

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000025976
Data Deposito	06/10/2021
Data Pubblicazione	06/04/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	55

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	635

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	35	02

Titolo

Combinazione di principi attivi per il trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (NPM1)

- 1 -

COMBINAZIONE DI PRINCIPI ATTIVI PER IL TRATTAMENTO
DELLA LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE (LAM) CON MUTAZIONE DELLA
NUCLEOFOSMINA (NPM1)

La presente invenzione riguarda una combinazione di principi attivi per il trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (NPM1). In particolare l'invenzione riguarda una combinazione di omacetaxina mepesuccinato e venetoclax per il trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (NPM1).

È noto che la leucemia acuta mieloide (LAM) è una malattia eterogenea dal punto di vista clinico e molecolare. Nonostante i continui progressi nella conoscenza della biologia della LAM, ad oggi solo il 40-45% dei pazienti più giovani e il 10-15 % dei pazienti più anziani (età ≥ 60 anni) può essere curato con terapia standard ed eventualmente sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali. Questa è una sfida importante, soprattutto perché i pazienti anziani costituiscono oltre il 50% della popolazione con LAM. Le prospettive sono particolarmente sfavorevoli per i pazienti di qualsiasi età affetti da malattia recidivante e/o refrattaria (R/R) (con tassi di guarigione non superiori al 10%). Inoltre, poiché l'età media dei soggetti malati si avvicina ai 70 anni, i pazienti hanno comunemente un cattivo performance status o altre comorbidità, con un conseguente aumento della mortalità correlata al trattamento, che impedisce di sottoporre tali pazienti a trattamenti intensivi.

Le opzioni terapeutiche standard disponibili per i pazienti anziani non idonei a regimi di chemioterapia intensiva sono agenti ipometilanti (HMA), in particolare azacitidina o decitabina, o citarabina a basso dosaggio (LDAC). Ad oggi, i suddetti agenti ipometilanti o la citarabina sono preferibilmente somministrati in associazione con l'agente pro-apoptotico venetoclax, inibitore della proteina anti-apoptotica B-cell leukemia/linfoma-2 (Bcl-2), di recente introduzione nella terapia delle LAM. Alternativamente, sempre nei pazienti anziani, sono adottate misure puramente di supporto.

Venetoclax è un inibitore selettivo della proteina Bcl-2, che è sovraespressa in più tipi di cancro. Il gene BCL-2 è un oncogene anti-apoptotico, il che significa che può prevenire l'apoptosi di cellule maligne. Con l'inibizione della proteina Bcl-2 può essere attivata l'apoptosi di cellule tumorali. I primi brevetti per venetoclax sono stati concessi negli Stati Uniti tra il 2013 e il 2015 [US8580794B2; US8546399B2; US9045475B2; US9174982B2;]. Venetoclax ha mostrato un'alta affinità di legame verso la proteina Bcl-2 ed efficacia in un contesto cellulare. Inoltre, è stato mostrato il legame selettivo di venetoclax a Bcl-2. Il percorso di sintesi originale e il percorso di produzione sono stati descritti nelle domande di brevetto di AbbVie [WO2010/138588A2; WO2011/149492A1; WO2012/071374A1; WO2012/071336A1; WO2014/165044A1]. Un percorso alternativo di sintesi può essere trovato nel brevetto CN104370905B.

Venetoclax può essere utilizzato per il trattamento di una varietà di tumori.

In particolare, venetoclax è indicato: *i)* per il trattamento di pazienti adulti con leucemia linfatica cronica (LLC) o linfoma a piccoli linfociti (SLL), con o senza delezione 17p, che hanno ricevuto almeno una precedente terapia; e, come detto sopra, *ii)* in combinazione con azacitidina o decitabina o citarabina a basso dosaggio per il trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) di nuova diagnosi negli adulti di età pari o superiore a 75 anni o con comorbidità che ne precludono l'uso della chemioterapia di induzione intensiva.

Inoltre, venetoclax è risultato essere efficace nei tumori resistenti.

Tuttavia, nonostante i risultati promettenti delle recenti terapie di associazione con venetoclax sopra descritte per il trattamento della LAM in soggetti non idonei a regimi di chemioterapia intensiva, la maggior parte dei pazienti va comunque incontro a recidiva e soccombe alla propria malattia.

Inoltre, sono noti diversi studi pubblicati che hanno impiegato omoarringtonina (HHT) o omacetaxina mepesuccinato nel trattamento delle LAM (1).

L'omacetaxina mepesuccinato (nota anche come omacetaxina, omoarringtonina o HHT) è una forma semisintetica di un estratto alcaloide della pianta *Cephalotaxus fortunei*. HHT si lega alla fessura del sito A dei ribosomi prevenendo la fase di allungamento iniziale della sintesi proteica e che porta a

un'inibizione transitoria ma profonda della sintesi proteica con effetto soprattutto sui livelli di proteine con più breve emivita, compresa la proteina antiapoptotica myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1)(2). Da sottolineare come Mcl-1 sia coinvolta nei meccanismi di resistenza a seguito dell'inibizione di Bcl-2.

Omacetaxina mepesuccinato è noto per il trattamento di pazienti adulti con leucemia mieloide cronica (LMC) in fase cronica o accelerata con resistenza e/o intolleranza a due o più inibitori della tirosin-chinasi (TKI).

L'omacetaxina è stata approvata dalla FDA, con il nome commerciale Synribo, per il trattamento di pazienti adulti con leucemia mieloide cronica (LMC) resistente e/o intollerante a due o più inibitori di tirosin chinasi. Synribo è un farmaco commercializzato da Teva Pharms Intl, ed è incluso in un NDA (New Drug Application) approvato dalla FDA (NDA: 203585). Synribo non è in commercio in Europa. C'è un brevetto che protegge questo farmaco: "Trattamento della leucemia mieloide cronica, resistente o intollerante a ST1571, che coinvolge l'omoarringtonina da sola o in combinazione con altri agenti" [US6987103B2].

Inoltre, è nota una recente pubblicazione concernente la sperimentazione di laboratorio in modelli cellulari di LAM e anche nel modello animale (murino) della associazione venetoclax e omoarringtonina (3).

Da una ricerca su *clinicaltrial.gov* si rileva che sono stati appena attivati (*not yet recruiting*) nel

setting terapia delle LAM i seguenti trial clinici, che prevedono l'associazione di omacetaxina mepesuccinato e venetoclax per il trattamento di pazienti con LAM:

- "Omacetaxine and Venetoclax for the Treatment of Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome Harboring Mutant RUNX1." ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04874194 (*not yet recruiting*);

- "Safety and Efficacy of Venetoclax With Escalating Doses of Omacetaxine in Patients With Acute Myeloid Leukemia (VEN-OM)." ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04926285 (*not yet recruiting*).

Ad oggi, quindi, la LAM rimane una necessità medica non soddisfatta (*unmet need*), in particolare nei pazienti non idonei a regimi di chemioterapia intensiva.

Inoltre, nonostante negli ultimi 5 anni siano stati sviluppati diversi nuovi farmaci mirati contro specifiche lesioni genetiche per il trattamento della LAM, in molti sottotipi di LAM la lesione genetica sottostante non è aggredibile. Pertanto, la terapia deve basarsi su farmaci che vadano possibilmente a colpire pathway cellulari alternativi essenziali per la sopravvivenza della leucemia.

La leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina (NPM1) è un sottotipo di LAM. In particolare, la mutazione del gene NPM1 è la lesione genetica più frequente nella LAM.

Diverse evidenze biologiche e cliniche indicano che la presenza della mutazione del gene NPM1

rappresenti uno dei principali fattori predittivi di risposta favorevole alla terapia con venetoclax nella LAM. Come detto sopra, venetoclax è un inibitore della proteina anti-apoptotica Bcl-2, che è altamente espressa nella maggior parte della LAM, inclusa la LAM NPM1-mutata. Venetoclax è risultato essere estremamente efficace in combinazione con agenti ipometilanti come prima linea di terapia, in particolare nella LAM con mutazione di NPM1, nei pazienti anziani non eleggibili alla chemioterapia intensiva (4,5). I meccanismi alla base di questa peculiare sensibilità ad oggi non sono ancora stati chiariti. Tuttavia, la presenza di altre mutazioni concomitanti, ed in particolare la mutazione FLT3-ITD (che è presente in circa il 35-40% dei casi di LAM NPM1-mutata), si rende responsabile della resistenza al trattamento (5,6).

Alla luce di quanto sopra, appare evidente la necessità di fornire nuovi trattamenti per la leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (NPM1), che superino gli svantaggi ai trattamenti noti.

Nell'ambito della medicina di precisione nella terapia della LAM, nella LAM con mutazione di NPM1 la proteina leucemica NPM1 mutata rappresenterebbe il bersaglio ideale. Tuttavia, come per la maggior parte delle mutazioni del cancro, NPM1 non è un bersaglio direttamente aggredibile farmacologicamente. Una strategia per superare questo problema può consistere nell'indirizzare l'oncoproteina NPM1 mutata alla degradazione. Il noto modello di una particolare forma di LAM, la leucemia acuta promielocitica (APL) dimostra

le grandi potenzialità di questa strategia. Infatti la terapia combinata con un derivato della vitamina A (acido all-trans-retinoico, ATRA) e triossido di arsenico (ATO) induce degradazione della proteina tumorale specifica della APL (PML-RARα) con conseguente sblocco della differenziazione e induzione di morte cellulare. A questi eventi si associa una elevatissima percentuale (>90%) di guarigione. Inoltre, è stato scoperto che la combinazione di ATRA e ATO induce in vitro la degradazione mediata dal proteasoma specificamente del mutante NPM1, seguita da arresto della crescita cellulare e apoptosi [US20160317579A1] (7). Tuttavia, l'efficacia clinica di ATRA/ATO nei pazienti con LAM NPM1-mutata appare limitata.

Queste osservazioni forniscono le basi per esplorare altri farmaci/composti più efficaci nel prendere di mira i livelli di proteina NPM1 mutata e probabilmente con una maggiore potenza anti-leucemica, legata anche ad altri meccanismi. Oltre alla riduzione dei livelli di proteina NPM1 mutata, infatti, potrebbe essere necessario colpire altri percorsi essenziali che contribuiscono allo sviluppo della leucemia e al mantenimento della crescita per eradicare le cellule leucemiche e ottenere risposte clinicamente rilevanti nei pazienti.

Tra le vie sensibili nella LAM con mutazione di NPM1, vi è l'esportazione nucleare di proteine Crm-1/Exportin 1-dipendente che media l'accumulo aberrante della proteina mutata NPM1 nel citoplasma delle cellule leucemiche, come evento critico nello sviluppo e

mantenimento della leucemia. In effetti, è stato riportato che il ritorno della proteina NPM1 al nucleo mediante correzione genetica della mutazione o con inibitori di Crml (ad esempio selinexor) determina una differenziazione terminale e una crescita delle cellule leucemiche significativamente ridotta in studi preclinici sia in vitro che in vivo sulla LAM con mutazione di NPM1 (8).

In questo contesto viene ad inserirsi la soluzione secondo la presente invenzione, che si propone di fornire una combinazione di farmaci efficace per il trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (NPM1).

In particolare, secondo la presente invenzione è stato ora sorprendentemente trovato che la combinazione di due farmaci non chemioterapici, ossia omacetaxina mepesuccinato e venetoclax, approvati per l'impiego in altre malattie oncoematologiche, può essere vantaggiosamente impiegata nel trattamento della leucemia acuta mieloide con mutazione di NPM1.

Più dettagliatamente, i risultati sperimentali mostrati più avanti hanno mostrato che questa nuova combinazione di farmaci ha una potente attività sinergica contro questa forma di leucemia, sia in esperimenti eseguiti su modelli cellulari in laboratorio sia in esperimenti eseguiti su modelli di leucemia umana nel topo. In particolare, nel modello animale, la combinazione ha dimostrato un marcato effetto anti-leucemico con arresto della crescita della leucemia, che si è tradotto in un significativo aumento

della sopravvivenza dei topi trattati con la combinazione rispetto quelli trattati con i singoli farmaci. Inoltre, la combinazione si è mostrata relativamente ben tollerata. Questi dati hanno fornito supporto per la sperimentazione clinica pilota approvata dagli organi italiani competenti, Istituto Superiore di Sanità (ISS) e Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), quale studio di fase I volto a valutare la sicurezza e l'efficacia preliminare di omacetaxina mepesuccinato in associazione a venetoclax in pazienti con leucemia mieloide acuta con mutazione del gene NPM1 recidiva o refrattaria a precedenti terapie. Lo studio ha arruolato il primo paziente (UPN01), con risultati promettenti (riportati più avanti).

Nel dettaglio, secondo la presente invenzione, l'efficacia terapeutica della combinazione omacetaxina mepesuccinato e venetoclax è stata testata *in vivo* utilizzando 2 diversi modelli estremamente aggressivi di PDX di LAM con mutazione di NPM1 (entrambi triplo-mutati per DNMT3A/NPM1/FLT3-ITD) modificati per esprimere la luciferasi. Questa tecnologia consente di tracciare la malattia in bioluminescenza in vivo (BLI) - mediante l'impiego della strumentazione IVIS Lumina - durante il trattamento e valutare la risposta al farmaco. Sorprendentemente, sulla malattia conclamata la terapia combinatoria con HHT e venetoclax ha determinato un forte effetto anti-leucemico e sinergico, risultando in assenza di malattia rilevabile in una coorte di topi analizzati dopo il primo ciclo di trattamento **(Figure 1 e 2)**, e in un vantaggio

significativo in termini di sopravvivenza in una coorte analizzata per sopravvivenza rispetto ad animali trattati con il singolo farmaco o con veicolo **(Figura 2)**.

Inoltre, la presente invenzione, oltre a fornire una combinazione mai sperimentata prima per il trattamento LAM con mutazione di NPM1, concerne anche uno nuovo schema di trattamento e un razionale di uso specifico nella leucemia mieloide acuta con mutazione della nucleofosmina, sulla base dei dati sperimentali sia su modelli cellulari in laboratorio sia sui topi e dei dati preliminari di sperimentazione nell'uomo riportati più avanti **(Figure 3-6)**.

In particolare, la scelta della dose dell'omacetaxina è stata fatta basandosi su quella approvata dalla FDA per la LMC (ciclo di induzione, 1.25 mg/m² iniezione sottocutanea due volte al giorno per 14 giorni consecutivi per un ciclo di 28 giorni). Secondo la presente invenzione, l'omacetaxina può essere somministrata inizialmente (livello 1) due volte al giorno ad una concentrazione di 0.625 mg/m², anche in questo caso la via sarà sottocutanea e il trattamento continuerà per 14 giorni di un ciclo di 28. Secondo la presente invenzione, alla omacetaxina viene aggiunto il venetoclax, preferibilmente alla dose di 400 mg al giorno per 21 giorni (per via orale) **(Figura 4)**.

Nell'uso proposto secondo la presente invenzione la somministrazione di omacetaxina per un periodo di tempo di 14 giorni è basata sul fatto che il farmaco ha

una azione inibente la sintesi proteica transitoria, non irreversibile, mentre si vuole raggiungere l'obiettivo di una inibizione sostenuta della sintesi proteica di proteine essenziali alla sopravvivenza della cellula leucemica, con particolare riferimento alla NPM1-mutated AML.

Secondo la presente invenzione, la somministrazione di venetoclax per un periodo di 21 giorni in cicli di 28 giorni in associazione alla modalità di somministrazione di omacetaxina mepesuccinato descritta sopra è unica e ha il vantaggio di potenziare l'effetto antileucemico e al contempo, con una settimana di wash-out dai farmaci, di ridurre la tossicità prevista dalla associazione di due farmaci con tossicità ematologica in parte sovrapponibile.

Infine, l'impiego di HHT è ritenuto vantaggioso, oltre che per la sua azione come "inibitore di Mcl-1" (mirando ai suoi livelli proteici), per i seguenti motivi:

i) è un farmaco approvato dalla FDA, nel contesto della leucemia mieloide cronica (LMC);

ii) ha mostrato una certa attività negli studi clinici sulla LAM;

iii) ha dimostrato di essere un trattamento sicuro, quando valutato anche in associazione alla chemioterapia, sia a regime standard intensivo o a basso dosaggio nella LAM;

iv) viene somministrato per via sottocutanea nella sua formulazione approvata dalla FDA;

v) efficacia della combinazione secondo la

presente invenzione in modelli di xenotrapianto di cellule primarie di pazienti di LAM con mutazione di NPM1 (modelli patient-derived-xenograft, PDX, **Figure 1 e 2**);

vi) HHT ha meccanismo di azione con potenziali effetti specifici identificati nella LAM con mutazione di NPM1 secondo la presente invenzione (ossia riduzione dei livelli di NPM1 e altri fattori essenziali, induzione della differenziazione cellulare, **Figura 3**).

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione una combinazione di omacetaxina mepesuccinato (o omoarringtonina) con venetoclax o con suoi sali o con suoi derivati che siano inibitori delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e farmaceuticamente accettabili, come ad esempio Venetoclax-M27, per l'uso separato o sequenziale nel trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (mutazione NPM1).

Secondo la presente invenzione, per "uso separato", si intende la somministrazione, nello stesso momento, dei due composti della combinazione secondo l'invenzione in forme farmaceutiche distinte.

Secondo la presente invenzione, per "uso sequenziale" si intende la somministrazione successiva dei due composti della combinazione secondo l'invenzione, ciascuno in una forma farmaceutica distinta.

Secondo la presente invenzione, detta leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina può comprendere ulteriormente la mutazione FLT3-ITD.

Inoltre la combinazione secondo la presente invenzione, per l'uso come definito sopra, può essere impiegata in pazienti di qualunque età non candidabili a chemioterapie intensive, sia pretrattati con altre terapie che non, in pazienti di età ≥ 75 anni, sia pretrattati con altre terapie che non, in pazienti di qualunque età con persistenza di malattia, anche minima, candidabili a trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Secondo la presente invenzione l'omacetaxina mepesuccinato può essere somministrata per via sottocutanea o per via orale, e venetoclax può essere somministrato per via orale.

Inoltre, secondo la presente invenzione, detta combinazione può essere somministrata in un ciclo di trattamento della durata complessiva da 21 a 45 giorni, preferibilmente 28 giorni, in cui

- omacetaxina mepesuccinato può essere somministrata, in un primo ciclo di trattamento e nei cicli di trattamento successivi, a un dosaggio da 0,5 a 2 mg/m² due volte al giorno dal giorno 1 al giorno 14 oppure dal giorno 1 al giorno 7, preferibilmente al dosaggio di 0,625 mg/m² oppure al dosaggio di 1,25 mg/m² dal giorno 1 al giorno 14 oppure dal giorno 1 al giorno 7;

- venetoclax, o suoi sali o suoi derivati, può essere somministrato in un primo ciclo di trattamento a un dosaggio da 50 a 800 mg dal giorno 2 ad almeno il giorno 21, in cui il dosaggio viene aumentato da un dosaggio iniziale a un dosaggio finale, preferibilmente

essendo somministrato a un dosaggio di 50 mg al giorno 2, 100 mg al giorno 3, 200 mg al giorno 4, 400 mg dal giorno 5 al giorno 21;

- venetoclax, o suoi sali o suoi derivati, può essere somministrato nei cicli di trattamento successivi al primo a un dosaggio da 50 a 800 mg dal giorno 1 al giorno 14, oppure dal giorno 1 al giorno 35, oppure preferibilmente dal giorno 1 al giorno 21, preferibilmente è somministrato al dosaggio di 400 mg dal giorno 1 al giorno 21; e in cui

- omacetaxina mepesuccinato, venetoclax o suoi sali o suoi derivati, possono non essere somministrati per un periodo di tempo da 7 a 10 giorni ("off-therapy") prima di iniziare un eventuale ciclo successivo di trattamento, preferibilmente né omacetaxina mepesuccinato né venetoclax sono somministrati dal giorno 22 al giorno 28 oppure dal giorno 36 al giorno 45.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, in un ciclo di trattamento con una durata complessiva di 28 giorni

- omacetaxina mepesuccinato è somministrata al dosaggio di 0,625 mg/m² oppure al dosaggio di 1,25 mg/m² dal giorno 1 al giorno 14 oppure dal giorno 1 al giorno 7;

- venetoclax è somministrato al dosaggio di 50 mg al giorno 2, 100 mg al giorno 3, 200 mg al giorno 4, 400 mg dal giorno 5 al giorno 21 quando detto ciclo di trattamento è un primo ciclo di trattamento oppure al dosaggio di 400 mg dal giorno 1 al giorno 21 quando

detto ciclo di trattamento è un ciclo successivo al primo ciclo di trattamento;

- dal giorno 22 al giorno 28 non viene somministrato né omacetaxina mepesuccinato né venetoclax o suoi sali o suoi derivati.

La presente invenzione concerne inoltre una composizione farmaceutica comprendente omacetaxina mepesuccinato e venetoclax o suoi sali o suoi derivati che siano inibitori delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e farmaceuticamente accettabili, come ad esempio Venetoclax-M27, assieme a eccipienti e/o adiuvanti farmaceuticamente accettabili, per l'uso nel trattamento della leucemia acuta mieloide (LAM) con mutazione della nucleofosmina (mutazione NPM1).

Secondo la presente invenzione, detta leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina può comprendere ulteriormente la mutazione FLT3-ITD.

Inoltre, la composizione farmaceutica secondo la presente invenzione, per l'uso come definito sopra, può essere impiegata in pazienti di qualunque età non candidabili a chemioterapie intensive, sia pretrattati con altre terapie che non, in pazienti di età ≥ 75 anni, sia pretrattati con altre terapie che non, in pazienti di qualunque età con persistenza di malattia, anche minima, candidabili a trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Secondo la presente invenzione, detta composizione farmaceutica può essere in una forma per la somministrazione orale.

La presente invenzione verrà ora descritta, a

titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo una sua forma preferita di realizzazione, con particolare riferimento agli esempi e alle figure dei disegni allegati, in cui:

- la **Figura 1** mostra risultati esemplificativi di un esperimento *in vivo* su modello PDX valutato mediante BLI. Cellule primarie di paziente di LAM NPM1-mutata ripopolate nel topo immunocompromesso (PDX2) esprimenti il gene della luciferasi sono state inoculate in un gruppo di topi e dopo 6 giorni è stato valutato mediante bioluminescenza *in vivo* (BLI) l'attecchimento di malattia. I topi sono stati divisi in 4 coorti di trattamento (veicolo, ABT, HHT e HHT/ABT) e monitorati nel tempo. Nella immagine in bianco e nero, in corrispondenza della immagine del topo, il segnale nero indica presenza di elevata quantità di malattia e quello bianco indica assenza di malattia. Come si può osservare, il gruppo HHT/ABT non ha malattia rilevabile a 17 giorni (D17) dal trapianto, dopo 2 settimane di trattamento, e ancora minima risulta al D31 (alla fine del I ciclo di 4 settimane di trattamento). Un marcato incremento del segnale (e quindi di malattia) si osserva invece negli altri gruppi. In particolare, al D31, 3 dei 5 topi del gruppo non trattato (veicolo) erano già deceduti per malattia. Veicolo: veicolo in assenza di farmaco; ABT: ABT-199 (venetoclax); HHT: omoarringtonina.

- la **Figura 2** mostra risultati di esperimenti *in vivo* su modelli PDX in termini di valutazione di infiltrazione di malattia e sopravvivenza dei topi. A)

Esperimento su modello PDX2 (NPM1/DNMT3A/FLT3-ITD triplo mutato). B) Esperimento su modello PDX3 (NPM1/DNMT3A/FLT3-ITD triplo mutato). A-B) Infiltrazione di malattia dopo il I ciclo (sinistra): una coorte di topi è stata analizzata al termine del I ciclo di trattamento (d28) mediante valutazione in citofluorimetria della percentuale di infiltrazione midollare da parte di cellule leucemiche umane CD45-positive (grafico a sinistra). Curve di sopravvivenza (destra): un'altra coorte di topi è stata assegnata al trattamento completo previsto di 2 + 2 cicli, e analizzata per sopravvivenza.

- la **Figura 3** mostra la teoria alla base della azione specifica di omacetaxina (HHT) + venetoclax (Ven) nella LAM con mutazione di NPM1 (NPM1m) e dati sperimentali in vitro. A) Meccanismo di azione congiunta di HHT e Ven nella LAM con mutazione di NPM1. La combinazione colpisce elementi chiave per la sopravvivenza e proliferazione della cellula leucemica NPM1-mutata. In particolare, FLT3 è un gene frequentemente mutato (FLT3-ITD) in associazione a NPM1 aumentando la crescita della leucemia e peggiorandone notevolmente la prognosi. Crm-1 (exportin 1/XP01) è una proteina carrier la cui presenza e funzione è essenziale per mantenere la proteina leucemica NPM1 mutata nel citoplasma. La loro interazione è dimostrata essere alla base del mantenimento delle caratteristiche della leucemia NPM1-mutata e la loro inibizione comporta differenziazione cellulare e arresto della crescita. B) Analisi in western blot con anticorpi

specifici diretti contro la proteina NPM1 mutata (NPM1 mutante), la proteina NPM1 originaria, la proteina carrier esportina 1 (Crml) e la proteina anti-apoptotica Mcl-1. La proteina histone H3, è usata come parametro di caricamento proteico omogeneo tra i diversi campioni analizzati. I campioni corrispondono a lisati proteici della linea cellulare di leucemia mieloide acuta IMS-M2, recante la mutazione di NPM1, non trattati (-) o trattati con diverse dosi di HHT (3.5 e 7 nM) per 2 (d2) o 6 (d6) giorni. Da questa analisi si osserva che in particolar modo i livelli della proteina leucemica NPM1, così come quelli di Crml e Mcl-1, appaiono ridotti dalla inibizione sostenuta della sintesi proteica da parte di HHT, con effetto dose- e tempo-dipendente. C) Cellule IMS-M2 sono state esposte a diverse dosi di HHT per 6 giorni con rinnovo del terreno di coltura e del farmaco a 72 ore (72h + 72h) e analizzate mediante citometria a flusso per l'espressione dei marker di superficie CD14 e CD11b (anti-CD14-FITC; anti-CD11b-PE). I valori di fluorescenza mediana (MF) sono indicati. Con il trattamento si osserva un progressivo incremento dei livelli di MF per i marker CD14 e CD11b, segno di differenziazione cellulare in senso mielomonocitario.

- la **Figura 4** mostra lo schema di trattamento del protocollo di sperimentazione nell'uomo, denominato SynVen-AML. Le dosi e la via di somministrazione di omacetaxina mepesuccinato (Synribo) sono state scelte in base al suo impiego e all'approvazione della FDA nel contesto della LMC, e sulla base del meccanismo

previsto sui livelli della proteina NPM1 leucemica. Poiché è probabile che sia necessaria un'esposizione prolungata al farmaco per ottenere un'azione antileucemica clinicamente rilevante senza l'aiuto di un farmaco citotossico concomitante, abbiamo scelto di esplorare per la sicurezza e l'efficacia preliminare un programma di 14 giorni consecutivi (14 giorni) di trattamento prima con Synribo e poi, in caso di non tollerabilità, per almeno 7 giorni (7 giorni).

L'aggiunta di venetoclax, data la sua azione pro-apoptotica come inibitore di bcl-2, alla dose di 400 mg ha il razionale scientifico oltre che sperimentale, come spiegato sopra. Per il primo ciclo è prevista una fase di progressivo incremento della dose (ramp-up) con venetoclax a dosi crescenti per prevenire la sindrome da lisi tumorale, che potrebbe verificarsi in presenza di elevata massa di malattia quale espressione della attività sinergica dei due farmaci.

- la **Figura 5** mostra le immagini dell'aspirato midollare pre (basale) e post (d28) I ciclo di terapia nel paziente UPN01 (protocollo di fase 1 SynVen-AML, EudraCT n. 2019-001821-29. Mentre nella condizione basale si apprezza una infiltrazione diffusa del midollo osseo da parte di blasti leucemici che appaiono come una popolazione cellulare di media taglia ed omogenea (75-80%), alla valutazione post-I ciclo (d28) si osserva una marcata riduzione dei blasti (6-10%) con cellularità midollare normale e una ripresa emopoietica trilineare, che appare come una eterogeneità della popolazione cellulare (con un elemento di grandi

dimensioni al centro, corrispondente ad un megacariocita, e cellule più piccole con nucleo segmentato o a banda corrispondenti a cellule normali della linea granulocitaria). Il quadro midollare depone per Risposta Parziale (RP) di malattia. La valutazione della frequenza dell'allele mutato (VAF=variant allelic frequency), sempre in eterozigosi (vale a dire solo 1 dei 2 presenti in ciascuna cellula), conferma la percentuale di cellule leucemiche con mutazione di NPM1 infiltranti il midollo e la loro marcata riduzione dopo trattamento.

- la **Figura 6** mostra evidenza morfologica di differenziazione cellulare delle cellule leucemiche nel Paziente UPN01 durante il trattamento. Durante il trattamento con omacetaxina mepesuccinato e venetoclax (d14) all'aspirato midollare si è osservata una marcata differenziazione dei blasti in senso monocitario, con cellule dai nuclei ripiegati e bizzarri, a forma di quadrifoglio a tratti. Contemporaneamente, compariva una marcata ipertrofia gengivale, con tutta probabilità attribuibile alla infiltrazione da parte dei blasti monocitoidi, come è noto accadere in tali casi. Con il proseguire del trattamento (d28, fine I ciclo), l'ipertrofia gengivale si è progressivamente attenuata.

ESEMPIO 1. *Studio in vitro degli effetti di omacetaxina mepesuccinato sui livelli di proteine essenziali nella LAM con mutazione di NPM1 e sulla differenziazione cellulare.*

Materiali e Metodi

Farmaci: Per gli esperimenti preclinici in vitro

abbiamo impiegato omoarringtonina (HHT), acquistato da Selleckchem (Houston, TX USA, Cat #S9015). ABT-199 (venetoclax) è stato acquistato da Selleckchem (Houston, TX USA, Cat # S8048).

Cellule: La linea cellulare IMS-M2 esprime la mutazione di NPM1 è stata gentilmente fornita dal prof. Daniel G. Tenen (from: Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore) e precedentemente descritta (7-9).

Analisi in Western blot: In breve, le cellule sono state lisate in tampone Laemmli (1,5M Tris-HCL Ph 6.8, glicerolo, β -mercaptoetanololo, SDS, blu di bromofenolo) e le proteine sono state separate su gel SDS/PAGE Precast 4-15% gradiente (Biorad, Hercules, CA, USA) e trasferite su membrane di nitrocellulosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari indicati, le membrane sono state sviluppate mediante chemiluminescenza potenziata (ECL, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) secondo le istruzioni del produttore e visualizzate utilizzando il sistema Hyperprocessor (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). L'istone H3 è stato utilizzato come controllo di caricamento.

I seguenti anticorpi sono stati usati come indicato: anticorpo policlonale di coniglio mutante anti-NPM1 (prodotto da B.F.); anticorpo monoclonale di topo anti-NPM1 wild-type (diretto contro il C-terminale di NPM1 wild-type, #32-5200, Invitrogen); anticorpo anti-Crm-1 (Exportin-1/CRM1 (D6V7N) Rabbit mAb #46249, Cell Signaling Danvers, Massachusetts, USA); anticorpo

anti-Mcl-1 (Mcl-1 (D5V5L) Rabbit mAb #39224, Cell Signaling); anticorpo anti-H3 (Histone H3 (3H1) Rabbit mAb #9717, Cell Signaling). Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario appropriato, il segnale è stato rivelato da una chemiluminescenza potenziata (substrato Immobilon Crescendo Western HRP, Millipore).

Risultati

Risultati esemplificativi sono illustrati nella **Figura 3, B e C**. L'analisi in western blot su estratti proteici dalla linea cellulare di LAM umana IMS-M2, recante la mutazione di NPM1, con anticorpi specifici diretti contro la proteina NPM1 mutata, la proteina Crml e la proteina anti-apoptotica Mcl-1, mostra che i livelli della proteina leucemica NPM1, così come quelli di Crml e Mcl-1, appaiono ridotti dalla inibizione sostenuta della sintesi proteica da parte di HHT, con effetto dose- e tempo-dipendente (**Figura 3, B**). La proteina histone H3, come controllo, indica un caricamento proteico omogeneo tra i diversi campioni analizzati. Inoltre, le cellule IMS-M2 quando esposte a diverse dosi di HHT per 6 giorni mostrano un progressivo incremento dell'espressione degli antigeni di superficie CD14 e CD11b, segno di differenziazione cellulare in senso mielomonocitario (**Figura 3, C**).

ESEMPIO 2. *Studio in vivo dell'efficacia della combinazione di omacetaxina mepesuccinato e venetoclax su topi.*

Materiali e Metodi

In relazione al prelievo e all'utilizzazione di materiale biologico di origine umana, si dichiara che è

stato ottenuto l'espresso consenso, libero e informato, a tale prelievo e utilizzazione, del soggetto a cui è stato prelevato tale materiale, in base alla normativa vigente.

Farmaci: Per gli esperimenti preclinici in vivo nel modello murino abbiamo impiegato omoarringtonina (HHT), acquistato da Selleckchem (Houston, TX USA, Cat #S9015). ABT-199 (venetoclax) è stato acquistato da Selleckchem (Houston, TX USA, Cat # S8048). Per l'uso in vivo nel topo, l'ABT-199 è stato sciolto settimanalmente in 100% DMSO a 10 mg/ml ed è stato preparato giornalmente con 15% etanolo, 60% kolliphor, e l'HHT è stato sciolto settimanalmente in 100% DMSO a 50 mg/ml ed è stato preparato giornalmente in NaCl 0,9%.

Cellule: Le cellule di leucemia umana impiegate per i modelli di xenotrapianto murini (patient-derived xenograft, PDX model) sono state ottenute da pazienti con diagnosi di LAM con mutazione di NPM1.

Sperimentazione animale (su topi): Tutti gli studi sugli animali sono stati eseguiti in conformità con i protocolli approvati dal Ministero della salute e dall'OPBA (Comitato locale per la cura e l'uso degli animali). I topi NOD.Cg-Prkdcscid1l2rgtm1Wjl/SzJ, NOD scid gamma (NSG) sono stati originariamente acquistati da Charles River Laboratories (Europe) e poi riprodotti e mantenuti presso il Centro di Servizi e Ricerca Preclinica dell'Università di Perugia, Perugia, Italia, in conformità con le linee guida nazionali/europee.

Topi di otto/dieci settimane sono stati iniettati per via endovenosa (vena della coda) con 1×10^6 di

cellule primarie di pazienti (cellule di leucemia mieloide acuta NPM1, DNMT3A e FLT3-ITD mutate) stabilmente trasdotte con il vettore pHIV-Luc-ZsGreen (Addgene, plasmide #39196) che co-esprime la luciferasi di lucciola (Luc2P) e la proteina ZsGreen sotto il promotore EF-1alfa umano (PDX2 e PDX3). Dopo il trapianto, i topi sono stati mantenuti in gabbie dedicate e alimentati con cibo sterile e acqua acidificata, contenente 100 µg/mL di ciprofloxacina, come antibiotico. L'impiego di cellule che esprimono luciferasi consente di monitorare la malattia mediante imaging di bioluminescenza in vivo (BLI) durante il trattamento farmacologico e valutare la risposta al farmaco.

Dopo 6-10 giorni dall'inoculo (stato di malattia conclamata), l'attecchimento veniva confermato e valutato mediante BLI e i topi divisi omogeneamente in quattro gruppi (almeno n = 5 per gruppo) e trattati con veicolo, ABT-199 (venetoclax) (100 mg/kg) per os (5 giorni/settimana per 4 settimane), HHT (1 mg/kg) per via sottocutanea (s.c.) (5 giorni/settimana per 2 settimane, induzione, o 1 settimana, consolidamento) o con la combinazione. I segni clinici, le variazioni del peso corporeo e la crescita del tumore sono stati misurati 2 volte a settimana fino alla conclusione dello studio. Il carico leucemico delle cellule PDX è stato monitorato mediante imaging di bioluminescenza in più punti temporali. In breve, i topi sono stati iniettati per via sottocutanea con luciferina (XenoLight D-Luciferin Potassium Salt, PerkinElmer) e

tenuti anestetizzati con isoflurano prima dell'imaging in vivo con IVIS Lumina III In Vivo Imaging System. La quantificazione e l'elaborazione delle immagini sono state eseguite utilizzando il Living Imaging Software (PerkinElmer).

Dopo il trattamento per il tempo indicato, i topi sono stati soppressi per dislocazione cervicale, per analisi della infiltrazione di leucemia del midollo osseo (bone marrow, BM), mediante impiego di anti-human CD45 con marcatore di fluorescenza e lettura in citometria a flusso (BD Biosciences), oppure sono stati monitorati per la sopravvivenza.

Risultati

Risultati esemplificativi sono illustrati nelle **Figure 1 e 2**. Nel modello animale, la combinazione ha dimostrato un marcato effetto anti-leucemico con arresto della crescita della leucemia alla fine del primo ciclo di trattamento (d28), valutata sia mediante BLI (**Figura 1**) che mediante citofluorimetria a flusso nel midollo estratto dalle ossa di un gruppo di topi sacrificati (**Figura 2**). In particolare, la malattia risultava assente, o minimamente rilevabile, nei topi trattati con la combinazione rispetto a quelli trattati con i singoli farmaci. Questo effetto antileucemico si è tradotto in un significativo aumento della sopravvivenza dei topi trattati con la combinazione rispetto quelli trattati con i singoli farmaci (**Figura 2**). Inoltre, la combinazione si è mostrata relativamente ben tollerata dagli animali.

ESEMPIO 3. Case Report (paziente UPN01) da studio

clinico di fase I volto a valutare la sicurezza e l'efficacia preliminare della combinazione di omacetaxina mepesuccinato e venetoclax in pazienti con LAM con mutazione di NPM1 recidivante/refrattaria.

In relazione al prelievo e all'utilizzazione di materiale biologico di origine umana, si dichiara che è stato ottenuto l'espresso consenso, libero e informato, a tale prelievo e utilizzazione, del soggetto a cui è stato prelevato tale materiale, in base alla normativa vigente.

Un uomo di 69 anni, affetto da LAM NPM1-mutata in sesta recidiva di malattia dopo cinque cicli di trattamento, è stato ricoverato per essere sottoposto al primo ciclo di chemioterapia di induzione secondo il protocollo sperimentale di fase 1 "SynVen-AML (**Figura 4**). L'emocromo all'ingresso mostrava: GB 10,070/mmc, Hb 7.8 g/dL, PLT 39,000/mmc. Alla valutazione molecolare: infiltrazione marcata (75-80%) da parte di cellule leucemiche NPM1 mutate (**Figura 5**).

Il paziente è stato ricoverato per 29 giorni e ha ricevuto I ciclo di terapia con omacetaxina mepesuccinato (Synribo) al dosaggio di 0.625 mg/m² (livello 1) sottocute due volte al giorno dal giorno 1 al giorno 14, e venetoclax per via orale al dosaggio di 50 mg al giorno 2, 100 mg giorno 3, 200 mg al giorno 4, 400 mg dal giorno 5 fino al termine della terapia (g 21), come previsto da protocollo. Il ciclo prevedeva, infine, un periodo di 7 giorni in assenza di somministrazione dei farmaci sperimentali ("off-therapy", (g 21-28) (**Figura 4**).

Al termine dei 14 giorni di terapia combinata è stato eseguito esame del midollo osseo, che mostrava riduzione della cellularità e marcati aspetti di differenziazione monocitaria, in linea con quanto descritto nel modello cellulare in laboratorio. In corrispondenza di e nei giorni successivi, e compatibilmente a tale reperto si documentava la comparsa di spiccata ipertrofia gengivale, che poi si è attenuata con il passare del tempo e il prosieguo del trattamento (**Figura 6**).

L'obiettivo primario di questo studio di fase 1 è determinare la tollerabilità della nuova associazione farmacologica e avere dati preliminari di efficacia.

Durante il periodo di terapia, come atteso in paziente con LAM in terapia, si sono verificate leucopenia di grado 4 (globuli bianchi, neutrofili <500/mm³), anemia di grado 3 (emoglobina <8 g/dl) e trombocitopenia di grado 4 (piastrine <20000/mm³). L'esigenza trasfusionale tuttavia si è limitata a 6 unità di globuli rossi e 5 unità di piastrine, in assenza di sintomatologia da anemia e/o manifestazioni emorragiche. Considerando la leucopenia di grado 4, è stata iniziata una profilassi della neutropenia febbrile mediante somministrazione dell'antibiotico levofloxacina per via orale.

Non si sono verificate altre tossicità significative: in particolare non si sono registrati rialzi termici né episodi infettivi durante questo ciclo di terapia. Anche dal punto di vista della tossicità di altri organi e tessuti (fegato, cuore,

reni, cute, polmone, etc), nulla da segnalare, neanche a livello di alterazione di esami di laboratorio.

Alla valutazione midollare del d28, si documentava una risposta parziale di malattia con una buona ripresa trilineare a livello midollare, nonostante la pancitopenia periferica (vale a dire, bassi valori delle cellule del sangue: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, rispetto alla norma) (attribuita al residuo di malattia leucemica) (**Figura 5**).

Il paziente, pertanto, è stato sottoposto a II ciclo di terapia secondo lo stesso schema, come previsto da protocollo. Anche questo ciclo è stato perfettamente tollerato con un periodo di ricovero di soli 17 giorni e un fabbisogno trasfusionale di appena 3 unità di globuli rossi e 1 unità di piastrine. Di nuovo, non si sono verificate altre tossicità significative.

Altri pazienti attendono di essere arruolati nel protocollo clinico attivo.

Bibliografia

- (1) Mi R, et al. Efficacy and Safety of Homoharringtonine for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Meta-analysis. Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia <https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.06.002>
- (2) Tang R, et al. Semisynthetic homoharringtonine induces apoptosis via inhibition of protein synthesis and triggers rapid myeloid cell leukemia-1 down-regulation in myeloid leukemia cells. Mol Cancer Ther. 2006;5(3):723-31. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0164
- (3) Shi Y, et al. The Basic Research of the

- Combinatorial Therapy of ABT-199 and Homoharringtonine on Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* 2021;11:692497. doi: 10.3389/fonc.2021.692497
- (4) DiNardo CD, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2020;383(7):617-629. doi: 10.1056/NEJMoa2012971
- (5) DiNardo CD, et al. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML. *Blood.* 2020;135(11):791-803. doi: 10.1182/blood.2019003988
- (6) Salah HT, DiNardo CD, Konopleva M, Khoury JD. Potential Biomarkers for Treatment Response to the BCL-2 Inhibitor Venetoclax: State of the Art and Future Directions. *Cancers (Basel).* 2021;13(12):2974. doi: 10.3390/cancers13122974
- (7) Martelli MP, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood.* 2015;125(22):3455-65. doi: 10.1182/blood-2014-11-611459
- (8) Brunetti L, et al. Mutant NPM1 Maintains the Leukemic State through HOX Expression. *Cancer Cell.* 2018;34(3):499-512.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2018.08.005
- (9) Chi HT, et al. Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line. *Leuk Res.* 2010;34(2):261-2.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1) Combinazione di omacetaxina mepesuccinato con venetoclax o con suoi sali o con suoi derivati, come ad esempio Venetoclax-M27, per l'uso separato o sequenziale nel trattamento della leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina.

2) Combinazione secondo la rivendicazione 1, per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui detta leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina comprende ulteriormente la mutazione FLT3-ITD.

3) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in pazienti non candidabili a chemioterapie intensive, in pazienti di età ≥ 75 anni, in pazienti con persistenza di malattia candidabili a trapianto di cellule staminali emopoietiche.

4) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui omacetaxina mepesuccinato è somministrata per via sottocutanea o per via orale, e venetoclax è somministrato per via orale.

5) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, detta combinazione essendo somministrata in un ciclo di trattamento della durata complessiva da 21 a 45 giorni, preferibilmente 28 giorni, in cui

- omacetaxina mepesuccinato è somministrata, in un

primo ciclo di trattamento e nei cicli di trattamento successivi, a un dosaggio da 0,5 a 2 mg/m² due volte al giorno dal giorno 1 al giorno 14 oppure dal giorno 1 al giorno 7, preferibilmente al dosaggio di 0,625 mg/m² oppure al dosaggio di 1,25 mg/m² dal giorno 1 al giorno 14 oppure dal giorno 1 al giorno 7;

- venetoclax, o suoi sali o suoi derivati, è somministrato in un primo ciclo di trattamento a un dosaggio da 50 a 800 mg dal giorno 2 ad almeno il giorno 21, in cui il dosaggio viene aumentato da un dosaggio iniziale a un dosaggio finale, preferibilmente essendo somministrato a un dosaggio di 50 mg al giorno 2, 100 mg al giorno 3, 200 mg al giorno 4, 400 mg dal giorno 5 al giorno 21;

- venetoclax, o suoi sali o suoi derivati, è somministrato nei cicli di trattamento successivi al primo a un dosaggio da 50 a 800 mg dal giorno 1 al giorno 14, oppure dal giorno 1 al giorno 35, oppure preferibilmente dal giorno 1 al giorno 21, preferibilmente è somministrato al dosaggio di 400 mg dal giorno 1 al giorno 21; e in cui

- né omacetaxina mepesuccinato né venetoclax o suoi sali o suoi derivati sono somministrati per un periodo di tempo da 7 a 10 giorni prima di iniziare un eventuale ciclo successivo di trattamento, preferibilmente né omacetaxina mepesuccinato né venetoclax sono somministrati dal giorno 22 al giorno 28 oppure dal giorno 36 al giorno 45.

6) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, per l'uso secondo una qualsiasi

delle rivendicazioni 1-5, in cui in un ciclo di trattamento con una durata complessiva di 28 giorni

- omacetaxina mepesuccinato è somministrata al dosaggio di 0,625 mg/m² oppure al dosaggio di 1,25 mg/m² dal giorno 1 al giorno 14 oppure dal giorno 1 al giorno 7;

- venetoclax è somministrato al dosaggio di 50 mg al giorno 2, 100 mg al giorno 3, 200 mg al giorno 4, 400 mg dal giorno 5 al giorno 21 quando detto ciclo di trattamento è un primo ciclo di trattamento oppure al dosaggio di 400 mg dal giorno 1 al giorno 21 quando detto ciclo di trattamento è un ciclo successivo al primo ciclo di trattamento;

- dal giorno 22 al giorno 28 non viene somministrato né omacetaxina mepesuccinato né venetoclax o suoi sali o suoi derivati.

7) Composizione farmaceutica comprendente omacetaxina mepesuccinato e venetoclax o suoi sali o suoi derivati, come ad esempio Venetoclax-M27, assieme a eccipienti e/o adiuvanti, per l'uso nel trattamento della leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina.

8) Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7, per l'uso secondo la rivendicazione 7, in cui detta leucemia acuta mieloide con mutazione della nucleofosmina comprende ulteriormente la mutazione FLT3-ITD.

9) Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-8, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-8, in pazienti non

candidabili a chemioterapie intensive, in pazienti di età ≥ 75 anni, in pazienti con persistenza di malattia candidabili a trapianto di cellule staminali emopoietiche.

10) Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-9, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-9, in cui detta composizione è in una forma per la somministrazione orale.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

- D17 dal trapianto_Induzione Ciclo 1_2a settimana

Veicolo (controllo)



ABT



HHT



HHT/ABT



- D31 dal trapianto_Induzione Ciclo 1_4a settimana

Veicolo (controllo)



ABT



HHT



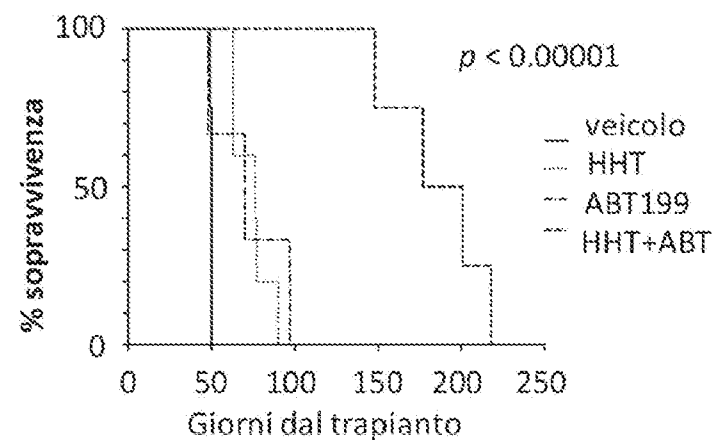
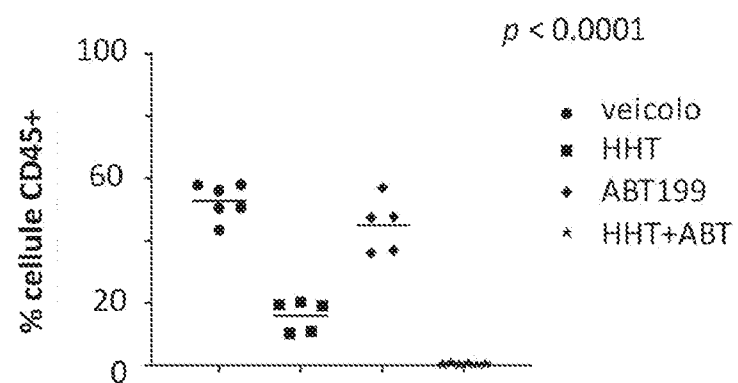
HHT/ABT



Fig. 1

A

PDX2



B

PDX3

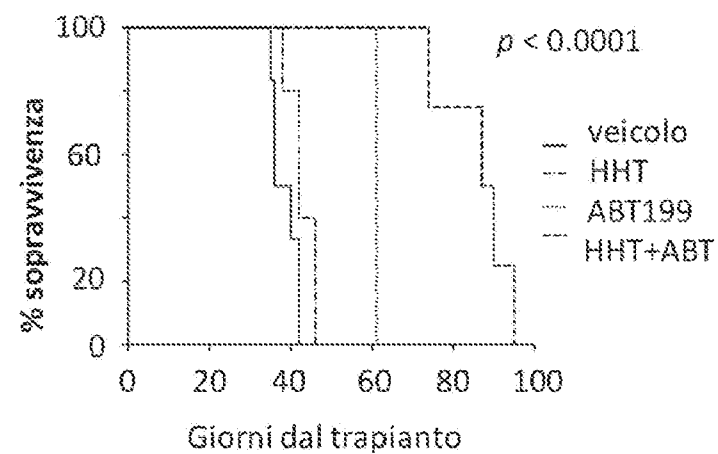
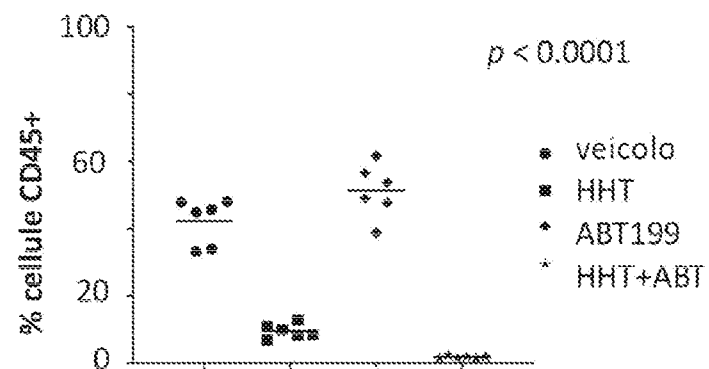
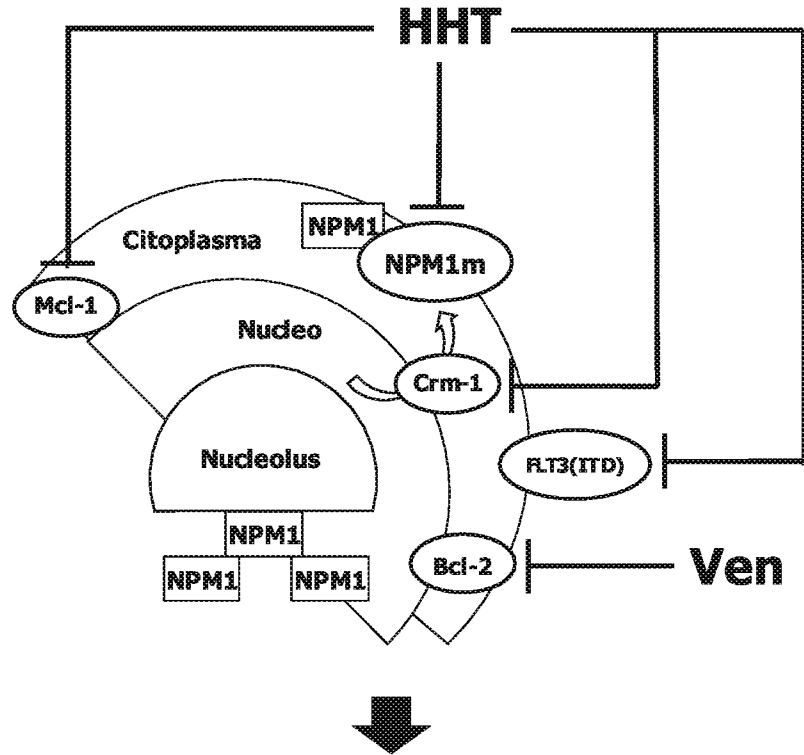


Fig. 2

A

Azione congiunta di HHT + Ven
contro 'elementi chiave' nella LAM NPM1-mutata



differentiazione, arresto della crescita e apoptosi

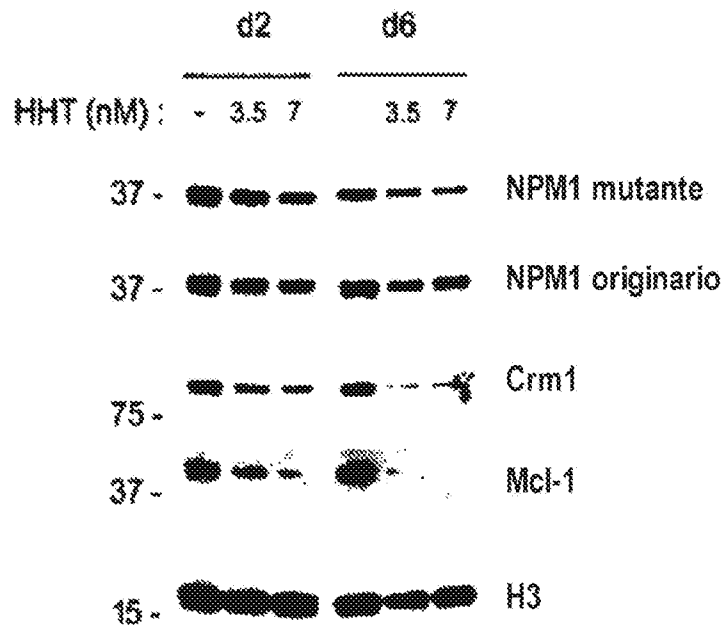
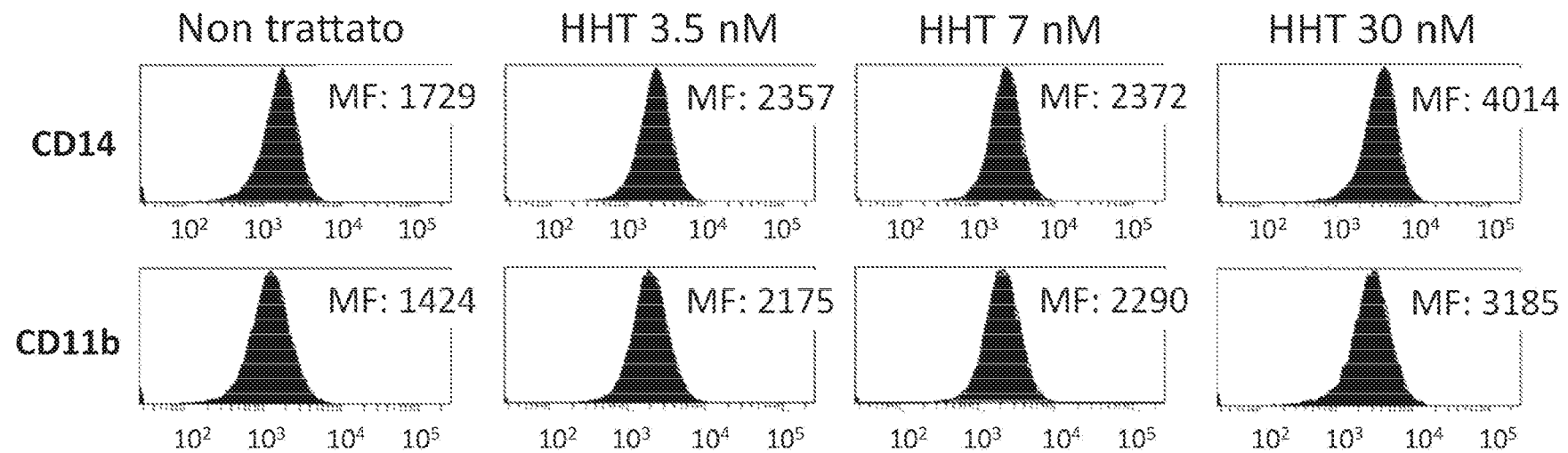
B

Fig. 3

C

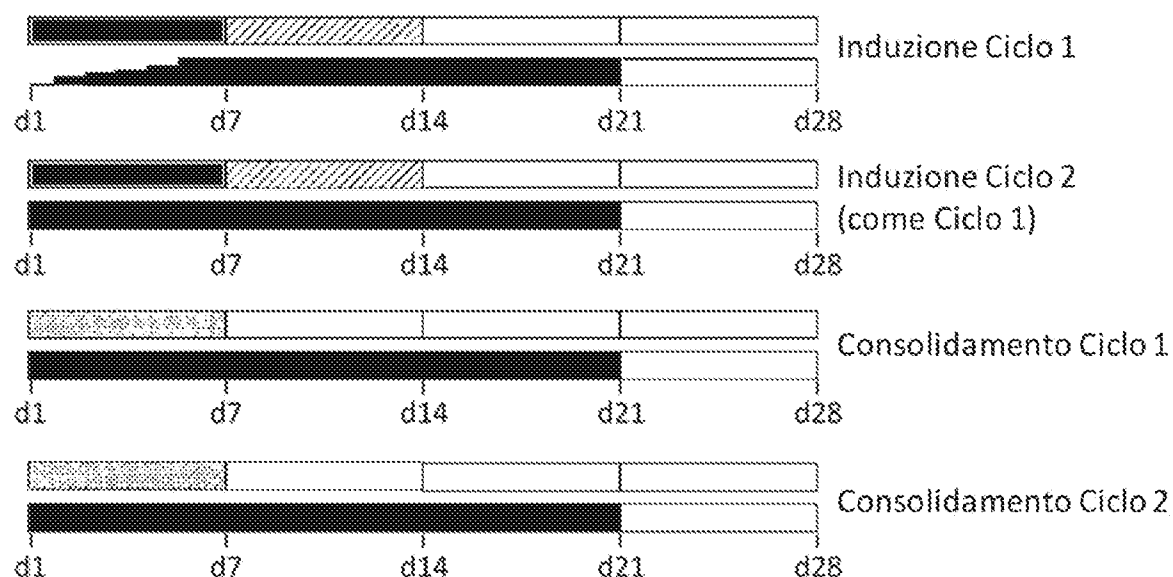
IMS-M2 (72h + 72h esposizione al farmaco)



4/6

Fig. 3

SynVen-AML: schema di trattamento



LEGENDA

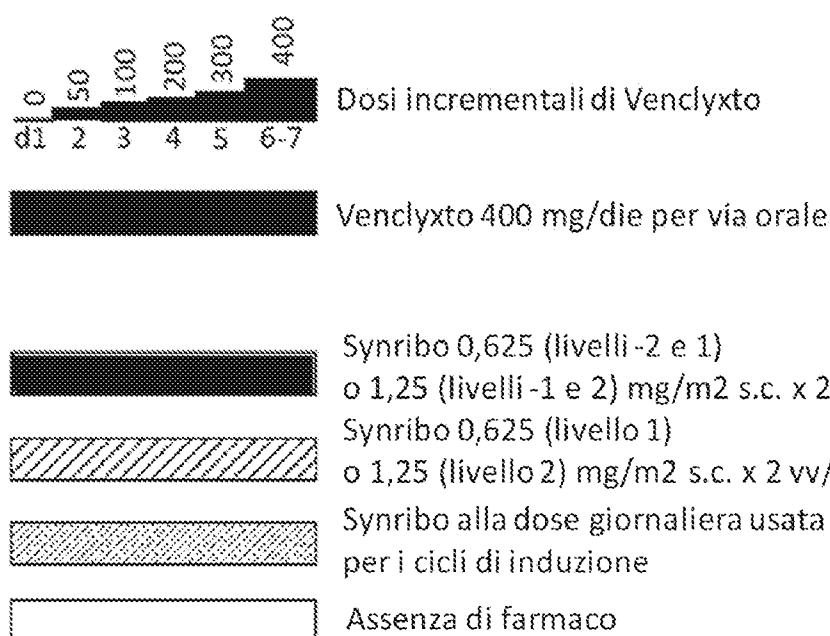


Fig. 4

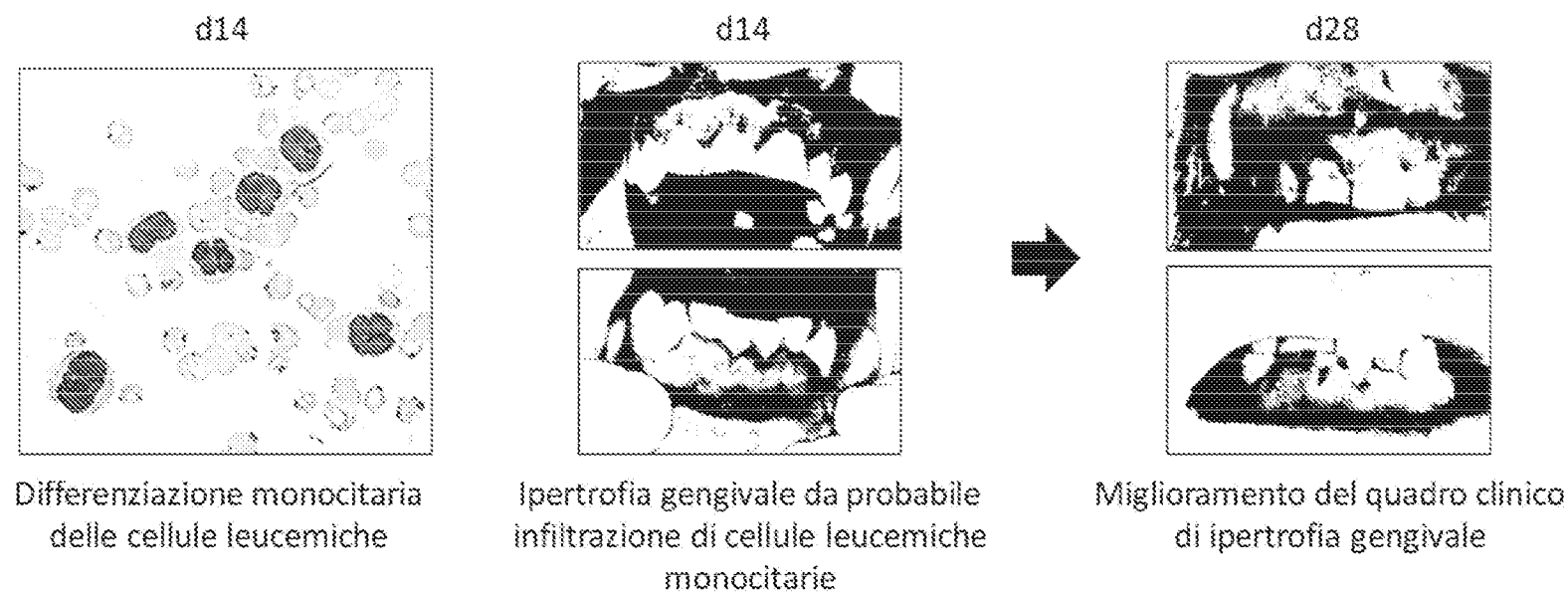
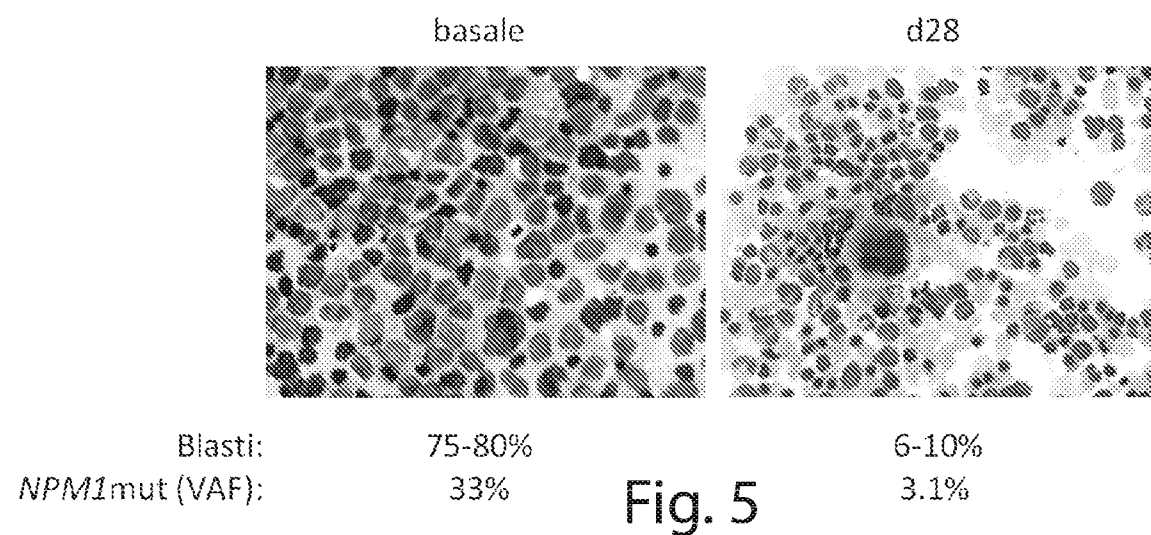


Fig. 6