de Rijn, M. (2004). The novel marker, DOG1, is expressed

ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am. J. Pathol.* 165, 107-113.

Wibmer, C., Leithner, A., Zielonke, N., Sperl, M. y Windhager, R.(2010). Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Ann. Oncol.* 21, 1106-1111.

- 5 Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. y Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 11, 3341-3351.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Sihto, Harri Pulkka, Olli-Pekka Kallioniemi, Olli Joensuu, Heikki	
5	<120> Composiciones que comprenden inhibidores de la fosfodiesterasa para su uso en el tratamiento de un tumor sólido en un paciente	
	<130> 52902	
10	<150> FI20136029 <151> 17102013	
	<160> 8	
15	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
25	<400> 1 aaagacaagc ttgctattcc aaa	23
	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
35	<400> 2 gtggaagaaa ctgcttcaa ca	22
	<210> 3	
	<211> 24	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de oligonucleótidos	
45	<400> 3 tgaatcttgg ttgtaaactt gacc	24
	<210> 4	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador de oligonucleótidos	
	<400> 4 ctcatgatta ccgcagcaaa	20
60	<210> 5	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 5
5 aacaatggta taagcctcat tatcaa 26

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 6
15 cgagcctcat ttagcactga 20

<210> 7
<211> 19
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 7
25 gagccagatg cacttcgtg 19

<210> 8
30 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

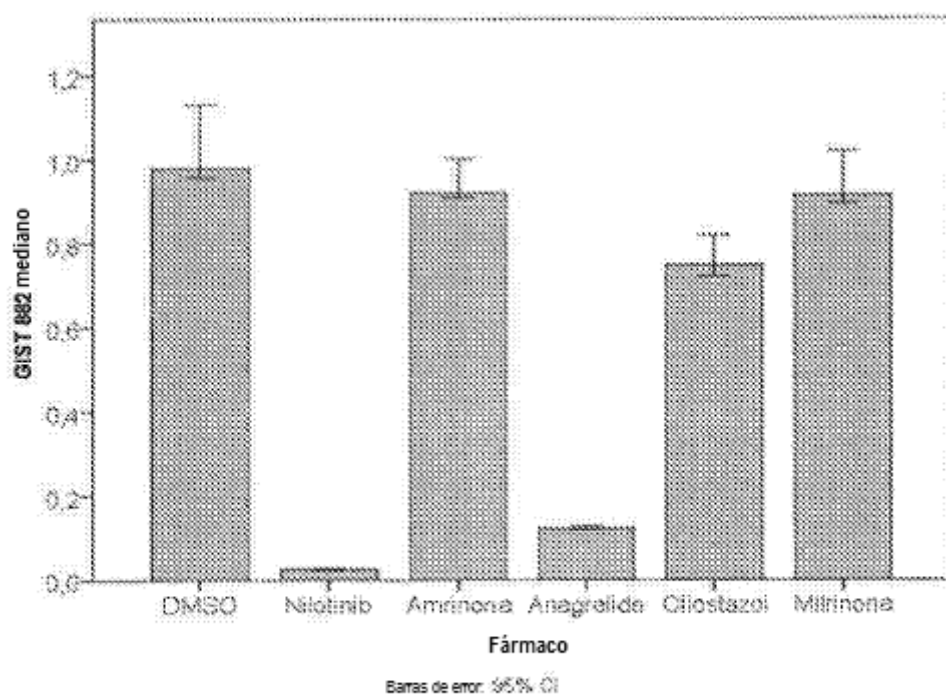
<220>
35 <223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 8
gggcttctcc agctcaatc 19

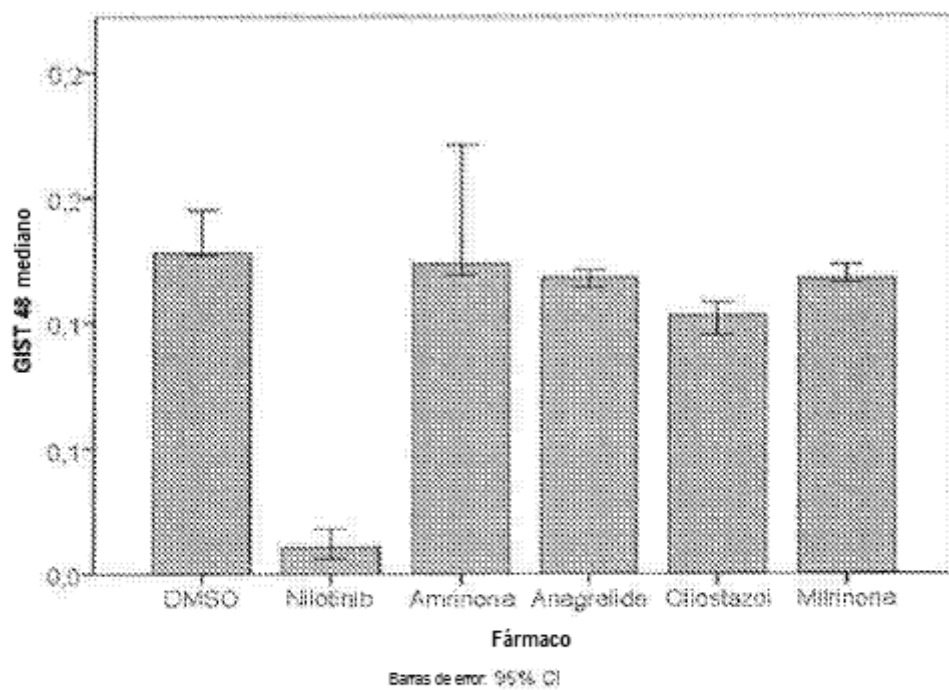
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende anagrelida o una de sus sales para su uso en el tratamiento de un tumor sólido que expresa la enzima fosfodiesterasa 3A y/o la fosfodiesterasa 3B en un paciente humano, en donde dicha anagrelida o una de sus sales disminuye la proliferación de células tumorales en dicho tumor sólido, y en donde dicho tumor sólido es el tumor de estroma gastrointestinal, GIST, o un liposarcoma.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho tumor sólido se detecta por comprender células que presentan alta expresión de ARNm de la enzima fosfodiesterasa 3A y/o la fosfodiesterasa 3B en comparación con el tejido sano de referencia.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha composición comprende clorhidrato de anagrelida.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un inhibidor de tirosina cinasa.
5. La composición para su uso según la reivindicación 4, en donde dicho inhibidor de tirosina cinasa es específico para KIT y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y se selecciona del grupo que consiste en nilotinib, sunitinib, regorafenib, imatinib, mesilato de imatinib, masitinib, dovitinib, ponatinib, pazopanib, sorafenib, dasatinib, vatalanib y crenolanib.
6. La composición para su uso según la reivindicación 4 o 5, en donde dicha composición se administra a dicho paciente, simultánea o sucesivamente, en combinación con una composición que comprende un inhibidor de tirosina cinasa.
7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición es una composición farmacéutica que comprende tampón, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptables.
8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en donde dicha composición farmacéutica se formula para liberación sostenida, liberación retardada o liberación programada, o dicha composición farmacéutica es una mezcla de formulaciones de liberación sostenida y liberación inmediata.

A



B



Figuras 1A y 1B

C

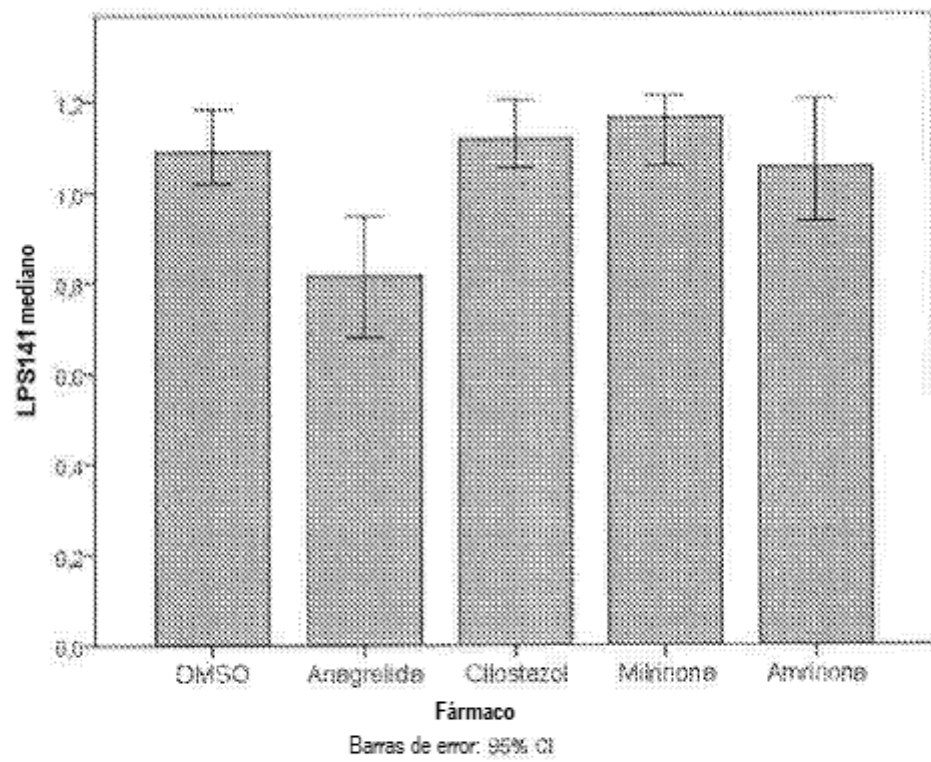
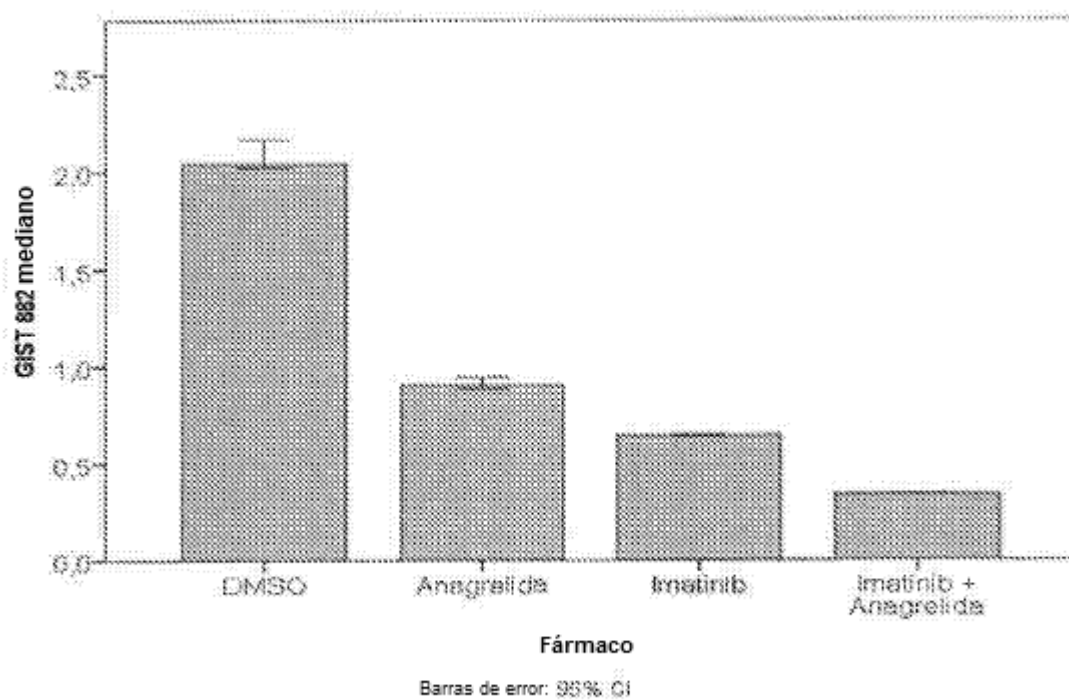
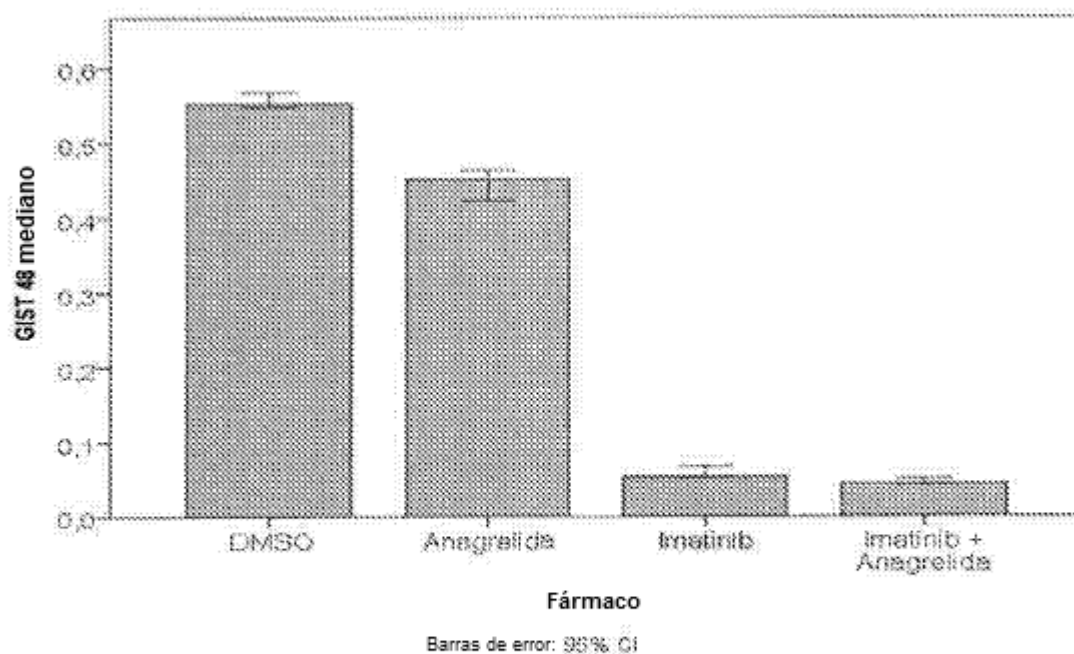


Figura 1C

A



B



Figuras 2A y 2B