

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 414**

51 Int. Cl.:

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2015 PCT/US2015/012244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112598**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2015 E 15740207 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3102199**

54 Título: **Régimen de terapia y métodos para sensibilizar células de cáncer tratadas con una terapia epigenética frente a inhibidores de PARP en múltiples cánceres**

30 Prioridad:

21.01.2014 US 201461929680 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2021

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US y
UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**RASSOOL, FEYRUZ;
BAYLIN, STEPHEN y
ROBERT, CARINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 817 414 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

Régimen de terapia y métodos para sensibilizar células de cáncer tratadas con una terapia epigenética frente a inhibidores de PARP en múltiples cánceres

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/929.680, presentada el 21 de enero de 2014.

Incorporación como referencia de material enviado electrónicamente

- 10 Esta solicitud contiene un listado de secuencias. Se ha enviado electrónicamente a través de EFS-Web como un archivo de texto ASCII titulado "111232-00370_ST25.txt". El listado de secuencias tiene un tamaño de 710 bytes y se creó el 21 de enero de 2015. Se incorpora como referencia en la presente en su totalidad.

Antecedentes

- 15 Las leucemias mieloides agudas ("acute myeloid leukemias", AML) son unas enfermedades heterogéneas que se subdividen en subconjuntos citogenéticos y moleculares que se caracterizan por una respuesta favorable y desfavorable a las terapias actuales. La tirosina quinasa 3 similar a FMS con duplicación en tándem interna ("Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication", FLT3/ITD) es una tirosina quinasa constitutivamente activa expresada en 30% de todos los casos de AML. Las células que expresan FLT3/ITD se consideran uno de los "conjuntos más desfavorables" de AML, sin tratamiento eficaz, lo cual sugiere la necesidad urgente de desarrollar nuevas terapias.

- 20 Varias líneas de evidencias sugieren que la inestabilidad genómica en las malignidades mieloides es estimulada por un aumento de los daños en el ADN endógeno y una reparación propensa a errores que conduce al avance de la enfermedad y a la resistencia a la terapia. La poli-(ADP)-ribosa polimerasa (PARP) participa en la reparación de las roturas monocatenarias ("single strand breaks", SSB), así como en la vía muy propensa a errores de reparación de roturas bicatenarias ("double strand breaks", DSB). Las células de leucemia son sensibles a inhibidores de PARP, tales como ABT888 (Veliparib; Abbott Laboratories, North Chicago, IL), lo cual sugiere su dependencia de la actividad PARP para su supervivencia. BMN673 (BioMarin Pharmaceuticals, San Rafael, CA) es un inhibidor de PARP1/2 nuevo y muy potente que se ha ensayado en ensayos clínicos frente a tumores sólidos que portan una deficiencia en la reparación de DSB, tal como una mutación BRCA1. En fechas recientes, se ha demostrado que, además de la inhibición catalítica de PARP, los inhibidores de PARP inducen complejos de PARP-ADN citotóxicos que pueden ser responsables de su efecto terapéutico. Se ha indicado este mecanismo para el inhibidor de PARP BMN673 (Murai *et al.*, 2014).

- 35 Estudios recientes han demostrado que las líneas de células de leucemia y células primarias que son resistentes a inhibidores de tirosina quinasa y los derivados resistentes a terapia de células de cáncer de mama ER/PR+ y ER/PR-, incluyendo biopsias de tejidos primarios de estos, tienen mayor actividad de una vía de reparación de DSB alternativa y muy propensa a errores denominada unión de extremos no homólogos alternativa ("alternative non homologous end-joining", ALT NHEJ). Estas células también sobreexpresan los niveles en estado estacionario de PARP1 y ADN ligasa III α , que son componentes implicados en esta vía. Estas células, así como las células de leucemia resistentes a inhibidores de tirosina quinasa, tienen mayor sensibilidad a la combinación de inhibidores de PARP y ADN ligasa III α , tal como se demuestran mediante un número mayor de DSB y un número de colonias significativamente mayor en los ensayos de supervivencia de colonias (Tobin *et al.*, 2012; Tobin *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que ALT NHEJ es una nueva diana terapéutica, muy dependiente de PARP1, en cánceres de mama y leucemias que dependen de este modo de reparación del ADN para la supervivencia.

Sumario

- 45 El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante una terapia.

- 50 En un aspecto, el contenido descrito en la presente proporciona un método para tratar un cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesita tratamiento para este una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y una cantidad eficaz de un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP). En aspectos concretos, el agente desmetilante del ADN es un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMT1). En ciertos aspectos, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, tal como leucemia mieloide aguda ("acute myeloid leukemia". AML), síndrome mielodisplásico ("myelodysplastic syndrome", MDS), cánceres de mama y cánceres de ovario.

- 55 En otros aspectos, el contenido descrito en la presente proporciona un método para sensibilizar una célula frente a un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP), comprendiendo dicho método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN antes de poner en contacto la célula con

una cantidad eficaz del inhibidor de PARP.

5 En algunos aspectos, el contenido descrito en la presente proporciona un método para reducir la reparación de roturas bicatenarias en el ADN en una célula, comprendiendo dicho método comprendiendo dicho método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y con una cantidad eficaz de un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP).

En ciertos aspectos, el contenido descrito en la presente proporciona un método para aumentar los complejos de ADN-poli ADP ribosa polimerasa (PARP) citotóxicos en una célula, comprendiendo dicho método comprendiendo dicho método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y con una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP.

10 El documento WO2011130689 describe la coadministración de un agente anticáncer seleccionado del grupo que consiste en: a) un agente alquilante y un antimetabolito, tales como los agentes desmetilantes reivindicados en la presente; b) metoxiamina; y c) un inhibidor de PARP, tal como el presente compuesto veliparib; en la que la metoxiamina y el inhibidor de PARP potencian la actividad citotóxica del agente anticáncer.

15 Ciertos aspectos del contenido descrito en la presente se han mencionado anteriormente, y serán tratados en su totalidad o en parte mediante el contenido descrito en la presente, y otros aspectos serán evidentes a medida que avanza la descripción cuando se considera en conexión con los ejemplos y figuras adjuntos, como se describe mejor a continuación.

Breve descripción de las figuras

20 Tras haber descrito el contenido descrito en la presente en términos generales, se remite ahora a las figuras adjuntas, que no están necesariamente dibujadas a escala, en las que:

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de una realización de un tratamiento con fármaco y la línea de tiempo de un protocolo descrito en la presente;

25 Las figuras 2A-2D muestran un ensayo clonogénico de metilcelulosa de: (A) Kasumi-1 (AML1-ETO); (B) MOLM14 REC D4 (FLT3-ITD-/+); (C) MV411 (FLT3-ITD +/+); y (D) MOLM14 REC D7 después de tratamientos y de un periodo de recuperación (REC), tal como se describe en la figura 1. Los resultados son representativos de al menos 2 experimentos por triplicado +/- PEE. *p<0,05 mediante un ensayo de la T comparado con CRTL, si no se indica lo contrario;

30 Las figuras 3A-3G muestran: (A)-(D) ensayos ELISA que miden el nivel total de poli-(ADP)-ribosa en células KASUMI1 (A), KG1 (B), MOLM14 (C) y MV411 (D) después de tratamientos y de un periodo de recuperación de 7 días. Los resultados son representativos de 3 experimentos por triplicado +/- PEE. *p<0,05 mediante un ensayo de la T comparado con CRTL, si no se indica lo contrario; y (E)-(G) ensayos de supervivencia de colonias como se han descrito previamente (Tsai *et al.*, 2012), y las colonias se contaron 21 días después de un tratamiento con ABT en células KASUMI-1 (E) y KG1 (F), y 10 días después de un tratamiento con ABT en células MOLM14 (G). E y F: se representan los cambios en número de veces de 3 experimentos por triplicado, ± 80 p<0,05 y ** p<0,01 mediante el ensayo de la T. G: se presenta el número promedio de colonias de 2 experimentos por triplicado, ± 80;

35 Las figuras 4A-4B demuestran el efecto de la longitud del periodo de recuperación sobre la clonogenicidad de las líneas celulares de AML KG1 y KASUMI1: (A) sin periodo de recuperación; y (B) 7 días de recuperación;

40 Las figuras 5A-5D muestran un ensayo de MTS después de cuatro días de: tratamiento de (A) MV411; (B) P39; (C) MOLM14 con dosis crecientes de ABT888 o BMN673; y (D) muestra los resultados de CI50 que se midieron basándose en tres experimentos independientes +/- PEE;

45 Las figuras 6A-6C muestran un ensayo clonogénico en metilcelulosa: se pretrataron células (A) MOLM14; (B) MV411 durante 3 días con DAC (20 nM), seguido de un periodo de recuperación de 4 días y un posterior tratamiento con BMN673 (1 nM, 10 nM y 100 nM). Diez días después, las colonias teñidas que contienen más de 40 células se cuantificaron; y (C) muestra un ensayo clonogénico de metilcelulosa de células MV411 pretratadas durante 3 días con DAC (10 nM), seguido de un periodo de recuperación de 4 días. Los resultados (cambios en número de veces comparados con el tratamiento CRTL) son representativos del promedio ± PEE de al menos dos experimentos independientes por triplicado. * p<0,05 mediante un ensayo de la T comparado con CRTL, si no se indica lo contrario;

50 Las figuras 7A-7C muestran un ensayo clonogénico en metilcelulosa de células mononucleares ("mononuclear cells", MNC) procedentes de 6 pacientes AML. Las células se pretrataron durante 3 días con DAC (10 nM-20 nM), seguidos de un periodo de recuperación de 4 días y de un posterior tratamiento con: (A) ABT888 (500 nM) usando muestras procedentes de los pacientes n.º 9, n.º 15, n.º 29, n.º 34, n.º 16 y n.º 30 (las barras en orden de izquierda a derecha para cada muestra son CRTL, ABT (500 nM), DAC (10 nM), DAC (10 nM + ABT); (B) BMN673 (1 nM) usando una muestra procedente del paciente n.º 34; y (C) BMN673 usando muestras procedentes de los pacientes n.º 16, n.º 29, y n.º 34 (las barras son CRTL a la izquierda y BMN673 1 nM a la derecha para los pacientes n.º 16 y n.º 34; y CRTL

a la izquierda, BMN673 (1 nM) en el centro, y BMN673 (10 nM) a la derecha para el paciente n.º 34). Diez días después, las colonias teñidas que contienen más de 40 células se cuantificaron, y los resultados (cambios en número de veces comparados con el tratamiento CRTL) son representativos del promedio \pm PEE de al menos un experimento por triplicado. * $p < 0,05$ mediante el ensayo de la T;

- 5 Las figuras 8A-8C muestran: (A) un análisis de la transferencia Western de ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), PARP1, y caspasa 3 del extracto total de células mononucleares de médula ósea ("bone marrow mononuclear cells", BMMNC) procedentes del paciente n.º 29 tratado con DAC y/o ABT (β -actina, control de carga); (B) ensayo ELISA que mide el nivel total de poli-(ADP)-ribosa (pADP) en BMMNC procedentes del paciente n.º 29; y (C) la clonogenicidad disminuye con DAC y disminuye aún más con DAC y ABT888 en las células mononucleares de
- 10 médula ósea procedentes del paciente (n.º 29). Se dejaron 4 días de recuperación entre el tratamiento de DNMTi y PARPi. Los resultados son representativos de al menos 1 experimento por triplicado \pm PEE. * $p < 0,05$ mediante un ensayo de la T comparado con CRTL, si no se indica lo contrario;

15 Las figuras 9A-9D demuestran que las líneas celulares de AML MOLM14 (A) y MV411 (B) y células primarias procedentes de los pacientes n.º 29 (C) y n.º 34 (D) son más sensibles a una combinación de DAC (10 nM-20 nM) y BMN673 (1 nM);

Las figuras 10A-10C muestran que la clonogenicidad disminuye con 5AZA y disminuye aún más con 5AZA y ABT888 usando células de cáncer de mama: (A) MCF7; (B) MDA MB231; y (C) HCC1937. Se dejaron 7 días de recuperación entre el tratamiento de DNMTi y PARPi;

20 Las figuras 11A-11B muestran que la clonogenicidad disminuye con 5AZA y disminuye aún más con 5AZA y ABT888 usando células de cáncer de ovario: (A) A2780; y (B) OVCAR3. Se dejaron 7 días de recuperación entre el tratamiento de DNMTi y PARPi;

Las figuras 12A-12B muestran un análisis de la transferencia Western de: (A) PARP1 y LIG3; y (B) pADPr usando células MOLM14 tratadas con control, DAC (5 nM y 10 nM), ABT888 (500 nM), o una combinación de ambos. Se usa la lamina como control de carga;

25 La figura 13 muestra un diagrama esquemático de los daños en una molécula de ADN y cómo interaccionan las vías epigenéticas y de PARP1;

Las figuras 14A-14B demuestran que PARP1 interacciona con DNMT, según se observa mediante ensayos de coinmunoprecipitación realizados sobre fracciones en gradiente de sacarosa, que definen el tamaño del complejo antes y después de los daños;

- 30 Las figuras 15A-15E muestran: (A)-(B) análisis de la transferencia Western de DNMT1, PARP1, e histona3 usando la fracción de cromatina (CH) y la fracción nuclear soluble ("soluble nuclear fraction", SNE) de células MV411 sometidas (+) o no sometidas (-) a una irradiación de rayos X de 4 Gy durante cuatro horas (SP1, control de carga); (C)-(D) análisis de la transferencia Western de la ubiquitina (UB), ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), PARP1 y caspasa 3 del extracto total de MOLM14 (C) y MV411 (D) en ausencia de irradiación de rayos X de 4 Gy (β -actina, control de carga); y (E) el tratamiento con el DNMTi decitabina o PARPi (ABT888 o BMN 673) por sí solo atrapa a la PARP en la cromatina, pero los dos fármacos en combinación atrapan más PARP1 en la cromatina: MV411 se
- 35 trataron diariamente durante 3 días con 20 nM de DAC, se dejó que se recuperasen sin ningún tratamiento de fármaco durante 4 días, seguido de un posterior tratamiento con ABT888 (ABT, 5 μ M), BMN673 (BMN, 10 nM) o control. Cuatro horas antes de la extracción de la fracción de cromatina (CH), las células MV411 se sometieron a una irradiación de rayos X de 4 Gy. Después se realizó un análisis de la transferencia Western para DNMT1, PARP1, y H3 como control de carga;
- 40

Las figuras 16A-16D muestran que la decitabina y el posterior tratamiento con PARPi aumenta los daños en el ADN y disminuye la eficacia de reparación del ADN de NHEJ. Se trataron células MV411 con DAC (20 nM), se dejó que se recuperasen sin ningún tratamiento con fármaco durante 4 días, seguido de un posterior tratamiento con ABT888 (ABT, 5 μ M), BMN673 (BMN, 10 nM) o control: (A) esquema del experimento. Se midió la eficacia de la reparación del ADN de NHEJ después de acoplar el plásmido EJ2 linealizado con IScel en presencia de un extracto nuclear (NUC + CH) procedente de MV411 tratadas con DAC (20 nM), se dejó que se recuperasen sin ningún tratamiento con fármaco durante 4 días, seguido de un posterior tratamiento con ABT888 (ABT, 5 μ M), BMN673 (BMN, 10 nM) o control, y 4 horas después se realizó una irradiación de rayos X de 4 Gy, seguido de un acoplamiento durante la

45 noche; (B) el ADN se purificó y se usaron cebadores que flanquean el sitio IScel de EJ5GFP para amplificar con PCR una banda de Xbp que representa la eficacia de la reparación del ADN de NHEJ. Se usó H3 como control de carga para la cantidad de extracto nuclear usado para el acoplamiento. Se midió la proporción de la banda de Xbp a las intensidades de H3, y se representa la eficacia de reparación de NHEJ como cambios en número de veces comparado con CRTL; (C) se representa la eficacia de reparación de NHEJ como cambios en número de veces comparado con CRTL; y (D) las células tratadas se recolectaron y se realizó una inmunofluorescencia para γ H2AX antes (Ai) o después (Aii) de una irradiación de rayos X de 4 Gy;

50

55

Las figuras 17A-17D muestran el porcentaje de supervivencia con relación al control usando muestras de los pacientes: (A) n.º 081; (B) n.º 086; (C) n.º 090; and (D) n.º 092 con BMN (5 nM), DAC (10 nM), DAC y BMN, AZA

(100 nM) o AZA y BMN. Se administraron terapias de combinación de modo simultáneo en lugar de secuencial;

La figura 18 muestra la supervivencia de las colonias usando BMN (1 nM) con células de médula ósea normales ("normal bone marrow", NBM) y AML que portan el marcador de pronóstico muy malo, las mutaciones FLT3/ITD (FLT3/ITD1 y FLT3/ITD2) (CRLT a la izquierda y BMN a la derecha para cada muestra);

- 5 Las figuras 19A-19F demuestran que los xenoinjertos de AML son sensibles a la combinación de DAC y PARPi: (A) formación de imágenes de luciferasa en ratones en diferentes grupos de tratamiento que muestran el promedio de recuento de fotones en los días 1, 16 y 30 después del tratamiento; (B) gráfica de recuentos promedio de fotones como porcentaje del control en diferentes grupos después del tratamiento. * $p < 0,01$, veh frente a la combinación; ** $p < 0,01$, aza frente a la combinación; * $p = 0,04$, veh frente a BMN; y ** $p < 0,04$, BMN frente a la combinación; (C) gráfica de la intensidad de los fotones en diferentes grupos de tratamiento con los días después del tratamiento (efecto de BMN y AzaC sobre MV4-11-luc); (D) pesos promedio del bazo; (E) porcentaje de blastos en la sangre periférica de ratones que recibieron eutanasia procedentes de diferentes grupos de tratamiento; y (F) porcentaje de peso corporal de ratones en diferentes grupos de tratamiento con el tiempo después del tratamiento (tolerabilidad de AzaC y BMN en AML sistémica (MV4-11-luc);
- 10
- 15 La figura 20 muestra las curvas de supervivencia de los ratones descritos en la figura 20;

Las figuras 21A-21B muestran: (A) características citogenéticas y moleculares de muestras de pacientes AML tratados con DAC en combinación con inhibidores de PARP; y (B) características citogenéticas y moleculares de líneas celulares tratadas con DAC en combinación con inhibidores de PARP; y

- 20 Las figuras 22A-22B muestran gráficas del índice de combinación para células MOLM14 tratadas a diario durante 7 días con el inhibidor de PARP BMN673 (0,5, 1, 2 y 4 nM) e inhibidores de DNMT1: (A) decitabina (5, 10, 20, 40 nM); o (B) 5-azacitidina (50, 100, 200, 400 nM). El eje de abscisas representa la fracción de células afectadas (Fa), y el eje de ordenadas muestra el índice de combinación (Ci). Cada punto representa un tratamiento de combinación (por ejemplo, BMN 0,5 nM y AZA 50 nM, etc.). La línea horizontal representa el valor $CI = 1$, cuando una combinación de fármacos concreta es aditiva. Cualquier punto por debajo de la línea horizontal ($CI < 1$) representa combinaciones sinérgicas, y los valores de CI por encima de la línea ($CI > 1$) representan combinaciones antagonistas. Todas las combinaciones (excepto BMN 1 nM/DAC 10 nM, y BMN 1 nM/AZA 100 nM) muestran sinergia.
- 25

Descripción detallada

- 30 El contenido descrito en la presente se describirá con más detalla a continuación remitiéndose los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas, las realizaciones del contenido descrito en la presente. Los mismos números se refieren a los mismos elementos en la presente.

La presente invención se refiere a una composición que comprende un agente desmetilante del ADN según las reivindicaciones, en combinación con un inhibidor de PARP según las reivindicaciones, para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, según se define en las reivindicaciones.

- 35 La presente composición es capaz de sensibilizar células, en particular células de cáncer, frente a inhibidores de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) (PARPi) con una terapia epigenética usando dosis bajas de agentes desmetilantes del ADN. Se ha descubierto que, junto con los inhibidores de PARP, los inhibidores de ADN metiltransferasa (DNMTi) también atrapan a la PARP en la cromatina. Los dos inhibidores juntos aumentan el atrapamiento de PARP, lo cual conduce a la incapacidad para reparar los daños en el ADN y a la muerte celular. El contenido descrito en la presente indica que los DNMTi unen las ADN metiltransferasas (DNMT) al ADN, los DNMTi y la PARP interactúan y, por tanto, los DNMTi atrapan a la PARP en la cromatina, los PARPi atrapan a la PARP en la cromatina, y ambos fármacos juntos aumentan aún más la unión de PARP a la cromatina, comparado con cada fármaco por sí solo. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, puesto que los PARPi han demostrado inhibir la reparación del ADN aumentando el atrapamiento de DNA en roturas bicatenarias, se ha propuesto que los DNMTi sensibilizan a las células del cáncer frente a PARPi potenciando el atrapamiento de PARP en la cromatina y, así, disminuyendo aún más la reparación del ADN y potenciando la toxicidad celular.
- 40
- 45

- 50 En algunas realizaciones, las dosis bajas de agentes desmetilantes del ADN sensibilizan a los cánceres frente a los inhibidores de poli ADP ribosa polimerasa (PARP). Estos agentes desmetilantes, en combinación con inhibidores de PARP, aumentan los complejos de ADN-PARP citotóxicos en la cromatina, reducen la reparación de DSB y conducen a una muerte celular citotóxica. En otras realizaciones, la exposición transitoria a agentes desmetilantes del ADN en concentraciones bajas de nM reprograma a las células del cáncer alterando los patrones de expresión de genes heredables en vías celulares clave, que incluyen las vías de reparación del ADN.

I. Composiciones para tratar el cáncer usando un fármaco desmetilante del ADN y un inhibidor de PARP

- 55 Los fármacos desmetilantes del ADN, tales como vidaza (5-azacitidina; 5-AZA; 5AZA; AZA) y dacogén (DAC), han sido aprobados por la FDA, pero se han empleado históricamente a altas dosis en cánceres, lo cual ha conducido a citotoxicidad en tejidos normales. Se ha demostrado recientemente que unas dosis transitorias bajas de nM de agentes desmetilantes del ADN reprograman a las células del cáncer, ejerciendo efectos antitumorales duraderos en

células de leucemia y de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (Tsai *et al.*, 2012). Estos efectos vienen acompañados de disminuciones sostenidas en la metilación de promotores en todo el genoma, alteraciones en los patrones de expresión de genes heredables, y cambios antitumorales en vías celulares clave, que incluyen las vías de reparación del ADN. Estos efectos ya se han traducido para el cáncer de pulmón no microcítico en una eficacia clínica temprana real, con una indicación particularmente intensa de que el uso de vidaza después de un tratamiento con inhibidores de la histona desacetilasa puede cebar a los pacientes para lograr respuestas robustas a posteriores quimioterapias. El contenido descrito en la presente demuestra que el tratamiento anterior con estos agentes epigenéticos sensibiliza a las células del cáncer frente a agentes dirigidos, tales como inhibidores de PARP (denominados en la presente PARPi).

Los PARPi alteran la reparación de los daños en el ADN e inducen una citotoxicidad proporcional al atrapamiento de PARP1 en los sitios de daños en el ADN. El contenido descrito en la presente demuestra que, en células de leucemia mieloide aguda (AML), los inhibidores de ADN metiltransferasa (DNMTi) potencian, de modo robusto, este atrapamiento y citotoxicidad. Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, el mecanismo subyacente parece ser que los DNMT y PARP1 interactúan en un complejo inducido por daños en el ADN. Unas dosis bajas de DNMTi por sí solos atrapan a PARP en la cromatina, y cuando se combinan con los PARPi aumentan aún más el atrapamiento de PARP1, suprimen la reparación del ADN, y dificultan las colonias y la autorrenovación de AML primarias y cultivadas. Estos efectos incluyen a células AML que portan el marcador de pronóstico muy malo, las mutaciones FLT3/ITD. De manera importante, el tratamiento *in vivo* con dosis bajas, bien toleradas, de la combinación de fármacos dificulta la tumorigénesis en ratones que portan células de AML injertadas con FLT3/ITD, con una carga tumoral reducida en la médula, y menores pesos de bazo y células de blastos leucémicos. Así, el contenido descrito en la presente proporciona una terapia convincente basada en el mecanismo para cánceres, tales como AML, incluyendo un subtipo de AML con prognosis muy mala.

En algunas realizaciones, el contenido descrito en la presente proporciona un método para tratar un cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesita tratamiento para este una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y una cantidad eficaz de un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) según las reivindicaciones.

Tal como se emplea en la presente, un agente desmetilante del ADN es un compuesto que puede inhibir la metilación del ADN. En algunas realizaciones, el agente desmetilante del ADN es un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMTi). Un inhibidor de la ADN metiltransferasa es un compuesto que inhibe una enzima que puede catalizar la transferencia de un grupo metilo al ADN. El DNMTi se selecciona del grupo que consiste en 5-azacitidina, decitabina.

Según la presente descripción general, el agente desmetilante del ADN o inhibidor de PARP pueden estar inactivos hasta que se convierten en la forma activa en un sujeto. Por ejemplo, en la presente se describen versiones inactivas de la decitabina, tales como SGI-110 (Astex), que es convertida en decitabina por el cuerpo.

Tal como se emplea en la presente, una poli ADP ribosa polimerasa (PARP) es un miembro de una familia de proteínas que está implicada en una serie de procesos celulares, tales como la reparación del ADN y la muerte celular programada. Un inhibidor de PARP (PARPi) reduce el funcionamiento de una PARP. El inhibidor de PARP se selecciona del grupo que consiste en veliparib, y BMN-673.

Una "dosis baja" de un agente metilante del ADN significa una dosis que es menor que la escala de 1 μM , tal como menor que 750 μM , menor que 500 μM , o menor que 100 μM . Con respecto a las dosis en mg/m^2 , una "dosis baja" significa una dosis menor que 100 mg/m^2 , menor que 80 mg/m^2 , menor que 60 mg/m^2 , menor que 40 mg/m^2 , o menor que 20 mg/m^2 .

La dosis baja del agente desmetilante del ADN es menor que aproximadamente 100 mg/m^2 . En otras realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN es de aproximadamente 20 mg/m^2 a aproximadamente 75 mg/m^2 .

La cantidad eficaz del inhibidor de PARP es menor que 500 mg/m^2 . En otras realizaciones, la cantidad eficaz del inhibidor de PARP es de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg/m^2 .

En algunos aspectos de la descripción, el agente desmetilante del ADN es SGI-110, y la dosificación es de aproximadamente 60 mg/m^2 o menor, administrada por vía subcutánea a diario durante cinco días a lo largo de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el agente desmetilante del ADN es decitabina, y la dosificación es de aproximadamente 20 mg/m^2 administrada por vía intravenosa a diario durante cinco días a lo largo de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el agente desmetilante del ADN es azacitidina, y la dosificación es de aproximadamente 75 mg/m^2 o menor, administrada por vía intravenosa o subcutánea a diario durante siete días a lo largo de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el PARPi se administra por vía oral en los días 1 a 28 a lo largo de un ciclo de 28 días. En otras realizaciones, el programa de administración comprende tres días de administración diaria del DNMTi (5AZA o DAC; en una escala menor que aproximadamente 1 μM), una recuperación de 4 a 7 días, y después un tratamiento con PARPi (ABT888, menos de aproximadamente 500 μM ; BMN673, aproximadamente 10 nM o menos).

En algunas realizaciones, el efecto del agente desmetilante del ADN y el inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa

(PARP) es sinérgico. Tal como se emplean en la presente, los términos "sinergia," "sinérgico," "sinérgicamente" y sus derivados, tales como en un "efecto sinérgico" o una "combinación sinérgica", se refieren a las circunstancias bajo las cuales la actividad biológica de una combinación del agente desmetilante del ADN y el inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) es mayor que la suma de las actividades biológica de los respectivos agentes cuando se administran de modo individual. La sinergia puede aparecer cuando los respectivos agentes se administran al mismo tiempo o si uno de los agentes se administra antes que el otro.

La sinergia puede expresarse en términos de un "índice de sinergia (SI)" que puede determinarse en general mediante el método descrito por F. C. Kull *et al.*, Applied Microbiology, 9, 538 (1961), a partir de la proporción determinada mediante:

$$Q_a/Q_A + Q_b/Q_B = \text{índice de sinergia (SI)}$$

en la que:

Q_A es la concentración del componente A, cuando actúa por sí solo, que produce un criterio de valoración con relación al componente A;

Q_a es la concentración del componente A, en una mezcla, que produce un criterio de valoración;

Q_B es la concentración del componente B, cuando actúa por sí solo, que produce un criterio de valoración con relación al componente B; y

Q_b es la concentración del componente B, en una mezcla, que produce un criterio de valoración.

En general, cuando la suma de Q_a/Q_A y Q_b/Q_B es mayor que uno, se indica un antagonismo. Cuando la suma es igual a uno, se indica una aditividad. Cuando la suma es menor que uno, se demuestra que existe sinergia. Cuanto menor sea el SI, mayor será la sinergia que muestra esa mezcla concreta. Así, una "combinación sinérgica" tiene una actividad mayor que la prevista basándose en las actividades observadas de los componentes individuales cuando se emplean por sí solos. Además, una "cantidad sinérgicamente eficaz" de un componente se refiere a la cantidad del componente necesaria para suscitar un efecto sinérgico, por ejemplo, en otro agente terapéutico presente en la composición.

La presente invención se refiere al tratamiento de la leucemia mieloide aguda. En la descripción, un "cáncer" en un animal se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de las células que provocan cáncer, por ejemplo, una proliferación descontrolada, la pérdida de funciones especializadas, la inmortalidad, un potencial metastásico significativo, un aumento significativo en la actividad antiapoptótica, un crecimiento y una tasa de proliferación rápidos, y cierta morfología y marcadores celulares característicos. En algunas circunstancias, las células de cáncer pueden estar en forma de un tumor; estas células pueden existir localmente dentro de un animal o circular en la corriente sanguínea como células independientes, por ejemplo, células leucémicas. Un cáncer puede incluir cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de estómago, leucemia/linfoma, cáncer uterino, cáncer de piel, cáncer endocrino, cáncer urinario, cáncer pancreático, cáncer gastrointestinal, cáncer ovárico, cáncer cervical y adenomas. En algunos aspectos de la descripción, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, síndrome mielodisplásico (MDS), de mama y de ovario. Tal como se emplea en la presente, la expresión "síndrome mielodisplásico" se refiere a un tipo de cáncer en el que la médula ósea no produce suficientes células sanguíneas sanas y existen células anómalas en la sangre y/o la médula ósea.

El sujeto tratado mediante las composiciones reivindicadas en la presente en sus muchas realizaciones es, de modo deseable, un sujeto humano, aunque debe entenderse que las composiciones descritas en la presente son eficaces con respecto a todas las especies de vertebrados, que pretenden incluirse en el término "sujeto". Por consiguiente, un "sujeto" puede incluir un sujeto humano para objetivos médicos, tales como para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección existente, o el tratamiento profiláctico para prevenir la aparición de una enfermedad, un trastorno o una afección en un sujeto animal para objetivos médicos, veterinarios o de desarrollo.

Los sujetos animales adecuados incluyen mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a primates, por ejemplo, seres humanos, monos, simios, gibones, chimpancés, orangutanes, macacos y similares; bovinos, por ejemplo, ganado bovino, bueyes y similares; ovinos, por ejemplo, ovejas y similares; caprinos, por ejemplo, cabras y similares; porcinos, por ejemplo, cerdos y similares; equinos, por ejemplo, caballos, burros, cebras y similares; felinos, que incluyen gatos salvajes y domésticos; caninos, que incluyen perros; lagomorfos, que incluyen conejos, liebres y similares; y roedores, que incluyen ratones, ratas, cobayas y similares. Un animal puede ser un animal transgénico. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano que incluye, pero no se limita a sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles, y adultos. Además, un "sujeto" puede incluir un paciente que padece o que se sospecha que padece una enfermedad, un trastorno o una afección. Así, los términos "sujeto" y "paciente" se emplean en la presente de modo intercambiable en la presente. Los sujetos también incluyen modelos de enfermedad en animales (por ejemplo, ratas o ratones usados en experimentos). En otras realizaciones, el sujeto no es un ser humano.

En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer incluye reducir el mecanismo de reparación del ADN bicatenario en una o más células de cáncer en el sujeto. En otras realizaciones, el tratamiento del cáncer incluye aumentar el

número de complejos de ADN-poli ADP ribosa polimerasa (PARP) citotóxicos en la cromatina en una o más células de cáncer en el sujeto. Tal como se emplea en la presente, el término "cromatina" se refiere a las macromoléculas de las que están compuestos los cromosomas de los eucariotas, que comprenden ADN, proteínas y ARN.

5 En algunas realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN se administra antes que la dosis eficaz del inhibidor de PARP. "Antes" puede significar que el agente desmetilante del ADN se administra minutos, horas o días antes de la administración del inhibidor de PARP. En otras realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN se administra simultáneamente con la dosis eficaz del inhibidor de PARP. En otras realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP se administran cada una en una dosis diaria única. Los dos agentes pueden administrarse al mismo tiempo en el día o en diferentes momentos en un día.

10 En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la administración de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y una dosis eficaz del inhibidor de PARP puede provocar una disminución de al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o incluso 100% en el cáncer en un sujeto.

15 Tal como se emplean en la presente, los términos "tratar", "tratamiento" y similares significan disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener la causa subyacente de un cáncer, o estabilizar el desarrollo o el avance de un cáncer y/o los síntomas asociados con este. Los términos "tratar", "tratamiento" y similares, tal como se emplean en la presente, pueden indicar una terapia curativa, una terapia profiláctica y una terapia preventiva. El tratamiento, la administración o la terapia pueden ser consecutivas o intermitentes. El tratamiento, la administración o la terapia consecutivos se refieren al tratamiento al menos diario sin una interrupción en el tratamiento de uno o más días. El
20 tratamiento o la administración intermitentes o el tratamiento o la administración de un modo intermitente se refieren a un tratamiento que no es consecutivo, sino que tiene una naturaleza cíclica. El tratamiento según los métodos descritos en la presente puede provocar el alivio completo o la cura de un cáncer, o una mejora parcial de uno o más síntomas del cáncer, y puede ser temporal o permanente. El término "tratamiento" también pretende incluir la profilaxis, la terapia y la cura.

25 II. Métodos para sensibilizar una célula frente a un inhibidor de PARP

El contenido descrito en la presente proporciona un método para sensibilizar una célula frente a un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP), comprendiendo dicho método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN antes de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del inhibidor de PARP. Tal como se emplea en la presente, "sensibilizar" una célula significa provocar que una célula
30 responda con más facilidad o más rápido a un inhibidor de PARP, comparado con una célula que no está sensibilizada.

"Poner en contacto" significa cualquier acción que provoque que la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP se pongan en contacto físico con al menos una célula. El método puede practicarse *in vivo*, en cuyo caso poner en contacto significa exponer al menos una célula en un sujeto a la dosis
35 baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP, tal como administrar la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP al sujeto mediante cualquier vía adecuada. Según el contenido descrito en la presente, poner en contacto puede comprender introducir, exponer y similares, la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP en un sitio distante a las células que se van a poner en contacto con estos, y dejar que las funciones corporales del sujeto, o movimientos naturales
40 (por ejemplo, difusión) o inducidos por el ser humano (por ejemplo, agitación) de los fluidos provoquen el contacto de la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP y la célula o células.

En algunas realizaciones, el agente desmetilante del ADN es un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMTi). En otras realizaciones, el DNMTi se selecciona del grupo que consiste en 5-azacitidina, decitabina, SGI110 y disulfiram. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP se selecciona del grupo que consiste en veliparib, BMN-
45 673, 4-yodo-3-nitrobenzamida, olaparib, rucaparib, y CEP 9722. En otras realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN es menor que aproximadamente 1 μM . En otras realizaciones, la dosis eficaz del inhibidor de PARP es menor que aproximadamente 500 μM . En otras realizaciones, el efecto del agente desmetilante del ADN y del inhibidor de PARP es sinérgico.

En algunas realizaciones, la célula es una célula de cáncer. En otras realizaciones, la célula de cáncer se selecciona del grupo que consiste en una leucemia, síndrome mielodisplásico (MDS), células de cáncer de mama y de ovario. En otras realizaciones, la leucemia es leucemia mieloide aguda (AML). En otras realizaciones, la AML es positiva a FLT3-ITD.

III. Métodos para reducir la reparación de roturas bicatenarias en el ADN en una célula

55 En algunas realizaciones, el contenido descrito en la presente proporciona un método para reducir la reparación de roturas bicatenarias en el ADN en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y con una cantidad eficaz de un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP).

En algunas realizaciones, el agente desmetilante del ADN es un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMTi). En otras realizaciones, el DNMTi se selecciona del grupo que consiste en 5-azacitidina, decitabina, SGI110 y disulfiram. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP se selecciona del grupo que consiste en veliparib, BMN-673, 4-yodo-3-nitrobenzamida, olaparib, rucaparib, y CEP 9722.

- 5 En algunas realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN es menor que aproximadamente 1 μM . En otras realizaciones, la dosis eficaz del inhibidor de PARP es menor que aproximadamente 500 μM . En otras realizaciones, el efecto del agente desmetilante del ADN y del inhibidor de PARP es sinérgico.

10 Tal como se emplea en la presente, el término "reducir" significa disminuir, suprimir, atenuar, disminuir o suprimir, por ejemplo, en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o incluso 100%, comparado con un sujeto control no tratado, una célula o una vía biológica.

IV. Métodos para aumentar los complejos de ADN-poli ADP ribosa polimerasa (PARP) citotóxicos en una célula

15 El contenido descrito en la presente describe el uso de agentes desmetilantes del ADN en combinación con inhibidores de PARP para potenciar la producción o aumentar el número de complejos de ADN-PARP citotóxicos en la cromatina, lo cual conduce a la muerte celular citotóxica. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el contenido descrito en la presente proporciona un método para aumentar los complejos de ADN-poli ADP ribosa polimerasa (PARP) citotóxicos en una célula, comprendiendo dicho método poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de una dosis baja de un agente desmetilante del ADN y con una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP.

20 En algunas realizaciones, el agente desmetilante del ADN es un inhibidor de ADN metiltransferasa (DNMTi). En otras realizaciones, el DNMTi se selecciona del grupo que consiste en 5-azacitidina, decitabina, SGI110 y disulfiram. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP se selecciona del grupo que consiste en veliparib, BMN-673, 4-yodo-3-nitrobenzamida, olaparib, rucaparib, y CEP 9722.

25 En algunas realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN es menor que aproximadamente 1 μM . En otras realizaciones, la dosis eficaz del inhibidor de PARP es menor que aproximadamente 500 μM . En otras realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN se administra antes que el inhibidor de PARP. En otras realizaciones, la dosis baja del agente desmetilante del ADN se administra simultáneamente con el inhibidor de PARP. En otras realizaciones, el efecto del agente desmetilante del ADN y el inhibidor de PARP es sinérgico.

30 Tal como se emplea en la presente, el término "aumentar" significa aumentar o hacer más grande en tamaño, cantidad, intensidad o grado, por ejemplo, en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o incluso 100%, comparado con un sujeto control no tratado, una célula o una vía biológica. En realizaciones concretas, el contenido descrito en la presente proporciona un método para aumentar el número de complejos de ADN-poli ADP ribosa polimerasa (PARP) citotóxicos en una célula.

V. Administración de composiciones farmacéuticas

35 El término "administrar", tal como se emplea en la presente, se refiere a poner en contacto una célula, o una de sus porciones, con una dosis baja del agente desmetilante del ADN y una dosis eficaz del inhibidor de PARP. Este término incluye la administración de los compuestos descritos en la presente a un sujeto en el que la célula, o una de sus porciones, está presente, así como introducir los compuestos descritos en la presente en un medio en el que se cultiva una célula, o una de sus porciones. En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

45 La administración a un sujeto para una terapia puede producirse mediante cualquier vía de administración adecuada, que incluye la vía oral, nasal, transmucósica, ocular, rectal, intravaginal, parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraarticulares, intraesternales, intrasinoviales, intrahepáticas, intralesionales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares, por vía intracisternal, tópica, así como mediante polvos, ungüentos o gotas (que incluyen colirios), incluyendo por vía bucal y sublingual, transdérmica, a través de un pulverizador de inhalación, u otras vías de administración conocidas en la técnica.

50 Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica", tal como se emplean en la presente, significan la administración de la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP de una manera diferente que directamente al sistema nervioso central, de modo que entran en el sistema del paciente y, así, se someten al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, la administración subcutánea.

55 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se emplean en la presente, significan vías de administración distintas de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, una infusión y una inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intraocular, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular,

intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal. En realizaciones concretas, la administración del agente desmetilante del ADN y el inhibidor de PARP puede producirse mediante administración subcutánea o intravenosa.

5 "En combinación con" significa la administración de la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP juntos o con uno o más agentes terapéuticos diferentes de modo simultáneo, secuencial, o una combinación de estos. La dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP pueden administrarse con uno o más agentes terapéuticos diferentes al mismo tiempo (es decir, de modo simultáneo) o en momentos diferentes (es decir, de modo secuencial, en cualquier orden, en el mismo día o en días diferentes), con la condición de que se logre el efecto de la combinación de ambos agentes en la célula o el sujeto.
 10 Cuando se administran de modo secuencial, los agentes pueden administrarse dentro de 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240 minutos o mayor entre ellos. En otras realizaciones, los agentes administrados de modo secuencial pueden administrarse dentro de 1, 5, 10, 15, 20 o más días entre ellos. Cuando la dosis baja del agente desmetilante del ADN y la dosis eficaz del inhibidor de PARP y uno o más agentes terapéuticos diferentes se administran de modo simultáneo, estos pueden administrarse a la célula o pueden administrarse al sujeto como composiciones farmacéuticas distintas, o pueden ponerse en contacto con la célula como una única composición o pueden administrarse a un sujeto como una única composición farmacéutica que comprende ambos agentes.

20 Cuando se administran en combinación, la concentración eficaz de cada uno de los agentes para suscitar una respuesta biológica concreta puede ser menor que la concentración eficaz de cada agente cuando se administra por sí solo, permitiendo con ello una reducción en la dosis de uno o más agentes con relación a la dosis que sería necesaria si el agente se administra como un agente individual. Los efectos de múltiples agentes pueden ser aditivos o sinérgicos, pero esto no es necesario. Los agentes pueden administrarse múltiples veces. En estas terapias de combinación, el efecto terapéutico del primer compuesto administrado no disminuye por la administración secuencial, simultánea o separada del compuesto o compuestos posteriores.

25 La expresión "cantidad eficaz", como en "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico se refiere a la cantidad del agente necesaria para suscitar la respuesta biológica deseada. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad eficaz de un agente puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el agente que se va a administrar, la composición de la composición farmacéutica, el tejido o la célula diana, y similares. Más en concreto, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, por ejemplo, para reducir o mejorar la gravedad, la duración, el avance o la aparición de una enfermedad, un trastorno o una afección (por ejemplo, un cáncer), o uno o más de sus síntomas; prevenir el avance de una enfermedad, un trastorno o una afección, provocar la regresión de una enfermedad, un trastorno o una afección; prevenir la recurrencia, el desarrollo, la aparición o la progresión de un síntoma asociado con una enfermedad, un trastorno o una afección, o potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia.

35 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, composición y vía de administración concretos, y la enfermedad, el trastorno o la afección, sin ser tóxicos para el sujeto. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto concreto empleado, o su sal, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto concreto que se está empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto concreto empleado, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del paciente que se está tratando y factores similares muy conocidos en la técnica médica.

VI. Definiciones generales

45 Aunque en la presente se emplean términos y expresiones específicos, estos se emplean solo en un sentido genérico y descriptivo, y no pretenden ser limitantes. A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece el contenido descrito en la presente.

50 Siguiendo la convención de la ley de patentes largamente asentada, los términos "un/una" "el/la" se refieren a "uno o más" cuando se emplean en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Así, por ejemplo, la referencia a "un sujeto" incluye una pluralidad de sujetos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario (por ejemplo, una pluralidad de sujetos), etc.

55 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "comprende" y "comprendiendo" se emplean en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario. De forma similar, el término "incluye" y sus variantes gramaticales pretenden no ser limitantes, de modo que la enumeración de artículos en una lista no implica la exclusión de otros artículos similares que pueden ser sustituidos o añadidos a los artículos listados.

Para los objetivos de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario,

debe entenderse que todos los números que expresan cantidades, tamaños, dimensiones, proporciones, formas, formulaciones, parámetros, porcentajes, parámetros, cantidades, características y otros valores numéricos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, están modificados en todos los casos con el término "aproximadamente", incluso aunque el término "aproximadamente" pueda no aparecer expresamente con el valor, la cantidad o el intervalo. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas no son ni necesitan ser exactos, sino que pueden ser aproximados y/o mayores o menores según se desee, reflejando tolerancias, factores de conversión, redondeados, errores de medición y similares, y otros factores conocidos por los expertos en la técnica dependiendo de las propiedades deseadas que quieran obtenerse mediante el contenido descrito en la presente. Por ejemplo, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor, puede significar que incluye variaciones en algunas realizaciones de $\pm 100\%$, en algunas realizaciones de $\pm 50\%$, en algunas realizaciones de $\pm 20\%$, en algunas realizaciones de $\pm 10\%$, en algunas realizaciones de $\pm 5\%$, en algunas realizaciones de $\pm 1\%$, en algunas realizaciones de $\pm 0,5\%$, y en algunas realizaciones de $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, puesto que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos o para emplearse en las composiciones descritas.

Además, debe entenderse que el término "aproximadamente", cuando se usa en conexión con uno o más números o intervalos numéricos, se refiere a todos estos números, incluyendo todos los números en un intervalo, y modifica este intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos indicados. La enumeración de intervalos numéricos mediante puntos finales incluye todos los números, por ejemplo, números enteros, incluyendo sus fracciones, subsumidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, la enumeración de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como sus fracciones, por ejemplo, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 y similares) y cualquier intervalo dentro de ese intervalo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar una guía a los expertos en la técnica para practicar las realizaciones representativas del contenido descrito en la presente. A la luz de la presente descripción y el nivel general de la técnica, los expertos en la técnica pueden apreciar que los siguientes ejemplos solo pretenden ser ejemplos.

Ejemplo 1: Sensibilización dependiente del inhibidor de DNMT de células de leucemia frente a la inhibición de PARP

Métodos

Cultivo celular, fármacos y programa y dosis del tratamiento: Se cultivaron células AML humanas KASUMI-1 (positivas a AML1-ETO) en RPMI1640 + L-glutamina (Life Technologies Gibco®, Grand Island, NY), suplementado con suero bovino fetal al 20% ("Fetal Bovine Serum", FBS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO); se cultivaron MV411 (homocigóticas para FLT3-ITD), MOLM14 (heterocigóticas para FLT3-ITD) en RPMI1640 + L-glutamina suplementado con FBS al 10%. El aislamiento de las células de médula ósea o células mononucleares sanguíneas ("blood mononuclear cells", MNC) a partir de las muestras de AML se realizó usando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante, y las MNC se incubaron durante la noche en medio de crecimiento de progenitores hematopoyéticos ("hematopoietic progenitor growth media", HPGM, Lonza, Walkersville, MD) suplementado con trombopoyetina 50 ng/ml y ligando de FLT3, factor de células madre 25 ng/ml, interleuquina-3 (IL-3) 10 ng/ml, IL-6, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos ("granulocyte macrophages-colony stimulating factor", GM-CSF) y G-CSF 1 ng/ml (Gemini Bio Product, West Sacramento, CA). El suministro de todas las AML primarias se realizó mediante protocolos aprobados por los comités de evaluación institucionales en University of Maryland School of Medicine (IRB n.º H25314). Todas las líneas celulares y MNC se cultivaron inicialmente a $0,2 \times 10^6$ células/ml y $0,5 \times 10^6$ células/ml, respectivamente, a 37 °C y 5% de CO₂.

La decitabina (DAC, 21,9 mM en DMSO, Sigma-Aldrich) se diluyó aún más en agua justo antes del tratamiento de las células con 5 nM, 10 nM o 20 nM de DAC. El PARPi veliparib (ABT888; 200 mM en agua, Enzo Life Sciences Alexis, Farmingdale, NY) y BMN673 (10 mM en DMSO, Abmole BioScience, Kowloon, Hong Kong) se diluyeron aún más en agua justo antes del tratamiento de las células con 500 nM de ABT888 y 1 nM, 10 nM o 100 nM de BMN673. Se añadió DAC cada 24 horas durante 72 horas con cambio de medio a diario, después el fármaco se retiró mediante lavado y se dejó que las células se recuperasen durante 4 días (a menos que se indique lo contrario) antes de su uso posterior. En el día 7, las células se contaron con azul de tripano, se trataron con PARPi, se cultivaron en placas de 100 mm a una densidad de $0,2 \times 10^6$ células/ml o en metilcelulosa para el ensayo de formación de colonias como se describirá a continuación. En los días indicados en las figuras, se recuperaron de 5 a 10×10^6 células viables (exclusión de azul de tripano), se congelaron rápidamente y se conservaron a -80 °C para su uso posterior para la extracción de proteínas. En la figura 1 se muestra un protocolo representativo.

Ensayo de formación de colonias: En el día 7 del experimento, se trató un número igual de células viables (células KASUMI-1, 10000 células/placa; MV411, 5000 células/placa; MOLM14, 1000 células/placa; pacientes n.º 16, 2000 células/placa, n.º 9, n.º 13 y n.º 15, 5000 células/placa, n.º 29, 10000 células/placa, n.º 30, 20000 células/placa y n.º 34, 40000 células/placa) como se describió anteriormente y se cultivaron por triplicado en una placa de 33 mm en MethoCult H4435 enriquecido (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canadá) para MNC, o disolución madre de metilcelulosa (R&D Systems, Minneapolis, MN) suplementados con medio de cultivo para las

líneas celulares según las instrucciones del fabricante. De diez a diecinueve días después, las colonias se tiñeron con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (1 mg/ml) durante la noche a 37 °C, y las colonias que contenían más de 40 células se cuantificaron usando un contador de colonias y el programa informático Protocol3 (Synbiosis, Frederick, MD). Los resultados (cambios en número de veces comparados con el tratamiento CRTL) son representativos del promedio \pm PEE de al menos dos experimentos independientes por triplicado.

Ensayo de proliferación celular/citotoxicidad: Se cultivaron células (20000 células/pocillo en 200 μ l) en placas de 96 pocillos con ABT888 o BMN673 (hasta 10 μ M) durante 72 horas. Cuatro horas antes de la evaluación, se añadieron 20 μ l de reactivo de marcaje de MTS ([3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, MTS suplementado con metosulfato de fenazina, PMS, Promega, Madison, WI) a cada pocillo. Los resultados se cuantificaron usando un lector de microplacas de ELISA VersaMax a una longitud de onda de 490 nm y el programa informático SofitMax®Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los resultados (cambios en número de veces comparados con CRTL) son representativos del promedio \pm PEE de tres experimentos independientes por triplicado.

Análisis estadístico: Todos los análisis estadísticos se realizaron usando un ensayo de la T de Student, y * significa un valor de $p < 0,05$, a menos que se indique lo contrario.

Resultados

Para estudiar si la reprogramación dependiente de DAC (Tsai *et al.*, 2012) puede sensibilizar a las células de AML frente a los PARPi, en primer lugar, se trataron células KASUMI-1, MOLM14 y MV411 con dosis crecientes de DAC (5 nM-20 nM) durante tres días con un reemplazo diario de fármacos y medios, según se ha descrito previamente (Tsai *et al.*, 2012). Después, las células se cultivaron sin fármacos durante 0 días a 7 días, y se varió el número de días sin fármaco entre cada línea, dependiendo de la sensibilidad de cada línea celular a DAC. Después del periodo de descanso, se cultivó la misma cantidad de células viables sobre metilcelulosa bajo un tratamiento continuo con PARPi ABT888 (500 nM), tal como se ha descrito previamente (Tobin, 2013) (figura 2). Diez días después, se midió la eficacia clonogénica contando las colonias con más de 40 células, y los resultados se expresan como cambios en número de veces comparados con los controles (CRTL) (figura 2). El tratamiento de las células con DAC como único agente demostró que las células KASUMI-1 eran las más sensibles, demostrando una disminución significativa en el número de colonias después de 10 nM de DAC (figura 2A). Las células MOLM14 y MV411 mostraron una disminución similar en las colonias, pero solo después de un tratamiento con 20 nM de DAC (figuras 2B-2C). El tratamiento de PARPi ABT888 como único agente demostró que las células MOLM 14 y MV411 positivas a FLT3-ITD presentaban una reducción significativa en el número de colonias comparado con CRTL, mientras que las células KASUMI-1 no se vieron significativamente afectadas. De modo notable, el pretratamiento de las líneas de células AML con DAC, seguido de ABT888, condujo a un número significativamente reducido de colonias, comparado con el tratamiento solo con ABT888 o DAC (figuras 2 y 3). Se descubrió que la falta de días de recuperación entre la adición de DAC y ABT888 no era tan eficaz como una recuperación durante 7 días (figura 4).

Estos resultados primero confirmaron que las células de AML positivas a FLT3-ITD eran sensibles a PARPi por sí solo, tal como ha sido sugerido anteriormente (Gaymes *et al.*, 2013; Gaymes *et al.*, 2009), pero, de modo más interesante, demostraron que un pretratamiento con una dosis baja no citotóxica de DNMTi (Tsai *et al.*, 2012), tal como DAC, puede sensibilizar a las células AML (AML1-ETO o FLT3-ITD) a una dosis baja de PARPi. Por tanto, este tratamiento combinatorio es un nuevo producto terapéutico para pacientes con AML.

BMN673 es más citotóxico para las células de AML que ABT888: se ha demostrado que los PARPi matan selectivamente a los tumores que portan una deficiencia en la reparación de DSB, tal como la mutación en BRCA1/2 en la vía de reparación recombinante homóloga (Bryant *et al.*, 2005; Helleday *et al.*, 2005), induciendo una "letalidad sintética" (Farmer *et al.*, 2005), lo cual sugiere el uso de PARPi en otros tumores con anomalías en la reparación de DSB (Ashworth *et al.*, 2008). Estos descubrimientos han conducido al desarrollo de PARPi más específicos y potentes (Murai *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013). En fechas recientes, BioMarin ha desarrollado un nuevo PARPi, BMN673, que es más potente en la destrucción de células de cáncer de mama y ovario deficientes en la reparación del ADN que cualquier otro PARPi (Shen *et al.*, 2013). Por tanto, ahora BMN673 se está ensayando en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos (Shen *et al.*, 2013). Para determinar si el pretratamiento con DAC sensibiliza a AML frente a BMN673, en primer lugar, se usó el ensayo de MTS para determinar las concentraciones de BMN673 y ABT888 que inducen citotoxicidad en las líneas celulares positivas a FLT3-ITD MOLM14 y MV411 (figura 5). En MV411 y MOLM14, BMN673 tiene una CI50 de 6,45 μ M y 4,46 μ M, respectivamente. Por contraste, la CI50 de ABT888 es > 25 μ M (figura 5). Estos resultados están en línea con los resultados previos que demuestran que MOLM14 es más sensible a PARPi ABT888 que MV411. De modo notable, BMN673 es mucho más potente que ABT888 en las líneas de células de AML, lo cual es similar a los descubrimientos en otros cánceres (Shen *et al.*, 2013).

El BMN673 inhibe potentemente la clonogenicidad en líneas de células de AML y su efecto es potenciado por un pretratamiento con DAC: Puesto que BMN673 es mucho más potente que ABT888, la cuestión era saber si las anteriores líneas de células de AML pretratadas con DAC también se sensibilizarían frente a BMN673. Por tanto, se pretrataron las líneas celulares FLT3-ITD MOLM14 y MV411 durante 3 días con DAC (20 nM), seguido de un periodo de recuperación de 4 días y un posterior tratamiento con BMN673 (1 nM, 10 nM y 100 nM), y después se realizaron ensayos clonogénicos en metilcelulosa (figura 6). Tal como se esperaba, un tratamiento entre 10 nM y

100 nM de BMN673 inhibió profundamente la formación de colonias en MOLM14 (figura 6A) y MV411 (figura 6B). De forma similar a los resultados con ABT888, las células MOLM14 fueron más sensibles a BMN673, apareciendo una citotoxicidad después del tratamiento con fármaco 1 nM, comparado con células MV411 que apenas eran sensibles a esta concentración. No obstante, un pretratamiento con DAC 20 nM hizo que las células MOLM14 fueran significativamente más sensibles a 1 nM de BMN673, comparado con el tratamiento con DAC o BMN673 por sí solos. Aunque los experimentos con células MV411 mostraron sensibilidad frente a BMN673 en todas las concentraciones ensayadas, un pretratamiento con DAC 20 nM no sensibilizó a estas células también frente a BMN673.

Las células primarias procedentes de pacientes AML son sensibles a la combinación de DAC y PARPi: AML es una enfermedad heterogénea y, por tanto, se determinó si las muestras primarias procedentes de pacientes AML pretratadas con DAC también se sensibilizaban al tratamiento con PARPi. Por tanto, se pretrataron MNC procedentes de 6 pacientes AML (n.º 9, n.º 15, n.º 29, n.º 16, n.º 30 y n.º 34) durante 3 días con DAC (10 nM-20 nM), seguido de 4 días de recuperación y un cultivo final en placa de las células en metilcelulosa en presencia de ABT888 (500 nM; figura 7A). Solo las MNC procedentes del paciente n.º 34 se pretrataron con DAC, seguido de un tratamiento con BMN673 (1 nM; figura 7B). Tres de los 6 pacientes (paciente n.º 15, n.º 29, n.º 16; 50% de respondedores) mostraron una disminución variable en el número de colonias con el tratamiento con PARPi ABT888 por sí solo. Todas las muestras mostraron menos colonias con el tratamiento con DAC por sí solo y, de hecho, las MNC procedentes del paciente n.º 9 fueron muy sensibles. De manera importante, las MNC procedentes de 4 de 6 pacientes (pacientes n.º 9, n.º 15, n.º 29, y n.º 34; 67%) demostraron que un pretratamiento con DAC sensibiliza también frente al tratamiento con ABT888 (figura 7A). Además, de modo similar a las células MOLM14 y MV411, los pacientes n.º 15, n.º 29 y n.º 34 fueron positivos a FLT3-ITD, lo cual valida los efectos del tratamiento de DAC más PARPi en este subgrupo molecular desfavorable de AML (figura 7A). De forma similar a los resultados con DAC más ABT888, las MNC procedentes del paciente n.º 34 demostraron que un pretratamiento con DAC sensibiliza también a las células frente al tratamiento con BMN673 (1 nM, figuras 7B,7C). Las células procedentes de los pacientes n.º 16 y n.º 29 también mostraron resultados similares (figura 7C). La figura 8 muestra un análisis de la muestra procedente del paciente n.º 29 con más detalle, e incluye un análisis de la transferencia Western de ubiquitina (UB), ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), PARP1, y caspasa 3 del extracto total de células mononucleares de médula ósea (BMMNC) (figura 8A), y ensayos ELISA que miden el nivel total de poli-(ADP)-ribosa (pADP) en BMMNC (figuras 8B-8C). Estos resultados demuestran que DAC disminuye la clonogenicidad y que DAC y ABT888 la disminuyen aún más en las células mononucleares de médula ósea del paciente n.º 29. Las figuras 9A-9D demuestran que las líneas celulares de AML MOLM14 y MV411 y células primarias procedentes de los pacientes n.º 29 y n.º 34 fueron más sensibles a una combinación de DAC y BMN673, comparado con cada compuesto por sí solo.

Estos resultados en las líneas celulares y las células primarias demuestran que AML, y en particular AML positivas a FLT3-ITDAMLs, pretratadas con DAC también se sensibilizan al tratamiento con PARPi, lo cual sugiere una estrategia terapéutica potencial con la administración de inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMTi), seguida de un inhibidor de la reparación de ADN de PARP (PARPi).

Se trataron múltiples líneas de células de cáncer derivadas de leucemia, mama, ovario y pulmón con una dosis baja de DAC/5-AZA (10 nM y 5 nM) durante 3 días, seguido de la retirada del fármaco durante 4 días a 7 días, y el posterior cultivo en placa de las células en metilcelulosa para seguir la capacidad de autorrenovación en presencia o en ausencia del inhibidor de PARP ABT888 (500 nM). Los resultados demuestran que el tratamiento con DAC/5/AZA solamente produce una disminución significativa en el número de las colonias, mientras que el tratamiento solo con PARP tiene efecto en algunos casos (figuras 10 y 11). Sin embargo, ambos fármacos usados consecutivamente reducen significativamente el crecimiento de las colonias aún más que DAC o ABT888 por sí solos.

Análisis

Estos resultados sugieren que los agentes desmetilantes pueden alterar la función de las dianas de PARP, conduciendo al efecto potenciado de los inhibidores. Ambos tratamientos con 5AZA y ABT888 por sí solos disminuyen la actividad de PARP y los niveles en estado estacionario de proteínas de reparación de roturas bicatenarias clave, incluyendo los niveles de expresión de la propia PARP 1, lo cual sugiere que uno de los mecanismos para la sensibilización por DAC de las células AML frente a los inhibidores de PARP se realiza a través de la alteración de la reparación de DSB. La PARP 1 parece estar unida en un complejo con agentes metilantes de ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) tras producirse daños en el ADN, lo cual sugiere un nuevo mecanismo para los efectos combinados de los agentes desmetilantes y los inhibidores de PARP sobre células de cáncer. Aunque no se pretenda limitación alguna por una teoría concreta, en este escenario, los DNMTi, tales como vidaza, dacogén, y SGI-110, que funcionan como agentes desmetilantes del ADN, deben incorporarse al ADN como una citosina alterada, y después deben unir la DNMT al ADN para bloquear la actividad enzimática de estas proteínas. Debido a que DNMT y PARP interaccionan, se demuestra que los DNMTi, por sí solos, atrapan a la PARP en la cromatina. Los PARPi también atrapan a la PARP en la cromatina en las roturas bicatenarias del ADN, y ambos fármacos juntos aumentan aún más la unión de PARP a la cromatina, comparado con cada fármaco por sí solo. Puesto que se ha demostrado que los PARPi inhiben la reparación del ADN aumentando el atrapamiento de PARP en roturas bicatenarias, este es el mecanismo propuesto mediante el cual los DNMTi sensibilizan a las células de cáncer frente a PARPi potenciando el atrapamiento de PARP en la cromatina y, por tanto, disminuyendo aún más la reparación del ADN y potenciando la toxicidad celular.

Estudios anteriores han demostrado unos niveles mayores de poli-(ADP)-ribosa polimerasa (PARP1), así como una mayor actividad de una vía muy propensa a errores para la reparación de roturas bicatenarias del ADN (DSB) en la leucemia mieloide. Además, estudios recientes han demostrado que la exposición transitoria a agentes desmetilantes del ADN (DNMTi), tales como decitabina (DAC) o azacitidina (AZA), a concentraciones bajas de nM reprograma a las células del cáncer, incluyen el cáncer de mama y AML, alterando los patrones de expresión de genes heredables en vías celulares clave, que incluyen las vías de reparación del ADN. Estos estudios demuestran que un pretratamiento de células de leucemia y células de cáncer de mama con agentes desmetilantes puede sensibilizarlas también frente a inhibidores de PARP (PARPi).

Así, se expusieron líneas celulares establecidas procedentes de AML (MOLM14, MV411, KASUMI-1), y células mononucleares (MNC) obtenidas de muestras de médula ósea o de sangre del paciente (N = 6) a dosis no citotóxicas de DNMTi, seguido de cuatros días sin exposición al fármaco y un posterior tratamiento con PARPi (ABT888 menos potente, o BMN673 muy potente). En todas las líneas celulares ensayadas, un tratamiento con DAC (5 nM-10 nM), seguido de ABT888 (500 nM), indujo una disminución significativa en la supervivencia de las colonias, comparado con el control o con el tratamiento único. El uso del PARPi BMN673 (0,1 nM-100 nM) confirmó que un tratamiento con DNMTi, seguido de PARPi, induce una inhibición robusta y significativa de la capacidad formadora de colonias de líneas de células de AML. De modo importante, el mismo programa de tratamiento de DAC, seguido de PARPi, disminuye significativamente la capacidad clonogénica en 4 de 6 (67%) MNC ensayados procedentes de pacientes AML, lo cual sugiere que un tratamiento secuencial de DNMTi y PARPi es una opción terapéutica para AML y, en particular, para malignidades de AML positivas a FLT3-ITD de las cuales se derivan múltiples líneas celulares y las muestras de pacientes examinadas. Esta estrategia de tratamiento también puede aplicarse a cánceres de mama y de ovario.

Tal como se muestra, la decitabina y los inhibidores de PARP (ABT888 y BMN673) participan juntos en la disminución de la clonogenicidad en las líneas de células de AML. En las dosis usadas, ni la apoptosis ni el bloqueo de la proliferación pueden explicar en su totalidad la disminución en la clonogenicidad. La decitabina disminuye los niveles de PARP1 a través de la posible activación del proteasoma, y este efecto aumentó en presencia de inhibidores de PARP (ABT888 y BMN673). Además, en presencia de daños, los inhibidores de PARP aumentan la presencia de PARP en la cromatina, creando complejos de PARP-ADN citotóxicos.

Los resultados preliminares muestran un mecanismo de acción mediante el cual el tratamiento con DAC conduce a la localización de PARP en la cromatina, y el posterior tratamiento con PARPi produce un mayor atrapamiento de PARP. Tal como se esperaba, en los ensayos de inmunotransferencia, el tratamiento con DAC por sí solo fue suficiente para disminuir los niveles de expresión de DNMT1 y aumentar la rotura de caspasa 3 en las líneas de células de AML, comparado con células tratadas control. De modo sorprendente, el tratamiento con DAC por sí solo también indujo una disminución en la expresión de proteínas de PARP, con una mayor disminución en las células tratadas con DAC seguido de PARPi, lo cual sugiere que la señalización de la reparación del ADN y la metilación alteran los niveles en estado estacionario de PARP1. Además, los resultados preliminares demuestran que la presencia de PARP en la cromatina disminuye con el tratamiento con DAC y disminuye aún más después de PARPi.

En resumen, estos resultados sugieren que los DNMTi reprograman a las células, sensibilizándolas frente a la inhibición de PARP en pacientes AML/MDS y modelos de líneas celulares, abriendo el paso al ensayo del potencial terapéutico de un tratamiento secuencial con estos agentes en ensayos clínicos. La comprensión del modo en que interactúan estas proteínas podría explicar los mecanismos subyacentes de la sensibilización de células epigenéticamente reprogramadas frente a PARPi, y podría definir los subconjuntos moleculares de pacientes AML que pueden responder a esta nueva estrategia terapéutica.

Ejemplo 2: Potenciación de los efectos citotóxicos de los inhibidores de PARP por agentes desmetilantes del ADN - una terapia potencial para la leucemia mieloide aguda (AML)

Introducción

En algunos aspectos, el contenido descrito en la presente introduce un paradigma de terapia basada en el mecanismo que emplea inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMTi) y de PARP (PARPi) que proporcionan una estrategia de tratamiento convincente para la leucemia mieloide aguda (AML), incluyendo un subtipo muy resistente a terapias. La AML es una enfermedad heterogénea que se subdivide en subconjuntos citogenéticos y moleculares que se caracterizan por unas respuestas favorables y desfavorables a las terapias actuales (Bullinger *et al.*, 2008). Los estudios en la presente incluyen el trabajo con uno de los subconjuntos más desfavorables, AML con tirosina quinasa 3 similar a FMS con duplicaciones en tándem internas (FLT3/ITD), una tirosina quinasa constitutivamente activa expresada en 30% de todos los casos de AML (Bullinger *et al.*, 2008). A lo largo de las últimas tres décadas, se ha realizado esfuerzos clínicos para mejorar el desenlace de los pacientes con AML, principalmente aumentando la intensidad de la quimioterapia. Los pacientes adultos y que presentan AML relacionada con terapia ("therapy-related AML", t-AML) y con AML en recaída o refractaria continúan presentando desenlaces malos, y menos del 10% logran una supervivencia a largo plazo, lo cual subraya la necesidad urgente de nuevas estrategias terapéuticas (Bullinger *et al.*, 2008).

La AML se caracteriza por una inestabilidad genómica y una dependencia de la reparación de los daños en el ADN

resultantes mediante vías que implican a las proteínas de la familia PARP. Estas vías incluye la reparación propensa a errores de roturas bicatenarias (DSB), que son la forma más letal de daños en el ADN y que pueden repararse mediante dos vías principales en las células de mamífero: (i) la recombinación homóloga ("homologous recombination", HR) sin errores, que usa las cromátidas hermanas como molde, o (ii) la unión de extremos no homólogos ("non-homologous end-joining", NHEJ) propensa a errores, que une extremos del ADN independientemente de sus orígenes y funciones a lo largo del ciclo celular. Las células de AML que expresan FLT3/ITD, en particular, muestran una mayor actividad de una forma alternativa y muy propensa a errores de NHEJ (ALT NHEJ) y, de importancia en el presente trabajo, unos aumentos concomitantes en los niveles de un constituyente clave, PARP1. La PARP1 es una proteína nuclear abundante que detecta las roturas monocatenarias (SSB) y que está implicada en su reparación mediante el uso de complejos de rotura de topoisomerasa I que median en la reparación de escisión de bases ("base excision repair", BER; Durkacz *et al.*, 1980). La PARP1 también es activa en la reparación de roturas bicatenarias (DSB) actuando a través de su acción para catalizar la poli-ADP-ribosilación de sí misma, histonas y otras proteínas diana (Hassa y Hottiger, 2008; Rouleau *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el bloqueo de la actividad catalítica de PARP1 inhibe la reparación de escisión de bases (BER), provocando la acumulación de SSB, así como de DSB durante la replicación, y este daño, a su vez, activa la recombinación homóloga (HR).

Basándose en los anteriores papeles de PARP, los PARPi se han usado con éxito para sensibilizar células de cáncer deficientes en HR frente a la citotoxicidad *in vitro* y ahora se están ensayando en ensayos clínicos. De manera importante, el efecto citotóxico de los PARPi se ha correlacionado no con la inhibición catalítica de PARP1, sino con el atrapamiento de complejos de ADN-PARP citotóxicos en los sitios de daños en el ADN. Se han desarrollado nuevas clases más potentes de inhibidores de PARP, tales como BMN673 (BioMarin), que tienen hasta 100 veces más actividad inhibitoria que las clases más antiguas de PARPi, y esta potencia se correlaciona con una capacidad mucho mayor para atrapar complejos de PARP-1-ADN comparado con PARPi más débiles, tales como veliparib (ABT888; Shen *et al.*, 2013).

El contenido descrito en la presente combina el uso de inhibidores de ADN metiltransferasas (DNMTi), tales como azacitidina (AZA) y decitabina (DAC), para potenciar el anterior atrapamiento de PARP en células de AML. En la actualidad, los DNMTi se usan en la clínica para el tratamiento de AML y están aprobados por the Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos ("myelodysplastic syndromes", MDS). Existen pruebas en el pasado de la interacción de DNMT con PARP1 (Caijafa *et al.*, 2009), y la presente investigación proporciona más pruebas de la interacción de estas proteínas en la cromatina tras daños en el ADN. La acción anterior requerida de los DNMTi es atrapar a DNMT en el ADN. En la presente se presenta la hipótesis de que estos agentes, por tanto, pueden atrapar también a PARP en la cromatina (figura 13).

Métodos

Cultivo celular, fármacos y programa y dosis del tratamiento: Se cultivaron células AML humanas KASUMI-1 (positivas a AML1-ETO) en RPMI1640 + L-glutamina (Life Technologies Gibco®, Grand Island, NY), suplementado con suero bovino fetal al 20% (FBS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO); se cultivaron MV411 (homocigóticas para FLT3-ITD), MOLM14 (heterocigóticas para FLT3-ITD) en RPMI1640 + L-glutamina suplementado con FBS al 10%. El aislamiento de las células de médula ósea o células mononucleares sanguíneas (MNC) a partir de las muestras de AML se realizó usando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante, y las MNC se incubaron durante la noche en medio de crecimiento de progenitores hematopoyéticos (HPGM, Lonza, Walkersville, MD) suplementado con trombopoyetina 50 ng/ml y ligando de FLT3, factor de células madre 25 ng/ml, interleuquina-3 (IL-3) 10 ng/ml, IL-6, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) y G-CSF 1 ng/ml (Gemini Bio Product, West Sacramento, CA). El suministro de todas las AML primarias se realizó mediante protocolos aprobados por los comités de evaluación institucionales en University of Maryland School of Medicine (IRB n.º H25314). Todas las líneas celulares y MNC se cultivaron inicialmente a $0,2 \times 10^6$ células/ml y $0,5 \times 10^6$ células/ml, respectivamente, a 37 °C y 5% de CO₂.

La decitabina (DAC, 21,9 mM en DMSO, Sigma-Aldrich) se diluyó aún más en agua justo antes del tratamiento de las células con 5 nM, 10 nM o 20 nM de DAC. El PARPi veliparib (ABT888; 200 mM en agua, Enzo Life Sciences Alexis, Farmingdale, NY) y BMN673 (10 mM en DMSO, Abmole BioScience, Kowloon, Hong Kong) se diluyeron aún más en agua justo antes del tratamiento de las células con 500 nM de ABT888 y 1 nM, 10 nM o 100 nM de BMN673. Se añadió DAC cada 24 horas durante 72 horas con cambio de medio a diario, después el fármaco se retiró mediante lavado y se dejó que las células se recuperasen durante 0 días a 7 días antes de su uso posterior. El número de días sin fármaco varía entre cada línea, dependiendo de su sensibilidad a DAC. En el día 7, las células se contaron con azul de tripano, se trataron con PARPi, se cultivaron en placas de 100 mm a una densidad de $0,2 \times 10^6$ células/ml o en metilcelulosa para el ensayo de formación de colonias como se describirá a continuación. En los días indicados en las figuras, se recuperaron de 5 a 10×10^6 células viables (exclusión de azul de tripano), se congelaron rápidamente y se conservaron a -80 °C para su uso posterior para la extracción de proteínas. Para los tratamientos de combinación, los fármacos se administraron simultáneamente durante la misma longitud de tiempo total que para los tratamientos secuenciales.

Ensayo de formación de colonias: En el día 7 del experimento, se trató un número igual de células viables (células KASUMI-1, 10000 células/placa; MV411, 3000 células/placa; MOLM14, 1000 células/placa; pacientes n.º 16, 2000

células/placa, n.º 9, n.º 13 y n.º 15, 5000 células/placa, n.º 29, 10000 células/placa, n.º 30, 20000 células/placa y n.º 34, 40000 células/placa) como se describió anteriormente y se cultivaron por triplicado en una placa de 33 mm en MethoCult H4435 enriquecido (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canadá) para MNC, o disolución madre de metilcelulosa (R&D Systems, Minneapolis, MN) suplementados con medio de cultivo para las líneas celulares según las instrucciones del fabricante. De diez a diecinueve días después, las colonias se tiñeron con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (1 mg/ml) durante la noche a 37 °C, y las colonias que contenían más de 40 células se cuantificaron usando un contador de colonias y el programa informático Protocol3 (Synbiosis, Frederick, MD). Los resultados (cambios en número de veces comparados con el tratamiento CRTL) son representativos del promedio \pm PEE de al menos dos experimentos independientes por triplicado.

Ensayo de proliferación celular/citotoxicidad: Se cultivaron células (20000 células/pocillo en 200 μ l) en placas de 96 pocillos con ABT888 o BMN673 (hasta 10 μ M) durante 72 horas. Cuatro horas antes de la evaluación, se añadieron 20 μ l de reactivo de marcaje de MTS ([3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, MTS suplementado con metosulfato de fenazina, PMS, Promega, Madison, WI) a cada pocillo. Los resultados se cuantificaron usando un lector de microplacas de ELISA VersaMax a una longitud de onda de 490 nm y el programa informático SofitMax®Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los resultados (cambios en número de veces comparados con CRTL) son representativos del promedio \pm PEE de tres experimentos independientes por triplicado.

Irradiación: Para los estudios de irradiación (IR), las células se expusieron a una radiación de rayos X de 4 Gy usando una máquina de rayos X Pantak HF320 (pico de 250 kV, 13 mA; capa de mitad de valor, 1,65 mm de cobre) a una tasa de dosis de 2,4 Gy/min. Después de la IR, se dejó que las células se recuperasen de los daños en el ADN durante 4 hr antes de la extracción de las proteínas.

Fraccionamiento subcelular: Para aislar la fracción unida a cromatina (CH) y la fracción nuclear soluble (NUC), se usó un kit de fraccionamiento de proteínas subcelular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el ensayo de reparación del ADN, NUC y CH se combinaron para formar un extracto nuclear (N).

Inmunotransferencia: La inmunotransferencia se realizó siguiendo procedimientos convencionales usando 5 μ g de las fracciones NUC y CH. Las proteínas se cargaron en un gel de SDS al 4%-20%-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) y las transferencias se lavaron en disolución salina tamponada con Tris-Tween 20 al 0,1% (TBST) tres veces, se bloquearon en TBST-albúmina de suero bovina al 5% (TBST-BSA) durante al menos una hora y primero se aplicaron anticuerpos en TBST-BSA durante la noche a 4 °C en un agitador. Las transferencias se volvieron a lavar 3 veces y se aplicaron anticuerpos secundarios antirratón-peroxidasa de rábano (HRP; Cell Signaling, Danvers, MA), anticonejo-HRP (BioLegend, San Diego, CA), o fosfatasa alcalina (AP; Bio-Rad) en TBST durante una hora, seguido de 3 lavados y la detección de HRP usando quimioluminiscencia potenciada o fosfatasa alcalina empleando 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitro azul de tetrazolio (BCIP/NBT; Promega). Los anticuerpos usados fueron PARP1 monoclonal de ratón (1:3000, C2-10, BD Biosciences), DNMT1 monoclonal de ratón (1:5000, Imgenex, San Diego, CA), caspasa 3 policlonal de conejo (1:1000, Cell Signaling), H3 policlonal de conejo (1:30000, Sigma-Aldrich), γ H2AX (1:500, EMD Millipore, Billerica, MA) y β -actina monoclonal de ratón (1:5000, Sigma-Aldrich).

Inmunofluorescencia: Se citocentrifugaron células AML (0,2 \times 10⁶ células) sobre portaobjetos de vidrio durante 5 min a 200 rpm en PBS 1X en un Shandon Cytospin 4. Después las células se fijaron durante 30 min en paraformaldehído al 4%, se lavaron 3 veces en DPBS (+CaCl₂ y MgCl₂, DPBS++), se permeabilizaron durante 10 min en disolución de permeabilización (NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, HEPES 10 mM, sacaros 200 mM y Triton X-100 al 0,5% en PBS IX), se lavaron 3 veces en DPBS (+CaCl₂, +MgCl₂) suplementado con BSA al 1% (DPBS-BSA) y después se bloquearon durante la noche en DPBS++ suplementado con suero al 10%. Después de una incubación con anti- γ H2A.x monoclonal de ratón (1:100, Upstate), anti-RAD51 policlonal de conejo (1:100, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX), poli-ADP-ribosa de conejo (PAR, 1:200, Axxora, Farmingdale, NY), o controles de isotipo durante una hora a 37 °C en DPBS-BSA, las células se lavaron y después se incubaron con Dylight 594-antirratón y Dylight 488-anticonejo (1:200, KPL, Gaithersburg, MD) durante una hora a 37 °C antes de una contratinción con hidrocloreuro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 0,3 μ g/ml, Promega, Madison, WI) en medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los portaobjetos se examinaron usando un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 80i (100X/1,4 aceite, Melville, NY). Se capturaron las imágenes de al menos 50 células/portaobjetos usando una cámara CCD ("charge-coupled device", dispositivo acoplado a carga) y el programa informático de formación de imágenes NIS Elements (BR 3.00, Nikon).

Ensayo de reparación del ADN: Para medir la eficacia de NHEJ se usó un protocolo modificado *in vitro* del ensayo EJ5-*Isce1*, según se describe en Bennardo *et al.*, 2008. El indicador pimEJ5GFP (Addgene, Cambridge MA) se linealizó con *I-Sce1* (New England Biolabs, Ipswich, MA) a 37 °C durante la noche, se desfosforiló usando fosfatasa alcalina Shrimp (New England Biolabs) durante una hora a 37 °C antes de una purificación en columna (Qiagen, Gaithersburg, MD). Para la reacción de NHEJ, se incubaron 500 ng de EJ5-*Isce1* linealizado con 5 μ g de N extractos dializados en tampón E (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol al 20%, K(OAc) 0,1 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM; 2 \times 1 hr) en tampón de acoplamiento (10X tampón ligasa T4, ATP 2 mM, desoxinucleótidos trifosfos 50 μ M). Después de una incubación durante la noche a 16 °C, EJ5 se purificó a través de una purificación en columna y se sometió a una PCR para la amplificación de los genes GFP usando los cebadores PI (directo) 5'-CTGCTAACCATGTTTCATGCC-3'

(SEQ ID NO:1), y p2 (inverso) 5'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3' (SEQ ID NO:2), según describen Bennardo *et al.*, 2008. Después los productos de la PCR se ensayaron en un gel de agarosa al 2% y el producto se visualizó con tinte de ácidos nucleicos GelStar™ (Lonza). Se calculó el plásmido acoplado (producto de la PCR) con relación al ADN total cargado y se expresa como eficacia relativa de la reparación (cambios en número de veces comparados con CRTL). Se usó la expresión de H3 como control de carga para la cantidad de proteínas usada en cada reacción.

Modelos de xenoinjerto de AML: Se usaron ratones NSG hembra (6-8 semanas de edad) para todos los estudios de xenoinjerto *in vivo* y se alojaron con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad con acceso sin límite a agua y alimento. Se inyectaron por vía intravenosa células MV4-11-luc en crecimiento exponencial (1×10^6 ; Dr. Sharyn Baker, St Jude) en la vena lateral de la cola de ratones inmovilizados. Tres días después se evaluó el injerto de células después de una inyección de D-luciferina (150 mg/kg IP) con un sistema de formación de imágenes Xenogen IVIS-2 (Alameda, CA). Los ratones se clasificaron en 4 grupos de tratamiento, de modo que la intensidad promedio de la señal era igual. Los ratones se observaron de modo visual a diario, se pesaron 5 días semanales y se evaluó la carga leucémica cada semana mediante formación de imágenes de luciferina no invasiva. Los ratones se trataron con BMN673 0,1 mg/kg, 5-AzaC 0,5 mg/kg, la combinación o el vehículo (DMAc al 10%/Solutol al 6%/PBS al 84% para BMN 673 o disolución salina para 5-AzaC). Se administró BMN 673 mediante sonda oral (per os) una vez diaria y se administró 5-AzaC mediante una inyección subcutánea diaria, 5 días por semana durante la duración del estudio.

Densitometría y análisis estadístico: Cuando resultó pertinente, se realizaron gráficas de densitometría usando el programa informático Quantity-one (v.4.6, Bio-Rad) después de un barrido de luminogramas no saturados, y los resultados se representan como cambios en número de veces comparado con CRTL de tres experimentos independientes \pm PEE. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando un ensayo de la T de Student, y * significa un valor de $p < 0,05$, a menos que se indique lo contrario.

Resultados

PARP1 interacciona con DNMT en un complejo de proteínas agrandado inducido por daños: Otros han indicado que PARP-1 interacciona de modo no covalente con la ADN metiltransferasa 1 (Dnmt1; Caiafa *et al.*, 2009), lo cual sugiere que las vías epigenéticas y de reparación del ADN están conectadas mecánicamente. En el presente estudio, estos datos se han extrapolado para la interacción usando un modelo de daños en el ADN previamente descrito, en el que células de cáncer humanas se han expuesto a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Dentro de 30 min de esta exposición, se observó un complejo de proteínas agrandado, que incluye las tres DNMT biológicamente activas, histona desacetilasas, y proteínas silenciadores de polipeptido. Los daños también inducen la unión fuerte de componentes del complejo a la cromatina, en especial DNMT1, y la localización en sitios de daños del ADN. En el presente trabajo se descubrió, en el anterior modelo, que un constituyente de este complejo, incluido en el complejo de tamaño agrandado después de daños en el ADN, es PARP1 (figura 14). En esta dinámica, PARP1 interacciona con DNMT, según se observa mediante ensayos de coimmunoprecipitación realizados sobre fracciones en gradiente de sacarosa, que definen el tamaño del complejo antes y después de los daños (figura 14).

DNMTi y PARPi aumentan el atrapamiento en sitios de daños en el ADN: PARPi y, en especial, la nueva clase de fármacos potentes, tales como BMN673, han demostrado no solo inhibir catalíticamente la actividad PARP, sino también atrapar a PARP en la cromatina, formando complejos de ADN-PARP citotóxicos. De manera importante para los estudios de la presente, los DNMTi, por sus mecanismos obligatorios de acción, se incorporan en el ADN en replicación como nucleótidos exógenos. Después de esto, se unen covalentemente a los sitios catalíticos de las tres DNMT biológicamente activas, inhibiendo su capacidad metilante del ADN y activando la degradación, en especial de las tres proteínas solubles en el núcleo. Sin embargo, los fármacos también unen a las DNMT a sus sitios de incorporación en el ADN y, dados los datos en las secciones anteriores, se estableció el interrogante de si PARP1 también se atraparía y si este tratamiento potenciaría la capacidad de PARPi para atrapar a PARP1. Usando la administración de DNMTi a concentraciones bajas de nM (DAC 10 nM y 20 nM DAC), y los PARPi ABT888 (500 μ M) o BMN673 (10 nM), de modo secuencial o en combinación, a células de AML MV411 y MOLM14 (figura 15; Tsai *et al.*, 2012), se estudiaron extractos de cromatina procedentes de células irradiadas con rayos X (4 Gy) para inducir DSB. Tal como se esperaba, mediante un análisis de la transferencia Western, la PARP1 aumenta en la cromatina en células de AML tratadas con 1 nM o 10 nM del potente BMN673, comparado con 500 nM o 5 μ M de ABT888 (PARPi más débil). Sin embargo, el tratamiento solo con DAC también atrapa a PARP1 en la cromatina, y el tratamiento de combinación de este fármaco con PARPi aumenta aún más el atrapamiento de PARP1, comparado con los tratamientos con un único fármaco (figura 15). Estos descubrimientos, a los que se dedican las siguientes secciones, sugieren que la combinación de agentes desmetilantes del ADN con PARPi puede tener ramificaciones mecánicas para los efectos de la reparación de daños en el ADN y para los paradigmas de la terapia del cáncer.

La combinación de DNMTi y PARPi induce una disminución en la reparación de DSB: Los anteriores datos sugieren que los procesos de reparación del ADN que implican a PARP, incluyendo la reparación de SSB, la reparación asociada a la replicación y ALT NHEJ, deben disminuir, a través de aumentar el atrapamiento de esta proteína con un tratamiento combinatorio de DAC y PARPi. Puesto que los factores de PARP1 y NHEJ Ku compiten para la unión a las DSB, se concluyó que el atrapamiento de PARP puede bloquear la reparación de c-NHEJ. Por tanto, primero se determinó si el tratamiento con DAC, seguido de PARPi, altera la eficacia de NHEJ. Se trataron MV411 a diario durante 3 días con DAC (20 nM), se dejó que se recuperasen durante 4 días, seguido de un tratamiento con ABT888 (5 μ M) o BMN673 (10 nM). La actividad NHEJ en extractos nucleares, según se cuantificó mediante ensayos de

NHEJ basados en plásmidos usando una construcción de PIM1EJ5-GFP (figura 16A; Bennardo *et al.*, 2008), disminuye inconfundiblemente con la combinación de fármacos, comparado con cualquiera de los fármacos por sí solo (figura 16B). Además, BMN673 (10 nM) en combinación con DAC (5 nM o 10 nM) muestra mayores porcentajes de células con más de 20 focos de γ H2AX y menos eficacia de reparación de NHEJ (figura 16C).

5 Para determinar si la anterior disminución en la reparación de DSB conduce a un aumento en los niveles de DSB se midieron los focos de γ H2AX en MV411 después de un tratamiento solo con DAC (20 nM), BMN673 (10 nM) o ABT888 (5 μ M), y combinaciones de los fármacos. El tratamiento solo con DAC no produjo un aumento en los focos en estos experimentos a corto plazo, tal como se ha indicado previamente (Tsai *et al.*, 2012). El tratamiento solo con BMN673 o ABT888 mostró un aumento en los focos y, como comparación, DAC seguido de PARPi mostró
10 significativamente más focos de γ H2AX (figura 16D).

DNMTi combinados con PARPi disminuye la clonogenicidad en células de AML primarias y cultivadas: Puesto que el atrapamiento de los complejos de ADN-PARP en los sitios de daños en el ADN se correlaciona con la citotoxicidad de PARPi, y que los DNMTi seguidos de PARPi disminuyen la clonogenicidad en ensayos de supervivencia de colonias de células de AML en metilcelulosa (figura 9), después se determinó si se observan los mismos resultados
15 en muestras primarias procedentes de pacientes AML.

Los anteriores estudios en células de AML cultivadas se siguieron con idénticos protocolos de tratamiento para muestras primarias procedentes de 11 pacientes AML usando ABT888 (500 nM) en 7 muestras (pacientes n.º 9, n.º 15, n.º 16, n.º 18, n.º 29, n.º 30, n.º 34; figuras 7A y 21), y además BMN673 (1 nM-10 nM) para 6 muestras (pacientes n.º 30, n.º 34, n.º 81, n.º 86, n.º 90, n.º 92; figura 21). Sin embargo, de modo muy importante, las
20 muestras de 7 de 11 pacientes (pacientes n.º 15, n.º 29, n.º 34, n.º 81, n.º 86, n.º 90, n.º 92) demostraron que un pretratamiento con DAC sensibiliza también a estas células frente al tratamiento con ABT888 o al tratamiento con BMN673 (1 nM-10 nM). De manera importante, al igual que en las líneas de cultivo MOLM14 y MV411, las muestras de los pacientes n.º 15, n.º 29 y n.º 34 tienen AML positiva a FLT3-ITD, que porta esta mutación de prognosis mala (figura 21A). Además, el uso de DAC (10 nM) o AZAC (100 nM) y BMN 673 (5 nM) administrados de modo
25 simultáneo (en lugar de secuencialmente), produjo descubrimientos similares de una supervivencia de las colonias significativamente disminuida, comparado con los tratamientos con un único agente (figuras 17A-17D). De modo importante, la médula ósea normal no se ve afectada por las concentraciones de fármacos usadas (figura 18).

Conjuntamente, todos los resultados en esta sección, en las líneas celulares y en células primarias, demuestran que AML y, en particular células de AML positivas a FLT3-ITD, tratadas con DAC/AzaC en combinación con PARPi, son
30 significativamente sensibles, comparado con los tratamientos con un único fármaco. Esto sugiere, tal como se ensayó a continuación, una estrategia terapéutica potencial con la administración de DNMTi en combinación con PARPi.

Los xenoinjertos de AML son sensibles a la combinación de DAC y PARPi: Para determinar si las células AML sensibilizadas a DNMTi son sensibles a PARPi *in vivo*, se realizaron experimentos de xenoinjertos en ratones usando la línea celular positiva a FLT3/ITD MV411 que expresa luciferasa de modo estable (MV411-luc). Animales macho o hembra *NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wj1/SzJ* (NSG) (número de artículo: 005557; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) recibieron una inyección intravenosa de 5×10^6 células MV4-11-luc. El injerto de las células se evaluó después de una inyección de D-luciferina (150 mg/kg i.p.; Perkin Elmer, Waltham, MA) con un sistema de formación de imágenes Xenogen IVIS-200 (Alameda, CA), y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento basándose en la intensidad de la señal. Los grupos de tratamiento fueron con vehículo, con azacitidina (AzaC) (0,5 mg/kg/día SC 5 días/semana), con BMN (1 mg/kg PO 5 días/semana) y con los dos fármacos combinados. Se controló la carga leucémica cada semana mediante formación de imágenes de luciferasa no invasivas, y los ratones se observaron a diario y recibieron una eutanasia humanitaria cuando aparecieron señales de enfermedad terminal (parálisis de las extremidades traseras, incapacidad para comer/beber, letargia moribunda). Las células MV4-11-luc se injertaron en la médula ósea en el día 7 en machos y en el día 9 en hembras después de la inyección de las células. En el momento de aparición de enfermedad terminal, se observó >90% de infiltración de células leucémicas en la médula ósea. Tal como se mide mediante intensidad de fotones, los resultados demuestran que la combinación de BMN673 y AzaC produce una disminución significativa ($p < 0,01$) en la carga tumoral hasta el día 30 después del tratamiento, comparado con cada uno de los fármacos por sí solos (figuras 19A, B). Aunque la carga de leucemia aumentó en todos los grupos después del día 30 después del tratamiento (figura 19C), al final del experimento, la carga de leucemia, el peso del bazo y los blastos en la sangre periférica mostraron enfermedad significativamente disminuida con la combinación de tratamiento, comparado con los tratamientos con cualquiera de los fármacos por sí solos (figuras 19D, E). Todos los tratamientos fueron bien tolerados (figura 19F). Los resultados también demuestran que la combinación de BMN673 y AzaC condujo a una mayor supervivencia, comparado con BMN673 por sí solo (figura 20).

55 Análisis

El desarrollo de inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) representa uno de los desarrollos más emocionantes en la terapia del cáncer. Aunque se ha demostrado una eficacia sustancial con los inhibidores de PARP clínicamente disponibles, hasta la fecha, en el tratamiento de deleciones hereditarias de BRCA1/2 en cánceres de mama y ovario no se había advertido la gran promesa de esos fármacos para cánceres no defectuosos en BRCA1/2. Los presentes estudios demuestran, por primera vez en AML, que DNMTi en combinación con el
60

potente PARPi BMN673 actúa aumentando el atrapamiento de complejos de ADN-PARP en la cromatina. Estos complejos producen una disminución en la reparación de DSB y aumentan las DSB citotóxicas *in vitro* e *in vivo*. Esta nueva estrategia de tratamiento es particularmente importante en el subgrupo de AML positivo a FLT3/ITD, que confiere una mala prognosis y para el cual están disponibles pocas opciones terapéuticas.

5 Usando ensayos basados en plásmidos establecidos que miden NHEJ, se demostró, por primera vez, que el tratamiento con inhibidores de PARP disminuye la eficacia de NHEJ, pero que un pretratamiento con DAC disminuye aún más esta actividad de reparación. De modo interesante, estudios recientes han sugerido que DAC podría afectar a la eficacia de reparación de NHEJ (Moscariello e Iliakis, 2013). De modo notable, este efecto podría explicar por
10 qué un pretratamiento con DAC, seguido de PARPi, o los dos fármacos en combinación, es un potente inductor de la citotoxicidad, puesto que estos dos fármacos colaboran para reducir/suspender la capacidad de las células de AML para reparar las DSB. Se ha demostrado previamente una alta actividad y "dependencia" celular potencial de esta vía en células leucémicas y de cáncer de mama, que se caracterizan por la dependencia de unos elevados niveles de expresión y actividad de PARP-1.

15 Estos estudios demuestran un paradigma terapéutico nuevo y apasionante de DNMTi en combinación con inhibidores de PARP, tales como BMN673, para la AML. Estos estudios preclínicos permitirán el avance rápido de esta nueva estrategia terapéutica hasta un ensayo clínico, para ensayar la eficacia de la terapia epigenética antes de la terapia con inhibidores de PARP para MDS y AML. Estos estudios ofrecen un trabajo preliminar para estudios combinatorios similares en otros cánceres, tales como el cáncer de mama negativo a receptores. Además, estos estudios pueden producir un mayor conocimiento del mecanismo por el cual interaccionan las vías epigenética y de
20 reparación del ADN, sugiriendo otras dianas terapéuticas.

Ejemplo 3: Sinergia de los agentes desmetilantes del ADN y los inhibidores de PARP

Se generaron gráficas del índice de combinación usando el programa informático CompuSyn (ComboSyn, Inc.) para células MOLM14 tratadas a diario durante 7 días con el inhibidor de PARP BMN673 (0,5, 1, 2 y 4 nM) y los
25 inhibidores de DNMT1 decitabina (5, 10, 20, 40 nM) o 5-azacitidina (50, 100, 200, 400 nM) (figura 22). Se usó el ensayo de MTS (Promega, Madison, WI), un método colorimétrico para determinar el número de células viables y, por tanto, la citotoxicidad, para medir la viabilidad celular y la citotoxicidad después de diversos tratamientos con fármacos, y estos valores se emplearon para calcular la sinergia. El eje de abscisas representa la fracción de células afectadas (Fa), y el eje de ordenadas muestra el índice de combinación (CI). Cada punto representa un tratamiento de combinación (por ejemplo, BMN 0,5 nM y AZA 50 nM, etc.). La línea horizontal representa el valor CI = 1, cuando
30 una combinación de fármacos concreta es aditiva. Cualquier punto por debajo de la línea horizontal (CI < 1) representa combinaciones sinérgicas, y los valores de CI por encima de la línea (CI > 1) representan combinaciones antagonistas. Todas las combinaciones (excepto BMN 1 nM/DAC 10 nM, y BMN 1 nM/AZA 100 nM) muestran sinergia.

Referencias bibliográficas

35 Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la cual pertenece el contenido descrito en la presente.

Agger K., Christensen J., Cloos P.A., Helin K., The emerging functions of histone demethylases, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008, 18(2):159-168.

40 Audebert, M., Salles, B., y Calsou, P. (2004), Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining, *J. Biol. Chem.*, 279, 55117-55126.

Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M., y Calsou, P. (2006), Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway, *J. Mol. Biol.*, 356, 257-265.

Baylin S.B., Jones P.A., A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications, *Nat. Rev. Cancer*, 2011, 11(10):726-734.

45 Beneke S., Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation, *Front. Genet.*, 2012, 3169.

Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., y Stark, J. M. (2008), Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair, *PLoS Genet.*, 4, e1000110.

50 Blum, W., Klisovic, R. B., Hackanson, B., Liu, Z., Liu, S., Devine, H., Vukosavljevic, T., Huynh, L., Lozanski, G., Kefauver, C., *et al.* (2007), Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia, *J. Clin. Oncol.*, 25, 3884-3891.

Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., y Helleday, T. (2005), Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase, *Nature*, 434, 913-917.

Bullinger, L., Dohner, K., Kranz, R., Stirner, C., Frohling, S., Scholl, C., Kim, Y. H., Schlenk, R. F., Tibshirani, R.,

- Dohner, H., y Pollack, J. R. (2008), An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML, *Blood*, 111, 4490-4495.
- Caiafa, P., Guastafierro, T., y Zampieri, M. (2009), Epigenetics: poly(ADP-ribose)ylation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns, *FASEB J.*, 23, 672-678.
- 5 Cashen, A. F., Shah, A. K., Todt, L., Fisher, N., y DiPersio, J. (2008), Pharmacokinetics of decitabine administered as a 3-h infusion to patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 61, 759-766.
- Durkacz, B. W., Omidiji, O., Gray, D. A., y Shall, S. (1980), (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair, *Nature*, 283, 593-596.
- 10 Fan J., Robert C., Jang Y.Y., *et al.*, Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining, *Mutat Res.*, 2011, 713(1-2):8-17.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005), Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy, *Nature*, 434, 917-921.
- 15 Fattah, F., Lee, E. H., Weisensel, N., Wang, Y., Lichter, N., y Hendrickson, E. A. (2010), Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells, *PLoS Genet.*, 6, e1000855.
- Gaymes T.J., Mohamedali A.M., Patterson M., *et al.* (2013), Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies, *Haematologica*, 98(9):1397-1406.
- 20 Gaymes, T. J., North, P. S., Brady, N., Hickson, I. D., Mufti, G. J., y Rassool, F. V. (2002), Increased error-prone non homologous DNA end-joining--a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome, *Oncogene*, 21, 2525-2533.
- Gaymes T.J., Shall S., MacPherson L.J., *et al.* (2009), Inhibitors of poly ADP-ribose polymerase (PARP) induce apoptosis of myeloid leukemic cells: potential for therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes, *Haematologica*, 94(5):638-646.
- 25 Guha M., PARP inhibitors stumble in breast cancer, *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29(5):373-374.
- Haince J.F., Kozlov S., Dawson V.L., *et al.*, Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(22):16441-16453.
- 30 Hassa, P.O., y Hottiger, M. O. (2008), The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases, *Front. Biosci.*, 13, 3046-3082.
- Helleday, T. (2011), The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings, *Molecular oncology*, 5, 387-393.
- 35 Helleday T., Bryant H.E., Schultz N., Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy, *Cell Cycle*, 2005, 4(9):1176-1178.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., y Sharma, R. A. (2008), DNA repair pathways as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 8, 193-204.
- Isakoff, S. J. (2010), Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents, *Cancer J.*, 16, 53-61.
- 40 Issa, J. P., Garcia-Manero, G., Giles, F. J., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C. S., Cortes, J., y Kantarjian, H. M. (2004), Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies, *Blood*, 103, 1635-1640.
- Jones, P. A. (2002), DNA methylation and cancer, *Oncogene*, 21, 5358-5360.
- Jones, P. A., y Taylor, S. M. (1980), Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation, *Cell*, 20, 85-93.
- 45 Juergens R.A., Wrangle J., Vendetti F.P., *et al.*, Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer, *Cancer Discov.*, 2011, 1(7):598-607.
- Kantarjian, H., Issa, J. P., Rosenfeld, C. S., Bennett, J. M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., *et al.* (2006), Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study, *Cancer*, 106, 1794-1803.

- Kashima L., Idogawa M., Mito H., *et al.*, CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation, *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(16):12975-12984.
- Khanna, K. K., y Jackson, S. P. (2001), DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.*, 27, 247-254.
- 5 Khanna K.K., Lavin M.F., Jackson S.P., Mulhem T.D., ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage, *Cell Death Differ.*, 2001, 8(11):1052-1065.
- Kouzarides T., Chromatin modifications and their function, *Cell*, 2007, 128(4):693-705.
- McCabe N., Turner N.C., Lord C.J., *et al.*, Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition, *Cancer Res.*, 2006, 66(16):8109-8115.
- 10 Moscariello, M., e Iliakis, G. (2013), Effects of chromatin decondensation on alternative NHEJ, *DNA Repair (Amst)*, 12, 972-981.
- Murai, J., Huang, S. Y., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., Ji, J., Takeda, S., y Pommier, Y. (2012), Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors, *Cancer Res.*, 72, 5588-5599.
- 15 Murai, J., Huang, S. Y., Renaud, A., Zhang, Y., Ji, J., Takeda, S., Morris, J., Teicher, B., Doroshow, J. H., y Pommier, Y. (2014), Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib, *Mol. Cancer Ther.*, 13, 433-443.
- Noel, G., Godon, C., Fernet, M., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., y Favaudon, V. (2006), Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis, *Mol. Cancer Ther.*, 5, 564-574.
- 20 O'Hagan, H. M., Wang, W., Sen, S., Destefano Shields, C., Lee, S. S., Zhang, Y. W., Clements, E. G., Cai, Y., Van Neste, L., Easwaran, H., *et al.* (2011), Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands, *Cancer Cell*, 20, 606-619.
- Rassool, F. V., y Tomkinson, A. E. (2010), Targeting abnormal DNA double strand break repair in cancer, *Cell Mol. Life Sci.*, 67, 3699-3710.
- 25 Rauth S., Song K.Y., Ayares D., Wallace L., Moore P.D., Kucherlapati R., Transfection and homologous recombination involving single-stranded DNA substrates in mammalian cells and nuclear extracts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83(15):5587-5591.
- Robert C., Rassool F.V., HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair, *Adv. Cancer Res.*, 2012, 11687-11129.
- 30 Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H., y Poirier, G. G. (2010), PARP inhibition: PARP1 and beyond, *Nat. Rev. Cancer*, 10, 293-301.
- Saleh-Gohari, N., Bryant, H. E., Schultz, N., Parker, K. M., Cassel, T. N., y Helleday, T. (2005), Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks, *Mol. Cell Biol.*, 25, 7158-7169.
- 35 Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K. T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., y Rassool, F. (2008a), Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML, *Blood*, 111, 3173-3182.
- Sallmyr, A., Tomkinson, A. E., y Rassool, F. V. (2008b), Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks, *Blood*, 112, 1413-1423.
- 40 Schiltz R.L., Mizzen C.A., Vassilev A., Cook R.G., Allis C.D., Nakatani Y., Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(3):1189-1192.
- Shen, Y., Rehman, F. L., Feng, Y., Boshuizen, J., Bajrami, I., Elliott, R., Wang, B., Lord, C. J., Post, L. E., y Ashworth, A. (2013), BMN 673, a Novel and Highly Potent PARP1/2 Inhibitor for the Treatment of Human Cancers with DNA Repair Deficiency, *Clin. Cancer Res.*, 19, 5003-5015.
- 45 Tobin L.A., Robert C., Nagaria P., Chumsri S., Twaddell W., Ioffe O.B., Greco G.E., Brodie A.H., Tomkinson A.E., Rassool F.V., Targeting abnormal DNA repair in therapy-resistant breast cancers, *Mol. Cancer Res.*, 2012, 10(1):96-107.
- Tobin, L. A., Robert, C., Rapoport, A. P., Gojo, I., Baer, M. R., Tomkinson, A. E., y Rassool, F. V. (2013), Targeting abnormal DNA double-strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias, *Oncogene*, 32, 1784-1793.

Tsai, H. C., Li, H., Van Neste, L., Cai, Y., Robert, C., Rassool, F. V., Shin, J. J., Harbom, K. M., Beaty, R., Pappou, E., *et al.* (2012), Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells, *Cancer Cell*, 21, 430-446.

Venkitaraman A.R., Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, *Cell*, 2002, 108(2):171-182.

- 5 Zhang, Y. W., Regairaz, M., Seiler, J. A., Agama, K. K., Doroshov, J. H., y Pommier, Y. (2011), Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, 39, 3607-3620.

Lista de secuencias

10 <110> Rassool, Feyruz V
Baylin, Stephen B
Robert, Carine

<120> Régimen de terapia y métodos para sensibilizar células de cáncer tratadas con una terapia epigenética frente a inhibidores de PARP en múltiples cánceres

15 <130> 111232-00370.P12345-02

<160> 2

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador PCR

30 <400> 1
ctgctaacca tggtcatgcc 20

<210> 2

<211> 20

35 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador PCR

40 <400> 2
aagtcgtgct gcttcatgtg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una combinación que comprende un agente desmetilante del ADN y un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que el agente desmetilante del ADN se administra a una dosis menor que 100 mg/m² y el inhibidor de PARP se administra a una dosis menor que 500 mg/m², y en la que la combinación se selecciona de lo siguiente:
- a) el agente desmetilante del ADN es 5-azacitidina, el inhibidor de PARP es BMN-673, y el cáncer es la leucemia mieloide aguda;
 - b) el agente desmetilante del ADN es decitabina, el inhibidor de PARP es BMN-673, y el cáncer es la leucemia mieloide aguda;
 - 10 c) el agente desmetilante del ADN es 5-azacitidina, el inhibidor de PARP es veliparib, y el cáncer es la leucemia mieloide aguda; y
 - d) el agente desmetilante del ADN es decitabina, el inhibidor de PARP es veliparib, y el cáncer es la leucemia mieloide aguda.
- 15 2.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que la dosis del agente desmetilante del ADN es de 20 mg/m² a 75 mg/m².
- 3.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que la dosis del inhibidor de PARP es de 1 a 500 mg/m².
- 4.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente desmetilante del ADN y el inhibidor de PARP se administran cada uno en una dosis diaria única.
- 20 5.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.
- 6.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el tratamiento del cáncer incluye reducir el mecanismo de reparación del ADN bicatenario en una o más células de cáncer en el sujeto.
- 7.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el tratamiento del cáncer incluye aumentar el número de complejos de ADN-PARP citotóxicos en la cromatina en una o más células de cáncer en el sujeto.
- 25 8.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente desmetilante del ADN se administra antes que el inhibidor de PARP o de modo simultáneo con el inhibidor de PARP.
- 9.- Una combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que el efecto del agente desmetilante del ADN y el inhibidor de PARP es sinérgico.

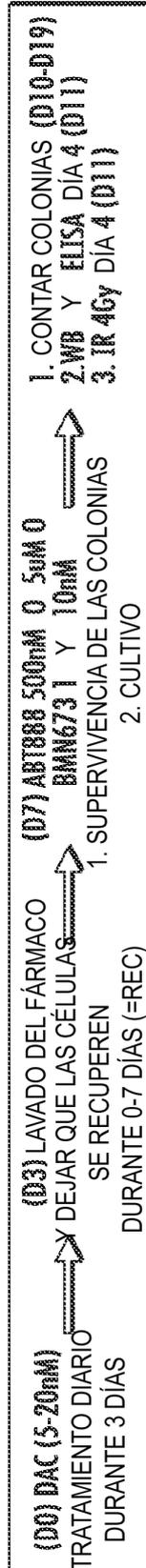


FIG. 7

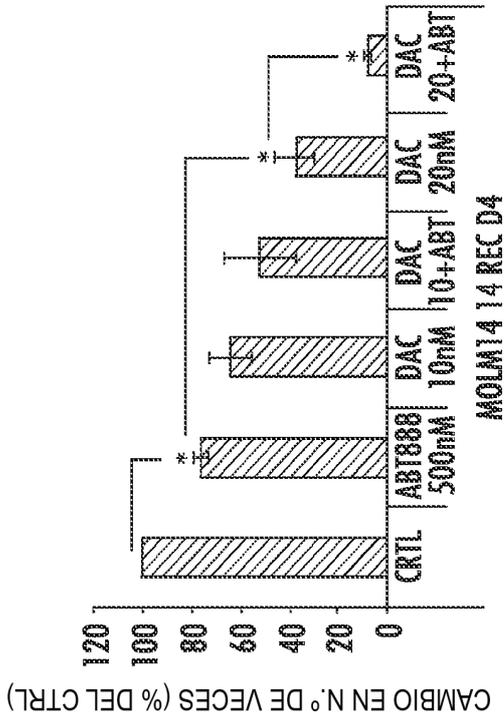


FIG. 2B

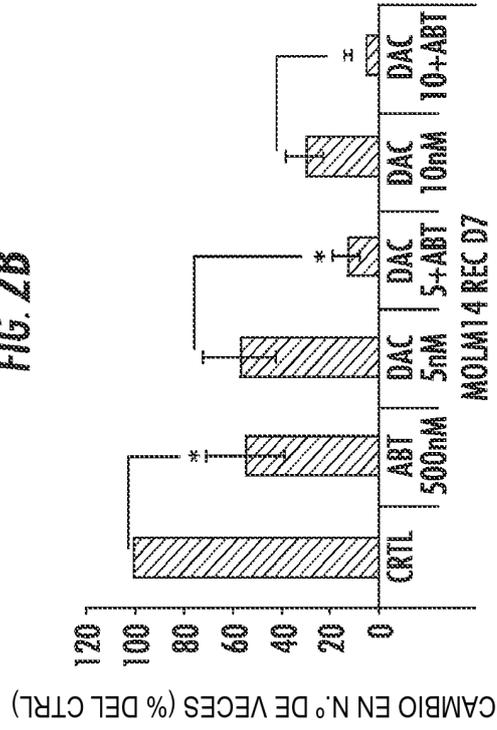


FIG. 2D

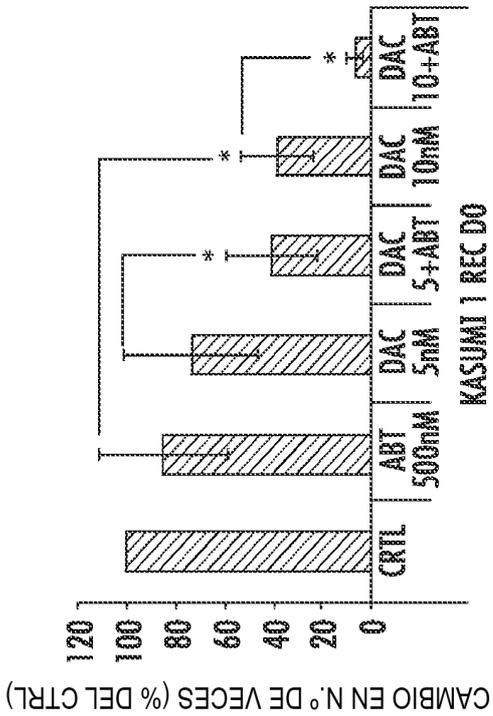


FIG. 2A

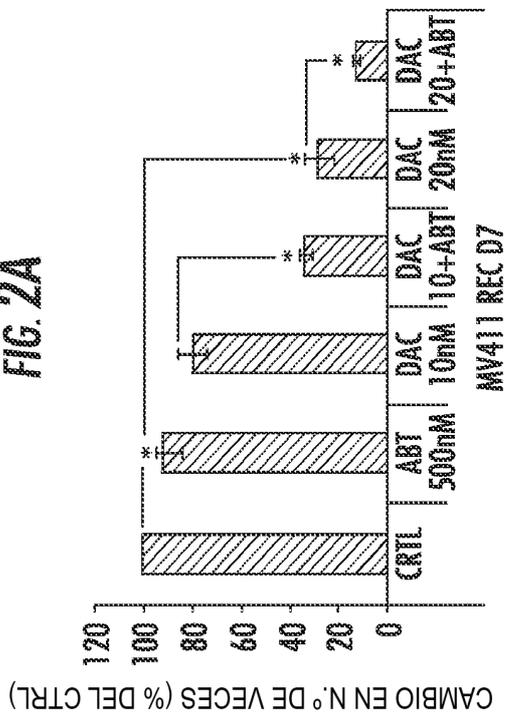


FIG. 2C

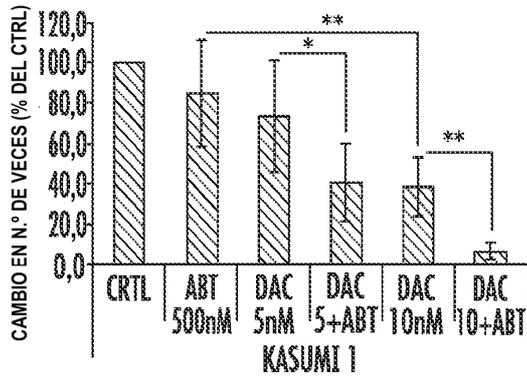


FIG. 3A

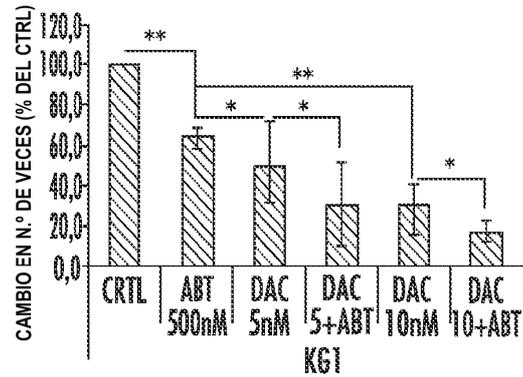


FIG. 3B

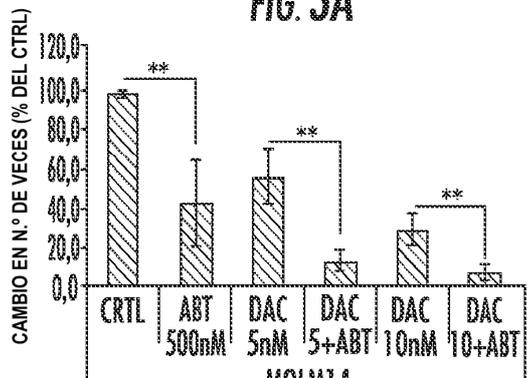


FIG. 3C

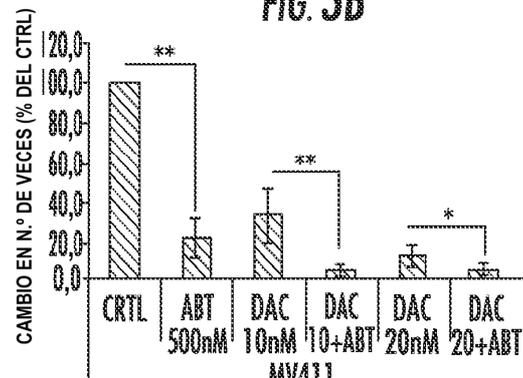


FIG. 3D

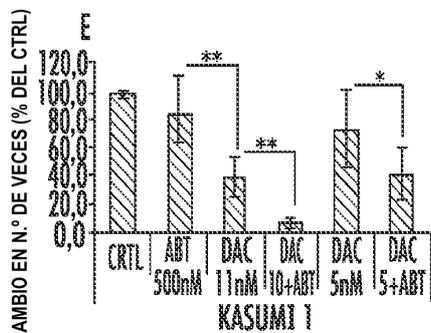


FIG. 3E

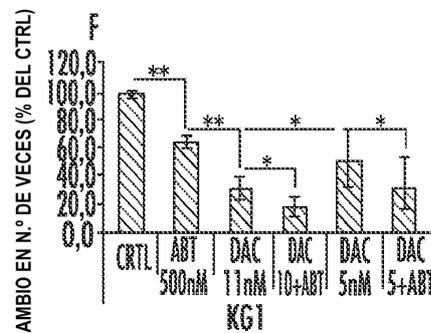


FIG. 3F

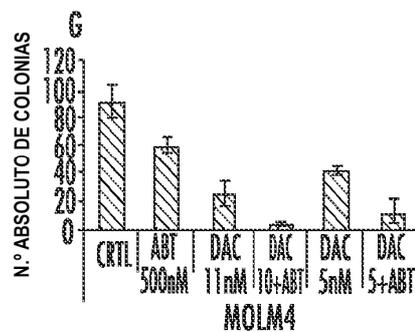


FIG. 3G

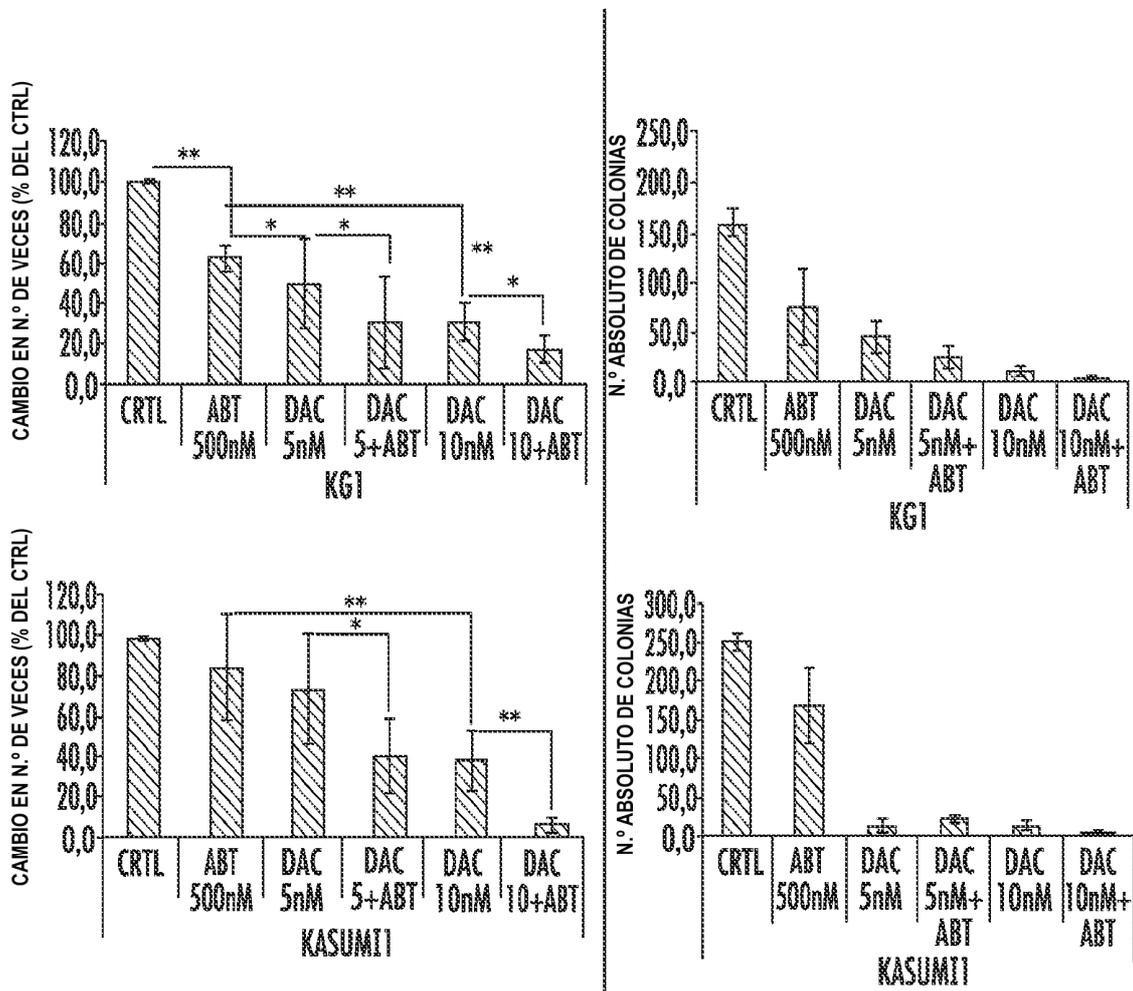


FIG. 4A

FIG. 4B

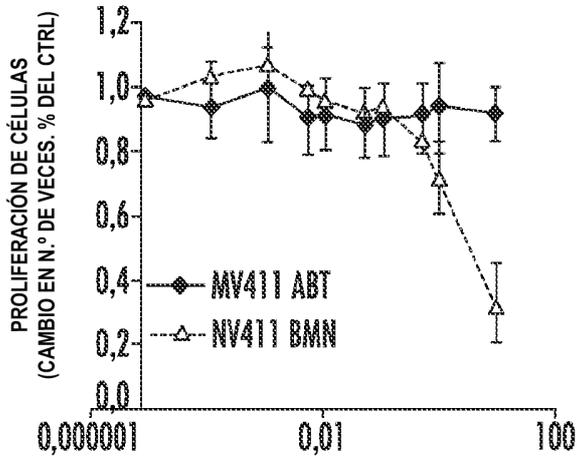


FIG. 5A

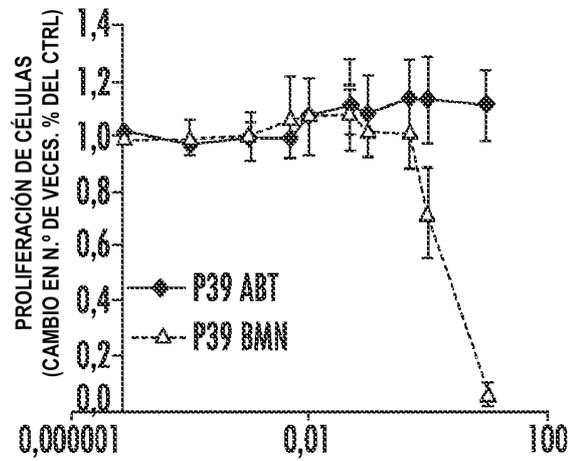


FIG. 5B

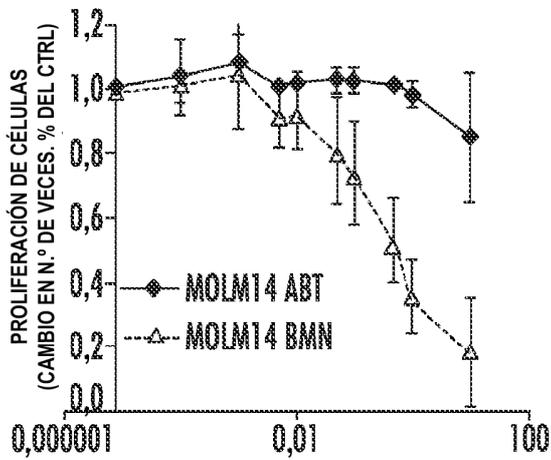


FIG. 5C

MUESTRA	MV411 ABT	MV411 BMN	MOLM14 BMN	MOLM14 BMN	P39 ABT	P39 BMN
IC50 (µM)	475	6,45	27,27	4,46	0	4,87

FIG. 5D

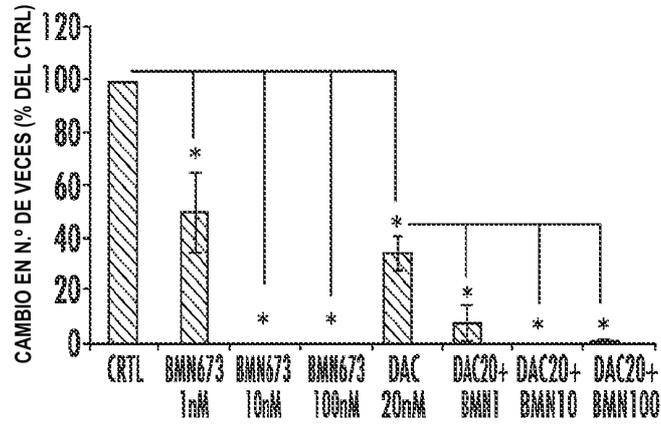


FIG. 6A

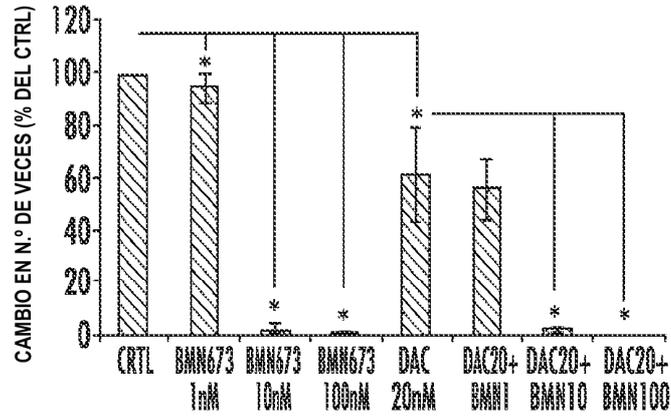


FIG. 6B

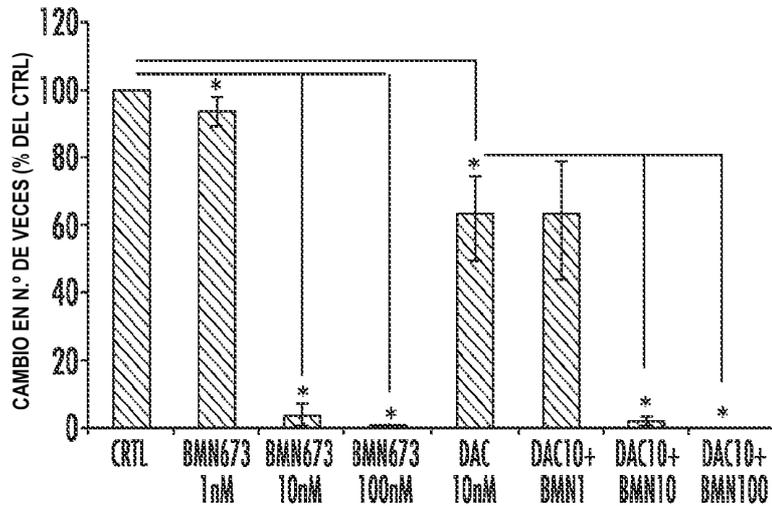


FIG. 6C

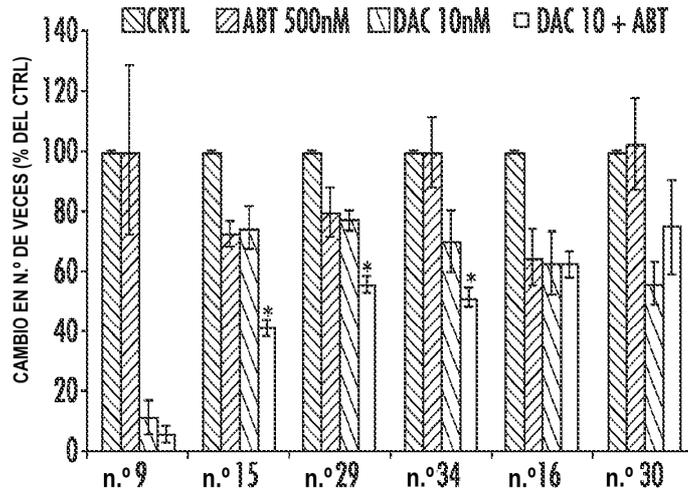


FIG. 7A

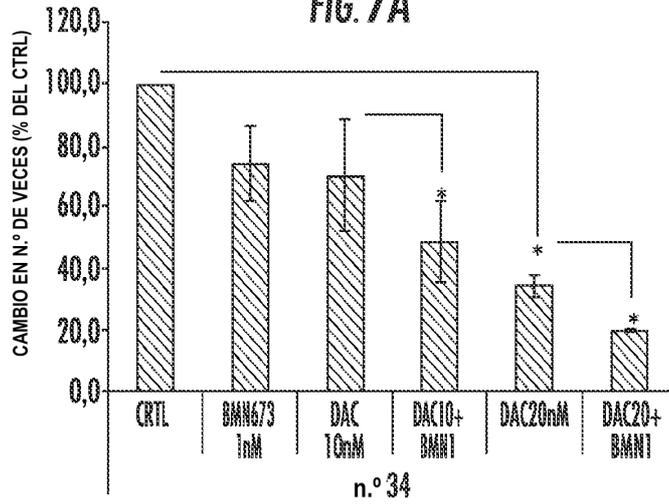


FIG. 7B

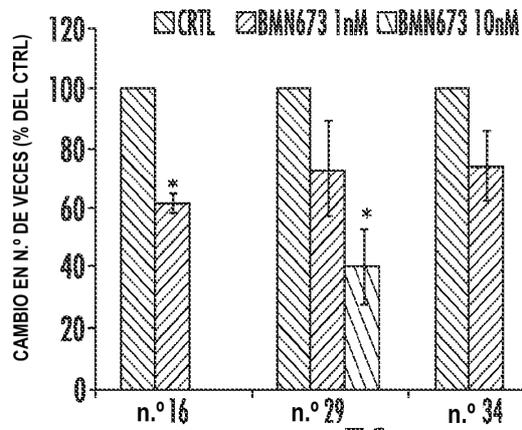


FIG. 7C

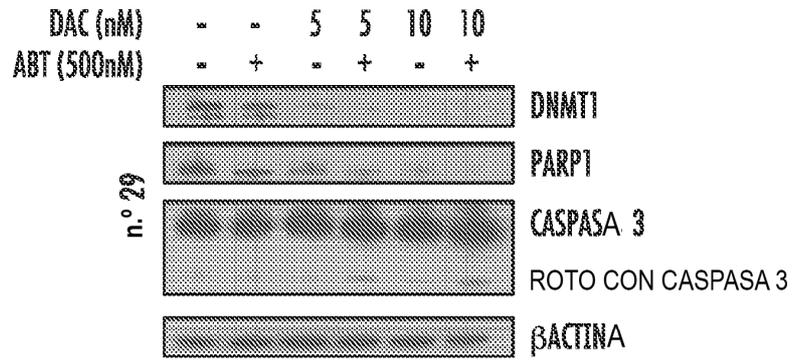


FIG. 8A

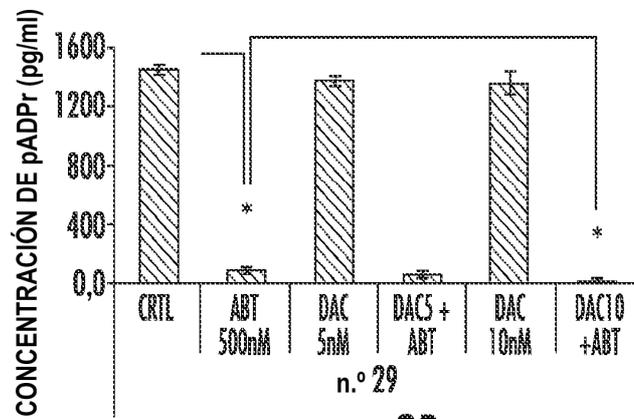


FIG. 8B

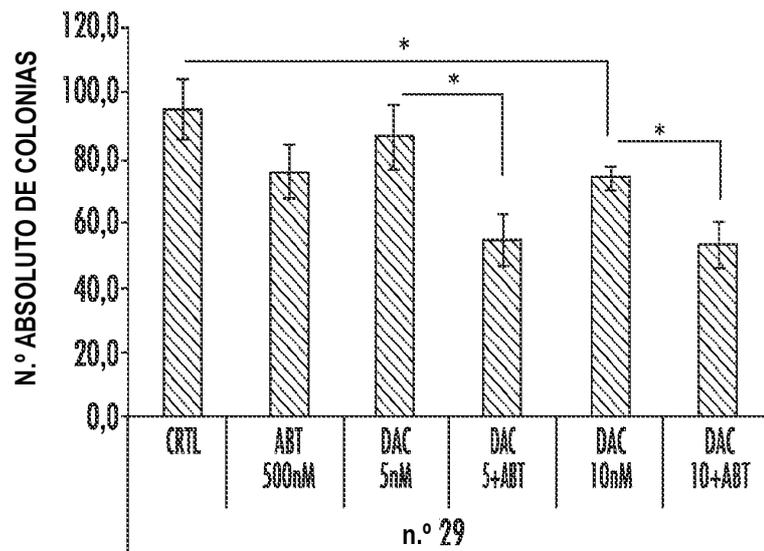


FIG. 8C

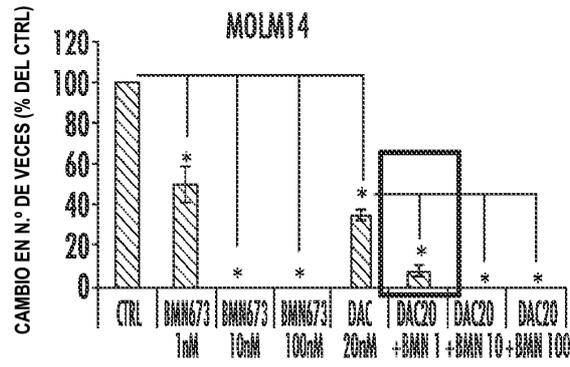


FIG. 9A

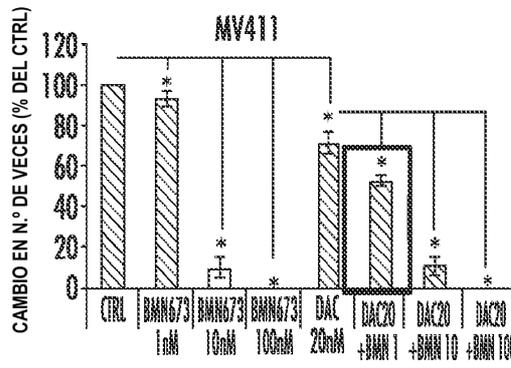


FIG. 9B

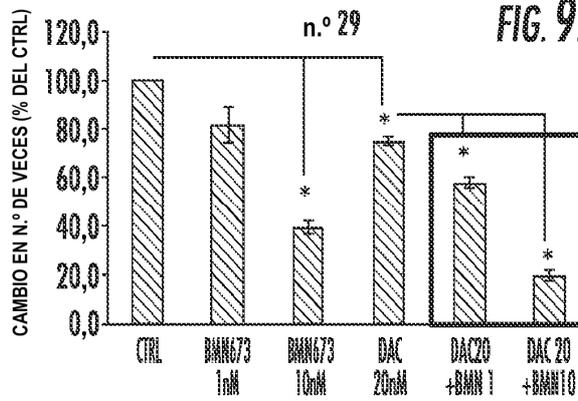


FIG. 9C

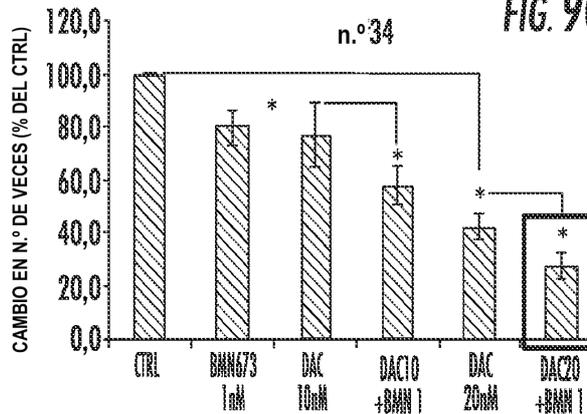
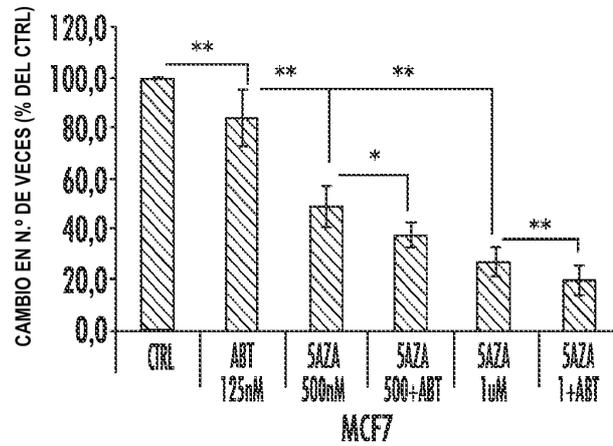
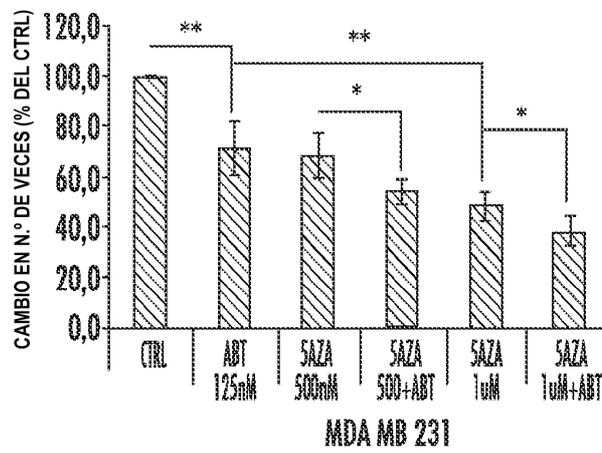


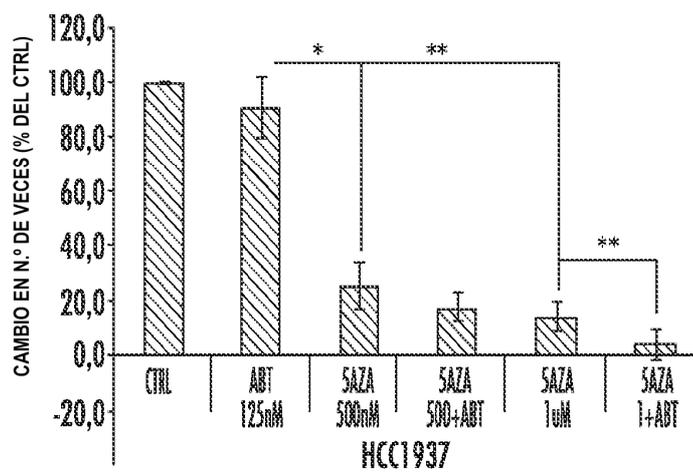
FIG. 9D



MCF7
FIG. 10A



MDA MB 231
FIG. 10B



HCC1937
FIG. 10C

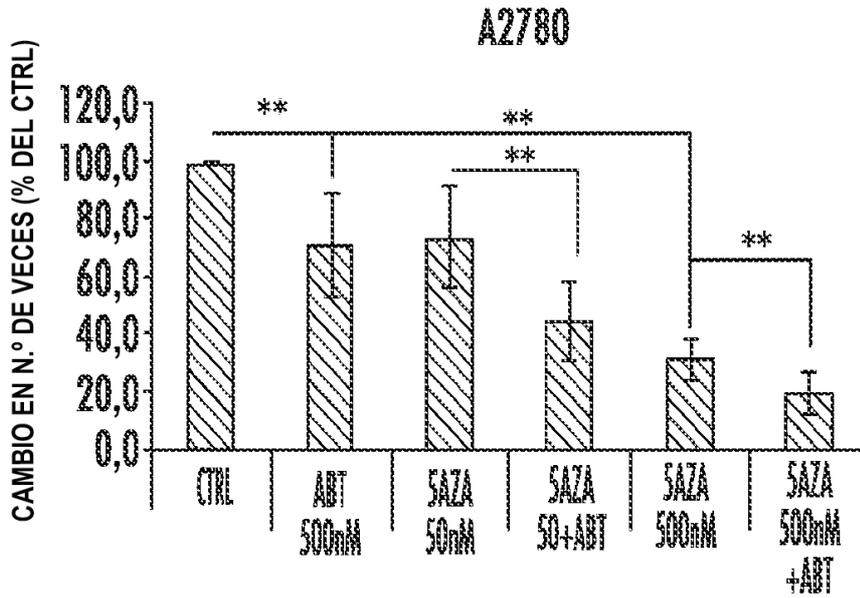


FIG. 11A

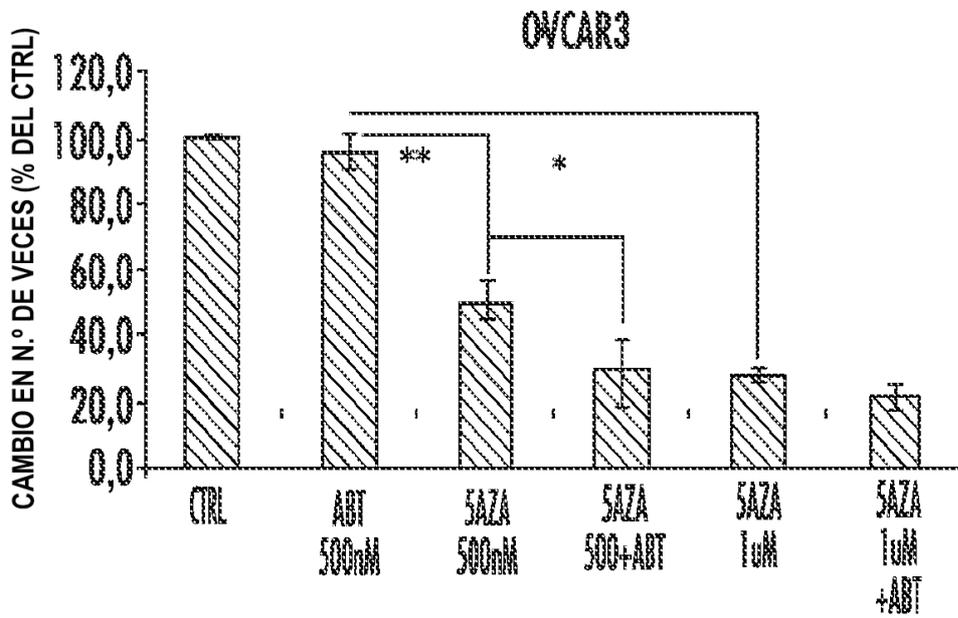


FIG. 11B

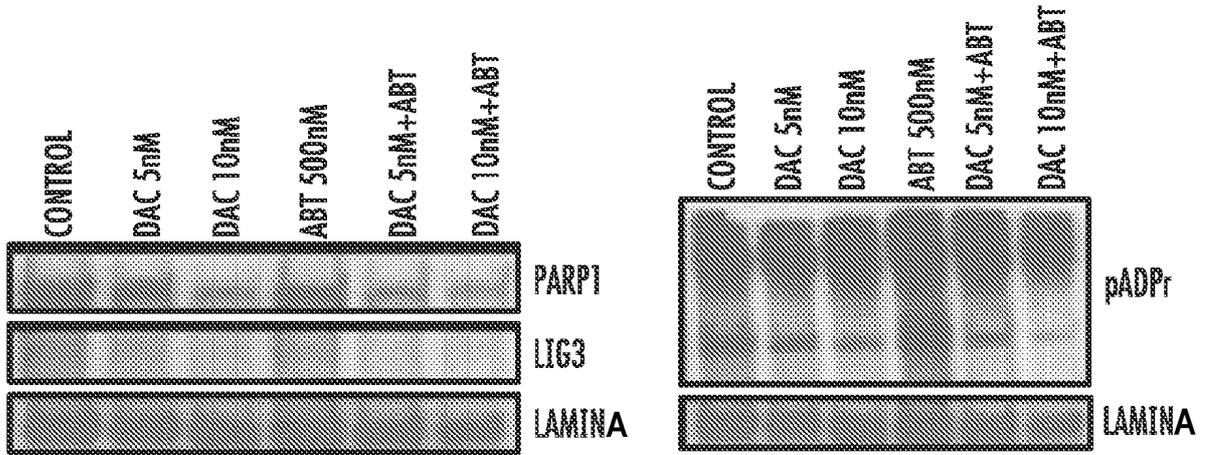


FIG. 12A

FIG. 12B

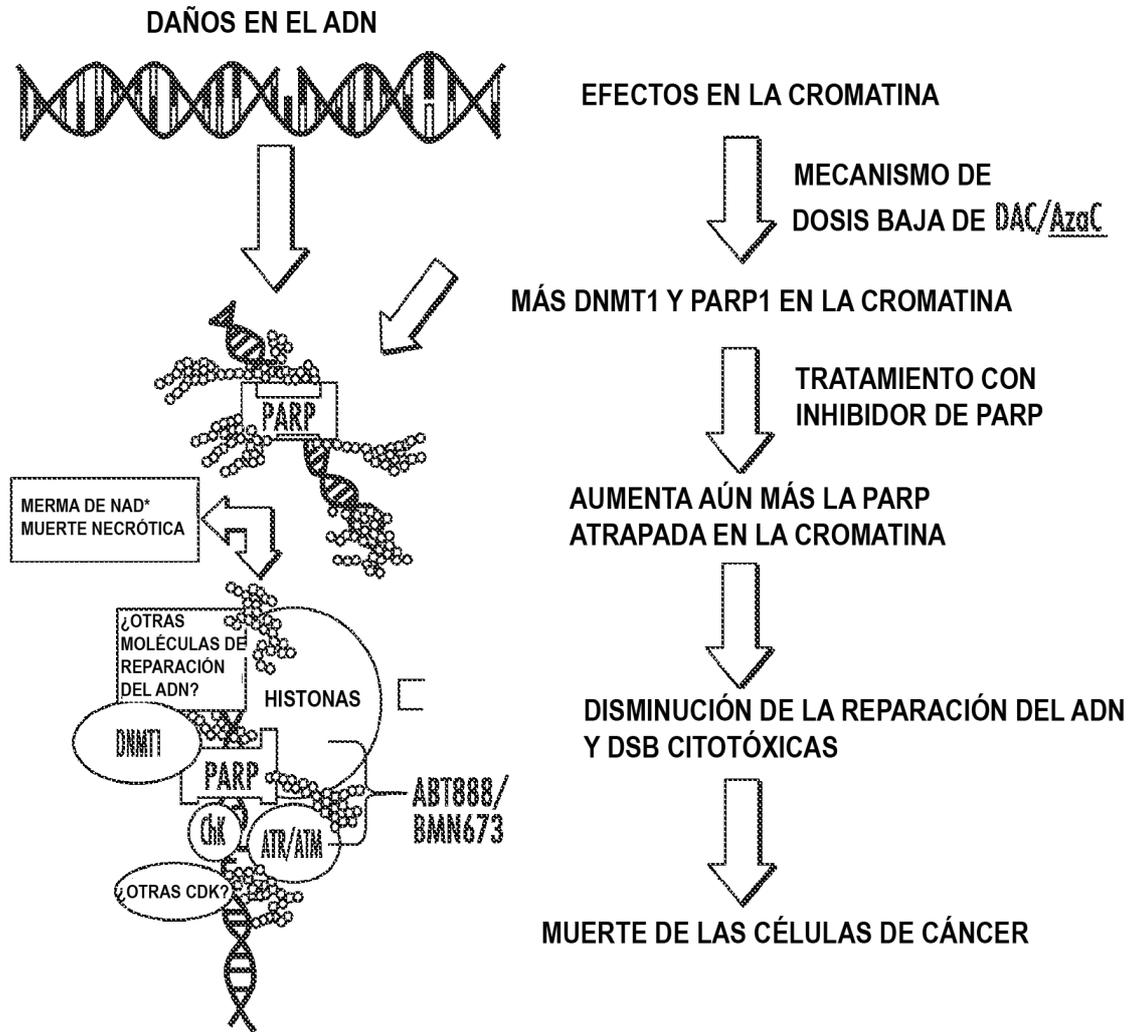


FIG. 13

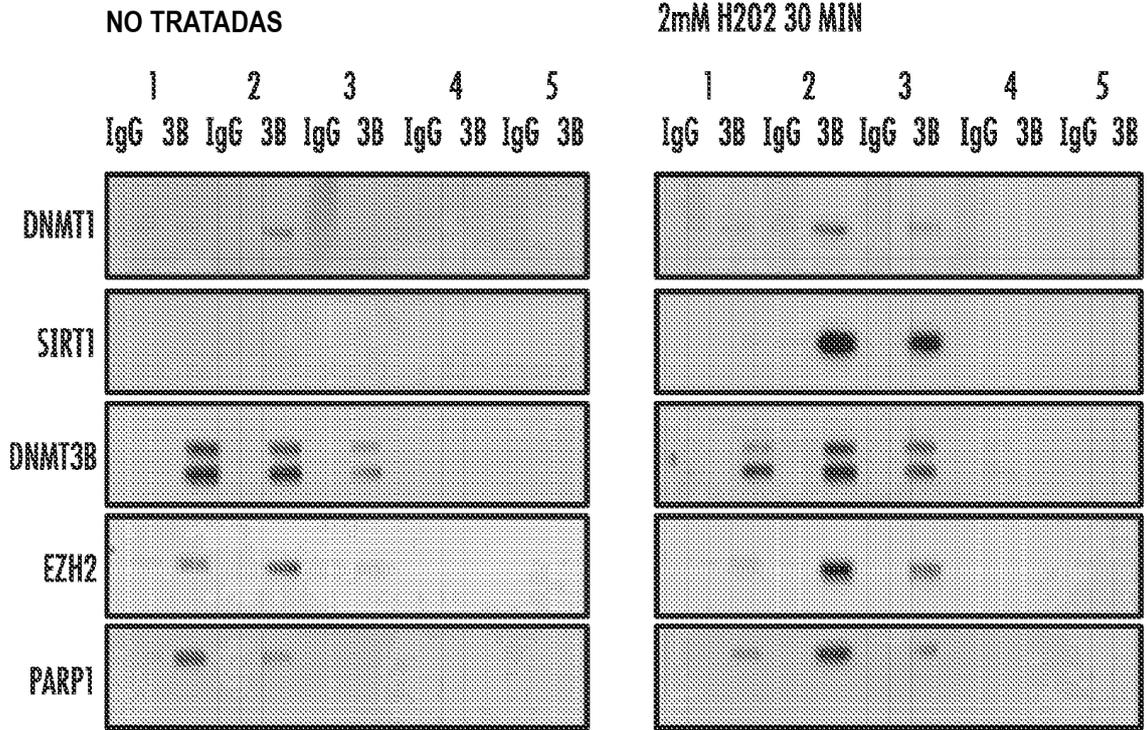


FIG. 14A

FIG. 14B

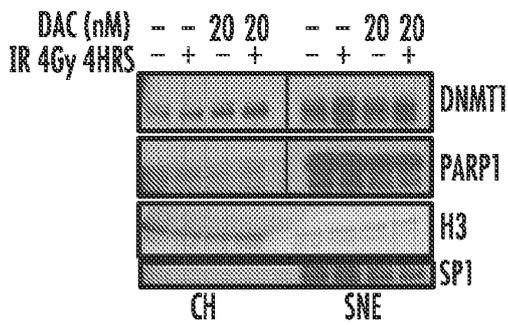
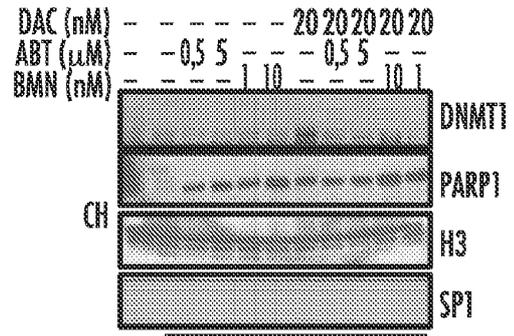


FIG. 15A



IR 4Gy 4 HRS
FIG. 15B

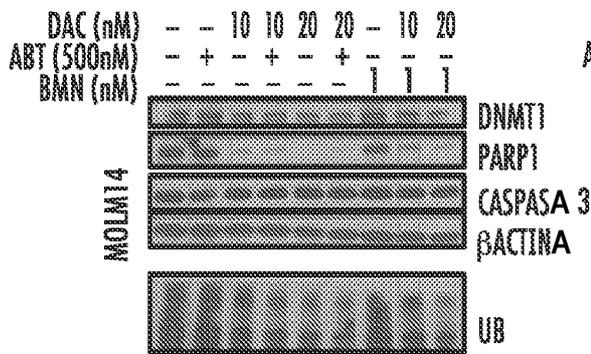


FIG. 15C

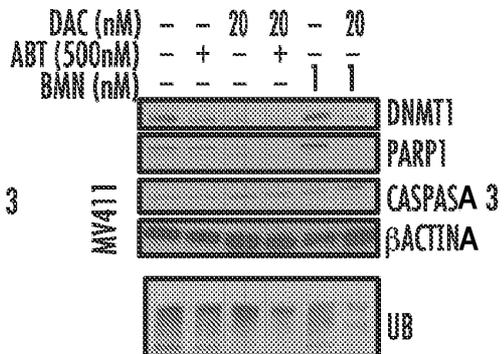


FIG. 15D

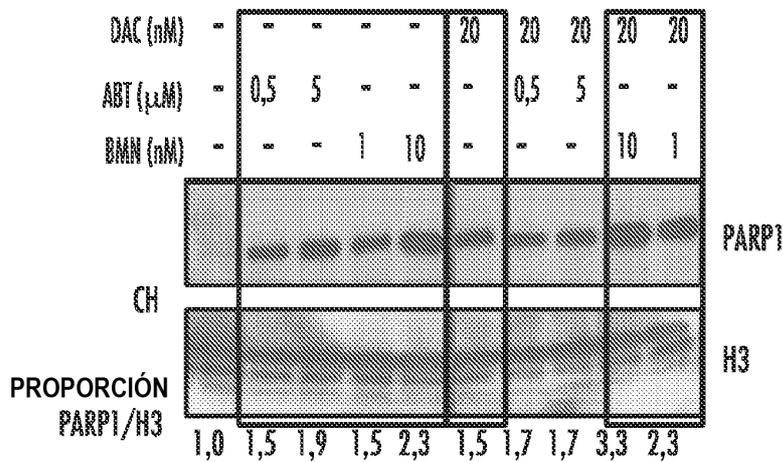
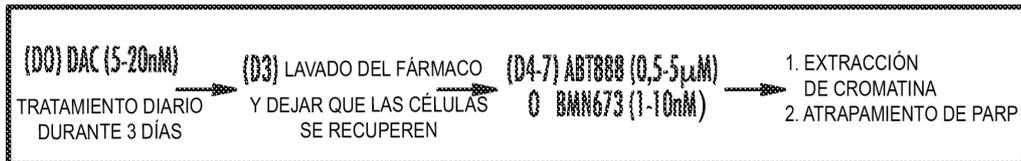


FIG. 15E



FIG. 16A

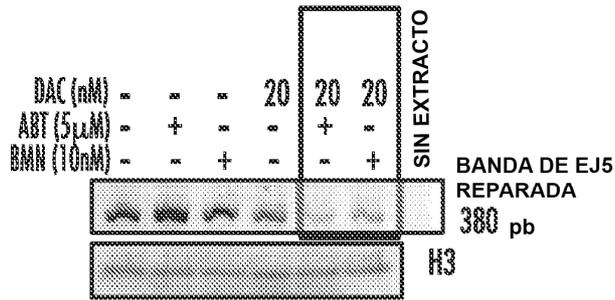


FIG. 16B

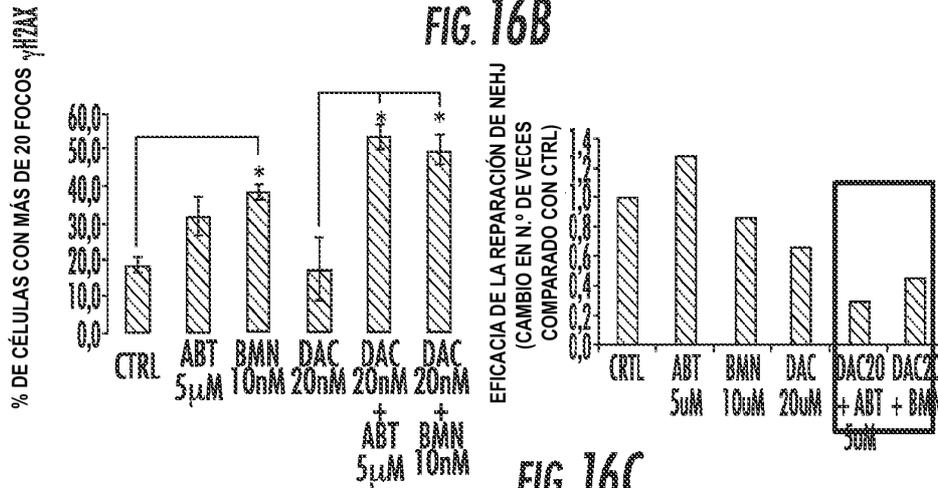


FIG. 16C

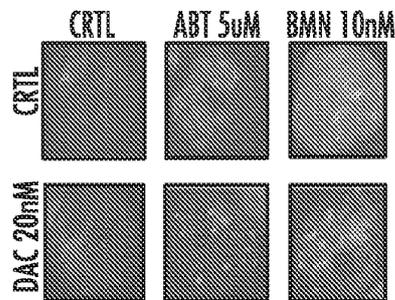


FIG. 16D

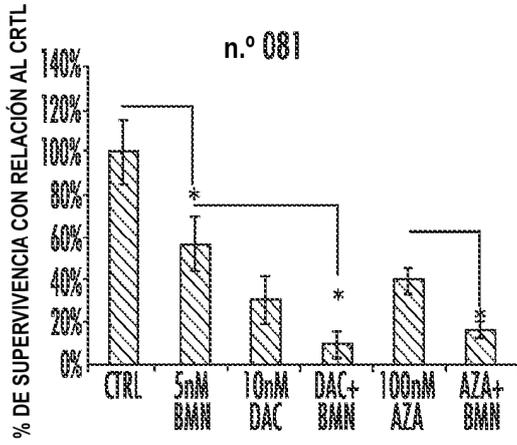


FIG. 17A

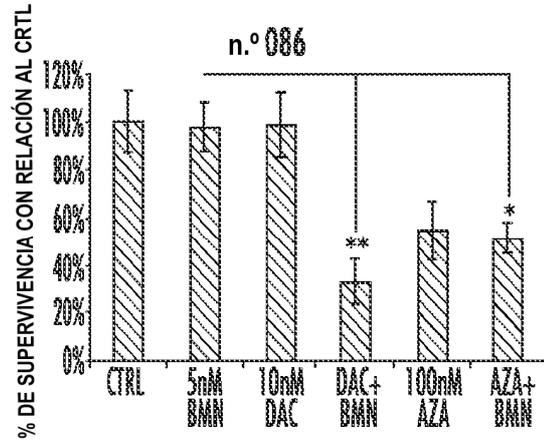


FIG. 17B

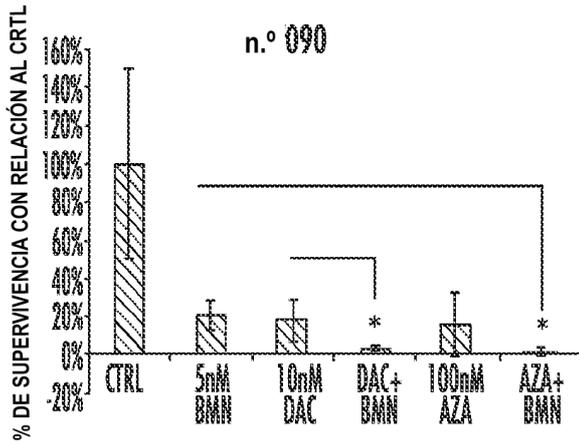


FIG. 17C

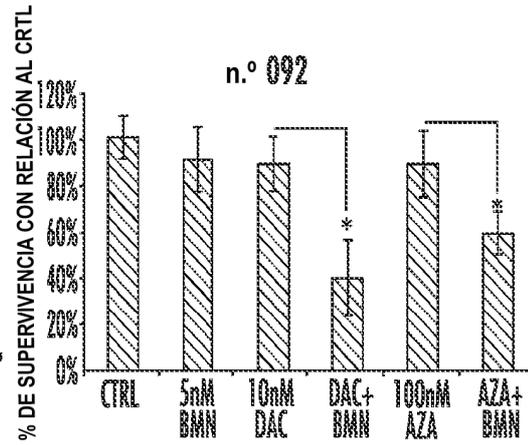


FIG. 17D

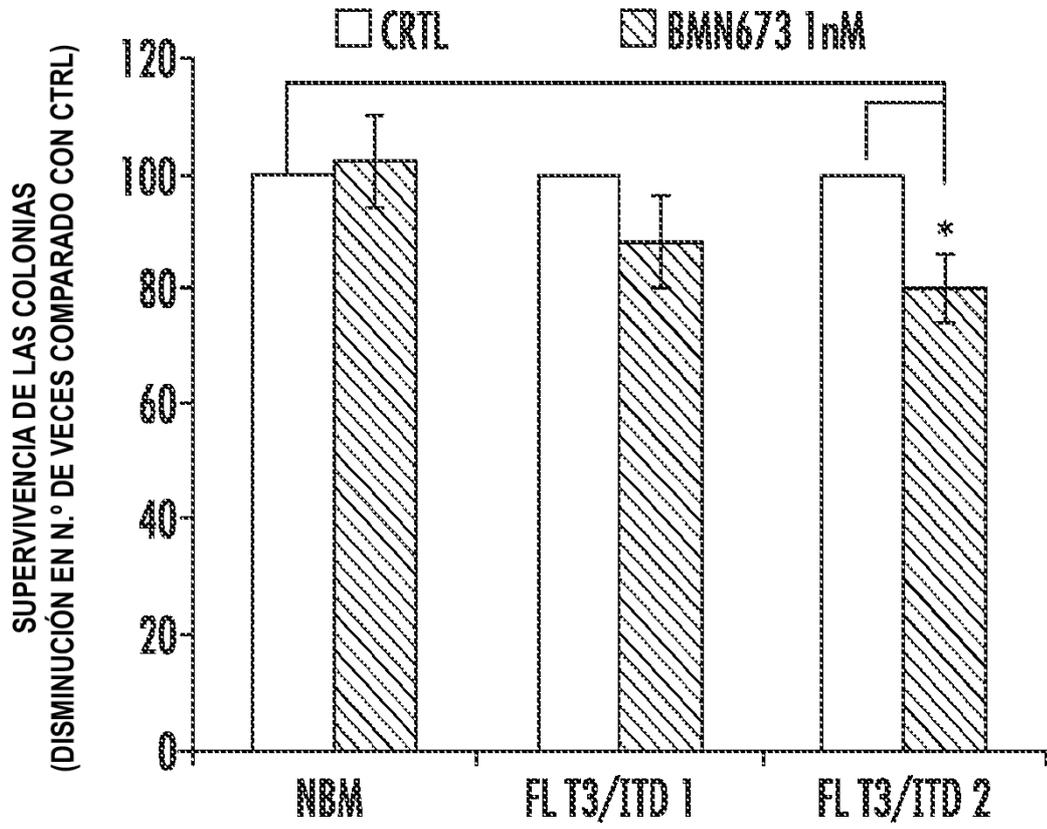
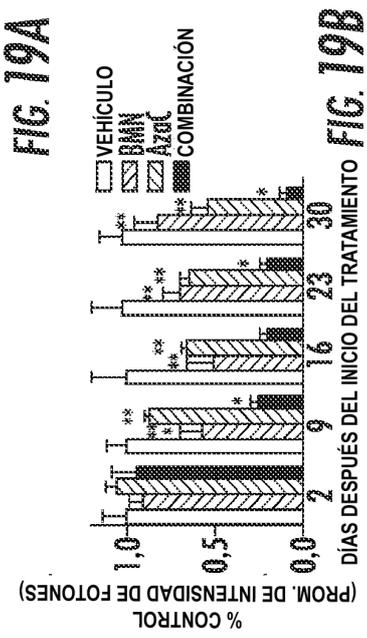
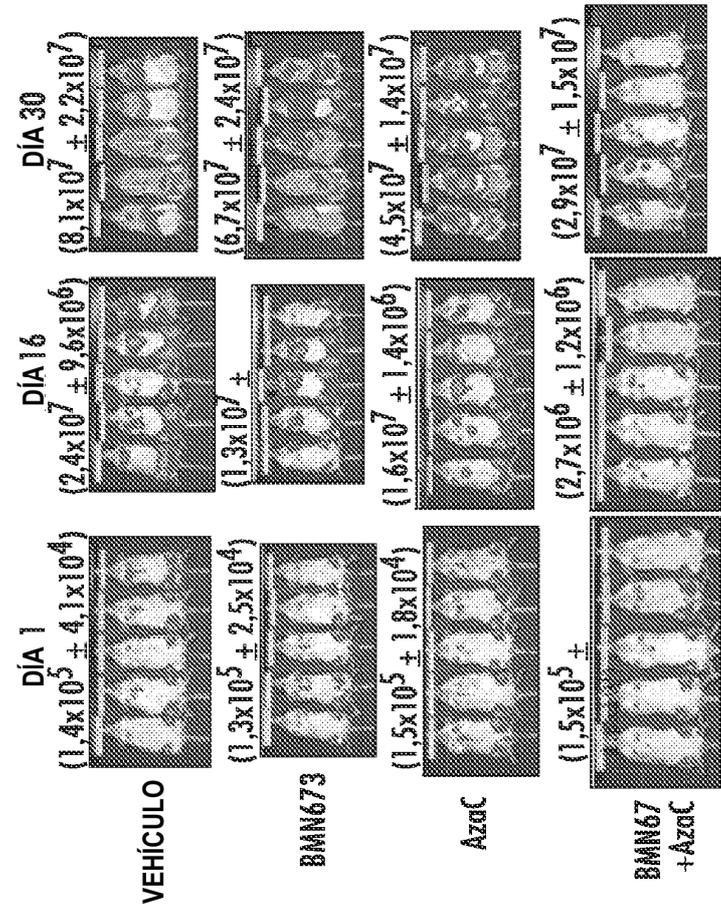
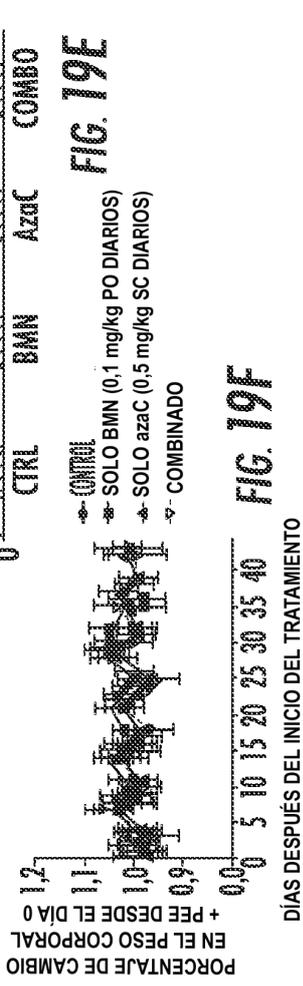
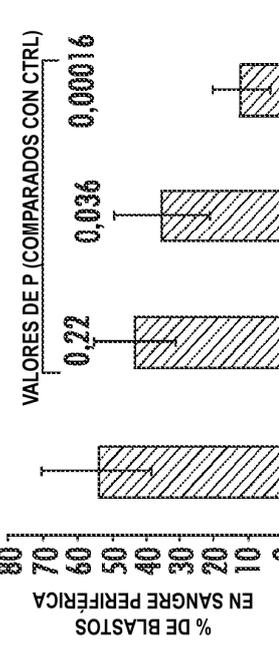
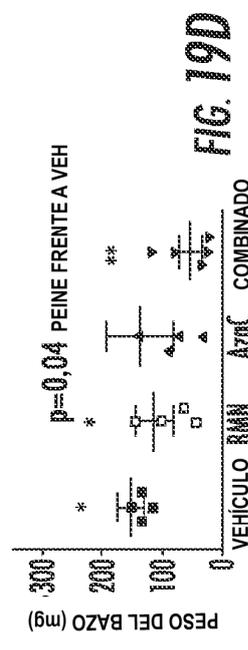
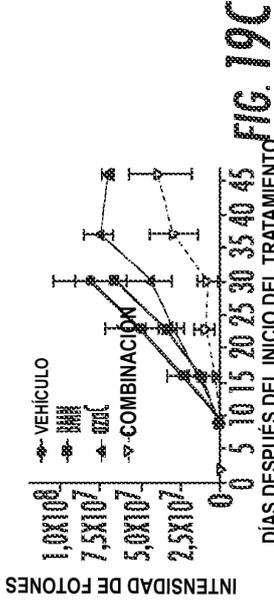


FIG. 18



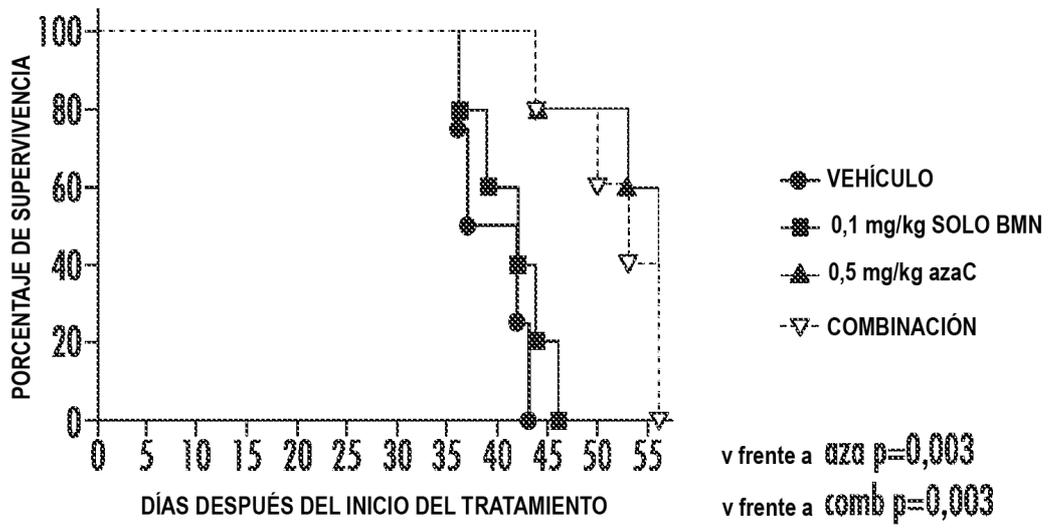


FIG. 20

COMBINACIÓN DE
DECITABINA Y BMN673

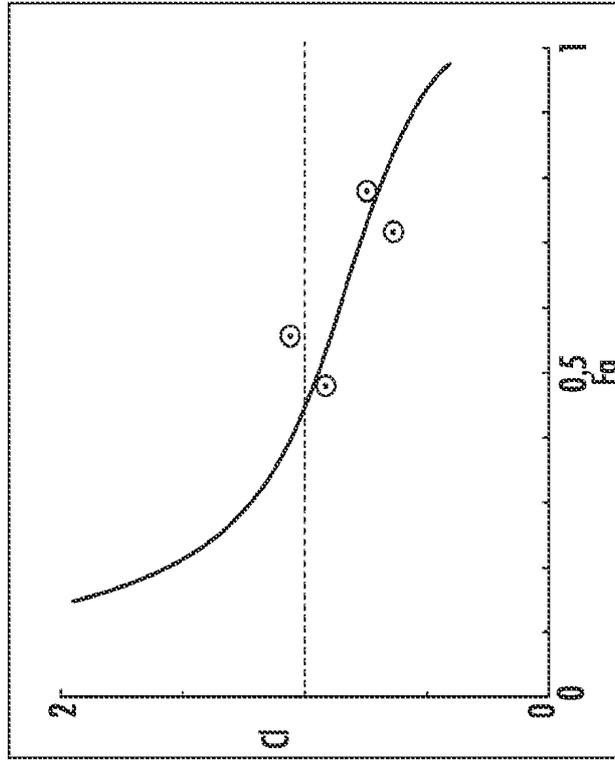


FIG. 22B

COMBINACIÓN DE
5-AZACITIDINA Y BMN673

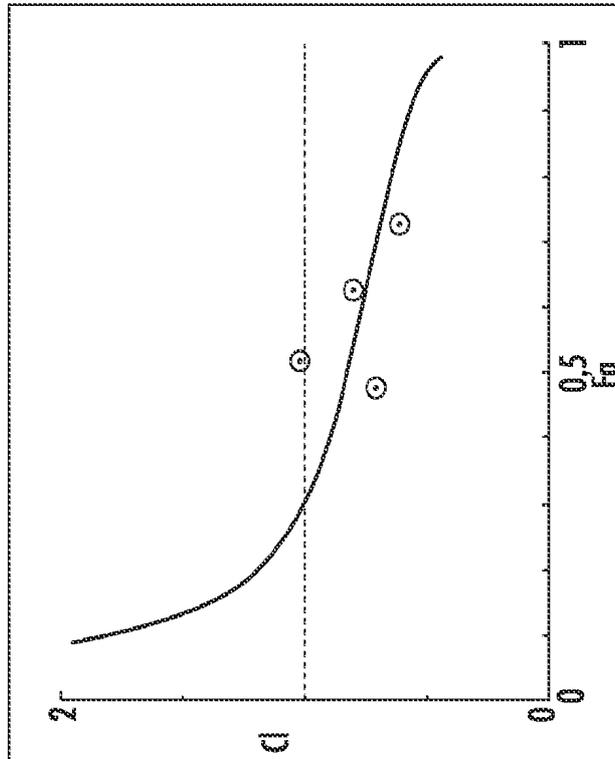


FIG. 22A