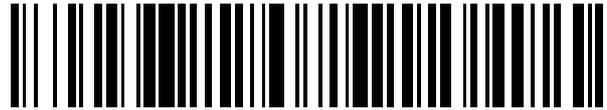


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 056**

51 Int. Cl.:

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2015 PCT/EP2015/064571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15197839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2015 E 15731945 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3160472**

54 Título: **Métodos para tratar, diagnosticar y pronosticar una neoplasia maligna hematológica**

30 Prioridad:

27.06.2014 EP 14382249

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

25.11.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECERCA CONTRA LA LEUCEMIA
JOSEP CARRERAS (100.0%)
Muntaner, 383, 3º 2ª
08021 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

MUÑOZ RISUEÑO, RUTH

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 796 056 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

Métodos para tratar, diagnosticar y pronosticar una neoplasia maligna hematológica

5 Campo técnico de la invención

La invención se relaciona con el campo de los métodos de tratamiento, diagnóstico y pronóstico.

10 Antecedentes de la invención

10

Las neoplasias malignas hematológicas o hematopoyéticas son cánceres de la sangre o la médula ósea, que incluyen la leucemia y el linfoma. La leucemia se caracteriza por la acumulación incontrolada de células de la sangre, que se clasifica en cuatro tipos: leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mielógena crónica (CML).

15

La leucemia mieloide aguda (AML), también conocida como leucemia no linfóide, mieloblástica, granulocítica o mielocítica, afecta a varios glóbulos blancos, que incluyen granulocitos y monocitos. La leucemia aguda es una enfermedad de progresión rápida que produce la acumulación de células inmaduras no funcionales en la médula y la sangre; la médula a menudo deja de producir suficientes glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas normales y las células leucémicas se propagan al hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, el sistema nervioso central, los riñones y las gónadas. Por consiguiente, un paciente con AML puede desarrollar uno o más síntomas de AML tales como, por ejemplo, anemia, fatiga, síntomas similares a la gripe, dolor óseo, pérdida de apetito, pérdida de peso, producción fácil de contusiones, hemorragia y susceptibilidad a la infección.

20

25

Más de un cuarto de millón de adultos en todo el mundo se diagnostican anualmente con leucemia mieloide aguda (AML). A pesar del progreso considerable durante las últimas 3 décadas en la terapia de AML, dos tercios de los adultos jóvenes y 90 % de los adultos mayores aún mueren de su enfermedad.

30

La experiencia de pacientes con neoplasias malignas hematológicas, y especialmente de pacientes con AML, sugiere que los perfiles sistémicos de citocinas en plasma/suero pueden ser útiles, tanto como herramienta de diagnóstico como para el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, una amplia variedad de células liberan citocinas/quimiocinas que están involucradas en una amplia variedad de procesos biológicos; por lo tanto, los niveles alterados pueden reflejar principalmente la fuerza y la naturaleza de los procesos biológicos, y el uso clínico óptimo de los análisis de quimiocinas/citocinas puede requerir, por lo tanto, la combinación con biomarcadores específicos de órganos. Los niveles de quimiocinas también se alteran por procedimientos clínicos, intervenciones terapéuticas y el estado general de los pacientes (Reikvam H. y otros, *Toxins* (Basilea). Feb 2013; 5(2): 336-362). Por lo tanto, son necesarios nuevos métodos de diagnóstico y pronóstico para establecer una evaluación y un manejo óptimos de las neoplasias malignas hematológicas.

35

40

Los tratamientos actuales para la AML pueden involucrar quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, transfusiones de sangre y trasplantes de médula ósea. El puntal de tratamiento inicial, el arabinósido de citosina (ara-C) combinado con una antraciclina, se desarrolló hace casi 40 años y sigue siendo el estándar de atención a nivel mundial, o alternativamente una combinación de tres a ocho medicamentos tales como, por ejemplo, citarabina, daunorrubicina, idarrubicina, tioguanina, mitoxantrona, etopósido y metotrexato. Si bien la quimioterapia actual puede producir remisiones completas, la tasa de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo para las leucemias, en particular la AML, es baja.

45

Las estrategias de tratamiento alternativas se dirigen al desarrollo de terapias menos tóxicas y más eficaces. Se ha evaluado una variedad de nuevos agentes quimioterapéuticos en la AML, que incluyen los inhibidores de la topoisomerasa I, tales como topotecán y campotecina, agentes que contienen platino (carboplatino) y nuevos antimetabolitos que incluyen gemcitabina, troxycitabina y clofarabina (Smith M, y otros, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004; 50(3): 197-222). Todos estos agentes tienen actividad contra los blastos leucémicos, pero su uso aún se encuentra en investigación. El bloqueo de MDR-1 con ciclosporina A o PSC 833 no es de beneficio comprobado y puede aumentar la toxicidad o necesitar una reducción de la dosis y, por lo tanto, reducir la exposición general a la quimioterapia (Larson RA. y otros, *Leukemia* 2003; 17: 488-91).

50

El documento WO 2010/135468 A1 describe la identificación y el tratamiento de neoplasias hematológicas tras la medición de la apoptosis, pero no describe una asociación entre la expresión de 5HTR y las neoplasias malignas hematológicas.

55

Varios documentos describen inhibidores de 5-HTR tales como SB-224289 o SB-216641 para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas (Sibella-Argüelles y otros 2001. *C.R. Acad Sci III*, vol. 324(4):365-372; Kahn Alissa R. y otros 2012. 54th ASH Annual Meeting and Exposition. *Blood*, vol. 120(21):413; Kahn Alissa R. y otros 2011. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. *Blood*, vol. 118(21):823), aunque estos documentos no muestran que las células malignas expresen 5-HTR.

60

65

Debido a que usualmente la quimioterapia también elimina las células normales, los pacientes que reciben quimioterapia a menudo experimentan efectos secundarios tales como, por ejemplo, náuseas, fatiga y un mayor riesgo de infección.

Por lo tanto, existe una necesidad evidente e insatisfecha de productos terapéuticos eficaces para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, que incluyen las leucemias, con toxicidad reducida.

Sumario de la invención

5

En un primer aspecto, la invención se refiere a la apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso en la prevención y/o tratamiento de una neoplasia maligna hematológica de linaje mieloide.

10

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la identificación o el aislamiento de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, dicho método comprende detectar la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en dicha célula, particularmente el 5-HTR tipo 1 es 5-HTR 1A, el método de aislamiento comprende además aislar dicha célula que expresa dicho 5-HTR.

15

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar una neoplasia maligna hematológica en un sujeto que comprende identificar células malignas mediante un método de la invención.

20

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica que comprende:

- (a) determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
- (b) comparar dicho nivel con un valor de referencia

25

en donde una disminución del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto muestra un buen pronóstico o en donde un aumento del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto muestra un mal pronóstico.

30

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia en un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica y que se trata con dicha terapia que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
- b) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior

35

en donde una disminución del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al nivel determinado en una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior es indicativo de que la terapia es eficaz o en donde un aumento del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al nivel determinado en una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior es indicativo de que la terapia es ineficaz.

40

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con una neoplasia maligna hematológica que comprende

45

- a) determinar los niveles de las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
- b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

50

en donde los niveles aumentados de células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto debe tratarse con un inhibidor de 5-HTR tipo 1 y/o un inhibidor de 5-HTR tipo 2.

Breve descripción de las figuras

55

Figura 1. El tratamiento con apomorfina redujo la viabilidad celular en AML. 10^6 células por ml de HL-60, KG-1, MonoMac-1 y Kasumi-1 en medio RPMI completo se trataron con apomorfina a 0,1, 1 y 10 μ M durante 72 h. Todas las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se tiñeron con 7-aminoactinomicina D (7-AAD, núm. de CAS 7240-37-1) y Hoechst 33342 (núm. de CAS 23491-52-3) y se analizaron por citometría de flujo. Las células nucleadas se identificaron por tinción positiva con Hoechst, mientras que las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. El número de células se calculó por recuento volumétrico. A. Se representa la media (símbolo) para cada línea celular de AML y la desviación estándar (barras de error) de 6 réplicas biológicas diferentes. B. Se representa el promedio correspondiente a las cuatro líneas celulares de AML diferentes. * $p < 0,05$.

60

65

Figura 2. Los antagonistas de 5HTR tipo 1 y 2 indujeron la muerte celular en las líneas celulares de AML. 10^6 células por ml de las líneas de AML HL-60, KG-1, MonoMac-1 y Kasumi-1 se incubaron con apomorfina, metiotepina, amperozida o GR113808 a 0,1, 1 y 10 μ M durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células nucleadas se identificaron por tinción positiva

con Hoechst, mientras que las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. El número de células se calculó por recuento volumétrico. A. Se representa la media (símbolo) para cada línea celular de AML y la desviación estándar (barras de error) de 6 réplicas biológicas diferentes. B. Las líneas celulares de AML se trataron con apomorfina o metiotepina a 10 μM en presencia o ausencia de 5-CT o 5-HT. * $p < 0,05$. Apo: apomorfina; Metio: metiotepina.

5

Figura 3. Los antagonistas de 5HTR redujeron la viabilidad celular de muestras de pacientes con AML primaria a las 24 h. 5×10^6 células de AML primaria por ml se trataron con apomorfina o metiotepina a 0,1, 1 y 10 μM en medio IMDM completo durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . La población general de AML se identificó por citometría en base a su expresión de CD45 y el perfil de SSC. La población de AML primitiva se identificó dentro de la población general de AML en base a su positividad para CD34 y su negatividad para CD38. Las células nucleadas se identificaron por tinción positiva con Hoechst, mientras que las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. El número de células se calculó por recuento volumétrico. Se analizaron 11 muestras de AML primaria por triplicado. Cada símbolo representa un paciente con AML específico. Las barras representan la media de la viabilidad celular de cada réplica. * $p < 0,05$

10

15

Figura 4. Los antagonistas de 5HTR redujeron la viabilidad celular de muestras de pacientes con AML primaria a las 72 h. 5×10^6 células de AML primaria por ml se trataron con apomorfina o metiotepina a 0,1, 1 y 10 μM en medio IMDM completo durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . La población general de AML se identificó por citometría en base a su expresión de CD45 y el perfil de SSC. La población de AML primitiva se identificó dentro de la población general de AML en base a su positividad para CD34 y su negatividad para CD38. Las células nucleadas se identificaron por tinción positiva con Hoechst, mientras que las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. El número de células se calculó por recuento volumétrico. Se analizaron 11 muestras de AML primaria por triplicado. Cada símbolo representa un paciente con AML específico. Las barras representan la media de la viabilidad celular de cada réplica. * $p < 0,05$.

20

25

Figura 5. Los antagonistas de HTR indujeron la diferenciación mieloide en las líneas celulares de AML. 10^6 células de AML por ml de HL-60, KG-1, MonoMac-1 y Kasumi-1 se trataron con apomorfina y metiotepina a 0,1, 1 y 10 μM durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO_2 en medio RPMI completo. La expresión de CD11c, CD11b y CD14 en la superficie se detectó por citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. * $p < 0,05$. MFI: Intensidad de fluorescencia media.

30

Figura 6. El antagonista de 5HTR apomorfina indujo la diferenciación mieloide en muestras de pacientes con AML primaria. 5×10^6 células de AML primaria por ml se trataron con apomorfina a 0,1, 1 y 10 μM en medio IMDM completo durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . La población general de AML se identificó por citometría en base a su expresión de CD45 y el perfil de SSC. La expresión de CD11b, CD14 y CD15 en la superficie se detectó por citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. Se analizaron 9 muestras de AML primaria por triplicado. Cada símbolo representa un paciente con AML específico. Las barras representan la media de la viabilidad celular de cada réplica. * $p < 0,05$.

35

40

Figura 7. El antagonista de 5HTR metiotepina indujo la diferenciación mieloide en muestras de pacientes con AML primaria. 5×10^6 células de AML primaria por ml se trataron con metiotepina a 0,1, 1 y 10 μM en medio IMDM completo durante 72 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . La población general de AML se identificó por citometría en base a su expresión de CD45 y el perfil de SSC. La expresión de CD11b, CD14 y CD15 en la superficie se detectó por citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. Se analizaron 9 muestras de AML primaria por triplicado. Cada símbolo representa un paciente con AML específico. Las líneas representan la media de la viabilidad celular de cada réplica. * $p < 0,05$.

45

Figura 8. La viabilidad de células de la sangre sanas no se afecta después del tratamiento con antagonistas de 5HTR. 5×10^6 células mononucleares aisladas con ficoll de muestras de sangre periférica obtenidas de donantes sanos se trataron con apomorfina o metiotepina a 0,1, 1 y 10 μM por 6 ml en medio RPMI completo durante 24 h (A) o 72 h (B) a 37 °C y 5 % de CO_2 . Las células de la sangre se identificaron por citometría en base a su expresión de CD45 y el perfil de SSC. Las células nucleadas se identificaron por tinción positiva con Hoechst, mientras que las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. El número de células se calculó por recuento volumétrico. Se analizaron 4 muestras primarias de donantes por triplicado. Las barras representan la media de la viabilidad celular de cada réplica y las barras de error indican la desviación estándar. * $p < 0,05$.

50

55

Figura 9. El tratamiento con antagonista de 5HTR no atacó las células madre/progenitoras hematopoyéticas sanas. 2×10^5 células mononucleares aisladas con ficoll y empobrecidas en linaje de muestras de sangre del cordón umbilical obtenidas de donantes sanos se trataron con apomorfina a 10 μM en medio IMDM completo durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Las células de la sangre se identificaron por citometría en base a su expresión de CD45 y el perfil de SSC. Se realizó la tinción de CD34 y CD38 en la superficie para identificar cada subpoblación. Las células nucleadas se identificaron por tinción positiva con Hoechst, mientras que las células muertas se excluyeron por tinción positiva con 7-AAD. El número de células se calculó por recuento volumétrico. Se analizaron 3 muestras primarias de sangre del cordón umbilical por triplicado. Las barras representan la media de la viabilidad celular de cada réplica y las barras de error indican la desviación estándar.

60

65

Figura 10. La capacidad clonogénica de las muestras de AML primaria se reduce tras el tratamiento con antagonistas de 5HTR. 5×10^5 células de la sangre de pacientes con AML primaria por ml se trataron con apomorfina o metiotepina a 10

5 μM en medio IMDM completo durante 18 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Después, las células se cultivaron en metilcelulosa complementada con citocinas hematopoyéticas durante 14 días. El número de CFU-B obtenidas se midió por microscopía en base a criterios morfológicos. Se analizaron 7 muestras de sangre de AML primaria. Cada símbolo representa la muestra de un paciente específico. Las líneas representan la mediana. * $p < 0,05$. CFU-B: Unidades formadoras de colonias de blastos.

10 Figura 11. El tratamiento con antagonistas de 5HTR no disminuyó la capacidad clonogénica de las células madre hematopoyéticas sanas. 1×10^3 células de la sangre primarias del cordón umbilical empobrecidas en linaje por ml se trataron con apomorfina o metiotepina a 10 μM en medio IMDM completo durante 18 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Después, las células se cultivaron en metilcelulosa complementada con citocinas hematopoyéticas durante 14 días. El número de colonias obtenidas se midió por microscopía en base a criterios morfológicos. A. Se representa el número total de colonias. CFU: unidades formadoras de colonias. B. Se muestra la frecuencia de cada subtipo de colonia (CFU-Mix, colonia de linaje mixto; CFU-GM, colonia de granulocitos-monocitos; CFU-G, colonia de granulocitos; CFU-M, colonia de monocitos; BFU-E colonia de blastos eritrocitarios). Se analizaron 4 muestras primarias de sangre del cordón umbilical. Las barras representan la media de la viabilidad celular de cada réplica y las barras de error indican la desviación estándar. * $p < 0,05$.

20 Figura 12. Las muestras de AML expresan 5HTR de manera diferencial. Las muestras de sangre de AML primaria, las muestras de sangre periférica sana y las líneas celulares de AML (HL-60, KG-1, MonoMac-1 y Kasumi-1) se tiñeron en la superficie para detectar 5HTR 1A y HTR1B. Las muestras se analizaron por citometría de flujo y se representa la frecuencia de células positivas. Se representan 18 muestras de sangre periférica de pacientes con AML primaria y 16 muestras de sangre periférica de donantes sanos. Círculos: Líneas celulares de AML, Cuadrados: AML, Rombos: células de la sangre maduras sanas * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

25 Figura 13. Los niveles de ARNm de 5HTR se correlacionan con el desenlace clínico de la AML. Se aisló el ARN total de las muestras de sangre de pacientes con AML primaria y los niveles de ARNm de 5HTR1A (A) y 5HTR1B (B) se midieron por PCR semicuantitativa. El nivel de expresión se normalizó contra GAPDH y se calculó según el método de $2^{-\Delta\text{Ct}}$. 6 muestras de AML correspondientes al grupo de buen pronóstico y 8 muestras de AML correspondientes al grupo de mal pronóstico se representan por triplicado. * $p < 0,05$.

30 Figura 14. El tratamiento con antagonistas de 5HTR produce una reducción en las CFU secundarias. 10^6 células por ml de pacientes con AML primaria de CFU primarias tratadas previamente con apomorfina a 10 μM , metiotepina a 10 μM o control de vehículo se volvieron a sembrar en metilcelulosa complementada con citocinas hematopoyéticas durante 14 días. El número de CFU-B obtenidas se midió por microscopía en base a criterios morfológicos. Se evaluaron tres muestras de AML primaria. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

35 Figura 15. El tratamiento con antagonistas de 5HTR1 reduce la carga de AML en un modelo de xenotrasplante *in vivo* en ratón. Se realizó la mieloablación de ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) de 6-8 semanas de edad con busulfán (30 mg/kg por vía IP) en el día 0. En el día 1, se inyectaron 10^6 células MonoMac-1 por vía IV. Desde el día 7 hasta el día 14, los ratones se trataron por vía IP cada dos días con apomorfina (5 mg/kg) o metiotepina (0,1 mg/kg), mientras que los ratones de control se trataron con solución salina como vehículo (NaCl al 0,9 %). En el día 15, los ratones se sacrificaron y sus huesos (crestas ilíacas, fémures y tibias) se cosecharon y analizaron para detectar la presencia de células humanas. Las muestras de médula ósea se midieron por citometría de flujo. La frecuencia de células positivas para CD45 humano (panel superior) y el total de células positivas para CD45 humano (panel inferior) en BM se refieren al control. Las barras representan el valor medio. Las barras de error representan la SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

45 Figura 16. El tratamiento con antagonistas de 5HTR reduce la capacidad de regeneración de la leucemia de las células de AML primaria, al tiempo que no ataca las células madre/progenitoras hematopoyéticas sanas. $1-10 \times 10^6$ células de pacientes con AML primaria o $10-14 \times 10^4$ células de CB empobrecidas en linaje se trataron *ex vivo* (apomorfina a 10 μM , metiotepina a 10 μM o control de vehículo) durante 18 h en IMDM complementado con suero bovino fetal al 5 % inactivado por calor y citocinas hematopoyéticas. Las células se inyectaron por vía IV en ratones NSG previamente acondicionados con busulfán (30 mg/kg) y se dejaron 8 semanas sin tratar. Los ratones se sacrificaron y sus huesos (crestas ilíacas, fémures y tibias) se cosecharon y analizaron por citometría de flujo para detectar la presencia de células de leucemia humana (panel superior) o de la sangre sanas (panel inferior). Se evaluaron cuatro muestras de pacientes con AML y tres muestras de sangre del cordón umbilical (UCB). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

50 Figura 17. Los tratamientos con antagonistas de 5HTR reducen la capacidad de regeneración de la leucemia de muestras de AML primaria en receptores secundarios, sin afectar la hematopoyesis normal. Panel superior. $3-10 \times 10^5$ células de médula ósea injertadas de ratones trasplantados primarios se inyectaron por vía intravenosa en receptores secundarios (ratones NSG acondicionados) y se dejaron sin tratar durante 8 semanas. Las células de médula ósea se analizaron como en la Figura 16. Se representa la frecuencia de células positivas para CD45 humano referida al control. Panel inferior. Se analizaron 50×10^3 células humanas injertadas para detectar las CFU. Se representa el número normalizado de CFU obtenidas. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

55 Descripción detallada de la invención

65

Los inventores de la presente invención han descubierto que las células hematológicas malignas, particularmente las células de AML, expresan receptores de serotonina (5HTR) y que la inhibición de 5HTR tipo 1 y/o tipo 2 tiene un efecto citotóxico en las células de AML, como se muestra en los Ejemplos 1 y 2, reduce la capacidad clonogénica de los blastos de AML mientras que no ataca las células madre hematopoyéticas sanas (Ejemplo 5), y que los inhibidores de 5-HTR tipo 1 y/o tipo 2 no tienen efecto ni en las células de la sangre sanas ni en las células madre/progenitoras hematopoyéticas sanas (Ejemplo 4). Además, han observado que la detección de la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 puede usarse para la identificación de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica (Ejemplo 6), y que una disminución en la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra de un paciente que padece una neoplasia maligna hematológica se correlaciona con un buen pronóstico (Ejemplo 7).

Definiciones

"Receptores de serotonina", también conocidos como receptores de 5-hidroxitriptamina o receptores de 5-HT o 5-HTR, como se usa en la presente descripción, son un grupo de receptores acoplados a proteína G (GPCR) y canales iónicos activados por ligando (LGIC) que se encuentran en los sistemas nerviosos central y periférico.

El término "receptor de 5-HT tipo 1" o "5-HTR tipo 1" o "receptor de 5-HT1" o "5-HTR1", como se usa en la presente descripción, se refiere a una subfamilia de receptores de 5-HT que se unen al neurotransmisor endógeno serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). La subfamilia de receptores de 5-HT1 consiste en cinco receptores acoplados a proteína G (GPCR) que se acoplan a Gi/Go y el término incluye a 5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR1D, 5-HTR1E y 5-HTR1F. Estos receptores median la neurotransmisión inhibitoria mediante la disminución de los niveles celulares de AMPc. La secuencia de proteína completa del receptor de 5-HT tipo 1A humano tiene el número de acceso de UniProt P08908 (16 de abril de 2014). La secuencia de proteína completa del receptor de 5-HT tipo 1B humano tiene el número de acceso de UniProt P28222 (16 de abril de 2014). La secuencia de proteína completa del receptor de 5-HT tipo 1D humano tiene el número de acceso de UniProt P28221 (16 de abril de 2014). La secuencia de proteína completa del receptor de 5-HT tipo 1E humano tiene el número de acceso de UniProt P28566 (14 de mayo de 2014). La secuencia de proteína completa del receptor de 5-HT tipo 1F humano tiene el número de acceso de UniProt P30939 (16 de abril de 2014).

El término "receptor de 5-HT tipo 2" o "5-HTR tipo 2" o "receptor de 5-HT2" o "5-HTR2", como se usa en la presente descripción, se refiere a una subfamilia de receptores de 5-HT que se unen al neurotransmisor endógeno serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). La subfamilia de receptores de 5-HT2 consiste en tres receptores acoplados a proteína G (GPCR) que se acoplan a Gq/G11 y el término incluye a 5-HTR2A, 5-HTR2B y 5-HTR2C. Estos receptores median la neurotransmisión excitatoria mediante el aumento de los niveles celulares de IP3 y DAG. La secuencia de proteína completa del receptor de 5-HT tipo 2A humano tiene el número de acceso de UniProt P28223 (14 de mayo de 2014), del receptor de 5-HT tipo 2B humano tiene el número de acceso de UniProt P41595 (14 de mayo de 2014) y del receptor de 5-HT tipo 2C humano tiene el número de acceso de UniProt P28335 (14 de mayo de 2014).

El término "inhibidor", como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto que inhibe la actividad del receptor de 5-HT. El término inhibidor incluye, sin limitación, antagonistas del receptor de 5-HT, anticuerpos contra el receptor de 5-HT, compuestos que previenen la expresión del receptor de 5-HT y compuestos que conducen a la reducción de los niveles de ARNm o proteína del receptor de 5-HT. En una modalidad preferida, el inhibidor es un antagonista. En el contexto de la presente invención, el término "antagonista" se refiere a un compuesto que se une al receptor de 5-HT y carece de cualquier capacidad sustancial de activar el receptor en sí mismo. De este modo, un antagonista puede prevenir o reducir la activación u ocupación funcional del receptor por un agonista o el ligando natural cuando el agonista está presente. El término "antagonista del receptor de 5-HT", como se usa en la presente descripción, pretende abarcar tanto antagonistas neutros como agonistas inversos. Un "antagonista neutro" es un compuesto que bloquea la acción del agonista pero no tiene efecto sobre la actividad intrínseca o espontánea del receptor. Un "agonista inverso" es capaz de bloquear la acción del agonista en el receptor y atenuar la actividad constitutiva del receptor. El término "antagonista" también incluye antagonistas competitivos, que son fármacos que se unen al mismo sitio que el ligando natural; antagonistas no competitivos que se unen a un sitio diferente en el receptor que el ligando natural; antagonistas reversibles que se unen y liberan del receptor a velocidades determinadas por la cinética receptor-ligando; y antagonistas irreversibles que se unen permanentemente al receptor ya sea mediante la formación de un enlace covalente con el sitio activo o simplemente mediante una unión tan fuerte que la velocidad de disociación es eficazmente cero.

El término "inhibidor de 5-HTR tipo 1", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir la actividad del 5-HTR1 (por ejemplo, mediante la unión a 5-HTR1 y carencia de cualquier capacidad sustancial de activar el receptor en sí mismo; o mediante la prevención o reducción de la expresión del ARNm de 5-HTR1 o la proteína 5-HTR1). Este término incluye inhibidores selectivos para el 5-HTR1 o para cualquiera de los subtipos de 5-HTR1 (5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR1D, 5-HTR1E y 5-HTR1F) e inhibidores no selectivos que también son capaces de actuar como inhibidores de los receptores de 5-HT de otras subfamilias.

El término "inhibidor de 5-HTR tipo 2", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir la actividad del 5-HTR2 (por ejemplo, mediante la unión a 5-HTR2 y carencia de cualquier capacidad sustancial de activar el receptor en sí mismo; o mediante la prevención o reducción de la expresión del ARNm de 5-HTR2 o la proteína 5-HTR2). Este término incluye inhibidores selectivos para el 5-HTR2 o para cualquiera de los subtipos de 5-HTR2

(5-HTR2A, 5-HTR2B y 5-HTR2C) e inhibidores no selectivos que también son capaces de actuar como inhibidores de los receptores de 5-HT de otras subfamilias.

"Apomorfina", como se usa en la presente descripción, se refiere a (6aR)-6-metil-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinolina-10,11-diol, número de CAS 314-19-2. La apomorfina es un antagonista de 5-HTR tipo 1 y tipo 2 (Millan M.J. y otros 2002. J Pharmacol Exp Ther, 303(2):791-804). En una modalidad, el inhibidor es apomorfina.

"Metiotepina" o metitepina, se refiere a 1-metil-4-(8-metilsulfanil-5,6-dihidrobenzo[b][1]benzotiepin-6-il)piperazina, número de CAS 74611-28-2. La metiotepina es un antagonista de 5-HTR tipo 1 y tipo 2 (Kawano H. y otros 2001. Blood, 97(6):1697-1702), particularmente un agonista inverso. En una modalidad, el inhibidor es metiotepina.

"Amperozida", como se usa en la presente descripción, se refiere a 4-[4,4-bis(4-fluorofenil)butil]-N-etilpiperazina-1-carboxamida, número de CAS 75558-90-6. La amperozida es un antagonista de 5-HTR tipo 2 (Svartengren J. y Simonsson P. Pharmacol Toxicol, 1990;66 supl. 1:8-11). En una modalidad, el inhibidor es amperozida.

El término "neoplasia maligna hematológica" se refiere a los tipos de cáncer que afectan la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Las neoplasias malignas hematológicas pueden derivarse de cualquiera de los dos linajes principales de células de la sangre: líneas celulares mieloides y linfoides. La línea celular mieloides normalmente produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos; la línea celular linfoides produce células B, T, NK y plasmáticas. Los linfomas, las leucemias linfocíticas y los mielomas son de la línea linfoides, mientras que la leucemia mielógena aguda y crónica, los síndromes mielodisplásicos y las enfermedades mieloproliferativas son de origen mieloides. Ejemplos ilustrativos no limitantes de neoplasias malignas hematológicas son leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica aguda (AMoL), linfomas de Hodgkin, linfomas no Hodgkin y mielomas.

"Leucemia", como se usa en la presente descripción, se refiere a un tipo de cáncer de la sangre o la médula ósea caracterizado por un aumento anormal de glóbulos blancos inmaduros llamados "blastos". La leucemia es un término amplio que cubre un espectro de enfermedades. A su vez, es parte del grupo aún más amplio de enfermedades que afectan la sangre, la médula ósea y el sistema linfático, todas conocidas como neoplasias malignas hematológicas. Hay cuatro tipos principales de leucemia: Leucemia linfoblástica aguda o ALL; Leucemia mieloides aguda o AML; Leucemia linfocítica crónica o CLL; Leucemia mielógena crónica o CML.

"Leucemia linfoblástica aguda (ALL) o leucemia linfoides aguda" es una forma aguda de leucemia o cáncer de los glóbulos blancos, caracterizada por la producción excesiva de glóbulos blancos cancerosos e inmaduros, conocidos como linfoblastos.

"Leucemia mieloides aguda (AML) o leucemia mielógena aguda o leucemia no linfocítica aguda (ANLL)" es un cáncer de la línea mieloides de células de la sangre, que se caracteriza por el rápido crecimiento de glóbulos blancos anormales (mieloblastos) que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células de la sangre normales. Los síntomas de la AML tienen como causa el reemplazo de la médula ósea normal con células leucémicas, lo que provoca una disminución de los glóbulos rojos, las plaquetas y los glóbulos blancos normales. La combinación de una tinción con mieloperoxidasa o Sudán negro y una tinción inespecífica de esterasa en frotis de sangre y médula ósea son útiles para distinguir la AML de la ALL.

"Leucemia linfocítica crónica (CLL) o leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL)" es un tipo de cáncer que provoca que el cuerpo produzca grandes cantidades de glóbulos blancos (células B linfocitarias).

"Leucemia mielógena crónica (CML)" también conocida como "leucemia granulocítica crónica (CGL)" es un tipo de cáncer que provoca que el cuerpo produzca grandes cantidades de glóbulos blancos (mielocitos). En la CML se encuentra una proliferación de granulocitos maduros (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y sus precursores. Se asocia con una translocación cromosómica característica llamada el cromosoma Filadelfia.

"Muestra", como se usa en la presente descripción, se refiere a una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos.

"Sangre periférica", como se usa en la presente descripción, se refiere a una muestra que comprende los componentes celulares de la sangre, que consisten en glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, que se encuentran dentro del conjunto de la sangre en circulación y no se encuentran secuestrados dentro del sistema linfático, el bazo, el hígado o la médula ósea.

"Célula maligna", como se usa en la presente descripción, es una "célula tumoral" o "célula cancerosa" y se refiere a células que crecen y se dividen a un ritmo acelerado y no regulado.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" incluye cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y

animales de zoológico o mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etcétera.

5 "Inmunocitoquímica" se refiere a una técnica usada para localizar la presencia de una proteína o antígeno específico en las células mediante el uso de un anticuerpo primario específico que se le une, en donde se eliminan la matriz extracelular y otros componentes del estroma, para dejar solamente las células enteras a teñir.

10 El término "disminución del nivel de expresión" se refiere al nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 que es inferior a un valor de referencia. Se considera que el nivel de expresión es inferior a un valor de referencia cuando es al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 100 %, al menos 110 %, al menos 120 %, al menos 130 %, al menos 140 %, al menos 150 % o más, inferior a su valor de referencia.

15 El término "aumento del nivel de expresión" se refiere al nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 que es superior a un valor de referencia. Se considera que los niveles de expresión son superiores a su valor de referencia cuando son al menos 1,5 %, al menos 2 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 100 %, al menos 110 %, al menos 120 %, al menos 130 %, al menos 140 %, al menos 150 % o más, superiores a su valor de referencia.

25 El término "valor de referencia", como se usa en la presente descripción, se refiere a un criterio predeterminado usado como referencia para evaluar los valores o los datos obtenidos de las muestras recolectadas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor mediano; un valor medio; o un valor en comparación con un control o valor inicial particular. Un valor de referencia puede basarse en el valor de una muestra individual, tal como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se evalúa, pero en un punto de tiempo anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como de la población de sujetos del grupo con la misma edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluye o excluye la muestra a evaluar.

35 "Buen pronóstico", como se usa en la presente descripción, significa un desenlace que se consideraría positivo para el paciente y depende del tipo de pronóstico; por ejemplo, un buen pronóstico de supervivencia a 1 año (1YS) significaría que el paciente sobrevivirá durante al menos 1 año. En una modalidad preferida, un buen pronóstico se refiere a una probabilidad de más de 40 % de supervivencia a 5 años después del diagnóstico de la enfermedad.

40 "Mal pronóstico", como se usa en la presente descripción, significa un desenlace que se consideraría negativo para el paciente y depende del tipo de pronóstico; por ejemplo, un mal pronóstico de supervivencia a 1 año significaría que el paciente no sobrevivirá durante al menos 1 año. En una modalidad preferida, el mal pronóstico se refiere a una probabilidad por debajo de 40 % de supervivencia a 5 años después del diagnóstico de la enfermedad.

"Punto de tiempo anterior", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier momento antes de administrar la terapia a un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica.

45 "Terapia eficaz", como se usa en la presente descripción, se refiere a una terapia que conduce a la reducción de los niveles de 5-HTR tipo 1 y/o 5-TR tipo 2 en una muestra del paciente que padece una neoplasia maligna hematológica y está en tratamiento con dicha terapia.

50 "Terapia ineficaz", como se usa en la presente descripción, se refiere a una terapia que no ayuda a reducir el nivel de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra del paciente que padece una neoplasia maligna hematológica y está en tratamiento con dicha terapia.

1- Usos médicos

55 Se describe que los inhibidores de 5-HTR tipo 1 y 5-HTR tipo 2 son terapéuticamente eficaces en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica, preferentemente AML, y que dichos inhibidores no tienen efecto ni en las células de la sangre sanas ni en las células madre hematopoyéticas sanas, por lo tanto se evita la toxicidad en las células normales producida por los tratamientos quimioterapéuticos clásicos.

60 En un primer aspecto, la invención se refiere a la apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso en la prevención y/o tratamiento de una neoplasia maligna hematológica de linaje mielóide.

65 El término "prevención", "que previene" o "prevenir", como se usa en la presente descripción, se refiere a la administración de un inhibidor de acuerdo con la invención o de un medicamento que comprende dicho inhibidor a un sujeto que no se ha diagnosticado como con posibilidad de tener una neoplasia maligna hematológica en el momento de la administración, pero que normalmente se esperaría que desarrolle dicha enfermedad o que esté en mayor riesgo de contraer dicha

enfermedad. La prevención pretende evitar la aparición de dicha enfermedad. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de una enfermedad). La prevención también puede ser parcial, de manera que la aparición de una enfermedad en un sujeto sea menor que la que se habría producido sin la administración del inhibidor de la presente invención. La prevención también se refiere a una menor susceptibilidad a una afección clínica.

5 El término "tratamiento", como se usa en la presente descripción, se refiere a la administración de un inhibidor de acuerdo con la invención o de un medicamento que comprende dicho inhibidor a un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica que incluye la administración en una etapa inicial o temprana de una enfermedad, en donde el objetivo es prevenir o enlentecer (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Los resultados clínicos beneficiosos o deseado
10 incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estable (es decir, no empeora), retraso o enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, mejora o alivio del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), detectable o indetectable. "Tratamiento" también significa prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

15 En una modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor de 5-HTR tipo 1 se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de 5-HTR tipo 1A, tipo 1B, tipo 1D, tipo 1E y tipo 1F; preferentemente es el inhibidor de 5-HTR tipo 1A.

20 En otra modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor de 5-HTR tipo 2 se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de 5-HTR tipo 2A, tipo 2B y tipo 2C; preferentemente se selecciona del inhibidor de 5-HTR tipo 2B y tipo 2C; con mayor preferencia es el inhibidor de 5-HTR tipo 2C.

25 El experto en la técnica conoce cómo determinar la afinidad de una molécula particular por un 5-HTR tipo 1 y/o un 5-HTR tipo 2 y también determinar si esta molécula particular es un inhibidor de dicho receptor. Por ejemplo, la afinidad por 5-HTR de una molécula puede determinarse con el uso de la metodología descrita por Millan y otros (Millan y otros J Pharmacol Exp Ther. 2002;303(2):791-804) (ensayo de unión a radioligandos) Un ensayo para evaluar si un compuesto es un inhibidor de 5-HTR tipo 1 es la determinación del estado de activación de Gi y la medición de la producción de AMPc y la activación de la adenilil ciclasa (Nichols D.E. y Nichols C.E. Chem Rev, 2008; 108(5):1614-41). Un ensayo para evaluar si un compuesto es un inhibidor de 5-HTR tipo 2 es la medición de la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana y la activación de PKC (Nichols D.E. y Nichols C.E. Chem Rev, 2008; 108(5):1614-41). Los ensayos que puede realizar el experto en la técnica para distinguir si el inhibidor de 5-HTR tipo 1 es un inhibidor de 5-HTR tipo 1A, tipo 1B, tipo 1D, tipo 1E o tipo 1F son los ensayos de activación competitiva con agonistas específicos de subtipo. Los ensayos que puede realizar el experto en la técnica para distinguir si el inhibidor de 5-HTR tipo 2 es un inhibidor de 5-HTR tipo 2A, tipo 2B y tipo 2C son los ensayos de activación competitiva con el uso de agonistas específicos de subtipo.

35 En una modalidad del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor de 5-HTR es un inhibidor no selectivo que puede actuar como inhibidor de diferentes tipos de 5-HTR. En otra modalidad del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor de 5-HTR es selectivo para un 5-HTR tipo 1 y/o un 5-HTR tipo 2.

40 Los inhibidores de 5-HTR tipo 1 o tipo 2 pueden ser, entre otros, proteínas, péptidos, ARN de interferencia, oligonucleótidos antisentido o moléculas orgánicas pequeñas.

45 En una modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor de 5-HTR tipo 1 y/o el inhibidor de 5-HTR tipo 2 se selecciona de los compuestos de la Tabla 1 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

TABLA 1: INHIBIDORES DE 5-HTR TIPO 1 Y/O TIPO 2 PARA EL USO DE ACUERDO CON EL QUINTO O SEXTO ASPECTO DE LA INVENCION	
50	Antagonistas de 5-HT1A tales como
	• Metiotepina
	• Apomorfina
55	• BMY 7378
	• Cianopindolol
	• Yodocianopindolol
	• Lecozotán
60	• Metisergida
	• NAN-190
65	• Nebivolol

	• Nefazodona
	• WAY-100,135
5	• WAY-100,635
	• Mefway
	II Antagonistas de 5-HT1B tales como
	• Metiotepina
10	• Alprenolol
	• AR-A000002
	• Asenapina
15	• Cianopindolol
	• GR-127,935
	• Yodocianopindolol
20	• Isamoltano
	• Metergolina
	• Oxprenolol
25	• Pindolol
	• Propranolol
	• SB-216,641
30	• Yohimbina
	• GR-55562
	• SB-224289
35	• SB-236057
	III Antagonistas de 5-HT1D tales como
	• BRL-15572
	• GR-127,935
40	• Ketanserina
	• Metergolina
	• Metiotepina
45	• Rauwolscina
	• Ritanserina
	• Vortioxetina
50	• Ziprasidona
	• SB-714786
	IV Antagonistas de 5-HT2A tales como
55	• Apomorfina
	• Antipsicóticos atípicos, tales como clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, ziprasidona.
	• Aripiprazol
60	• Asenapina
	• Amitriptilina
	• Clomipramina
65	• Ciproheptadina

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	• Eplivanserina
	• Etoperidona
	• Haloperidol
	• Hidroxicina
	• Iloperidona
	• Ketanserina
	• Metisergida
	• Mianserina
	• Mirtazapina
	• Nefazodona
	• Pimavanserina
	• Pizotifeno
	• Ritanserina
	• Trazodona
	• Yohimbina
	• MDL-100907
V	Antagonistas de 5-HT _{2B} tales como
	• Apomorfinina
	• Agomelatina
	• Asenapina
	• BZP
	• Ketanserina
	• Metisergida
	• Ritanserina
	• RS-127,445
	• Tegaserod
	• Yohimbina
	• SB-200646
	• SB-204741
VI	Antagonistas de 5-HT _{2C} tales como
	• Apomorfinina
	• Agomelatina
	• Amitriptilina
	• Asenapina
	• Clomipramina
	• Clozapina
	• Ciproheptadina
	• Dimebolina
	• Eltoprazina
	• Etoperidona
	• Fluoxetina

5	• Haloperidol
	• Iloperidona
	• Ketanserina
	• Lisurida
10	• Metisergida
	• Mianserina
	• Mirtazapina
15	• Nefazodona
	• Olanzapina
	• Paroxetina
20	• Quetiapina
	• Risperidona
	• Ritanserina
25	• Tramadol
	• Trazodona
	• Ziprasidona
30	• SB-242084
	• RS-102221
	VII Otros compuestos, tales como:
35	• (S)-UH-301 ((S)-5-fluoro-8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina) (Moreau y otros, Brain Res. Bull.29, 901-04 (1992))
	• Alprenolol (1-(1-metiletil)amino-3-[2-(2-propenil)-fenoxi]-2-propanol) (Brandstrom y otros, patente de Estados Unidos 3,466,325)
40	• Espiperona (8-[4-(4-fluorofenil)-4-oxobutil]-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-ona (patentes de Estados Unidos 3,155,669 y 3,155,670)
	• Tertatolol (8-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiloxi)-tiocromano) (patente de Estados Unidos 3,960,891)
45	• Propranolol (1-isopropilamino-3-(1-naftaleniloxi)-2-propanol) (Crowther y otros, patente de Estados Unidos 3,337,628)
	• Penbutolol (1-(t-butilamino)-2-hidroxi-3-(2-ciclopentil-fenoxi)propano) (Ruschig y otros, patente de Estados Unidos 3,551,493)
50	• Pindolol (4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-indol), (patente de Estados Unidos 3,471,515)
	• Los compuestos de fórmula I descritos en el documento EP 0687472 A2
	VIII Anticuerpos inhibidores de 5-HTR tipo 1 y/o tipo 2
55	IX Un ARN de interferencia específico para las secuencias de 5-HTR tipo 1 y/o tipo 2
	X Un oligonucleótido antisentido específico para las secuencias de 5-HTR tipo 1 y/o tipo 2
	XI Una ribozima o enzima de ADN específica para las secuencias de 5-HTR tipo 1 y/o tipo 2

60

En una modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor es un antagonista, y con mayor preferencia un antagonista seleccionado del grupo que consiste en apomorfin, metiotepina, amperozida y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El término "antagonista" se ha definido previamente. La actividad del 5-HTR tipo 1 puede determinarse mediante la detección de la disminución de los niveles de AMPc (Williams C. Nat Rev Drug Discovery, 2004;3(2): 125-35) y el aumento de los niveles de fosfo-Akt (Sun MA. y Maino VC. Methods Mol Biol 2011;717:155-69); y la actividad del 5-HTR tipo 2 puede determinarse mediante la detección del aumento de los niveles

65

de IP3 y DAG (Thomsen W., Frazer J. y otros Curr Opin Biotechnol, 2005;16(6):655-65) y también del aumento de los niveles de fosfo-ERK1/2 (Sun MA. y Maino VC. Methods Mol Biol 2011;717:155-69).

5 El término "sales farmacéuticamente aceptables del mismo", como se usa en la presente descripción, se refiere a derivados de los compuestos de la Tabla 1 en donde el compuesto precursor se modifica mediante la producción de sales de ácido o base del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales de álcali u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos seleccionados de 1,2-etanodisulfónico, 2-acetoxibenzoico, 2-hidroxietanosulfónico, acético, ascórbico, bencenosulfónico, benzoico, bicarbónico, carbónico, cítrico, edético, etano disulfónico, etano sulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, glicoliarsanílico, hexilresorcínico, hidrabámico, hidrobromico, clorhídrico, yodhídrico, hidroximaleico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, lauril sulfónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, napsílico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, subacético, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfúrico, tánico, tartárico y toluenosulfónico.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la Tabla 1 pueden sintetizarse por métodos químicos convencionales a partir de un compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido. Generalmente, tales sales pueden prepararse mediante la reacción de las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, son útiles los medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990, p. 1445.

30 En una modalidad del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo inhibidor. Se entiende que el término "anticuerpo inhibidor" significa, de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo que es capaz de unirse al 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2 para provocar la inhibición de la activación de dichos receptores por su ligando natural. Los anticuerpos pueden prepararse con el uso de cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por lo tanto, los anticuerpos policlonales se preparan por inmunización de un animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse con el uso del método descrito por Kohler, Milstein y otros (Nature, 1975, 256: 495). Una vez que se identifican los anticuerpos capaces de unirse al 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2, se seleccionarán los anticuerpos capaces de inhibir la actividad de 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2 con el uso de los ensayos mencionados anteriormente para la determinación de la actividad de 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2. Los anticuerpos adecuados en la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región variable de unión al antígeno y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂", "Fab", Fv, scFv, dímeros y anticuerpos biespecíficos.

40 En otra modalidad del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor es un ARN de interferencia. Como se usa en la presente descripción, el término "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere a moléculas de ARN capaces de silenciar la expresión del gen de 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2 o de cualquier gen necesario para la función de 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2. Con ese fin, los ARNi son típicamente oligonucleótidos bicatenarios que tienen al menos 30 pares de bases de longitud, y con mayor preferencia comprenden aproximadamente 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 o 17 pares de bases de ácido ribonucleico. Varios tipos diferentes de moléculas se han usado de manera eficaz en la tecnología de ARNi, que incluye el ARN de interferencia pequeño (ARNip), en ocasiones conocido como ARN de interferencia corto o ARN silenciador, micro ARN (miARN) que normalmente se diferencia del ARNip porque se procesan a partir de precursores de ARN monocatenarios y muestran ser solo parcialmente complementarios al ARNm diana y ARN en horquilla corto (ARNhc).

50 Los ARN de interferencia pequeños (ARNip) son capaces de inhibir la expresión del gen diana mediante la interferencia por ARN. Los ARNip pueden sintetizarse químicamente o pueden obtenerse mediante transcripción *in vitro*, o pueden sintetizarse *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en un ARN bicatenario de 15 a 40 nucleótidos de longitud y pueden contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos de longitud. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan por degradación postranscripcional o silenciamiento del mensajero diana.

60 El ARNip puede denominarse ARNhc (ARN en horquilla corto) caracterizado porque las cadenas antiparalelas que forman el ARNip se conectan mediante una región de lazo u horquilla. Los ARNip están constituidos por una secuencia antisentido corta (19 a 25 nucleótidos) seguida de un lazo de 5-9 nucleótidos y la cadena sentido. Los ARNhc pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y, más particularmente, retrovirus y bajo el control de promotores tales como el promotor U6 para la ARN polimerasa III.

65 Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm de 5-HTR tipo 1 o tipo 2 o esta secuencia genómica codificante de proteínas. Se entiende que el término "sustancialmente homogéneo" significa que los ARNip tienen una secuencia suficientemente complementaria o similar al ARNm diana de modo que el ARNip es capaz de provocar la

degradación del ARNm mediante interferencia por ARN. Los ARNip adecuados para provocar interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen modificaciones químicamente diferentes, tales como:

- ARNip en los que los enlaces entre nucleótidos son diferentes a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces de fosforotioato.
- 5 – Conjugados de cadenas de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- Modificación de los extremos de las cadenas de ARN, particularmente el extremo 3' mediante la combinación con diferentes grupos hidroxilo funcionales en la posición 2'.
- Nucleótidos modificados con azúcar, tales como radicales O-alquilados en la posición 2', tal como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluororribosa.
- 10 – Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo, 5-bromouracilo y 5-yodouracilo) o bases alquiladas (por ejemplo, 7-metilguanina).

Los ARNip y los ARNhc de la invención pueden obtenerse con el uso de una serie de técnicas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, el ARNip puede sintetizarse químicamente a partir de fosforamiditas de ribonucleósidos protegidos en un sintetizador de ADN/ARN convencional. Alternativamente, el ARNip puede producirse mediante una enzima Dicer recombinante a partir de vectores plasmídicos y virales, donde la región codificante de la cadena o cadenas de ARNip está bajo control operativo de los promotores de la ARN polimerasa III. La RNasa Dicer procesa el ARNhc a ARNip en las células.

20 La región que se toma como base para el diseño del ARNip no es limitante y puede contener una región de secuencia codificante (entre el codón de inicio y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región 5' o 3' no traducida, preferentemente de 25 a 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en la posición 3' con respecto al codón de inicio. Un procedimiento para el diseño de ARNip involucra la identificación del motivo de secuencia AA(N19)TT en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia de interés y la selección de los que exhiben un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo de secuencia, es posible identificar el motivo de secuencia NA(N21) en donde N puede ser cualquier nucleótido.

En otra modalidad del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor de la invención es un oligonucleótido antisentido específico para el 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2, es decir, moléculas cuya secuencia es complementaria al ARNm que codifica el 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2, es decir, complementaria a la cadena que codifica el ADNc. El oligonucleótido antisentido puede ser complementario a una región codificante completa o una región de la misma que incluye tanto la región codificante como las regiones 5' y 3' no traducidas. Los oligonucleótidos antisentido pueden consistir en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos antisentido pueden obtenerse por síntesis química o mediante reacciones de unión enzimática ampliamente conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido puede contener además nucleótidos modificados que aumentan su estabilidad biológica o la estabilidad de los complejos bicatenarios de ADN-ARN formados entre el oligonucleótido antisentido y el polinucleótido diana, tales como derivados de fosforotioato, ácidos nucleicos peptídicos y oligonucleótidos sustituidos con acridina. Los oligonucleótidos modificados que pueden usarse para la preparación de ácidos nucleicos antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetil-citosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5 -carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5 -carboximetil-amino metil uracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5 -metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente con el uso de un vector de expresión en el que se ha clonado el ácido nucleico en orientación antisentido.

Otro grupo de inhibidores que pueden usarse en el quinto o sexto aspecto de la presente invención son los ácidos nucleicos con actividad catalítica conocidos como ribozimas. Las ribozimas comprenden una región catalítica y una segunda región cuya secuencia es complementaria al ácido nucleico diana y confiere especificidad de sustrato a la ribozima. Después de la interacción entre la ribozima y su sustrato por hibridación y acoplamiento entre regiones complementarias del ácido nucleico diana y la ribozima, se produce una activación de la región catalítica que provoca la ruptura intermolecular o intramolecular del ácido nucleico diana. El experto en la técnica conoce ampliamente las consideraciones básicas para el diseño de ribozimas (ver, por ejemplo, Doherty y Doudna (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2001; 30:457-75).

Otros compuestos capaces de inhibir la expresión de 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2 que pueden usarse en el quinto o sexto aspecto de la invención incluyen aptámeros y spiegelmeros. Los aptámeros y los spiegelmeros son ácidos nucleicos D o L monocatenarios o bicatenarios que se unen específicamente a la proteína lo que produce una modificación de la actividad biológica de la proteína. Los aptámeros y spiegelmeros tienen de 15 a 80 nucleótidos de longitud y, preferentemente, de 20 a 50 nucleótidos de longitud.

Los métodos adecuados para determinar si un inhibidor es capaz de disminuir los niveles de ARNm incluyen, sin limitación, ensayos estándar para determinar niveles de expresión de ARNm tales como qPCR, RT-PCR, análisis de protección de

ARN, transferencia Northern, transferencia puntual de ARN, hibridación *in situ*, tecnología de micromatrices, métodos basados en etiquetas tales como el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) que incluye variantes tales como LongSAGE y SuperSAGE, micromatrices, hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), que incluye variantes tales como Flow-FISH, qFISH y FISH de fusión doble (D-FISH), y similares.

Los métodos adecuados para determinar si un inhibidor actúa mediante la disminución de los niveles de proteínas 5-HTR tipo 1 o tipo 2 incluyen la cuantificación por medio de métodos convencionales, por ejemplo, con el uso de anticuerpos con capacidad de unirse específicamente a las proteínas codificadas por el gen (o a fragmentos de las mismas que contienen determinantes antigénicos) y posterior cuantificación de los complejos anticuerpo-antígeno resultantes.

Un inhibidor de la invención puede inhibir la actividad de 5-HTR tipo 1 o tipo 2 en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 %, y todos los intervalos entre 5 % y 100 %. Los métodos adecuados para determinar si un inhibidor actúa mediante la disminución de la actividad de 5-HTR tipo 1 o tipo 2 se han descrito previamente.

En otra modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la invención, el inhibidor es un inhibidor de 5-HTR tipo 1, preferentemente un antagonista.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, la apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es útil para prevenir y/o tratar a un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica de linaje mielóide. En una modalidad preferida de la invención, el sujeto es un mamífero. En una modalidad más preferida de la invención, el sujeto es un ser humano de cualquier raza y sexo. En otra modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia, con mayor preferencia leucemia mielóide aguda (AML).

Como reconoce el experto, la eficacia de un inhibidor de 5-HTR tipo 1 y un inhibidor de 5-HTR tipo 2 en una terapia contra la neoplasia maligna hematológica puede demostrarse mediante el análisis de la respuesta hematológica (medición del número de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas y niveles de hemoglobina y hematocrito), la respuesta citogenética y/o marcadores tumorales serológicos.

Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos para cantidades terapéuticamente eficaces del inhibidor para el uso de acuerdo con la invención pertenece a la experiencia común de los expertos en la técnica. En general, la dosis necesaria para proporcionar un tratamiento eficaz, que puede ajustarse por un experto en la técnica, variará en dependencia de la edad, la salud, el estado físico, el sexo, la dieta, el peso, el grado de alteración del receptor, la frecuencia del tratamiento, la naturaleza y condición de la lesión, la naturaleza y extensión de la afectación o enfermedad, la afección médica del sujeto, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como actividad, eficacia, perfil farmacocinético y toxicológico del compuesto particular usado, si se usa un sistema de suministro de fármacos y si el inhibidor se administra como parte de una combinación de fármacos.

El inhibidor de la invención puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada, tal como, pero sin limitarse a, vía parenteral, oral, tópica, nasal, rectal. En una modalidad particular, el inhibidor descrito en la presente descripción se administra por vía parenteral, por ejemplo, por administración intravenosa, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intramuscular o epidural.

2- Método para la identificación de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica.

Los inventores de la presente invención han descubierto que las células malignas de una neoplasia maligna hematológica, particularmente de AML, expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una cantidad significativamente mayor en comparación con donantes sanos. Por lo tanto, la detección de la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de la sangre puede ser útil para identificar células malignas de una neoplasia maligna hematológica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la identificación de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, dicho método comprende detectar la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en dicha célula.

Como puede conocer un experto en la técnica, la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 también puede detectarse mediante la detección de la expresión de una variante funcionalmente equivalente de dichos receptores.

Se entiende que "variante funcionalmente equivalente" significa todas las proteínas derivadas de la secuencia de 5-HTR tipo 1 o 5-HTR tipo 2 por modificación, inserción y/o delección o uno o más aminoácidos, siempre que la función se mantenga sustancialmente.

La actividad del 5-HTR tipo 1 puede determinarse mediante la detección de la disminución de los niveles de AMPc y el aumento de los niveles de fosfo-Akt; y la actividad del 5-HTR tipo 2 puede determinarse mediante la detección del aumento de los niveles de IP3 y DAG y también el aumento de los niveles de fosfo-ERK1/2.

Preferentemente, las variantes de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 son (i) polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se sustituyen con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho aminoácido sustituido puede estar codificado o no por el código genético, (ii) polipéptidos en los que hay uno o más residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, residuos modificados por unión a sustituyentes, (iii) polipéptidos resultantes del procesamiento alternativo de un ARNm similar, (iv) fragmentos de polipéptidos y/o (v) polipéptidos resultantes de la fusión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 o el polipéptido definido en (i) a (iii) con otro polipéptido, tal como un secuencia líder secretora o una secuencia que se usa para la purificación (por ejemplo, etiqueta de His) o para la detección (por ejemplo, etiqueta de epítipo Sv5). Los fragmentos incluyen polipéptidos generados a través del corte proteolítico (que incluye la proteólisis en múltiples sitios) de una secuencia original. Las variantes pueden modificarse postraduccionalmente o químicamente. Se supone que tales variantes son evidentes para los expertos en la técnica.

Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos y los aminoácidos sustituidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Las variantes se definen de modo que incluyan secuencias polipeptídicas diferentes de la secuencia original, preferentemente diferentes de la secuencia original en menos de 40 % de los residuos por segmento en cuestión, con mayor preferencia diferentes de la secuencia original en menos de 25 % de los residuos por segmento en cuestión, con mayor preferencia diferente de la secuencia original en menos de 10 % de los residuos por segmento en cuestión, con mayor preferencia diferente de la secuencia original en solo algunos residuos por segmento en cuestión y, al mismo tiempo, suficientemente homólogas a la secuencia original para conservar la funcionalidad de la secuencia original. La presente invención incluye secuencias de aminoácidos que son al menos 60 %, 65 %, 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 90 % o 95 % similares o idénticas a la secuencia de aminoácidos original. El grado de identidad entre dos polipéptidos puede determinarse con el uso de algoritmos y métodos informáticos ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente con el uso del algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S. y otros, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y otros, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

El nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos.

Se puede obtener una muestra de una médula ósea mediante aspiración y biopsia con trefina como se conoce en la técnica. Las muestras de sangre pueden obtenerse por métodos convencionales, con el uso de procesos conocidos en el estado de la técnica por el experto en la técnica, tal como la extracción de sangre por medio de punción de una arteria o una vena, normalmente una vena de la parte interna del codo o del dorso de la mano, la muestra de sangre se recolecta en un vial o una jeringa hermética. Los ganglios linfáticos se obtienen por biopsia de la totalidad o parte de un ganglio linfático (biopsia de ganglio linfático excisional o biopsia de ganglio linfático incisional).

La expresión "detectar la expresión" se refiere a detectar la presencia de una célula hematológica en una muestra portadora de un 5-HTR tipo 1 y/o un 5-HTR tipo 2 en su superficie o que expresa el ARNm de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2. Dicha detección puede ser cualitativa o cuantitativa.

En una modalidad, el método para identificar una célula maligna de la presente invención no requiere la determinación del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2.

En otra modalidad, el método para identificar una célula maligna de la presente invención comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2.

La expresión "determinar el nivel de expresión", como se usa en la presente descripción, se refiere a determinar el nivel de expresión de un biomarcador (5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2) y/o el número de células portadoras de este biomarcador en su superficie (es decir, un marcador de superficie celular). Allí, el nivel de expresión se refiere al nivel de ARNm y/o el nivel de proteína y/o el número de células portadoras de un biomarcador en su superficie.

Los métodos para detectar la expresión pueden basarse en la detección del ARNm o proteína de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2, o también pueden basarse en la determinación de los niveles de ARNm o los niveles de proteína y los niveles de variantes de los mismos, en una muestra en su conjunto, en células de una muestra y/o en la fracción no celular de una muestra.

Los métodos para detectar ARNm se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, PCR en tiempo real (rtPCR), tecnologías de transferencia Northern, nanocadena y micromatrices.

A modo de ilustración no limitante, los niveles de expresión se determinan por medio de la cuantificación de los niveles de los ARNm codificados por dichos genes. Estos últimos pueden cuantificarse por medio del uso de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de amplificación de dicho ARNm, tal como electroforesis y tinción, o alternativamente, por medio de transferencia Northern y el uso de sondas adecuadas del ARNm del gen de interés o de su ADNc/ARNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, micromatrices, etcétera. De manera similar, los niveles del ADNc/ARNc correspondiente a dicho

ARNm codificado por el gen marcador también pueden cuantificarse por medio del uso de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del ADNc correspondiente por medio de la transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguido de la síntesis (ARN polimerasa) y amplificación del ARNc complementario a dicho ADNc.

Para normalizar los valores de expresión del ARNm entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras de prueba con la expresión de un ARN de control. Un "ARN de control", como se usa en la presente descripción, se refiere al ARN cuyos niveles de expresión no cambian o cambian solo en cantidades limitadas. Preferentemente, el ARN de control es ARNm derivado de genes constitutivos y que codifican proteínas que se expresan constitutivamente y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Los genes constitutivos preferidos para el uso en la presente invención incluyen proteína ribosomal 18-S, β -2-microglobulina, ubiquitina, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y β -actina.

Alternativamente, también es posible determinar los niveles de expresión de los genes de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 por medio de la determinación de los niveles de expresión de las proteínas codificadas por dichos genes, ya que si la expresión de los genes aumenta, debería producirse un aumento de la cantidad de las proteínas correspondientes y si la expresión de los genes disminuye, debería producirse una disminución de la cantidad de las proteínas correspondientes.

Se puede usar prácticamente cualquier método convencional dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de proteínas. A modo de ilustración no limitante, los niveles de expresión se determinan por medio de anticuerpos con la capacidad de unirse específicamente a la proteína a determinar (o a fragmentos de la misma que contienen los determinantes antigénicos) y la cuantificación posterior de los complejos antígeno-anticuerpo resultantes. Los anticuerpos que se usarán en este tipo de ensayo pueden ser, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. Al mismo tiempo, los anticuerpos pueden o no estar etiquetados. Los ejemplos ilustrativos, pero no exclusivos, de marcadores que pueden usarse incluyen isótopos radioactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores o sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etcétera. Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos que pueden usarse en la presente invención, que usan anticuerpos no etiquetados (anticuerpo primario), anticuerpos etiquetados (anticuerpos secundarios) o antagonistas o agonistas etiquetados de 5-HTR tipo 1 o 2; estas técnicas incluyen transferencia Western o inmunotransferencia, ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (ELISA sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas de detectar y cuantificar las proteínas incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligandos, etcétera.

En una modalidad preferida de la invención, las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se detectan por inmunocitoquímica, preferentemente por inmunofluorescencia.

En una modalidad preferida de la invención, la detección de la expresión o la determinación de los niveles de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se realiza por inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia (IF) es una técnica usada para microscopía óptica con un microscopio de fluorescencia y se usa principalmente en muestras biológicas. Esta técnica usa la especificidad de los anticuerpos por su antígeno para dirigir colorantes fluorescentes a biomoléculas diana específicas dentro de una célula y, por lo tanto, permite la visualización de la distribución de la molécula diana en la muestra. La IF es un ejemplo ampliamente usado de inmunotinción y es un ejemplo específico de inmunohistoquímica (IHC) o inmunocitoquímica (ICC) que usa fluoróforos para visualizar la ubicación de los anticuerpos. La IF puede usarse en secciones de tejido, líneas celulares cultivadas o células individuales. La IF puede usarse en combinación con otros métodos de tinción fluorescente sin anticuerpos, por ejemplo, el uso de DAPI para etiquetar el ADN. Se pueden usar varios diseños de microscopios para el análisis de muestras por IF; el más simple es el microscopio de epifluorescencia, y el microscopio confocal también se usa ampliamente. También pueden usarse varios diseños de microscopios de superresolución que son capaces de una resolución mucho mayor. En una modalidad preferida, la identificación de una célula maligna se realiza por citometría de flujo, que es una tecnología biofísica basada en láser empleada en el recuento de células, la clasificación de células y la detección de biomarcadores mediante la suspensión de las células en una corriente de fluido y su paso por un detector electrónico.

De acuerdo con la invención, la detección de la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos es útil para la identificación de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica.

En una modalidad preferida, la muestra de sangre es sangre periférica.

En otra modalidad preferida, el 5-HTR tipo 1 es 5-HTR 1A y el 5-HTR tipo 2 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 2A, 5-HTR 2B y 5-HTR 2C. En una modalidad más preferida, el 5-HTR tipo 2 es 5-HTR 2C.

En otra modalidad preferida, el método de la invención para identificar una célula maligna comprende detectar la expresión de 5-HTR1A y 5-HTR2C.

En una modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia, con mayor preferencia leucemia mieloide aguda.

Todos los términos y modalidades descritos previamente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

3- Método para diagnosticar una neoplasia maligna hematológica

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar una neoplasia maligna hematológica en un sujeto que comprende identificar células malignas mediante un método de acuerdo con la invención, particularmente la identificación de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, dicho método comprende detectar la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en dicha célula.

El diagnóstico, como se usa en la presente descripción, se refiere tanto al proceso de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir, el procedimiento diagnóstico, como a la opinión alcanzada mediante este proceso, es decir, la opinión diagnóstica. Como tal, también puede considerarse como un intento de clasificar la afección de un individuo en categorías separadas y distintas que permitan tomar decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico. Como entenderán los expertos en la técnica, no es necesario que el diagnóstico de una neoplasia maligna hematológica sea correcto para el 100 % de los sujetos a diagnosticar o evaluar, aunque se prefiere que lo sea. El término, sin embargo, requiere que una porción estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como que padece una neoplasia maligna hematológica. El experto en la técnica puede determinar si un sujeto es estadísticamente significativo sin más preámbulos con el uso de varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etcétera. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %. Los valores p son, preferentemente, 0,05, 0,01, 0,005 o inferiores.

En una modalidad preferida, el método para diagnosticar una neoplasia maligna hematológica en un sujeto comprende:

- (a) determinar los niveles de las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
- (b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

en donde los niveles aumentados de células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto padece una neoplasia maligna hematológica.

El valor de referencia se obtiene de una colección de muestras formada preferentemente por una mezcla de la muestra a analizar de individuos normales no afectados por una neoplasia maligna hematológica. Dicho valor de referencia puede determinarse por medio de técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante la determinación de la media de los niveles de proteínas 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 medidos en una muestra tomada de sujetos sanos. El valor de referencia también puede obtenerse de las proteínas expresadas constitutivamente tomadas del mismo sujeto a analizar.

En una modalidad preferida, la muestra de sangre es sangre periférica. En otra modalidad preferida, el 5-HTR tipo 1 es 5-HTR 1A y el 5-HTR tipo 2 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 2A, 5-HTR 2B y 5-HTR 2C. En una modalidad más preferida, el 5-HTR tipo 2 es 5-HTR 2C.

En otra modalidad preferida, el método para diagnosticar una neoplasia maligna hematológica de la invención comprende detectar la expresión de 5-HTR 1A y 5-HTR 2C.

En una modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia, con mayor preferencia leucemia mieloide aguda.

En otra modalidad preferida, las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se detectan por inmunocitoquímica, preferentemente por inmunofluorescencia, con mayor preferencia por citometría de flujo.

Todos los términos y modalidades descritos previamente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

4- Método para el aislamiento de una célula maligna.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el aislamiento de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, dicho método comprende detectar la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en dicha célula y aislar dicha célula que expresa dicho 5-HTR.

El término "aislar", como se usa en la presente descripción, significa identificar y separar o eliminar una célula maligna de los componentes restantes presentes en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos.

5 En una modalidad preferida, la muestra de sangre es sangre periférica.

En otra modalidad preferida, el 5-HTR tipo 1 es 5-HTR 1A y el 5-HTR tipo 2 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 2A, 5-HTR 2B y 5-HTR 2C. En una modalidad más preferida, el 5-HTR tipo 2 es 5-HTR 2C.

10 En otra modalidad preferida, el método de la invención para aislar una célula maligna comprende detectar la expresión de 5-HTR 1A y 5-HTR 2C.

En una modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia, con mayor preferencia leucemia mieloide aguda.

15 En otra modalidad preferida, las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se detectan por inmunocitoquímica, preferentemente por inmunofluorescencia, con mayor preferencia por citometría de flujo.

Todos los términos y modalidades descritos previamente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

20 5- Método para determinar el pronóstico

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica que comprende:

25 (a) determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
(b) comparar dicho nivel con un valor de referencia

30 en donde una disminución del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto muestra un buen pronóstico o en donde un aumento del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto muestra un mal pronóstico.

35 En una modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia y con mayor preferencia leucemia mieloide aguda.

El término "determinar", como se usa en la presente descripción, se refiere a la determinación de cualquier parámetro que pueda ser útil para determinar la evolución de un paciente. Como entenderán los expertos en la técnica, no es necesario que la predicción del desenlace sea correcta para el 100 % de los sujetos a diagnosticar o evaluar, aunque se prefiere que lo sea. Sin embargo, el término requiere que una porción estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como que tiene una mayor probabilidad de tener un desenlace dado. El experto en la técnica puede determinar si un sujeto es estadísticamente significativo sin más preámbulos con el uso de varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etcétera. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al 90 % o al menos 95 %. Los valores p son, preferentemente, 0,05, 0,01, 0,005 o inferiores.

50 El término "pronóstico", como se usa en la presente descripción, significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción del desarrollo o desenlace probable de una enfermedad, que incluye, pero sin limitarse a, la predicción de la duración de la supervivencia global (OS), la supervivencia a 1 año (1YS), la respuesta a la terapia (RT), la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia libre de eventos. Como entenderán los expertos en la técnica, no es necesario que la predicción sea correcta para el 100 % de los sujetos a diagnosticar o evaluar, aunque se prefiere que lo sea. Sin embargo, el término requiere que una porción estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como que tiene una mayor probabilidad de tener un desenlace dado. El experto en la técnica puede determinar si un sujeto es estadísticamente significativo sin más preámbulos con el uso de varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etcétera. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %. Los valores p son, preferentemente, 0,05, 0,02, 0,01 o inferiores.

60 Los criterios estándar (Miller y otros *Cancer*, 1981; 47(1): 207-14) pueden usarse en la presente descripción para evaluar el desenlace clínico de un paciente en respuesta a una terapia. Cualquier parámetro que se acepte ampliamente para determinar la eficacia de los tratamientos puede usarse para determinar el desenlace clínico de un paciente en respuesta a un tratamiento e incluye, sin limitación:

- progresión libre de enfermedad que, como se usa en la presente descripción, describe la proporción de sujetos en remisión completa que no han tenido recurrencia de la enfermedad durante el período de estudio.
- supervivencia libre de enfermedad (DFS), como se usa en la presente descripción, se entiende como el período de tiempo después del tratamiento de una enfermedad durante el cual un sujeto sobrevive sin signos de la enfermedad.
- 5 • respuesta objetiva que, como se usa en la presente invención, describe la proporción de sujetos tratados en los que se observa una respuesta completa o parcial.
- control del tumor que, como se usa en la presente invención, se refiere a la proporción de sujetos tratados en los que se observa respuesta completa, respuesta parcial, respuesta menor o enfermedad estable \geq 6 meses.
- 10 • supervivencia libre de progresión que, como se usa en la presente descripción, se define como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la primera medición del crecimiento del cáncer.
- Tiempo hasta la progresión, como se usa en la presente descripción, se refiere al tiempo después de tratar una enfermedad hasta que la enfermedad comienza a empeorar. El término "progresión" se ha definido previamente.
- supervivencia libre de progresión a seis meses que, como se usa en la presente descripción, se refiere al porcentaje de sujetos en donde están libres de progresión en los primeros seis meses después del inicio de la terapia.
- 15 • Supervivencia general (OS) que, como se usa en la presente descripción, se define como el porcentaje de pacientes que sobreviven después del diagnóstico de un cáncer primario.
- mediana de supervivencia que, como se usa en la presente descripción, se refiere al tiempo en el cual la mitad de los sujetos inscritos en el estudio todavía están vivos, y
- 20 • Estratificación del riesgo citogenético, que, como se usa en la presente descripción, se refiere a la probabilidad de supervivencia a 5 años en base a la estructura cromosómica de las células leucémicas.

En una modalidad preferida, el desenlace clínico de un paciente se mide mediante la determinación de la estratificación del riesgo citogenético.

25 La primera etapa del método *in vitro* para determinar el pronóstico comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos. La determinación del nivel de expresión de un biomarcador, se refiere a la determinación del nivel de expresión de un biomarcador y/o el número de células portadoras de un biomarcador en su superficie (es decir, un marcador de superficie celular). Allí, el nivel de expresión se refiere al nivel de ARNm y/o el nivel de proteína y/o el número de células portadoras de un biomarcador en su superficie. Previamente se han descrito ejemplos de métodos para determinar el nivel de expresión de un biomarcador.

30 En otra modalidad preferida, el método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 por medición del nivel de ARNm codificado por los genes de 5-HTR tipo 1 y/o los genes de 5-HTR tipo 2, o de variantes de los mismos. En otra modalidad preferida, el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina por medición del nivel de proteínas 5-HTR tipo 1 y/o proteínas 5-HTR tipo 2, o de variantes de las mismas. En una modalidad más preferida, el nivel de expresión de ARNm se determina por PCR. En otra modalidad preferida, el nivel de expresión de proteínas o de variantes de las mismas se determina por transferencia Western o inmunocitoquímica. En una modalidad más preferida, el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina por PCR semicuantitativa.

En otra modalidad preferida, la muestra de sangre es sangre periférica.

45 En una modalidad preferida, el método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica comprende determinar el nivel de 5-HTR tipo 1. En una modalidad más preferida, el 5-HTR tipo 1 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 1A y 5-HTR-1B.

En una modalidad preferida, el método comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR 1A y 5-HTR-1B.

50 En una segunda etapa el método *in vitro* para determinar el pronóstico comprende comparar el nivel de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con un valor de referencia. Dicha comparación permite concluir si el sujeto muestra un pronóstico bueno o malo.

55 En una modalidad preferida, el pronóstico determinado por el método *in vitro* de la invención es la probabilidad de supervivencia a 5 años.

Todos los términos y modalidades descritos previamente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

60 6- Método para monitorizar el efecto de una terapia.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia en un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica y que se trata con dicha terapia que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
 b) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior

5 en donde una disminución del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al nivel determinado en una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior es indicativo de que la terapia es eficaz o en donde un aumento del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al nivel determinado en una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior es indicativo de que la terapia es ineficaz.

10 En una modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia y con mayor preferencia leucemia mieloide aguda.

15 Como entiende un experto en la técnica, la terapia se dirige al tratamiento de neoplasias malignas hematológicas. A modo de ejemplo no limitante, puede usarse una combinación de citarabina (ara-C) y daunorrubicina (daunomicina) o idarrubicina, fludarabina o topotecán. En otra modalidad, la terapia es un inhibidor de 5-HTR tipo 1 o un inhibidor de 5-HTR tipo 2.

20 Los métodos para determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se han descrito previamente en detalle.

25 En una modalidad preferida, el método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia en un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica consiste en determinar el nivel de 5-HTR tipo 1. En una modalidad más preferida, el 5-HTR tipo 1 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 1A y 5-HTR-1B.

En una modalidad preferida, el método comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR 1A y 5-HTR-1B.

En otra modalidad preferida, la muestra de sangre es sangre periférica.

30 En otra modalidad preferida, el método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia en un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica consiste en determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 por medición del nivel de ARNm codificado por los genes de 5-HTR tipo 1 y/o los genes de 5-HTR tipo 2, o de variantes de los mismos. En otra modalidad preferida, el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina por medición del nivel de proteínas 5-HTR tipo 1 y/o proteínas 5-HTR tipo 2, o de variantes de las mismas.

35 En una modalidad más preferida, el nivel de expresión de ARNm se determina por PCR. En otra modalidad preferida, el nivel de expresión de proteínas o de variantes de las mismas se determina por transferencia Western o inmunocitoquímica. En una modalidad más preferida, el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina por PCR semicuantitativa.

40 Todos los términos y modalidades descritos previamente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

7- Método para diseñar una terapia personalizada.

45 En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con una neoplasia maligna hematológica que comprende

- a) determinar los niveles de las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
 b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

50 en donde los niveles aumentados de células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto debe tratarse con un inhibidor de 5-HTR tipo 1 y/o un inhibidor de 5-HTR tipo 2.

55 El diseño de una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con una neoplasia maligna hematológica se entiende como una decisión, en base a la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2, de administrar según corresponda un inhibidor de 5 HTR tipo 1 y/o un inhibidor de 5-HTR tipo 2.

60 En una modalidad preferida, el inhibidor de 5-HTR se selecciona de un compuesto de la Tabla 1 o una sal farmacéuticamente del mismo.

En una modalidad más preferida, el inhibidor de 5-HTR se selecciona del grupo que consiste en apomorfina, metiotepina, amperozida y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65

En una modalidad preferida, el método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada en un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1. En una modalidad más preferida, el 5-HTR tipo 1 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 1A y 5-HTR-1B.

5 En una modalidad preferida, el método comprende determinar el nivel de expresión de 5-HTR 1A y 5-HTR 1B.

En otra modalidad preferida, la neoplasia maligna hematológica es leucemia, y con mayor preferencia leucemia mieloide aguda.

10 En otra modalidad preferida, la muestra de sangre es sangre periférica.

En otra modalidad preferida, el método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia en un sujeto que padece una neoplasia maligna hematológica consiste en determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 por medición del nivel de ARNm codificado por los genes de 5-HTR tipo 1 y/o los genes de 5-HTR tipo 2, o de variantes de los mismos. En otra modalidad preferida, el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina por medición del nivel de proteínas 5-HTR tipo 1 y/o proteínas 5-HTR tipo 2, o de variantes de las mismas. En una modalidad más preferida, el nivel de expresión de ARNm se determina por PCR. En otra modalidad preferida, el nivel de expresión de proteínas o de variantes de las mismas se determina por transferencia Western o inmunocitoquímica. En una modalidad más preferida, el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 se determina por PCR semicuantitativa.

20 Todos los términos y modalidades descritos previamente son igualmente aplicables a este aspecto de la invención.

La invención se describirá por medio de los siguientes ejemplos que deben considerarse simplemente ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

25

Ejemplos

Material y métodos

30 Ejemplo 1. Los antagonistas del receptor de serotonina (5HTR) tipo 1 y 2 tienen un efecto citotóxico en líneas celulares de AML.

Para evaluar el efecto antileucémico de los antagonistas de 5HTR, las líneas celulares de AML (leucemia mieloide aguda) HL-60 (Collins, Gallo y otros Nature. 1977;270(5635):347-9), MonoMac-1 (Steube, Teepe y otros Leuk Res. 1997;21(4):327-35), KG-1 (Koeffler y Golde. Science. 1978;200(4346):1153-4) y Kasumi-1 (Asou, Tashiro y otros Blood. 1991;77(9):2031-6) se trataron con el antagonista general de 5HTR apomorfina (núm. de CAS 314-19-2) a diferentes dosis durante 72 h. Se sembró un millón de células por ml en medio RPMI completo complementado con suero bovino fetal al 10 % en una placa de 96 pocillos. La concentración usada para el tratamiento con apomorfina fue de 0,1, 1 y 10 μ M. Como se muestra en la Figura 1, se detectó una reducción en la viabilidad celular en forma de respuesta a la dosis en todas las líneas celulares de AML evaluadas.

La familia de 5HTR humanos está compuesta por 7 subtipos (de 1 a 7) de receptores (Nichols y Nichols. Chem Rev 2008, 108:16414-41). Las líneas celulares de AML HL-60, KG-1, MonoMac-1 y Kasumi-1 se incubaron con antagonistas de 5HTR específicos de subtipo: Apomorfina (tipo 1, 2 y 5), Metiotepina (tipo 1 y 2) (núm. de CAS 74611-28-2), Amperozida (tipo 2) (núm. de CAS 75558-90-6), GR113808 (tipo 4) (núm. de CAS 144625-51-4). A las 72 h después del tratamiento, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo. Las células se tiñeron con 7-AAD (núm. de CAS 7240-37-1) y Hoechst 33342 (núm. de CAS 23491-52-3). Las células viables se identificaron por exclusión de tinción con 7-AAD y la presencia de tinción positiva con Hoechst. Los recuentos celulares se midieron por volumen. Solo apomorfina, metiotepina y amperozida indujeron muerte celular en las líneas celulares de AML (Figura 2); por lo tanto, la inhibición de 5HTR tipo 1 y 2 tiene efecto citotóxico en las células de AML. De hecho, el efecto antileucémico se invirtió en presencia de un agonista competitivo tal como el ligando natural 5-HT (núm. de CAS 153-98-0) o 5-CT (núm. de CAS 74885-72-6).

55 Ejemplo 2. Los antagonistas del receptor de serotonina (5HTR) tipo 1 y 2 tienen un efecto citotóxico en muestras de pacientes con AML primaria.

Las muestras de pacientes con AML primaria se trataron con antagonistas de los subtipos de HTR 1 y 2 durante 24 y 72 h a 0,1, 1 y 10 μ M. Se sembraron quinientas mil células por ml en IMDM complementado con insulina, transferrina, albúmina de suero bovino, IL3 y aminoácidos no esenciales. La viabilidad celular se midió por citometría de flujo como se describió anteriormente. De manera similar a las líneas celulares de AML, el tratamiento tanto con apomorfina como con metiotepina indujo la muerte celular en los blastos de AML primaria en forma de respuesta a la dosis (Figuras 3 y 4).

65 Al igual que el sistema hematopoyético normal, se cree que la AML está organizada como una jerarquía de clases de células distintas y funcionalmente heterogéneas que, en última instancia, se encuentra sustentada por un pequeño número de células madre leucémicas (LSC) con capacidad de autorrenovación aumentada, capacidad de diferenciación afectada y resistencia a los fármacos aumentada (Bonnet y Dick Nat Med. 1997;3(7):730-7). La población de LSC se encuentra enriquecida dentro de la población de blastos de AML CD34+CD38-. La apomorfina y la metiotepina redujeron la viabilidad

celular de la población de blastos enriquecida en LSC más primitiva (Figura 3 y 4) identificada por citometría de flujo en base a la presencia de CD34 y la ausencia de CD38. De hecho, la reducción en la fracción primitiva fue significativamente mayor que en la población general; por lo tanto, los antagonistas de 5HTR afectan selectivamente a las LSC.

5 Ejemplo 3. Los antagonistas de 5HTR indujeron la diferenciación en líneas celulares de AML

Las líneas celulares de AML HL-60, KG-1, MonoMac-1 y Kasumi-1 se trataron con apomorfina y metiotepina a diferentes concentraciones durante 72 h como se describió anteriormente. La expresión de marcadores de superficie asociados a la diferenciación se midió por citometría de flujo. En todas las líneas celulares de AML, la presencia de antagonistas de 5HTR indujo la expresión de CD11c, CD11b y CD14 (Figura 5).

De manera similar, la apomorfina y la metiotepina indujeron la regulación positiva de los marcadores mieloides en muestras de pacientes con AML primaria (Figura 6 y 7).

15 Ejemplo 4. Los antagonistas de 5HTR no tienen efecto ni en las células de la sangre sanas ni en las células madre/progenitoras hematopoyéticas sanas

Se aislaron células de sangre periférica de donantes sanos y se trataron con antagonistas de 5HTR con el uso de las mismas condiciones que para las muestras de pacientes con AML primaria. A diferencia de estas últimas, las células de la sangre sanas no se afectan tras el tratamiento con apomorfina o metiotepina (Figura 8).

Para estudiar el efecto del tratamiento con antagonistas de 5HTR en células madre/progenitoras hematopoyéticas, se aislaron células mononucleares de muestras de sangre del cordón umbilical de donantes sanos y se cultivó la fracción negativa para linaje en presencia de apomorfina. A diferencia de las células de AML, las células madre/progenitoras hematopoyéticas primarias no se afectan tras el tratamiento. No se observaron cambios significativos en la viabilidad celular en la frecuencia de cada población o el número absoluto de células (Figura 9).

30 Ejemplo 5. Los antagonistas de 5HTR reducen la capacidad clonogénica de los blastos de AML mientras no atacan las células madre hematopoyéticas sanas

Teniendo en cuenta que los antagonistas de 5HTR redujeron la viabilidad celular de la población de AML más primitiva, se investigó la capacidad clonogénica tras el tratamiento. Las muestras de pacientes con AML primaria se cultivaron en presencia de apomorfina y metiotepina durante 18 h y se sembraron en un medio semisólido de metilcelulosa durante 14 días en presencia de citocinas instructivas a una concentración de cincuenta mil células por ml. Las colonias se contaron por microscopía óptica en base a la morfología y la celularidad. Como se muestra en la Figura 10, ambos antagonistas de 5HTR redujeron la capacidad clonogénica de las muestras de AML primaria medida por el número de CFU-B obtenidas.

A continuación, las células de la sangre del cordón umbilical empobrecidas en linaje se trataron con apomorfina o metiotepina como se hizo anteriormente para las células de AML. 14 días después de la siembra, las colonias se contaron por microscopía óptica en base a la morfología y la celularidad. Ninguno de los antagonistas de 5HTR afectó la capacidad clonogénica de las células madre/progenitoras hematopoyéticas sanas, medida por el número total de colonias o la frecuencia de cada subtipo de CFU (Figura 11).

45 Ejemplo 6. Los 5HTR se expresan de manera diferencial en muestras de pacientes con AML

Para determinar si los 5HTR se expresan de manera diferencial en muestras de pacientes con AML frente a muestras de sangre sanas se estudió su expresión, por citometría de flujo, en muestras de sangre periférica de pacientes con AML primaria, muestras de sangre periférica de donantes sanos y líneas celulares de AML. Como se muestra en la Figura 12, las células de sangre periférica de pacientes con AML primaria expresaron los 5HTR en una cantidad significativamente mayor en comparación con los donantes sanos.

Ejemplo 7. La expresión de los 5HTR se correlaciona con el desenlace clínico en pacientes con AML

Los niveles de expresión de ARNm de 5HTR1A y 5HTR1B se determinaron en muestras de pacientes con AML primaria y se correlacionaron con el desenlace clínico. Se definieron dos grupos de pacientes en base al riesgo citogenético: bueno (grupo molecular favorable) y malo (grupo molecular desfavorable). En ambos casos, hubo una asociación entre la alta expresión del ARNm de cada 5HTR y un peor desenlace clínico (Figura 13).

60 Ejemplo 8. Los antagonistas del receptor de serotonina (5HTR) reducen la capacidad clonogénica de las células de AML en CFU secundarias

Para analizar la capacidad clonogénica *in vitro* las CFU-B primarias equivalentes tratadas con apomorfina, metiotepina y vehículo de pacientes con AML (como se explica en el ejemplo 5) se sembraron en serie en un medio semisólido de metilcelulosa durante 14 días en presencia de citocinas instructivas a una concentración de cincuenta mil células por ml pero en ausencia de cualquier fármaco. Las colonias se contaron por microscopía óptica en base a la morfología y la celularidad. Como se muestra en la Figura 14, se observó una reducción en la capacidad clonogénica tras el tratamiento.

Ejemplo 9. El tratamiento con antagonistas de los receptores de serotonina redujo la carga de AML en un modelo de xenotrasplante *in vivo* en ratón, sin atacar las células de la sangre sanas

5 Las células de leucemia residen principalmente en el nicho de la médula ósea, donde el compartimento de células estromales proporciona una señalización paracrina que media fuertemente su supervivencia y proliferación y las protege de la apoptosis (). En consecuencia, ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG) inmunodeficientes acondicionados (Sanchez y otros Leukemia. 2009 Nov;23(11):2109-17) recibieron un trasplante de células de AML humanas y se dejaron durante 7 días para que se estableciera la leucemia. Posteriormente, los ratones se trataron cada 2 días con un total de 10 4 dosis intraperitoneales de apomorfina (5 mg/kg de peso) (Schmidt y otros J Neurosci. 1982 Mar;2(3):376-80) o metiotepina (0,1 mg/kg de peso) (Ginawi y otros J Physiol Pharmacol. 2004 Jun;55(2):357-69) durante 7 días. Ambos antagonistas de 5HTR1 produjeron una reducción significativa en la carga de AML en la médula ósea (BM) en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 15).

15 Las células iniciadoras de la leucemia (LIC) o LSC son responsables del injerto de células de AML en modelos de xenoinjerto en ratón y se cree que inician y mantienen la enfermedad en seres humanos. Las muestras de pacientes con AML primaria se trataron *ex vivo* con antagonistas de 5HTR durante 18 h y se trasplantaron a ratones NSG inmunodeficientes acondicionados. Ocho semanas después del trasplante, se analizó la médula ósea murina para detectar la presencia de células de AML humanas. Como se muestra en la Figura 16, las células de AML tratadas con apomorfina y metiotepina demostraron menos alojamiento y capacidad de injerto en comparación con las células de AML 20 tratadas con vehículo. Curiosamente, se observó un efecto insignificante en la capacidad de regeneración hematopoyética normal de las células de UCB empobrecidas en linaje después del tratamiento con apomorfina y metiotepina (Figura 16).

25 Para analizar la capacidad de autorrenovación *in vivo* restante en las muestras injertadas, se realizaron trasplantes secundarios. Se detectó menos de 35 % de células de AML en ratones inyectados con células tratadas con apomorfina o metiotepina (Figura 17). Sin embargo, las células madre hematopoyéticas sanas conservaron su capacidad de autorrenovación y diferenciación tras el tratamiento, como lo demuestra su potencial de regeneración en trasplantes secundarios (Figura 17). Por otra parte, la capacidad clonogénica de las muestras injertadas se redujo significativamente en las células de AML tratadas con antagonistas de 5HTR1 como se midió mediante ensayos de CFU. Curiosamente, se observa poco efecto en HSC sanas injertadas (Figura 17). 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso en la prevención y/o tratamiento de una neoplasia maligna hematológica de linaje mielóide.
2. Apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la neoplasia maligna hematológica es leucemia.
- 10 3. Apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la neoplasia maligna hematológica de linaje mielóide se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielóide aguda (AML), síndromes mielodisplásicos, leucemia mielógena crónica (CML) y leucemia monocítica aguda (AMoL).
- 15 4. Apomorfina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la neoplasia maligna hematológica de linaje mielóide es leucemia mielóide aguda (AML).
- 20 5. Un método *in vitro* para la identificación o el aislamiento de una célula maligna de una neoplasia maligna hematológica en una muestra seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, dicho método comprende detectar la expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en dicha célula, particularmente el 5-HTR tipo 1 es 5-HTR 1A, el método de aislamiento comprende además aislar dicha célula que expresa dicho 5-HTR.
- 25 6. Un método *in vitro* para diagnosticar una neoplasia maligna hematológica en un sujeto que comprende identificar células malignas mediante un método de acuerdo con la reivindicación 5.
- 30 7. Un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto que padece de una neoplasia maligna hematológica que comprende:
 - (a) determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
 - (b) comparar dicho nivel con un valor de referencia

en donde una disminución del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto muestra un buen pronóstico o en donde un aumento del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto muestra un mal pronóstico.
- 35 8. Un método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia en un sujeto que padece de una neoplasia maligna hematológica y que se trata con dicha terapia que comprende:
 - a) determinar el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
 - b) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en células de una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior

en donde una disminución del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al nivel determinado en una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior es indicativo de que la terapia es eficaz o en donde un aumento del nivel de expresión de 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al nivel determinado en una muestra de dicho sujeto en un punto de tiempo anterior es indicativo de que la terapia es ineficaz.
- 40 9. Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto diagnosticado con una neoplasia maligna hematológica que comprende
 - a) determinar los niveles de las células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 en una muestra de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre y ganglios linfáticos, y
 - b) comparar dichos niveles con un valor de referencia

en donde los niveles aumentados de células que expresan 5-HTR tipo 1 y/o 5-HTR tipo 2 con respecto al valor de referencia son indicativos de que el sujeto debe tratarse con un inhibidor de 5-HTR tipo 1 y/o un inhibidor de 5-HTR tipo 2.
- 45 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde se determina el nivel de expresión de 5-HTR tipo 1, particularmente el 5-HTR tipo 1 se selecciona del grupo que consiste en 5-HTR 1A y 5-HTR 1B.
- 50 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la neoplasia maligna hematológica es leucemia, particularmente leucemia mielóide aguda.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde la muestra de sangre es sangre periférica.

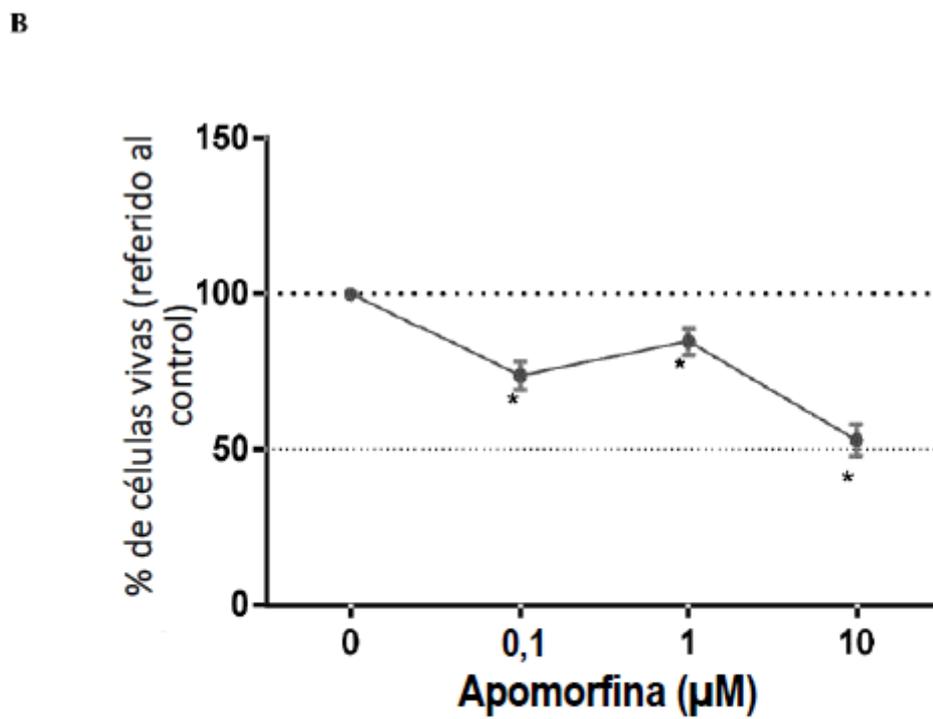
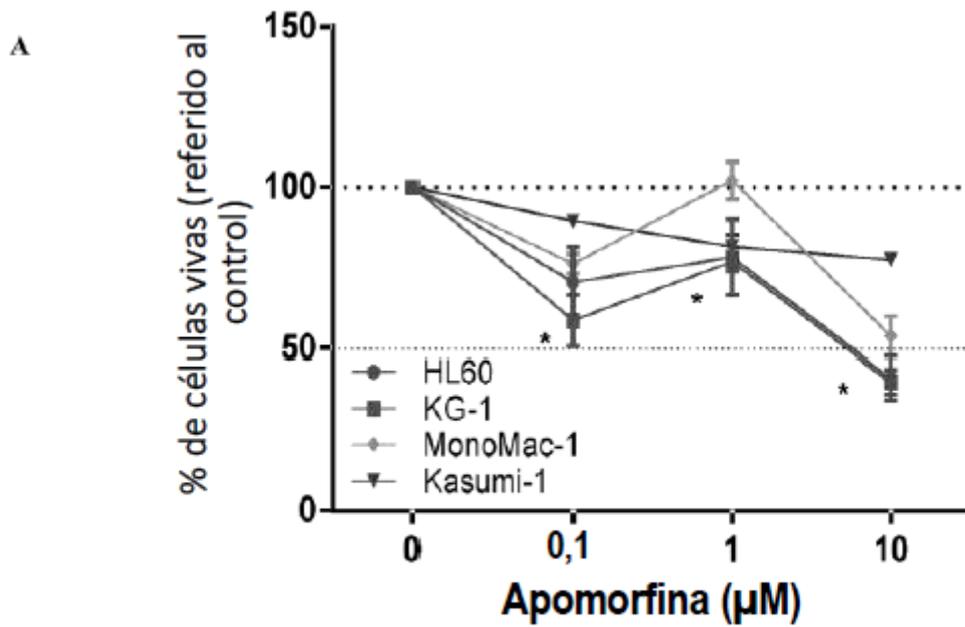
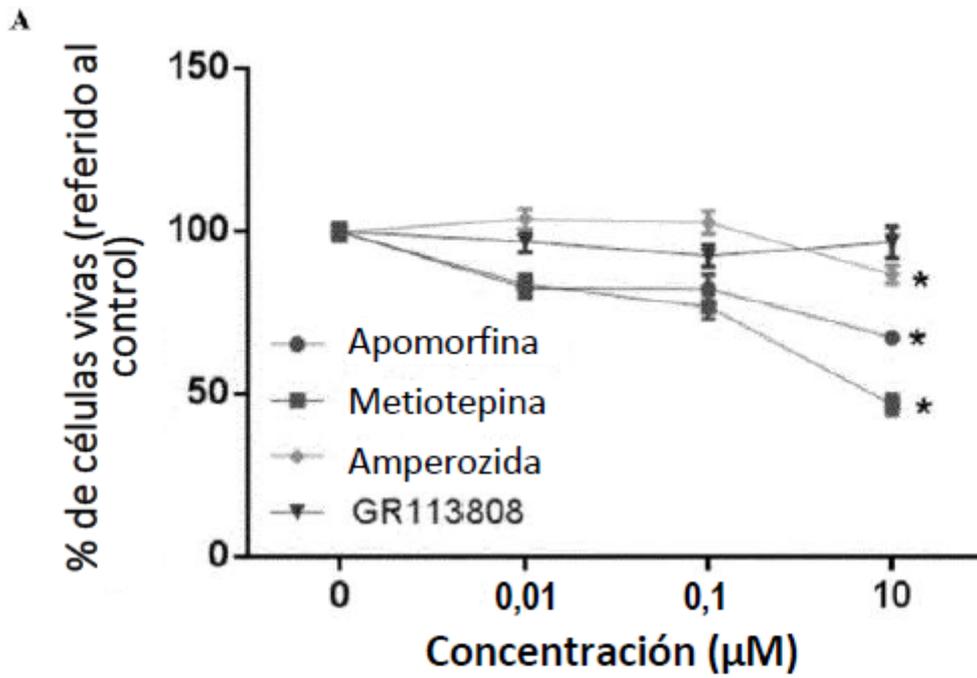


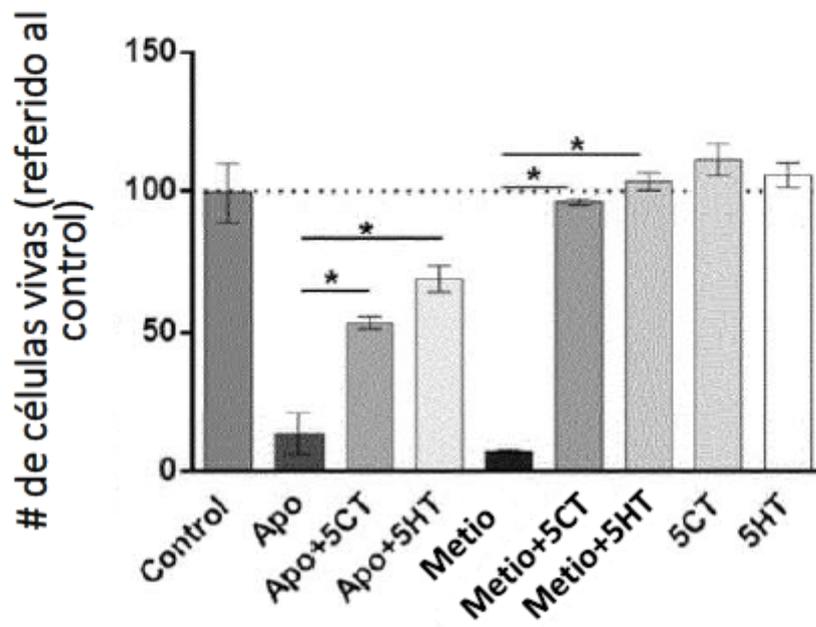
FIGURA 1



Compuesto	Efecto Biológico	Diana
Apomorfina	antagonista	5-HTR 1/2/5
Metiotepina	antagonista	5-HTR 1/2
Amperozida	antagonista	5-HTR 2
GR113808	antagonista	5-HTR 4

FIGURA 2

B



Compuesto	Efecto Biológico	Diana
5-HT	agonista	5-HTR
5-CT	agonista	5-HTR 1/2

FIGURA 2 (Cont.)

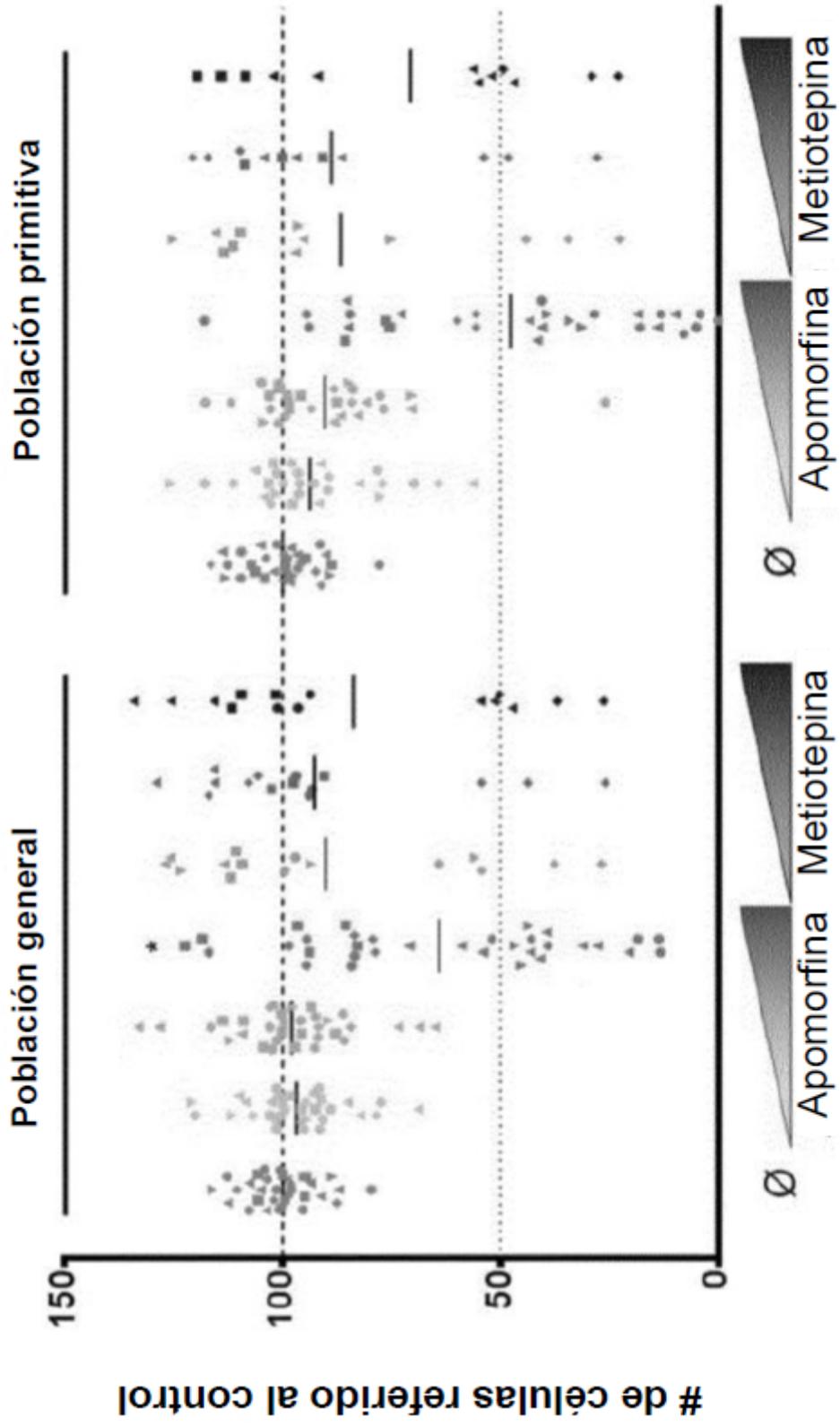


FIGURA 3

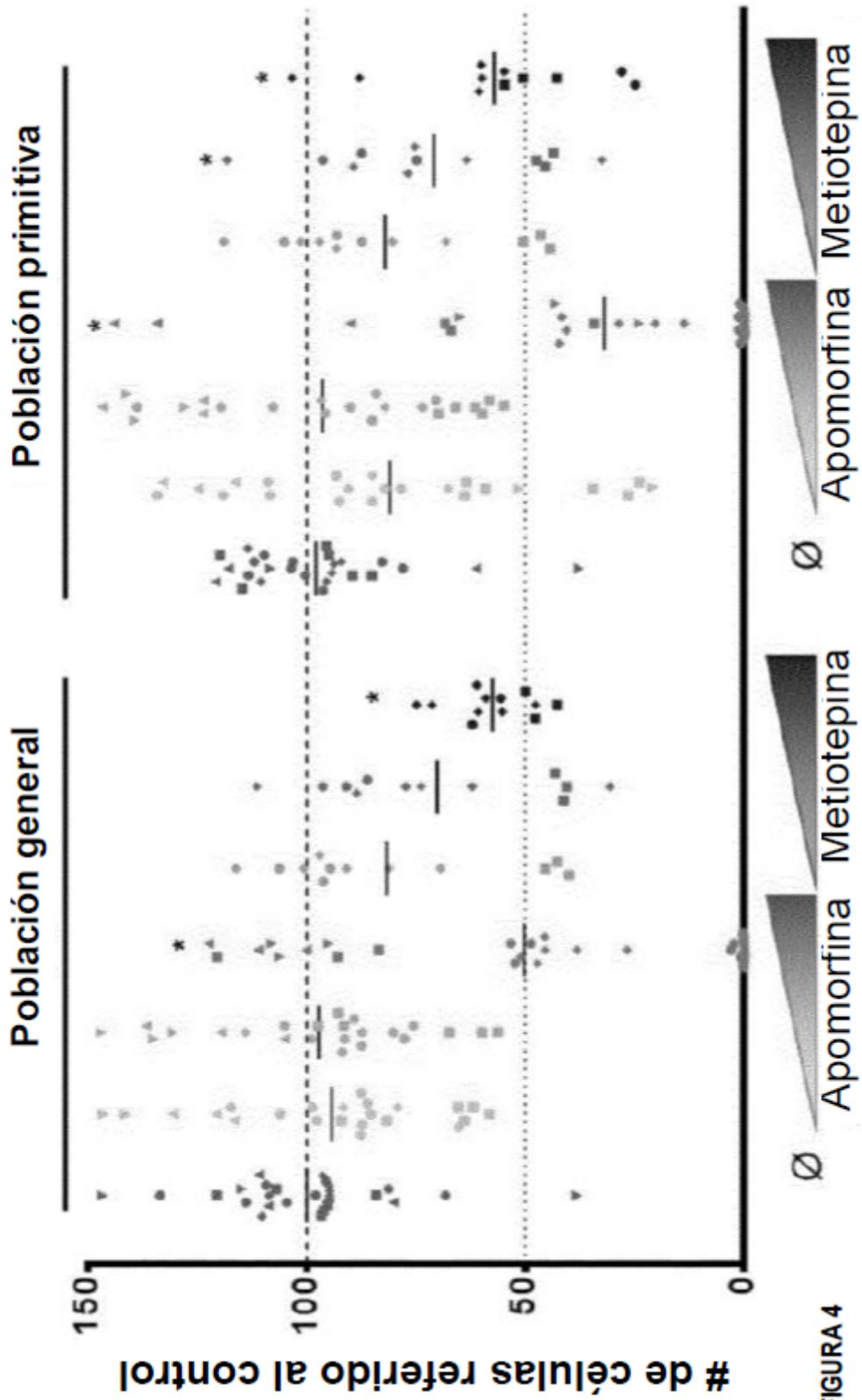


FIGURA 4

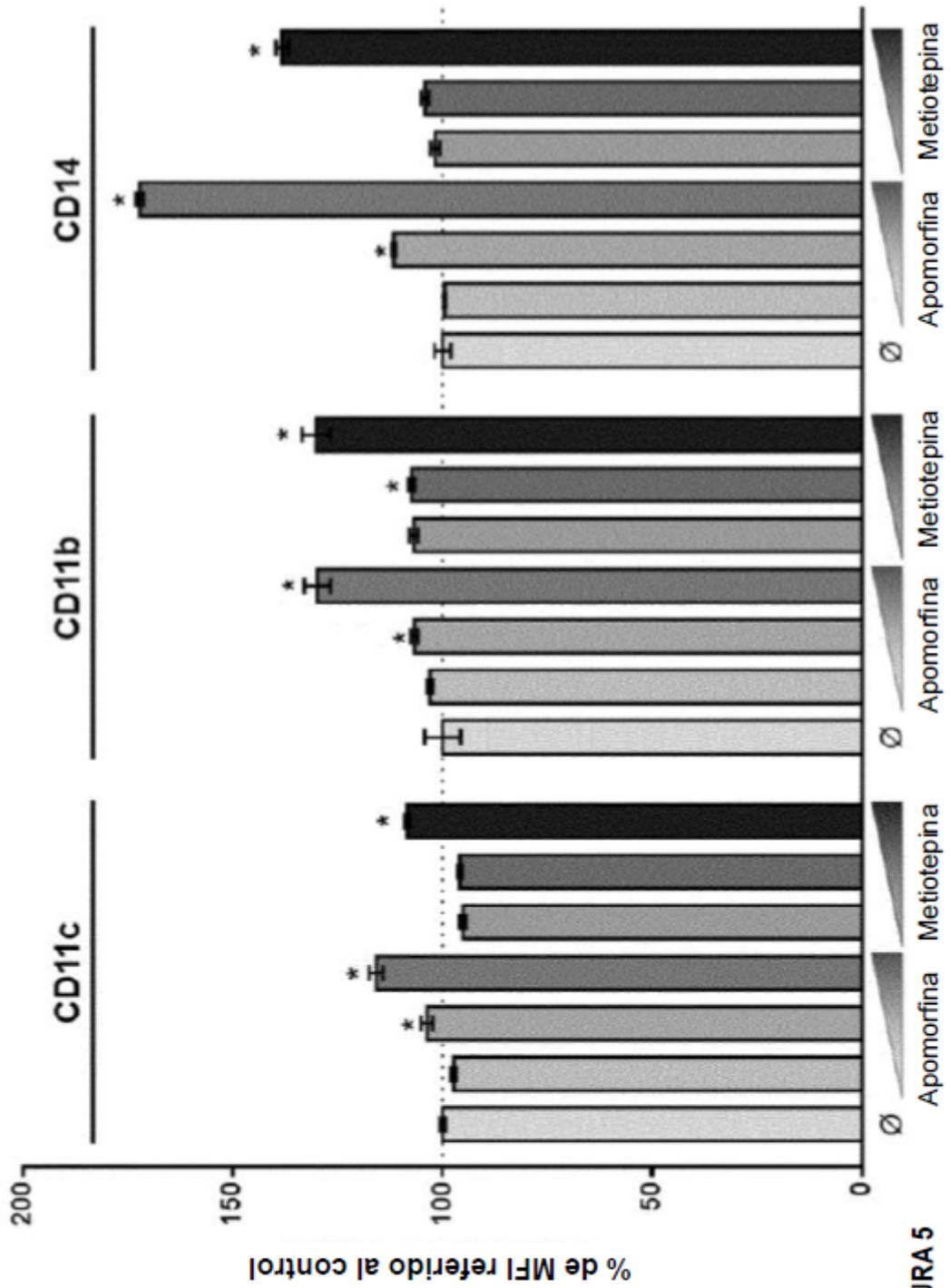


FIGURA 5

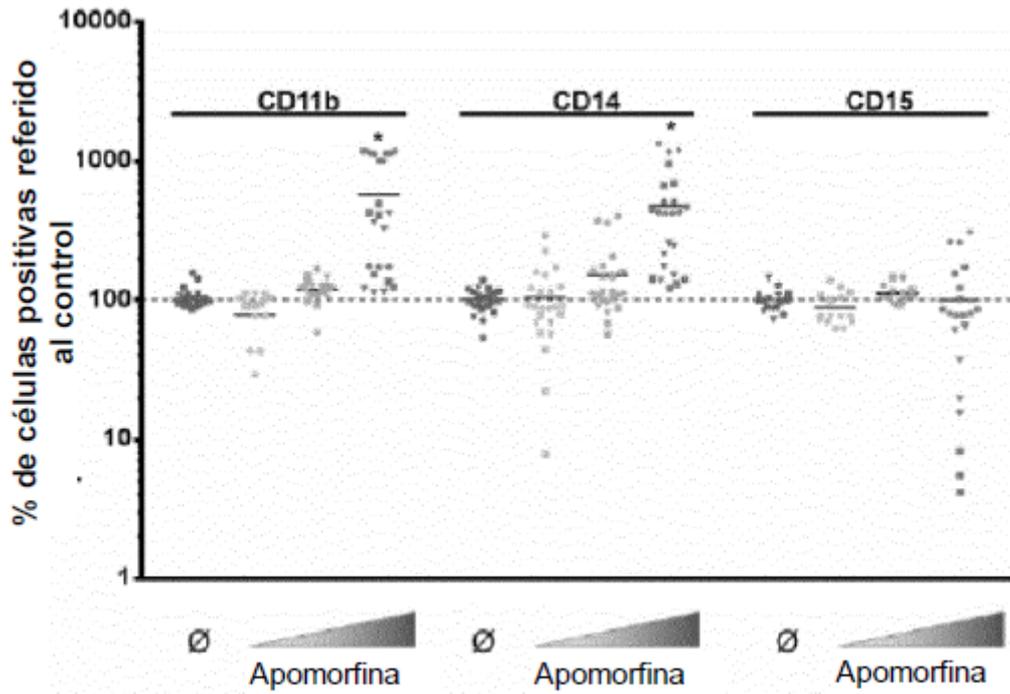


FIGURA 6

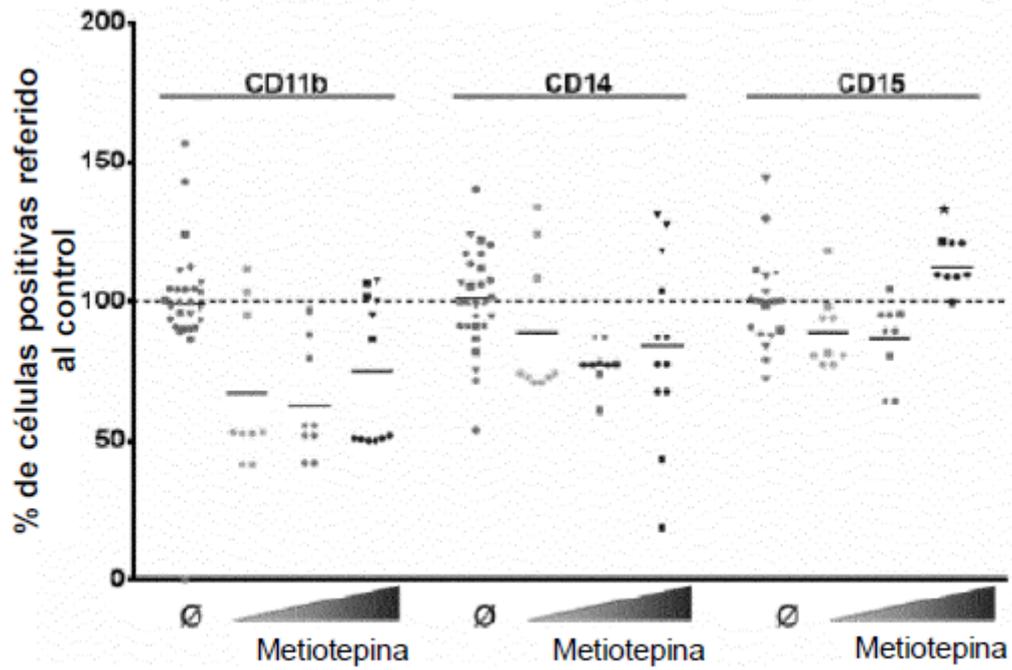


FIGURA 7

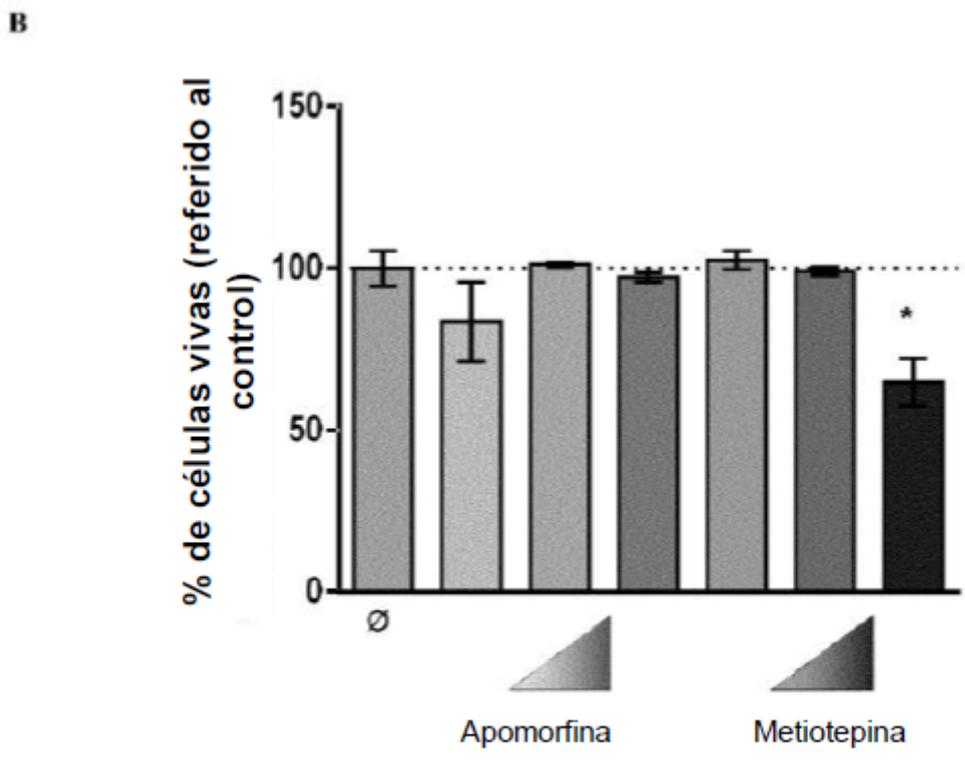
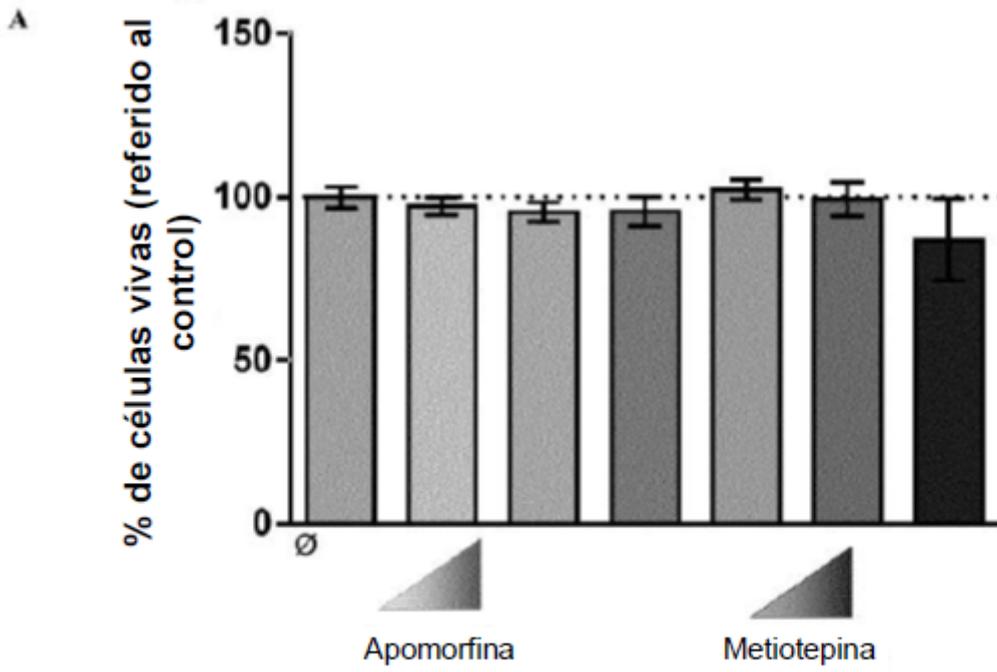


FIGURA 8

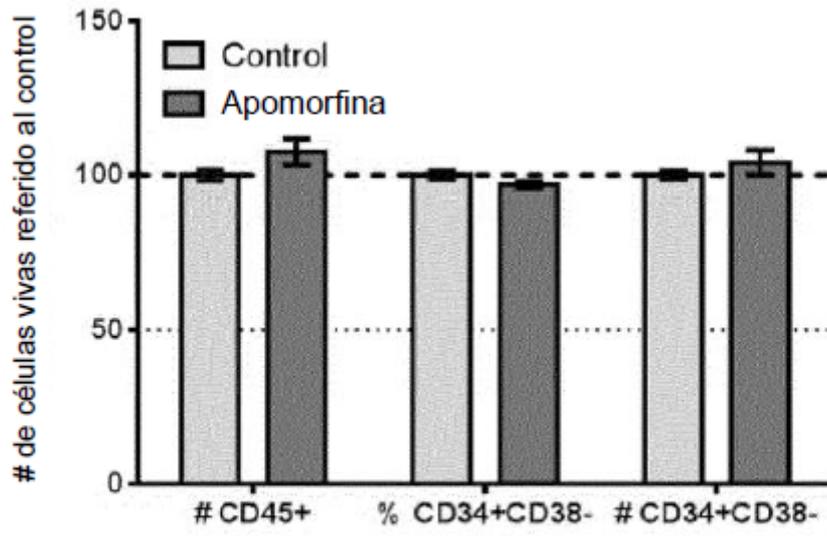


FIGURA 9

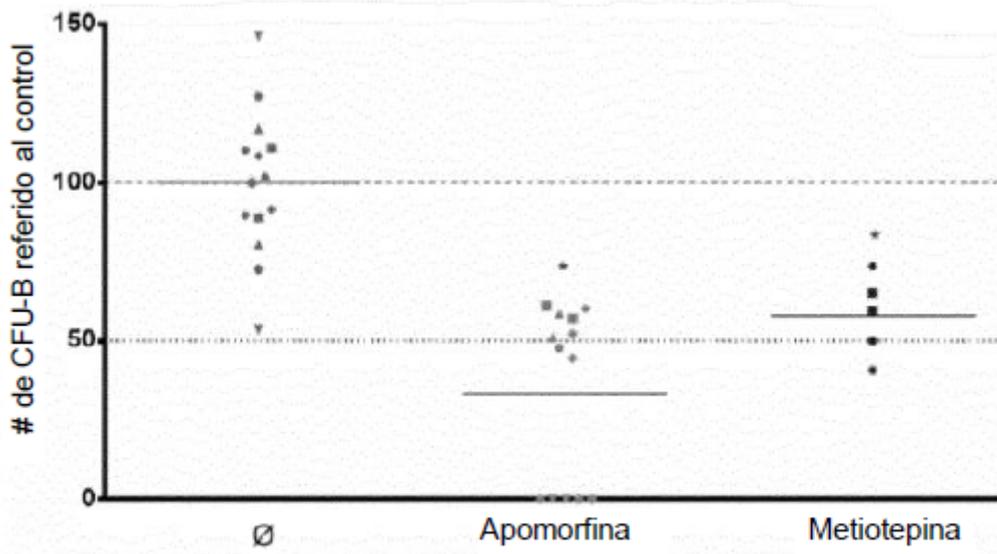


FIGURA 10

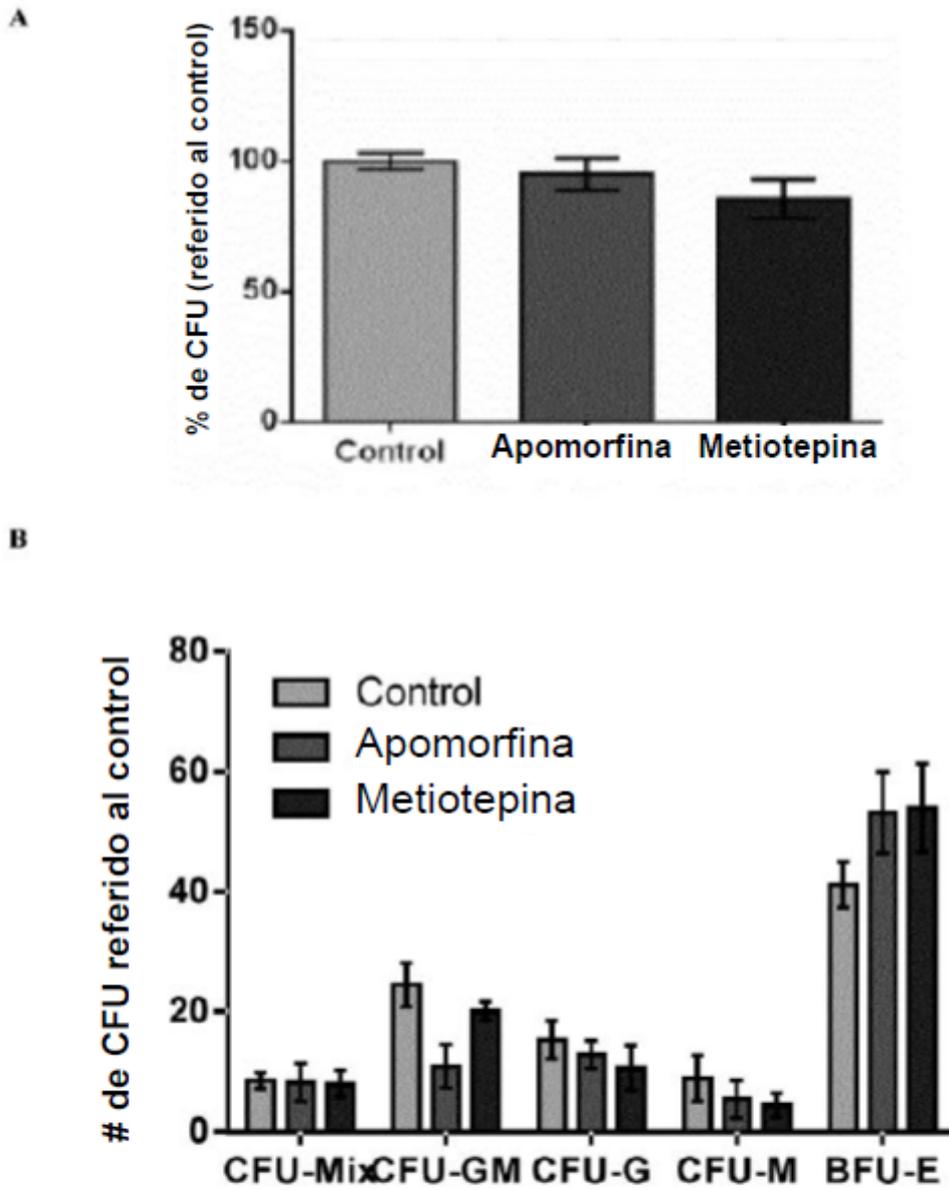


FIGURA 11

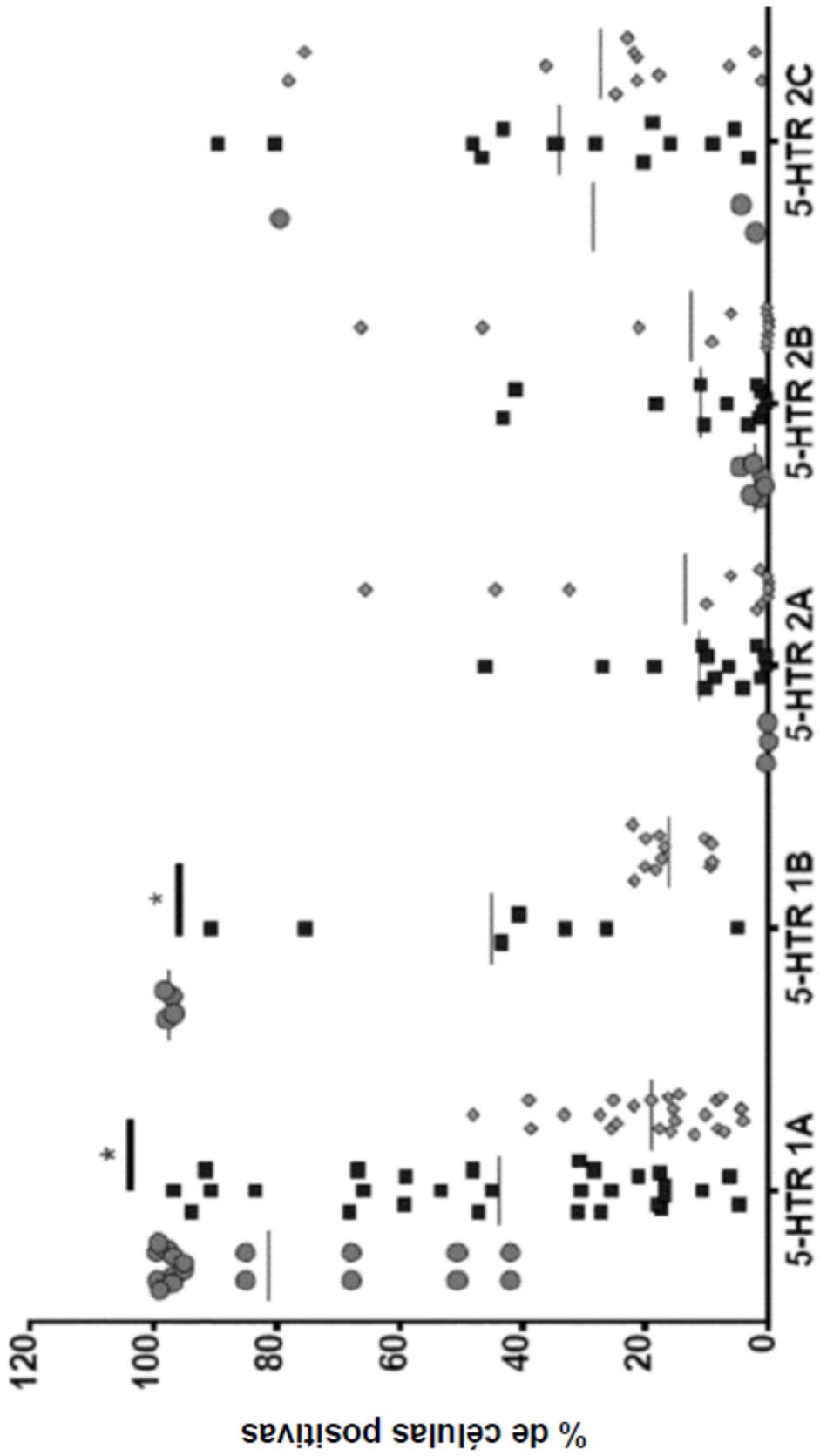


FIGURA 12

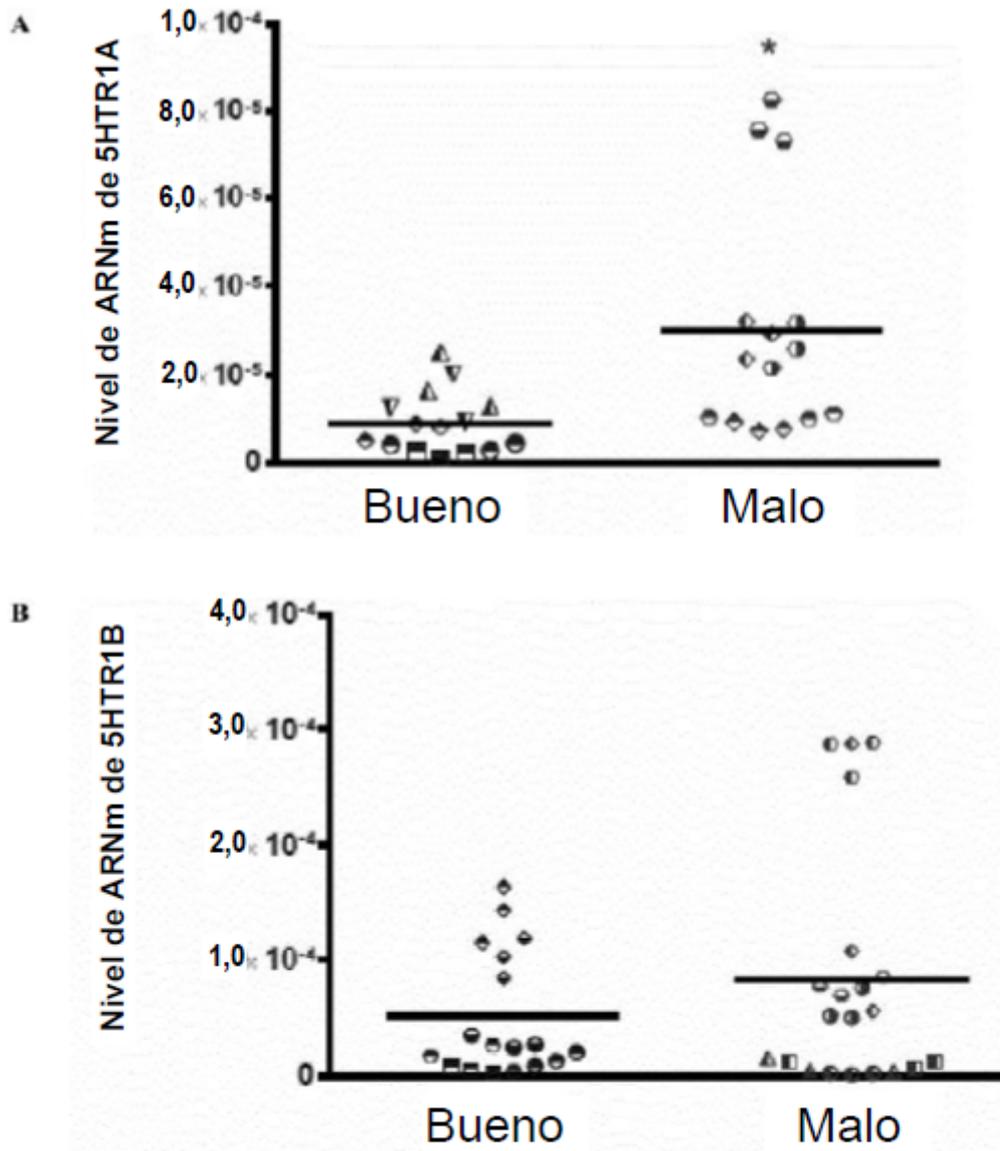


FIGURA 13

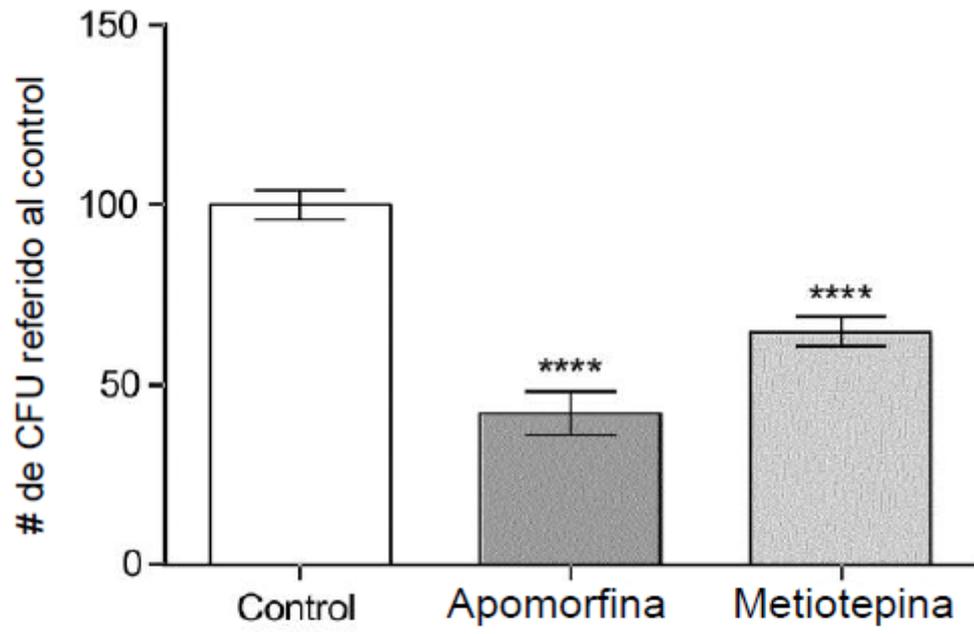


FIGURA 14

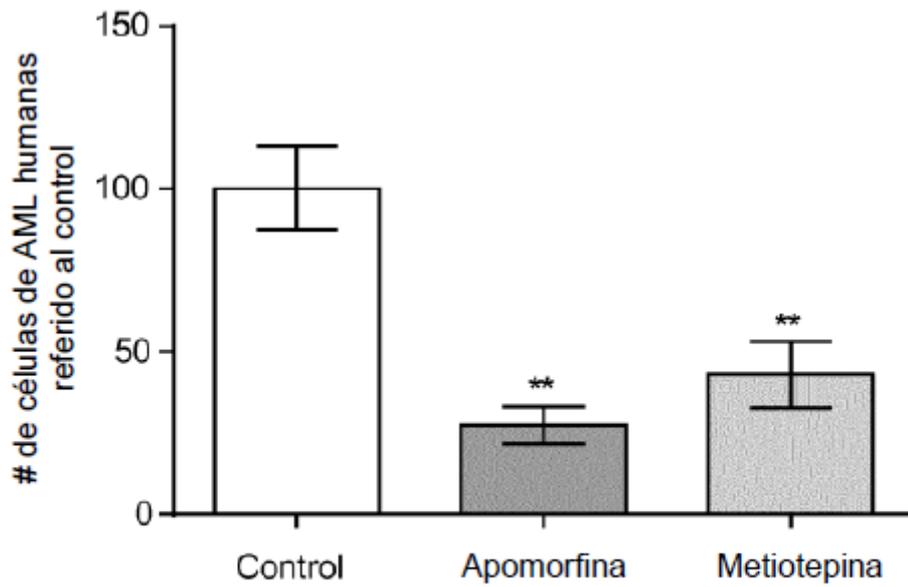
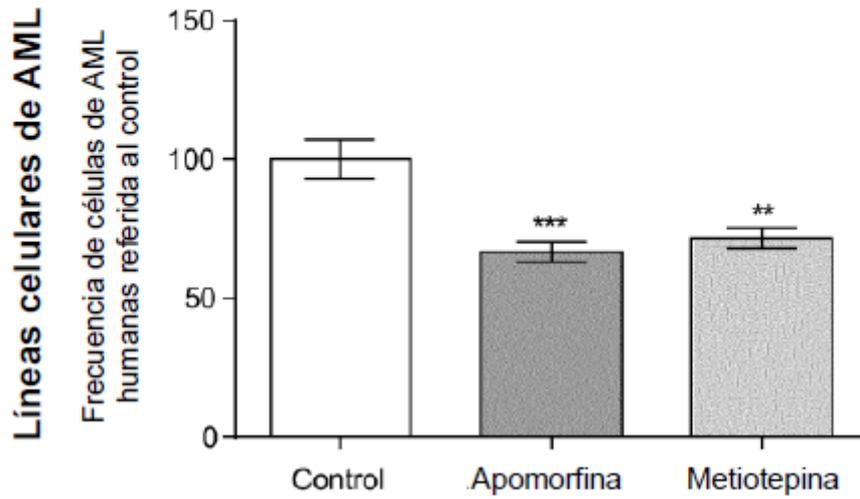
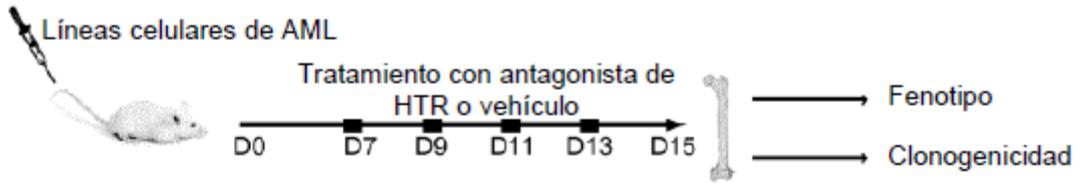


FIGURA 15

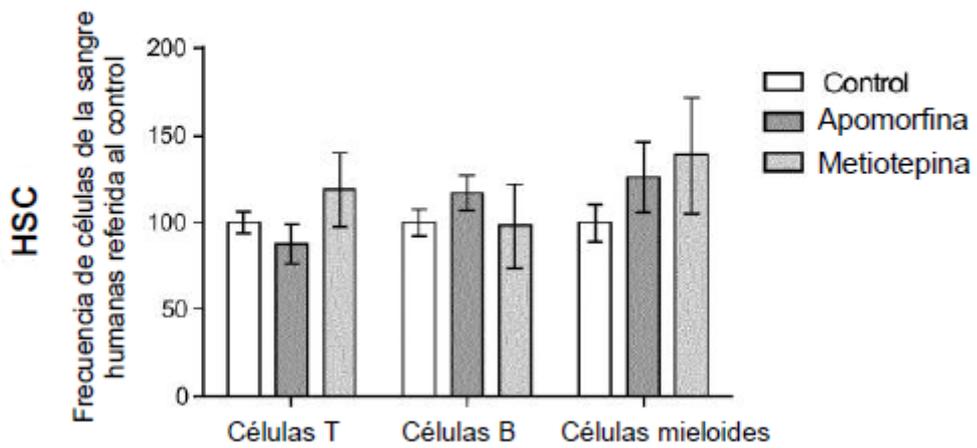
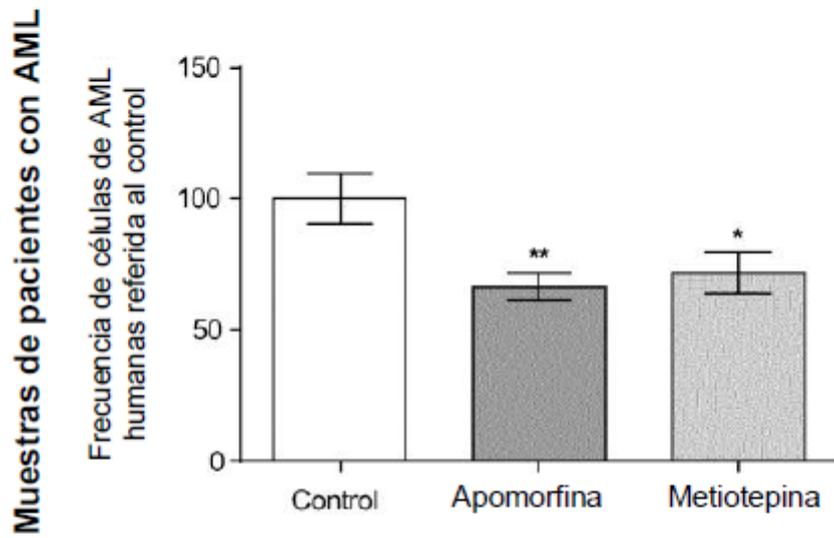
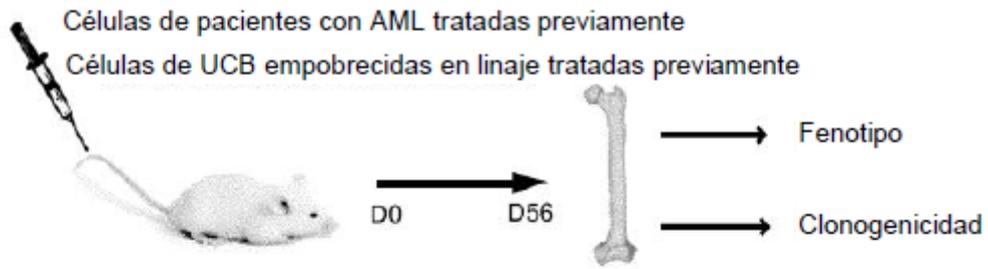


FIGURA 16

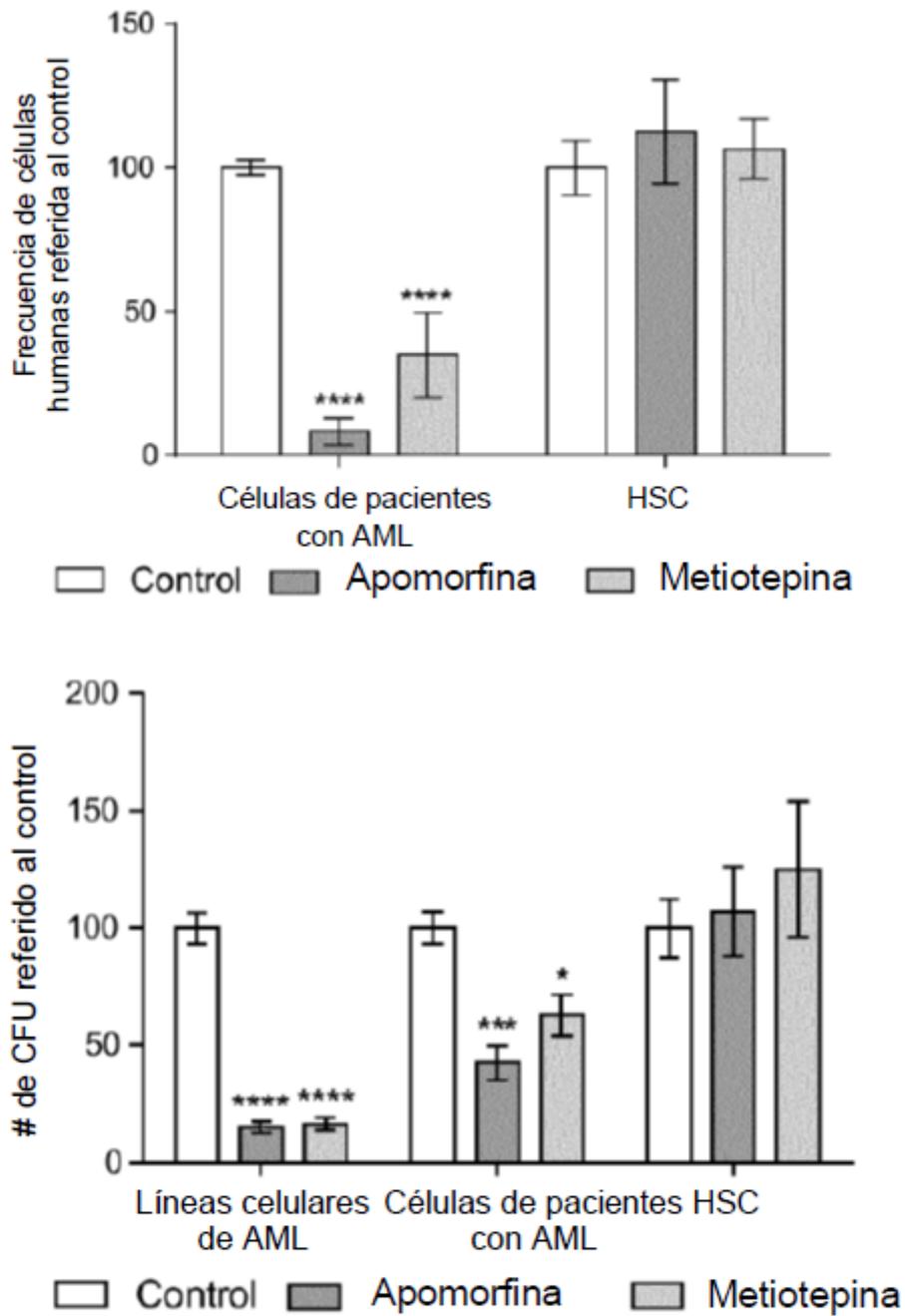


FIGURA 17