

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 021 687**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4427 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2020** **PCT/EP2020/072514**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2021** **WO21028438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2020** **E 20751178 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 4013413**

54 Título: **Direccionamiento a WNK1 en cánceres de sangre**

30 Prioridad:

12.08.2019 EP 19191246

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2025

73 Titular/es:

KØBENHAVNS UNIVERSITET (100.00%)
Nørregade 10
1165 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

HELIN, KRISTIAN y
AGGER, KARL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 021 687 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

Direccionamiento a WNK1 en cánceres de sangre

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para su uso en el tratamiento de pacientes con cánceres de sangre, en particular leucemia y mieloma múltiple.

10 Antecedentes de la invención

Actualmente, no existe un tratamiento eficaz disponible para el mieloma múltiple, mientras que el 70% de los pacientes con leucemia mieloide aguda morirán en cinco años. Los inventores han demostrado que la reducción de la actividad de WNK1 es tóxica para las células de origen leucémico y de mieloma y tiene efectos menos perjudiciales en las células normales.

Curiosamente, WNK1 tiene un papel bien descrito en una forma hereditaria de, por ejemplo, hipertensión, pero no se ha relacionado previamente con el cáncer de sangre. Debido al papel de WNK1 en la hipertensión, actualmente se están desarrollando varios inhibidores de moléculas pequeñas con el objetivo de usarlos para tratar el aumento de presión arterial.

US20080286809A1 divulga que la velocidad de autofosforilación de WNK1 expresada endógenamente aumenta ~5 veces por estrés hipertónico en células epiteliales de riñón y en líneas celulares de cáncer de mama y colon. Se sabe que estas condiciones estimulan la actividad de NKCC1 (cotransportador Na-K-CL) al inducir su fosforilación, lo que conduce a una mayor absorción de iones Na⁺ y K⁺ para mantener el volumen celular.

US2003/0082720A1 divulga ácidos nucleicos que codifican para una WNK de mamífero, y proteínas codificadas por esta, preferentemente, WNK1 humana y WNK4 humana. US2003/0082720A1 divulga que estos ácidos nucleicos, y formas mutantes de estos, están asociados con, entre otros, manejo de electrolitos renales, hipertensión y pseudohipoadosterismo tipo II (PHAII).

CN102408484A, divulga un péptido recombinado de penetración en membrana con un efecto inhibidor de quinasa WNK. Sirviendo como un inhibidor específico de WNK serina/treonina quinasa, el péptido recombinado de penetración de membrana se puede usar para reducir la actividad de NKCC1 activada por la quinasa WNK después de combinarse con la quinasa WNK, reduciendo así específicamente el Cl⁻ en las células neuronales del ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal (DRG) y el ganglio trigémino, inhibiendo la acción de excitabilidad de GABA (ácido gamma-amino butírico) en el DRG e inhibiendo la transferencia del sentido del dolor.

WO16107933A2 divulga un método para tratar cáncer usando una combinación de inhibición de miARN-152 y expresión de miARN 150 en función de datos experimentales que muestran esta combinación que conduce a la inhibición completa del crecimiento de múltiples tipos de cánceres *in vivo*. Entre una larga lista de cánceres a tratar se encuentra preferentemente un tumor sólido, pero podría ser cualquier tumor que incluye, pero no se limita a, leucemia.

WO0138503 A2 divulga polipéptidos de fosfatasa, secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos de fosfatasa, así como diversos productos y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades y condiciones relacionadas con la fosfatasa. WO0138503 A2 divulga que WNK3 muestra una alta expresión en riñón humano, en líneas celulares de carcinoma de riñón, en próstata, líneas celulares de próstata y metástasis óseas de tumor de próstata, en tejido colorrectal y líneas celulares tumorales, y en células de leucemia humana.

Yamada K, J Med Chern. (2017);60(16): 7099-7107, sugiere que a 30 mg/kg como dosis oral única se encontró una concentración de 2 µM del inhibidor de WNK1 "Compuesto 12" cierta reducción en la presión arterial en modelos de hipertensión de roedores.

Chen et al., Oncotarget, (2018), 9(43), sugiere que la quinasa WNK1 podría ser una diana terapéutica para el glioblastoma con propiedades similares a las de células madre (es decir, cáncer) y también menciona que varias mutaciones de WNK1 se han asociado con el cáncer, aunque se desconoce su contribución al inicio del tumor.

Zhang et. al. Acta Pharm. Sinica (2017), 39, divulga que WNK1 se activó por estrés hipertónico en células epiteliales de riñón, así como líneas celulares de cáncer de mama y colon.

Pio et al., PLOS ONE, (2017), divulga que la inactivación de WNK1 dio como resultado una reducción significativa de la migración de células de cáncer de mama en respuesta a BMCM en relación con un control de ARNip no específico.

Shyamasundar et al., Int. Jour. de Oncology (2016), 49, menciona que WNK1, una de las dianas de miR-93, se verificó como una supuesta diana por el ensayo de luciferasa. D9 también muestran que el silenciamiento mediado por ARNip de WNK1, dio como resultado una disminución de la capacidad invasiva de estas células, lo que sugiere que los cambios mediados por miR-93 en la invasión celular fueron posiblemente a través de WNK1.

Tsuboi et al., Official journal of the Int. Association of Pancreatology (2016), 16 (5), divulga el papel del factor de intercambio de nucleótidos de guanina Vav3 en la motilidad e invasividad de las células de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), y afirma que la *inactivación de WNK1 inhibió la motilidad e invasividad en la motilidad e invasividad de las células de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)*.

Hsu et al., Oncotarget (2016), 7(19), divulga que la *inactivación de WNK1 por transfección de ARNip evitó la migración del cáncer mediada por LCAF-CM y Kyn. Estos hallazgos sugieren que Kyn derivado de LCAF activa AKT, lo que da como resultado el desencadenamiento de la progresión del cáncer mediada por WNK1 en el cáncer de pulmón*.

WNK1 (Sin K (por sus siglas en inglés) (lisina)) y su quinasa cadena abajo se dirige a la respuesta de estrés oxidativo 1 (OXSR1) y la quinasa rica en prolina/alanina relacionada con STE20/SPSI (SPAK) tienen papeles bien descritos en la regulación de la actividad del transporte de Na/Cl en el riñón, donde OXSR1/SPAK activado fosforila miembros de la familia SLC12 de transportadores de cationes. Las mutaciones hereditarias encontradas en el primer exón codificante de WNK1 y WNK4, que da como resultado una mayor estabilización de las proteínas, están relacionadas con una forma hereditaria de hipertensión (Alessi et al., 2014; Rodan y Jenny, 2017). Debido al vínculo bien descrito con la hipertensión de las quinastas WNK, existe un interés continuo en desarrollar inhibidores de las quinastas de esta vía (AlAmri et al., 2017; Ishigami-Yuasa et al., 2017; Yamada et al., 2017; Yamada et al., 2016a; Yamada et al., 2016b).

Por lo tanto, en la literatura, actualmente no se ha informado un papel específico de las quinastas WNK en los cánceres de sangre, tal como leucemia y mieloma múltiple.

Breve descripción de la invención

La invención descrita en la presente cubre inhibidores de moléculas pequeñas existentes de WNK1 para su uso en el tratamiento de pacientes con cánceres de sangre, en particular leucemia y mieloma múltiple. Los inventores han demostrado efectos de inhibición de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) en células leucémicas en experimentos de cultivo de tejidos *in vitro*, así como en un modelo de ratón de leucemia *in vivo*. Además, los inventores han demostrado que una molécula pequeña inhibidora de WNK1 es tóxica para las células de mieloma múltiple.

Recientemente, se han desarrollado varios inhibidores de WNK1 de moléculas pequeñas con el objetivo de usarlos para tratar el aumento de presión arterial. Los inventores han demostrado que el inhibidor de WNK1 5-cloro-2-(2-((metil-d3)amino)tiazol-4-il)-piridin-4-il)(4-(4-clorobencil)piperazin-1-il)metanona (un inhibidor de WNK1 denominado "Compuesto 12" en Yamada K, J Med Chern. 24 de agosto de 2017;60(16):7099-7107) se puede reutilizar, para ser utilizado en el tratamiento de cánceres de sangre.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a la provisión de un uso terapéutico hasta ahora desconocido de inhibidores de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1), es decir, para su uso en el tratamiento de pacientes con cánceres de sangre, en particular leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para su uso en el tratamiento de cánceres de sangre en un sujeto mamífero.

Otra realización de la invención se refiere a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso en el tratamiento de cánceres de sangre en un sujeto mamífero, en donde los cánceres de sangre se seleccionan del grupo que consiste en

- (1) leucemia, que incluye leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL) o leucemia de células pilosas (HCL), y
- (2) linfoma, que incluye linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de zona marginal, linfoma de Burkitt o linfoma linfoplasmacítico, y
- (3) mieloma, que incluye mieloma múltiple, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, plasmacitoma solitario, plasmacitoma extramedular, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiple latente (SMM), mieloma de inmunoglobulina D (IgD) o mieloma de inmunoglobulina E (IgE).

Aún otras realizaciones de la invención se refieren a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) que tiene un peso molecular menor que 900 daltones para uso en el tratamiento de cánceres de sangre en un sujeto humano, en donde los cánceres de sangre se seleccionan del grupo que consiste en

(1) leucemia, que incluye leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL) o leucemia de células pilosas (HCL), y

(2) linfoma, que incluye linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de zona marginal, linfoma de Burkitt o linfoma linfoplasmacítico, y

(3) mieloma, que incluye mieloma múltiple, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, plasmacitoma solitario, plasmacitoma extramedular, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiple latente (SMM), mieloma de inmunoglobulina D (IgD) o mieloma de inmunoglobulina E (IgE).

Aún otras realizaciones de la invención se refieren a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) que tiene un peso molecular menor que 900 dáltones para uso en el tratamiento de cánceres de sangre en un sujeto humano, en donde los cánceres de sangre se seleccionan del grupo que consiste en

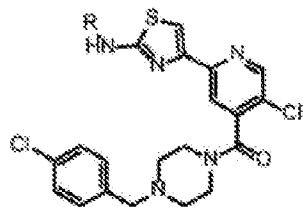
(1) leucemia, que incluye leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL) o leucemia de células pilosas (HCL), y

(2) linfoma, que incluye linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de zona marginal, linfoma de Burkitt o linfoma linfoplasmacítico, y

(3) mieloma, que incluye mieloma múltiple, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, plasmacitoma solitario, plasmacitoma extramedular, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiple latente (SMM), mieloma de inmunoglobulina D (IgD) o mieloma de inmunoglobulina E (IgE).

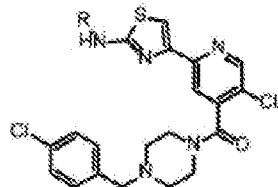
Aún otras realizaciones de la invención se refieren a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) que tiene un peso molecular menor que 900 dáltones para uso en el tratamiento de leucemia o mieloma múltiple en un sujeto humano.

Aún otras realizaciones de la invención se refieren a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso en el tratamiento de cánceres de sangre en un sujeto humano, en donde el inhibidor está representado por la fórmula general



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es CD_3 o Me.

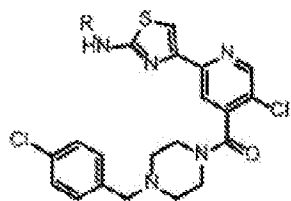
Aún otras realizaciones de la invención se refieren a un inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso en el tratamiento de leucemia o mieloma múltiple en un sujeto humano, en donde los inhibidores están representados por la fórmula general



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es CD_3 o Me.

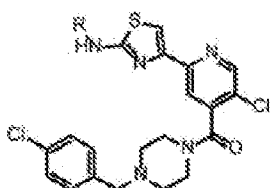
Aún otras realizaciones de la invención se refieren a un inhibidor de proteína deficiente en lisina

quinasa 1 (WNK1) para uso en el tratamiento de leucemia o mieloma múltiple en un sujeto humano, en donde el inhibidor está representado por la fórmula general



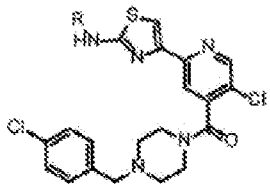
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es CD_3 o Me, en donde el inhibidor se formula en una composición farmacéutica, que comprende opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

Una realización adicional de la invención se refiere al siguiente compuesto para su uso en un método para tratar cánceres de sangre en un sujeto mamífero, que incluye un sujeto humano, mediante la inhibición de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) en células de cáncer de sangre, caracterizado por que un inhibidor de WNK1 de la siguiente fórmula general



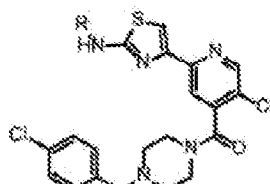
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es CD_3 o Me, se administra al sujeto.

Aún una realización adicional de la invención se refiere al siguiente compuesto para uso en un método para tratar cánceres de sangre en un sujeto mamífero, que incluye un sujeto humano, mediante la inhibición de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) en células de cáncer de sangre, caracterizado por que un inhibidor de WNK1 de la siguiente fórmula general



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es CD_3 o Me, se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

Aún una realización adicional de la invención se refiere al siguiente compuesto para uso en un método para tratar leucemia o mieloma múltiple en un sujeto humano, mediante la inhibición de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) en células de cáncer de sangre, caracterizado por que un inhibidor de WNK1 de la siguiente fórmula general



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es CD_3 o Me, se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 (A-D) muestran que el agotamiento de proteína WNK1 (usando tres ARNg diferentes contra WNK1: WNK1_6, WNK1_17, WNK1_1) afecta negativamente al crecimiento de las líneas celulares cancerosas MA9, THP1 y MOLM13, pero no a los MEF. Las células se transdujeron con el ARNg etiquetado con GFP indicado que expresa lentivirus (WNK1_6, WNK1_17, WNK1_1, RPS19 y Nctrl). La fracción de células que expresan ARNg con respecto al día 2 después de la transducción se midió mediante FACS. RPS19 expresa un ARNg contra un gen esencial y funciona como un control positivo Nctrl como control negativo. Figura 1A: MA9 (línea celular de leucemia mieloide

aguda impulsada por MLL-AF9 de ratón). Figura 1B: MEF (fibroblastos embrionarios de ratón con inactivación de p53). Figura 1C y Figura 1D: THP1 y MOLM13 (dos líneas celulares diferentes de leucemia mieloide aguda humana). Nctrl y NCL son controles negativos. Las indicaciones en el eje Y de las figuras 1A-D representan el % de células positivas para GFP. D1, D2...D17 representan días transcurridos desde la transducción con lentivirus.

La figura 2 (A-B) muestra que se requiere la actividad catalítica de WNK1 para el crecimiento de células MA9. La figura 2A muestra un dibujo esquemático de la combinación de alelos *Wnk1* en los ratones compuestos WNK1 y el resultado de la inducción de recombinación mediante inyección de tamoxifeno. *Wnk1^{f/-};R26creERT2⁺* se refiere al genotipo de la cepa de ratón con inactivación, *Wnk1^{f/D368A}; R26creERT2⁺* se refiere al genotipo de la cepa de ratón mutante catalítico. La figura 2B muestra curvas de crecimiento en cultivo líquido de células leucémicas derivadas de ratones con compuesto WNK1 con los genotipos indicados. El eje Y (duplicaciones) representa el número de duplicaciones del número de células en el cultivo, *Wnk1^{D368A}* representa ratones que expresan un mutante WNK1 muerto catalítico (R26: *Wnk1^{-lox}* se refiere a células con un alelo condicional de *Wnk1* antes de la inducción de inactivación, R26: *Wnk1^{D368A/lox}* se refiere a células con una activación condicional del mutante catalítico WNK1 antes de la inducción de activación, R26: *Wnk1^{-lox}* + OHT se refiere a células con la inactivación de *Wnk1* después del tratamiento con OHT, R26: *Wnk1^{D368A/lox}* + OHT se refiere a células que expresan solo el mutante catalítico WNK1 después del tratamiento con OHT.

La figura 3 muestra que se requiere actividad de quinasa WNK1 para leucemia impulsada por MLL-AF9 *in vivo*, ("MLL-AF9" que es un oncogén de leucemia). Se indujo leucemia impulsada por MLL-AF9 en Rosa26CreERT2: *Wnk1^{+/-lox}* y Rosa26CreERT2: Ratones *Wnk1^{D368A/lox}*. Se utilizaron células de ratones leucémicos en trasplantes para generar leucemias secundarias (más agresivas). Cuando la leucemia se volvió detectable, se inyectó a los ratones tamoxifeno (indicado con una línea punteada vertical) para inducir la inactivación del alelo floxeado. *Wnk1^{+/-}* control (figura 3A), o WNK1D368/- quinasa muerta (figura 3B). La importancia es el resultado de una prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). BMT se refiere al trasplante de médula ósea con células leucémicas para inducir leucemia.

La figura 4 muestra que "Compuesto 12" inhibe el crecimiento de células MA9. La figura 4A: Curvas de respuesta a la dosis generadas usando células MEF o MA9 con cantidades crecientes de "Compuesto 12" disuelto en DMSO. Figura 4B: Transferencia Western (WB) usando lisados de células MA9 tratadas durante 3 horas con las concentraciones indicadas de "Compuesto 12". Las transferencias se sondaron con un anticuerpo contra OXSR1 o un anticuerpo contra la forma fosforilada de OXSR1 (P-OXSR1). El WB con un anticuerpo fosfoespecífico contra la forma fosforilada de OXSR1 documenta que "Compuesto 12" inhibe WNK1 en células leucémicas y que el grado de inhibición se correlaciona con el efecto sobre el crecimiento. Figura 4C: Curva de crecimiento de células MA9 cultivadas en diferentes concentraciones de "Compuesto 12". Las células se contaron y se volvieron a colocar en placas cada 2 días.

La figura 5 muestra que las líneas celulares de cáncer de sangre humano son más sensibles al "Compuesto 12" que los fibroblastos diploides humanos. La figura 5 muestra curvas de respuesta a la dosis para "Compuesto 12" en las líneas celulares humanas indicadas. Los valores de IC50 se calcularon utilizando el software Prism. BJ tert se refiere a una línea celular de fibroblastos humanos diploides, U2OS se refiere a una línea celular de osteosarcoma humano, MOLM13 se refiere a una línea celular de leucemia mieloide aguda humana, THP1 se refiere a una línea celular de leucemia monocítica humana, Monomac se refiere a una línea celular de leucemia monocítica humana, MMS1 se refiere a una línea celular de mieloma múltiple humano, KMS18 se refiere a una línea celular de mieloma múltiple humano, KSM11 se refiere a una línea celular de mieloma múltiple humano, MsTo se refiere a una línea celular de mesotelioma humano, H226 se refiere a una línea celular de carcinoma de pulmón humano.

La figura 6A muestra que el tratamiento de ratones leucémicos con "Compuesto 12" aumenta su vida útil. A los ratones se les trasplantaron células leucémicas (MA9) para inducir leucemia mieloide aguda (AML) se les inyectó diariamente 1,8 mg de "Compuesto 12" durante un período total de 18 días.

La presente invención ahora se describirá más detalladamente a continuación.

Descripción detallada de la invención

Los inventores realizaron un cribado de CRISPR/Cas9 en células de leucemia de ratón e identificaron la quinasa WNK1 como una posible diana terapéutica en leucemia. Usando células de ratón con inactivación condicional de *WNK1*, así como aplicando tecnología CRISPR/Cas9, los inventores han confirmado el éxito de la detección inicial tanto *in vitro* como *in vivo*.

Es importante destacar que los inventores han demostrado que se requiere la actividad catalítica de WNK1 para la función de WNK1 en células leucémicas, lo que hace que la inhibición de WNK1 sea una estrategia terapéutica factible en la leucemia.

Vía de la quinasa WNK1 esencial para las células de leucemia mieloide aguda (AML) translocadas de MLL-AF9

Con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas en células de leucemia mieloide aguda (AML), los inventores han examinado una biblioteca CRISPR/Cas9 de todo el cinoma en células derivadas de un modelo de leucemia de ratón, en el que el evento transformante es la expresión de MLL-AF9 (MA9). La biblioteca consistió en alrededor de 6000 ARNg dirigidos a un total de 545 quinasas con 5-10 ARNg diferentes por gen, así como controles positivos y negativos. El cribado fue un cribado de exclusión, donde las células crecieron durante 10 duplicaciones después de la transducción de la biblioteca. Los

ARNg presentes en el inicio y al final del experimento se determinaron mediante secuenciación NGS (Illumina). Los análisis de los resultados de cribado demostraron que se requieren varias quinasas diferentes para el crecimiento de células MA9; muchos de estos se han encontrado previamente esenciales para las células AML. Una quinasa que se destaca como de particular interés es la quinasa WNK1.

Validación de éxitos de cribado

Para validar los éxitos del cribado, los inventores clonaron ARNg individuales contra WNK1 de ratón y humano y probaron su fenotipo en ensayos de agotamiento de GFP. Para probar si WNK1 era esencial para todos los tipos de células, los inventores también transdujeron MEF con inactivación de p53. A partir de estos datos, los inventores concluyeron que las células de AML son más sensibles al agotamiento de WNK1 que los MEF de control (figura 1A-D).

Se requiere la actividad catalítica de WNK1 para el crecimiento de células MA9

Para investigar si se requiere la actividad catalítica de WNK1 para el crecimiento de células MA9, los inventores obtuvieron ratones heterocigotos compuestos con un alelo flanqueado por loxP de *Wnk1^{flox}* y un alelo de quinasa inactiva de *Wnk1^{D3S8A}*, así como Cre inducible por tamoxifeno; *Rosa26-CreERT2* (*Wnk1^{flox/D3S8A};R26creERT2*). El tratamiento de estos ratones con tamoxifeno da como resultado células MA9 que expresan solo mutante catalítico de WNK1 (WNK1D368A) (figura 2A a la izquierda). Para medir el efecto de delección completa de WNK1, los inventores utilizaron ratones *Wnk1^{flox/-}Rosa26creERT2*, en los que la inyección de tamoxifeno conduce a delección del alelo condicional de *Wnk1*, dejando un alelo nulo (figura 2A derecha) y como control los inventores utilizaron ratones *Wnk1^{flox/+}Rosa26creERT2*, en los que la inyección de tamoxifeno conduce a la expresión de un alelo funcional de *Wnk1*. Los inventores transdujeron células de médula ósea enriquecidas con c-Kit aisladas de estos ratones con un vector retroviral que expresa MLL-AF9 y las utilizaron en experimentos de trasplante para generar células MA9 con los tres genotipos diferentes de *Wnk1*; MA9(*Wnk1^{flox/D368A};R26creERT2*), MA9(*Wnk1^{flox/-}Rosa26creERT2*) y MA9(*Wnk1^{flox/+}Rosa26creERT2*). Usando estas células en ensayos de crecimiento *in vitro*, los inventores demostraron que la delección de *Wnk1* dio como resultado una fuerte atenuación del crecimiento y que la expresión del mutante catalítico, solo, tuvo un efecto similar (figura 2B). Estos resultados demuestran que se requiere actividad de quinasa WNK1 para el crecimiento de células MA9.

Se requiere actividad de quinasa WNK1 para el mantenimiento de leucemia mieloide aguda (AML) in vivo

Para investigar si también se requiere la actividad de quinasa WNK1 para el crecimiento de células MA9 *in vivo*, los inventores trasplantaron ratones con MA9(*Wnk1^{flox/D3S8A};R26creERT2*) o células de control MA9(*Wnk1^{flox/+}Rosa26creERT2*). Cuando la leucemia secundaria comenzó a desarrollarse, los inventores inyectaron a los ratones tamoxifeno para eliminar el alelo de *Wnk1* floxeado, lo que dio como resultado células que expresan un alelo de WNK1 (células de control) o en células que expresan solo un mutante inactivo de quinasa de WNK1D368A. Es evidente que la inyección de tamoxifeno para inducir la recombinación de *MM(Wnk1^{flox/D368A};R26creERT2)* y la expresión de solo el mutante WNK1 catalítico da como resultado un aumento significativo de la vida útil de los ratones (figura 3B), mientras que la inducción del alelo de control *MM(Wnk1^{flox/+}Rosa26creERT2)* que deja un alelo funcional de *Wnk1* no tiene un efecto significativo en la vida útil de los ratones (figura 3A).

(5-Cloro-2-(2-((metil-d3)amino)tiazol-4-il)-piridin-4-il)(4-(4-clorobencil) piperazin-1-il)metanona, "Compuesto 12", inhibidor de WNK1

Varios inhibidores de WNK diferentes de eficacia y especificidad variables se han descrito en la literatura. Uno de estos es (5-Cloro-2-(2-((metil-d3)amino)tiazol-4-il)-piridin-4-il)(4-(4-clorobencil)piperazin-1-il)metanona, llamado "Compuesto 12" en Yamada et al., 2017, que tiene una IC50 de 6 nM y una EC50 para OXSR1 fosforilado de 0,59 µM en células (Yamada et al., 2017). Los inventores tuvieron "Compuesto 12" sintetizado de acuerdo con la siguiente síntesis de "Yamada K, J Med Chern. 24 de agosto de 2017;60(16): 7099-7107" y lo probaron en ensayos de viabilidad en células MA9 y MEF *in vitro*. IC50 en células MA9 es de alrededor de 1 µM y significativamente mayor en MEF (figura 4A). Los experimentos de transferencia Western (WB) con anticuerpo fosforo- OXsr1 y curvas de crecimiento de células MA9 respaldan la noción de que la inhibición mediada por "Compuesto 12" de WNK1 da como resultado un crecimiento atenuado de células MA9 (figura 4B-C). Para extender los datos a líneas celulares humanas, los inventores realizaron ensayos de viabilidad en 10 líneas celulares humanas diferentes. La mayoría de las líneas celulares de cáncer de sangre tenían una IC50 de alrededor de 1 µM y eran significativamente más sensibles a la inhibición de WNK1 que los fibroblastos diploides (figura 5).

Síntesis de "Compuesto 12"

La síntesis descrita posteriormente del "Compuesto 12" se divulga en "Yamada K, J Med Chern. 24 de agosto de 2017;60(16):7099-7107": A una solución de (4-(4-clorobencil)piperazin-1-il)(2,5- dicloropiridin-4-il)metanona (550 mg, 1,43 mmol) y tributil(1-etoxivinil)estaño (0,5 mL, 1,487 mmol) en 1,4-dioxano (20 mL) se añadió Pd(PPh₃)₄ (70 mg, 0,061 mmol), y la mezcla se agitó a 100 °C durante 7 h. Después de dejarla enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se añadió a una solución acuosa de fluoruro de potasio 2 M (5 mL). A esta mezcla de reacción se le añadió N-bromosuccinimida (300 mg, 1,69 mmol) en una porción. Esta mezcla de reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. El material insoluble se eliminó mediante filtración, enjuagando con metanol (3 x 20 mL). El filtrado resultante se enfrió a 0 °C en el que se añadió una solución de N-Boc-tiourea (400 mg, 2,27 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó durante 2 h, dejándola calentar a temperatura ambiente. Después de la eliminación del disolvente, el material crudo resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con solución acuosa de NaOH 1 N y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo) para producir (4-(5-cloro-6-(4-(4-clorobencil)piperazin-1-carbonil)piridin-2-il)-tiazol-2-il)carbamato de terc-butilo (550 mg, 70%). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,58 (s, 9H), 2,40-2,46 (m, 2H), 2,56 (br s, 2H), 3,26-3,31 (m, 2H), 3,52 (s, 2H), 3,82-3,88 (m, 2H), 7,26-7,32 (m, 4H), 7,66 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,99 (br s, 1H), 8,59 (s, 1H). ESI-MS m/z: 548,0 [M + H]⁺.

A una suspensión de (4-(5-cloro-6-(4-(4-clorobencil) piperazin-1-carbonil)- piridin-2-il)tiazol-2-il)carbamato de terc-butilo (530 mg, 0,966 mmol) y carbonato de potasio (340 mg, 2,46 mmol) en DMF (15 mL) se añadió CD₃I (161 mg, 1,11 mmol) gota a gota a 0 °C, y la mezcla se agitó durante 2 h dejando calentar a temperatura ambiente. Después de la eliminación del disolvente bajo presión reducida, el material resultante se suspendió en agua (50 mL) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente para formar un precipitado marrón. El precipitado resultante se recolectó mediante filtración y se enjuagó con agua fría y hexano para producir (4-(5-cloro-4-(4-(4-clorobencil) piperazin-1-carbonil)piridin-2-il)tiazol-2-il) (metil-d₃) carbamato de terc-butilo (430 mg, 79%). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,53 (s, 9H), 2,32-2,38 (m, 2H), 2,48 (br s, 2H), 3,18-3,27 (m, 2H), 3,43 (s, 2H), 3,70-3,72 (m, 1H), 3,82-3,86 (m, 1H), 7,17-7,23 (m, 4H), 7,64 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,49 (s, 1H). ESI-MS m/z: 565,4 [M + H]⁺. A una suspensión de (4-(5-cloro-4-(4-(4-clorobencil)-piperazin-1-carbonil)piridin-2-il)tiazol-2-il)(metil-d₃)carbamato de terc-butilo (50 mg, 0,088 mmol) en metanol (6 mL) se añadió solución acuosa de HCl 3 M (0,3 mL, 0,90 mmol), y la mezcla se agitó durante 2 h a 60 °C. La mezcla se enfrió y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el "Compuesto 12": Clorhidrato de (5-cloro-2-(2-((metil-d₃)-amino) tiazol-4-il) piridin-4-il) (4-(4-clorobencil) piperazin-1-il)-metanona (41 mg, 86%). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3,04 (br s, 2H), 3,20 (brs, 1H), 3,29-3,42 (m, 3H), 3,52-3,62 (m, 2H), 4,35-4,40 (m, 2H), 4,59 (brs, 1H), 7,44 (brs, 1H), 7,54-7,55 (m, 2H), 7,63 (brs, 2H), 7,92-7,97 (m, 1H), 8,70 (s, 1H), 11,45 (brs, 0,5H), 11,58 (brs, 0,5H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 169,59, 163,73, 158,30, 158,05, 150,89, 148,86, 147,05, 142,48, 134,38, 133,29, 128,73, 124,91, 118,56, 116,16, 114,24, 106,65, 57,75, 50,58, 50,07, 49,93, 42,88, 42,34, 37,76, 30,71. HRMS (TOF) calculado para C₂₁H₂₅Cl₂N₅OS [M + H]⁺ +465,1156, encontrado 465,1110.

El tratamiento *in vivo* de ratones leucémicos con "Compuesto 12" aumenta su vida útil "Compuesto 12" tiene baja toxicidad en ratones (Yamada et al., 2017). Para probar la eficacia *in vivo* en el modelo de ratón de leucemia translocada MLL-AF9, los inventores inyectaron "Compuesto 12" en ratones 4 días después de haberse trasplantado con células leucémicas. Como se puede ver (figura 6A), la inyección continua de "Compuesto 12" da como resultado una mayor vida útil de los ratones.

Para resumir, los inventores han encontrado que la quinasa WNK1 es necesaria para el crecimiento de células de leucemia mieloide aguda (AML) translocadas de MLL-AF9. Los inventores han demostrado que la actividad catalítica de WNK1 es crítica para la supervivencia de células leucémicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, los inventores ven que las células MA9 también, como otras líneas celulares de cáncer de sangre, son sensibles a la inhibición de WNK1. Es importante destacar que los inventores demostraron que el tratamiento de un modelo de ratón con leucemia con "Compuesto 12" dio como resultado un aumento de la vida útil de los ratones tratados.

Definiciones

Antes de analizar la presente invención con más detalles, primero se definirán los siguientes términos y convenciones:

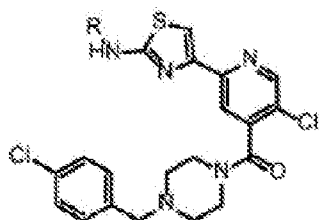
AML: cuando se usa en la presente, AML se refiere a leucemia mieloide aguda.

BJ tert: cuando se usa en la presente, BJ tert se refiere a una línea celular de fibroblastos diploides humanos diploides, inmortalizada por la expresión de Telomerasa (tert).

Cánceres de sangre: cuando se usan en la presente, los cánceres de sangre se refieren a los tres tipos principales de cáncer de sangre, es decir, leucemia, linfoma y mieloma, donde (1) la leucemia es un cáncer de sangre que se origina en la sangre y la médula ósea. Se presenta cuando el cuerpo crea demasiados glóbulos blancos anormales

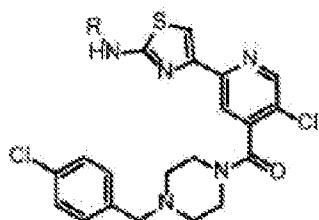
e interfiere con la capacidad de la médula ósea para producir glóbulos rojos y plaquetas, y (2) el linfoma no Hodgkin es un cáncer de sangre que se desarrolla en el sistema linfático a partir de células llamadas linfocitos, un tipo de glóbulo blanco que ayuda al cuerpo a combatir infecciones. El linfoma de Hodgkin es un cáncer de sangre que se desarrolla en el sistema linfático a partir de células llamadas linfocitos. El linfoma de Hodgkin se caracteriza por la presencia de un linfocito anormal llamado célula de Reed-Sternberg, y (3) el mieloma múltiple es un cáncer de sangre que comienza en las células plasmáticas de sangre, un tipo de glóbulo blanco producido en la médula ósea.

"Compuesto 11": cuando se usa en la presente, "Compuesto 11" se refiere al inhibidor de WNK1 con el nombre IUPAC (5-Cloro-2- (2-(metilamino)tiazol-4-il)-piridin-4-il)(4-(4-clorobencil)piperazin-1-il) metanona)), como se describe, por ejemplo, en la página 7102 en Yamada K, J Med Chern. 24 de agosto de 2017;60(16): 7099-7107), es decir, que tiene la fórmula molecular



en donde R es Me.

"Compuesto 12": cuando se usa en la presente, "Compuesto 12" se refiere al inhibidor de WNK1 con el nombre IUPAC (5-Cloro-2- (2-((metil-d₃)amino)tiazol-4-il)-piridin-4-il)(4-(4-clorobencil)piperazin-1-il) metanona) como se describe, por ejemplo, en la página 7102 en Yamada K, J Med Chern. 24 de agosto de 2017;60(16): 7099-7107), es decir, que tiene la fórmula molecular



en donde R es CD₃.

CRISPR: cuando se usa en la presente, CRISPR se refiere a sistemas que contienen dos componentes: un ARN guía (ARNg) y una endonucleasa asociada a CRISPR (proteína Cas (cuando se usa en la presente: Cas 9)). El ARNg es un ARN sintético corto compuesto por una secuencia de andamio necesaria para la unión a Cas y un espaciador de ~20 nucleótidos definido por el usuario que define la diana genómica que se va a modificar.

DMSO: cuando se usa en la presente, DMSO se refiere a dimetilsulfóxido, que es un compuesto de organosulfuro con la fórmula (CH₃)₂SO. Este líquido incoloro es un disolvente aprótico polar que disuelve compuestos polares y no polares y es miscible en una amplia gama de disolventes orgánicos, así como en agua.

FACS: cuando se usa en la presente, FACS se refiere a un clasificador de células activado por fluorescencia.

GFP: cuando se usa en la presente, GFP se refiere a proteína fluorescente verde.

Alelo flojado: cuando se usa en la presente, el alelo flojado se refiere al intercalado de una secuencia de ADN (alelo), que luego se dice que está flojada, entre dos sitios *lox P*. Floxing un gen permite que se elimine (noqueado), translocado o invertido.

H226: cuando se usa en la presente, H226 se refiere a una línea celular de carcinoma de pulmón humano.

Kinoma: cuando se usa en la presente, el kinoma de un organismo se refiere al conjunto completo de proteínas quinasas codificadas en su genoma.

KMS11: cuando se usa en la presente, KMS11 se refiere a una línea celular de mieloma múltiple humano, es decir, una línea celular de cáncer.

KMS18: cuando se usa en la presente, KMS18 se refiere a una línea celular de mieloma múltiple humano, es decir,

una línea celular de cáncer.

MA9: cuando se usa en la presente, MA9 se refiere a una línea celular de leucemia mieloide aguda impulsada por *MLL-AF9* (oncogén de leucemia) de ratón/murina.

MEF: cuando se usa en la presente, MEF se refiere a fibroblastos embrionarios de ratón con inactivación de p53 (p53: proteína tumoral (TRP53), es cualquier isoforma de una proteína codificada por genes homólogos en diversos organismos, tal como *TP53* (humanos) y *Trp53* (ratones)).

MsTo: cuando se usa en la presente, MsTo se refiere a la línea celular de mesotelioma humano.

MLL-AF9: cuando se usa en la presente, MLL-AF9 se refiere a un oncogén de leucemia asociado principalmente con leucemia mieloide aguda monocítica.

MMS1 (o MMS-1): cuando se usa en la presente, MMS1 se refiere a una línea celular de mieloma múltiple humano.

MOLM13: cuando se usa en la presente, MOLM13 se refiere a una línea celular de leucemia mieloide aguda humana.

Monomac: cuando se usa en la presente, monomac se refiere a una línea celular de leucemia monocítica humana.

Secuenciación NGS (Illumina): cuando se usa en la presente, la secuenciación NGS (Illumina) se refiere a la secuenciación de próxima generación (NGS) mediante el secuenciador Illumina, modelo NextSeq500.

OXS1: cuando se usa en la presente, OXS1 se refiere a serina/treonina-proteína quinasa OXS1, una enzima que en humanos está codificada por el gen *OXS1*. El producto de este gen pertenece a la familia de proteínas quinasas Ser/Thr.

ARNsg: cuando se usa en la presente, el ARNsg es un ARN sintético corto compuesto por una secuencia de andamio necesaria para la unión a Cas y un espaciador de ~20 nucleótidos definido por el usuario que define la diana genómica que se va a modificar.

Molécula pequeña: cuando se usa en la presente, una molécula pequeña, tal como los inhibidores de WNK1 de molécula pequeña, se refiere a una molécula que tiene un peso molecular inferior a 900 dáltones.

Tamoxifeno: cuando se usa en la presente, el tamoxifeno se usa, por ejemplo, para inducir actividad de una versión modificada de la recombinasa Cre (CreERT2) para eliminar el *alelo* *Wnk1* flojado *in vivo*.

THP1: cuando se usa en la presente, THP1 se refiere a una línea celular monocítica humana derivada de un paciente humano con leucemia monocítica aguda.

WNK1: cuando se usa en la presente, WNK1 se refiere a proteína quinasa 1 deficiente en lisina, que es una enzima que está codificada por el gen *WNK1*. WNK1, al ser una proteína está compuesta por 2382 aminoácidos (peso molecular 230 kDa), es serina-treonina quinasa y parte de la familia WNK quinasa "sin lisina/K".

Inhibidores de WNK1: cuando se usa en la presente, "inhibidores de WNK1" (o expresiones similares) se refiere a compuestos químicos pequeños (peso molecular inferior a 900 dáltones) que pueden inhibir la actividad catalítica de WNK1.

Wnk1^{D368A}: cuando se usa en la presente, *Wnk1*^{D368A} se refiere a un mutante WNK1 muerto catalítico (o ratones que expresan el mutante WNK1 muerto catalítico).

Wnk1^{flox}: cuando se usa en la presente, *Wnk1*^{flox} se refiere a una inactivación condicional de *Wnk1* (o ratones en los que el gen *Wnk1* estaba inactivado condicionalmente).

U2OS: cuando se usa en la presente, U2OS se refiere a una línea celular de osteosarcoma humano, es decir, una línea celular de cáncer.

Célula 293FT: cuando se usa en la presente, la célula 293FT (o línea celular) se refiere a un aislado clonal altamente transfectable de crecimiento rápido derivado de células de riñón embrionario humano transformadas con el antígeno T grande de SV40.

Se señala que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los otros aspectos de la invención.

La invención ahora se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de ARNg

Las secuencias de ARNg se diseñaron utilizando la herramienta de diseño de ARNg (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>). Los oligonucleótidos se sintetizaron y clonaron en el vector de expresión lentiviral (pL-CRISPR-SFFV-Puro-P2A-EGFP) usando protocolos estándar.

Los oligonucleótidos de ARNg utilizados en este estudio fueron:

SEQ ID NO 1 (Wnk1_6): TGGTCTGGCAACTCTAAAGC
 SEQ ID NO 2 (Wnk1_17): TCTGGACACCGAAACCACTG
 SED ID NO 3 (Rps19): ATTCTCTTGGTTCTAGGTCC
 SEQ ID NO 4 (Nctrl): GACGTCTAATTTCTGGCCGT
 SEQ ID NO 5 (Wnk1_1): GCCGTGGGAATGTCTAACGA
 SEQ ID NO 6 (RPS19): CGAATGGGTGGATACCGTCA
 SEQ ID NO 7 (NCL): CCCGCATGACACCGTCACTT

Ejemplo 2: Crecimiento de líneas celulares murinas y humanas

Se cultivaron células THP1 y MOLM13 en medio de crecimiento RPMI (Gibco, ThermoFisher: 61870-0100) que contiene 10% de suero fetal bovino, FBS (HyClone: SV30160.03) y penicilina/estreptomicina (Gibco, ThermoFisher: 15140-122). Las líneas celulares leucémicas transformadas con MLL-AF9 murinas se cultivaron en RPMI, FBS al 20% (HyClone: SV30160.03) y 10 ng/mL de IL3 murina (Reprotech 213-13). Los fibroblastos embrionarios de ratón se cultivaron en medio de crecimiento DMEM (Gibco, ThermoFisher: 31966-021), FBS al 10% (HyClone: SV30160.03) y penicilina/estreptomicina (Gibco, ThermoFisher: 15140-122).

Ejemplo 3: Generación de inactivación de WNK1 murino transformado con MLL-AF9/en líneas celulares

Se enriquecieron células que expresan CD117 (c-Kit) a partir de la médula ósea de R26CreERT2:Wnk1^{D368A/lox}, R26CreERT2: Wnk1^{+/-lox} y R26CreERT2: Wnk1^{-/-lox} usando perlas magnéticas acopladas con anticuerpo CD117 (microperlas CD117, ratón. Miltenye Biotec: 130-091-224) usando columnas MACS (Miltenye Biotec: 130-042-401). Las células positivas para c-kit se transdujeron con un retrovirus que expresa la fusión MLL-AF9 (MSCV-MLL-AF9 (Muntean et al., 2010)).

Se colocaron células transducidas en placas en medio de metilcelulosa (M3534. Tecnologías STEMCELL: 03534). Después de 2 rondas de recolocación en placas, se trasplantaron 1×10^6 células en ratones B6.SJL irradiados letalmente (950 cGY) junto con 2×10^5 células de médula ósea completa de B6.SJL, como soporte. Después de 1-2 meses después del desarrollo de leucemia, las líneas celulares leucémicas primarias se derivaron del bazo y la médula ósea de ratones enfermos mediante siembra en medios RPMI que contienen FBS al 20%, penicilina/estreptomicina y 10 ng/mL de IL3.

Ejemplo 4: Cepas de ratón utilizadas en este estudio

Las cepas de ratón utilizadas en la presente invención fueron:

Wnk1^{tm1Clhu} (Wnk1^{lox}) (Xie et al., 2013)
 Wnk1^{tm2Clhu} (Wnk1⁻) (Xie et al., 2013)
 Wnk1^{tm1.1Tyb} (Wnk1^{D368A}) (Kochi et al., 2016)
 Gt(ROSA)26Sor^{tm1(cre/ESR1)Thl} (R26CreERT2) (de Luca et al., 2005)
 B6.SJL (The Jackson Laboratory, reserva núm. 000966)

Para inducir la recombinación de los diferentes alelos de WNK1 *in vitro*, se cultivaron células en presencia de 4-hidroxitamoxifeno 500 nM (Sigma-Aldrich: H7904).

Se indujo recombinación *in vivo* mediante 5 inyecciones intraperitoneales consecutivas de 1 mg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich: T5662) disuelto en aceite de girasol (Sigma: 88921-250ML-F).

Ejemplo 5: Generación de curvas dosis-respuesta

Se generaron curvas de dosis-respuesta usando el ensayo CellTiter-Glo® (Promega: G7570). Se sembraron células por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo en presencia de concentraciones variables de "Compuesto 12". Después de 72 horas, se midió el número de células viables en los cultivos utilizando el CellTiter-Glo®. Los valores de IC50 se calcularon utilizando el software Prism (GraphPad: Prism 7 para Mac OS X). Los experimentos muestran que la IC50 es de aproximadamente 1 μ M para células MA9 y $>20 \mu$ M para fibroblastos

embrionarios de ratón (figura 4A).

Ejemplo 6: Transferencia Western (WB) de Oxsr1 y P-Oxsr1

5 Se trataron células leucémicas transformadas con MLL-AF9 murinas (MA9) durante 3 horas con diferentes concentraciones de "Compuesto 12". Se contaron las células tratadas y se lisaron en amortiguador 1xLSB y se cargaron una cantidad igual a 100.000 células en cada carril de un gel de SDS-Page al 10%.

10 Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa sondadas con anti-OXSR1 de oveja [S336B] o anti-P-OXSR1 de oveja [S688B] (ambos de la Universidad de Dundee). La unión del anticuerpo primario se realizó en películas sensibles a la luz detectadas, utilizando anticuerpo IgG anti-oveja conjugado con peroxidasa de conejo (dilución 1 en 30.000, Abcam: ab6900) seguido de quimioluminiscencia mejorada (Pierce ECL Plus, ThermoFisher: 34577) (figura 4B).

15 Ejemplo 7: Curvas de crecimiento de células transformadas con MLL-AF9 murinas en presencia de "Compuesto 12"

Se cultivaron cultivos de células MA9 por triplicado en placas de 24 pocillos en presencia de concentraciones variables de "Compuesto 12". Las células se colocaron en placas con una densidad de 50.000 células por pocillo, después de lo cual se contaron y se volvieron a colocar en placas cada 3 días.

20 Los resultados muestran una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células MA9 en respuesta al "Compuesto 12" (figura 4C).

25 Ejemplo 8: Tratamiento *in vivo* con "Compuesto 12"

Se inyectaron 1×10^4 células leucémicas en la vena de la cola de ratones BL6.SJL irradiados subletalmente (450 rad). Dos días después del trasplante, se inyectó a los ratones 1,8 mg de "Compuesto 12" disuelto en 200 μ L de aceite de girasol o aceite de girasol solo (control). Se utilizó un total de 26 ratones en el experimento, donde 14 recibieron aceite solo y 12 recibieron "Compuesto 12".

Las inyecciones se continuaron diariamente durante un período de 20 días.

35 Los resultados muestran que el "Compuesto 12" extiende significativamente la vida útil de los ratones inyectados con células MA9 (figura 6).

Ejemplo 9: Experimentos de exclusión de GFP *in vitro*

40 Las líneas celulares MA9, MEF, THP1 y MOLM13 se transdujeron con pLV-Cas9-Blast (Addgene: 83481) y se seleccionó durante dos semanas en presencia de 4 μ g/ml de blasticidina (Gibco, ThermoFisher: A1 113902) para generar líneas celulares que expresan de forma estable Cas9. Las líneas celulares indicadas se transdujeron con sobrenadantes lentivirales.

45 Dos días después de la transducción, el porcentaje de células positivas para GFP se midió mediante FACS (Becton Dickinson LSRII), que se repitió cada 3 días durante un período de 14 días. Los datos se representaron como el porcentaje de positividad de GFP con respecto al día 2 después de la transducción (figura 1A-D).

Ejemplo 10: Transducción lentiviral de líneas celulares murinas y humanas

50 Para la producción de lentivirus, se cotransfectaron células 293FT con vectores lentivirales que expresan ARNsg (ver arriba) y plásmido lentiviral psPAX2 (Addgene # 12269) y plásmido pMD2.G (Addgene #12259) usando el método de transfección de fosfato de calcio.

55 48-72 horas después de la transfección, los sobrenadantes virales se recolectaron y se centrifugaron en placas revestidas de 6 pocillos RetroNectin® (TaKaRa: T202) durante 2 horas a 2000 g. Después de girar, las placas se lavaron brevemente en PBS y las células se centrifugaron en las placas a 400 g durante 5 min.

Ejemplo 11: Generación de curvas dosis-respuesta para líneas celulares humanas

60 Las curvas de dosis-respuesta se generaron usando el ensayo CellTiter-Glo® (Promega: G7570). BJ-tert, U2OS, MOLM13, THP1, Monomac, MMS1, KMS18, KMS11, MSTo y H226, las células se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo en presencia de concentraciones variables de "Compuesto 12". Después de 72 horas, se midió el número de células viables en los cultivos utilizando el CellTiter-Glo®. Los valores de IC50 se calcularon utilizando el software Prism (GraphPad: Prism 7 para Mac OS X). El experimento muestra los valores de IC50 para las diferentes líneas celulares humanas (figura 5).

Ejemplo 12: Experimentos con el "Compuesto 12" en otros cánceres de sangre

Se contemplan experimentos con el "Compuesto 12" en otros cánceres de sangre que no sean leucemia y mieloma múltiple.

5

Listados de secuencias

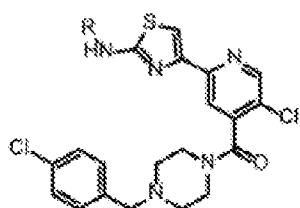
Los oligonucleótidos de ARNsg utilizados en este estudio fueron:

10	SEQ ID NO 1 (Wnk1_6): TGGTCTGGCAACTCTAAAGC
	SEQ ID NO 2 (Wnk1_17): TCTGGACACCGAAACCACTG
	SEQ ID NO 3 (Rps19): ATTCTCTTGGTTCTAGGTCC
	SEQ ID NO: 4 (Nctrl): GACGTCTAATTTCTGGCCGT
	SEQ ID NO 5 (Wnk1_1): GCCGTGGGAATGTCTAACGA
15	SEQ ID NO 6 (RPS19): CGAATGGGTGGATACCGTCA
	SEQ ID NO 7 (NCL): CCCGCATGACACCGTCACTT

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1), donde el inhibidor es un compuesto químico pequeño con peso molecular inferior a 900 dáltones que puede inhibir la actividad catalítica de WNK1, para uso en el tratamiento de cánceres de sangre en un sujeto mamífero.

2. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el inhibidor está representado por la fórmula general



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R es CD₃ o Me.

3. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde los cánceres de sangre se seleccionan del grupo que consiste en leucemia, linfoma y mieloma.

4. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL) o leucemia de células pilosas (HCL).

5. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el linfoma se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de zona marginal, linfoma de Burkitt o linfoma linfoplasmacítico.

6. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el mieloma se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, plasmacitoma solitario, plasmacitoma extramedular, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiple latente (SMM), mieloma de inmunoglobulina D (IgD) o mieloma de inmunoglobulina E (IgE).

7. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el inhibidor se formula en una composición farmacéutica, que comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Inhibidor de proteína quinasa 1 deficiente en lisina (WNK1) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el sujeto mamífero es un sujeto humano.

MA9Ej. 2

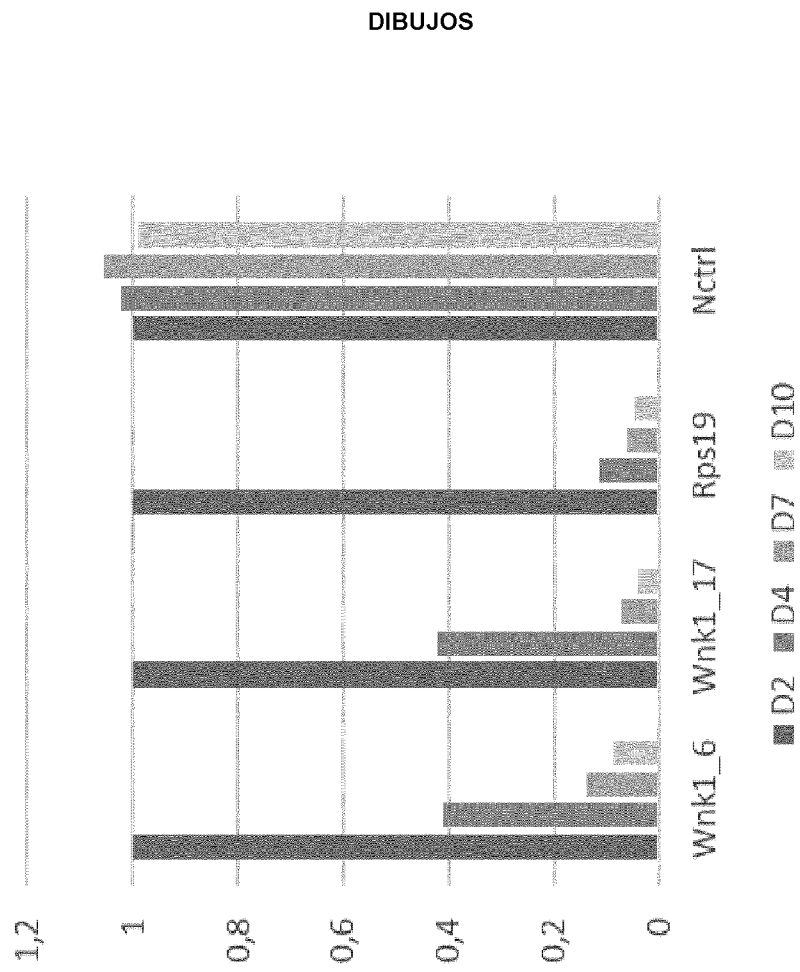


Fig. 1A

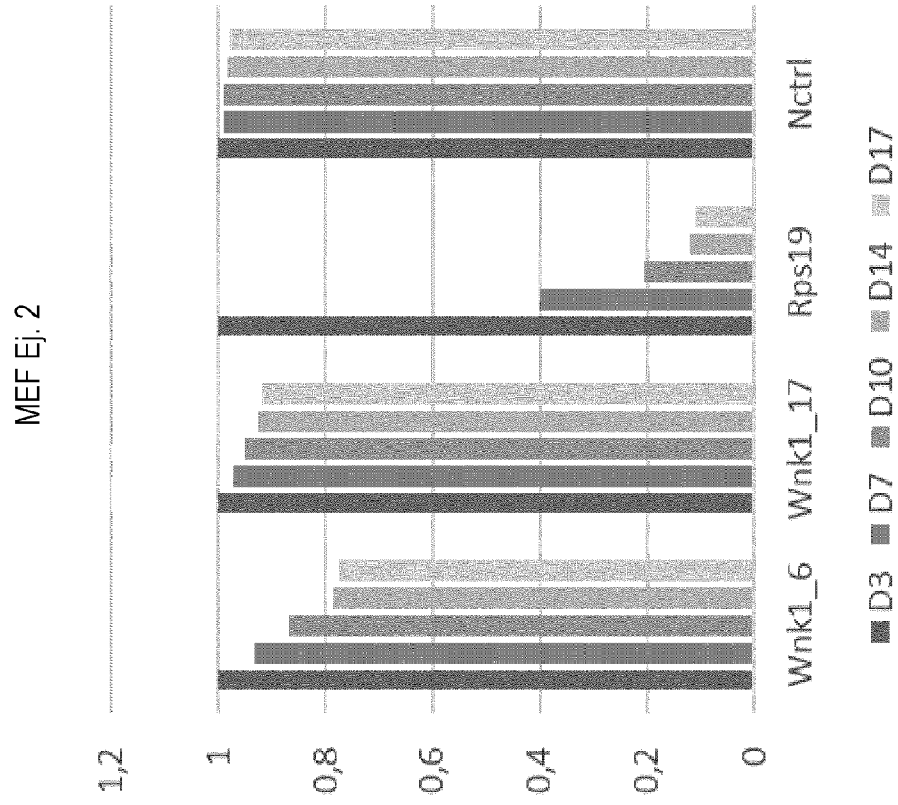


Fig. 1B

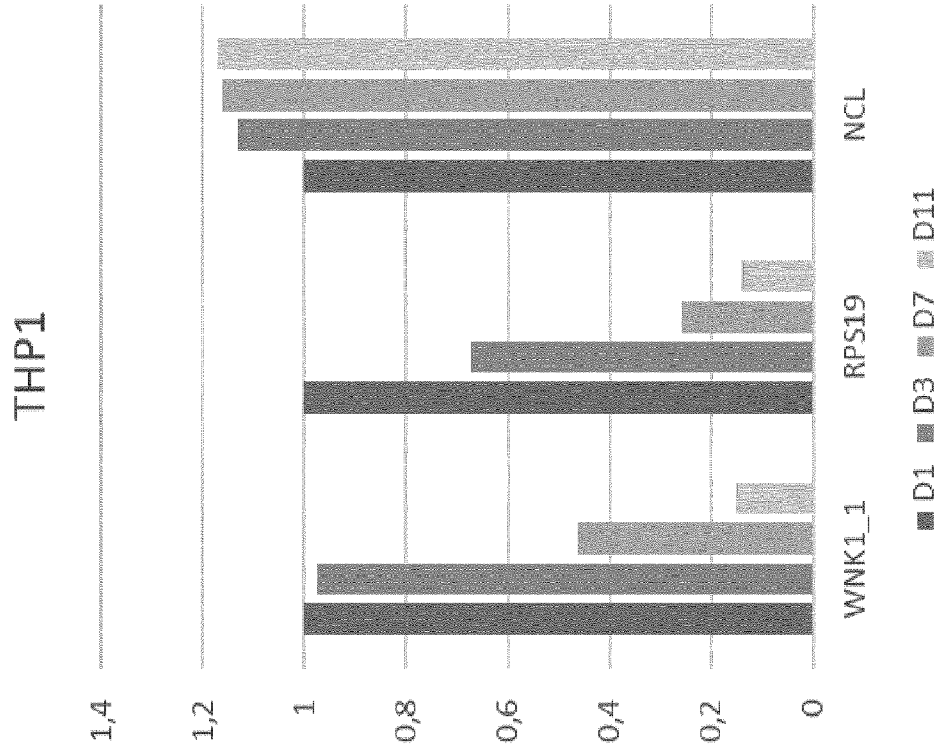


Fig. 1C

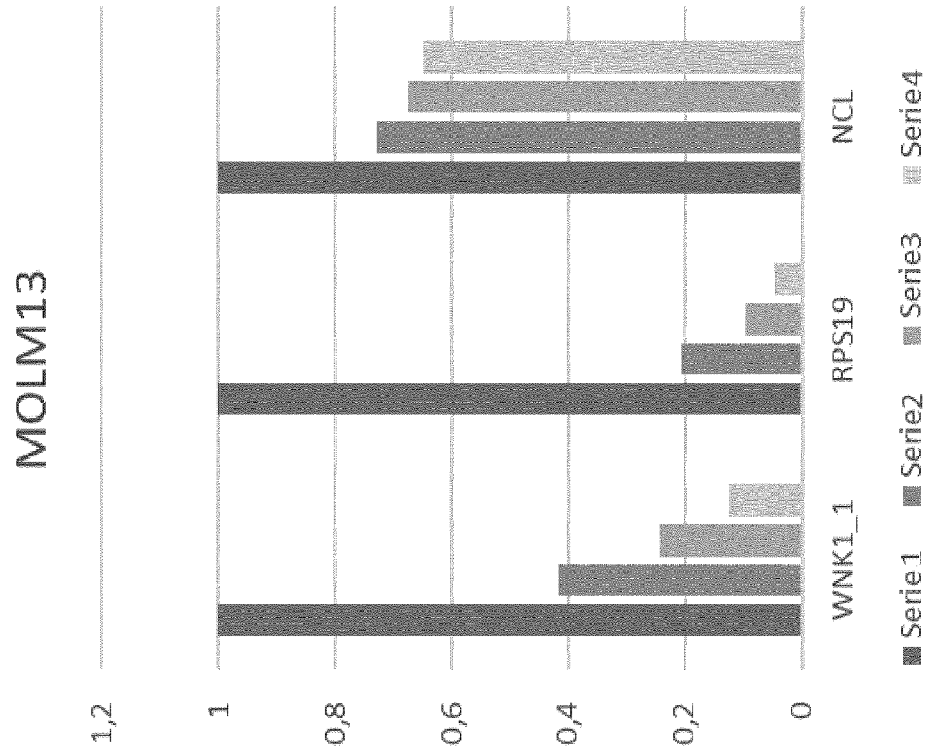


Fig. 1D

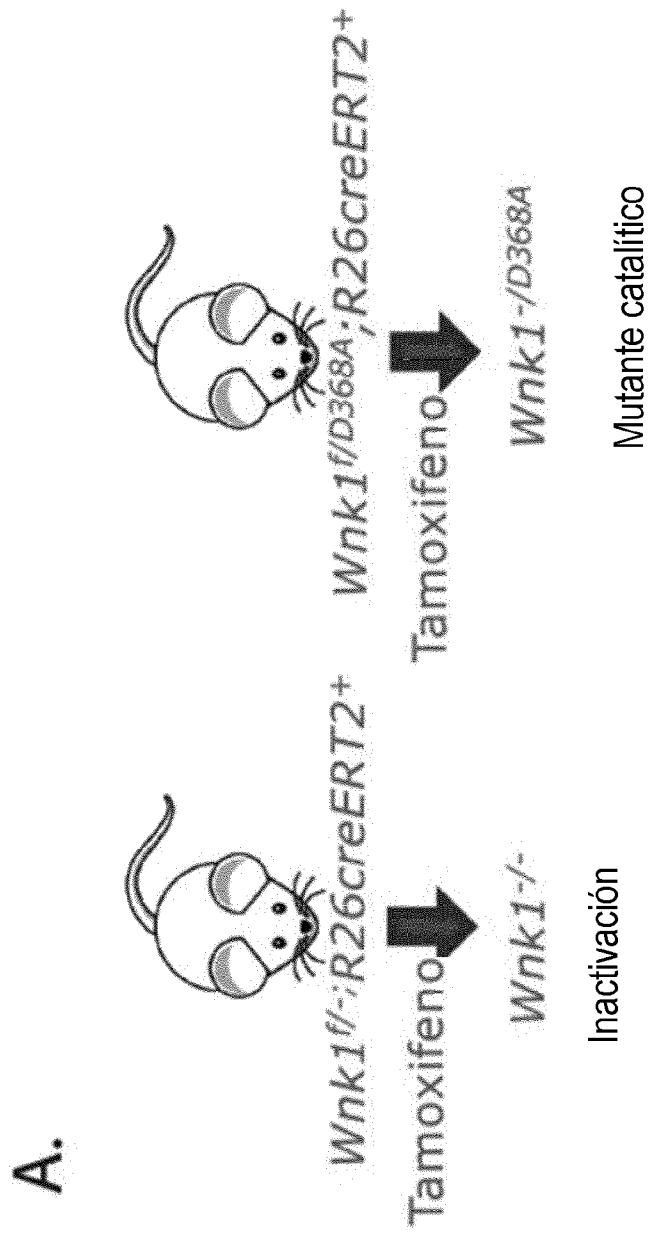


Fig. 2A

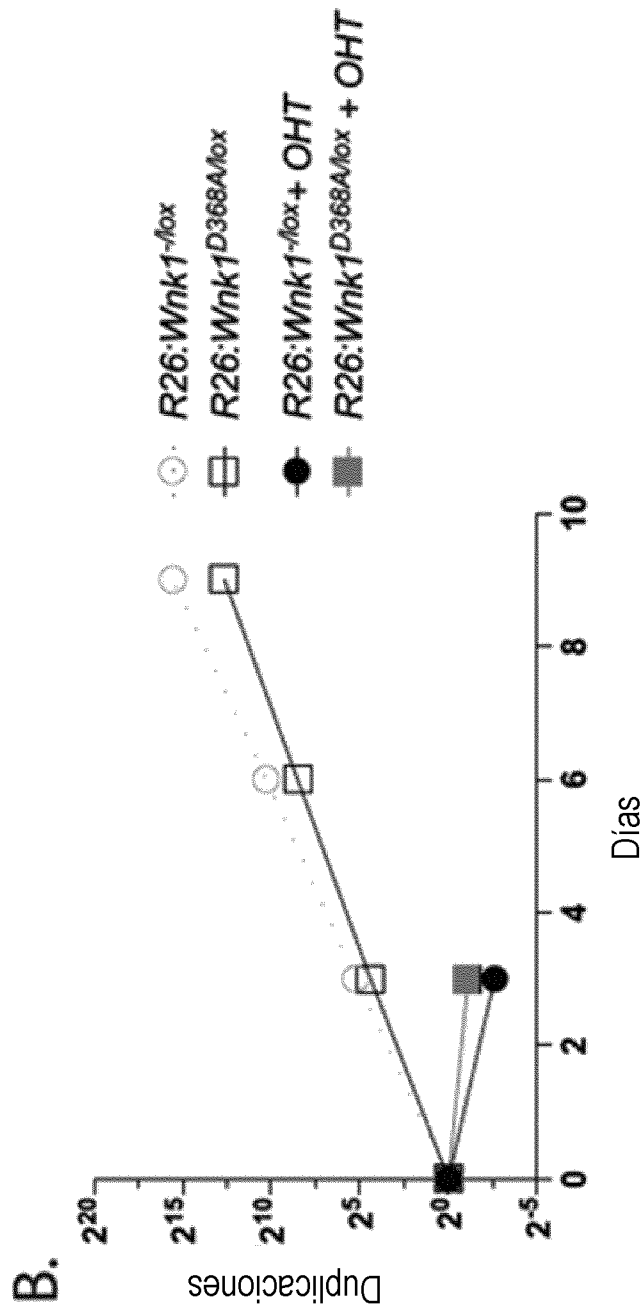


Fig. 2B

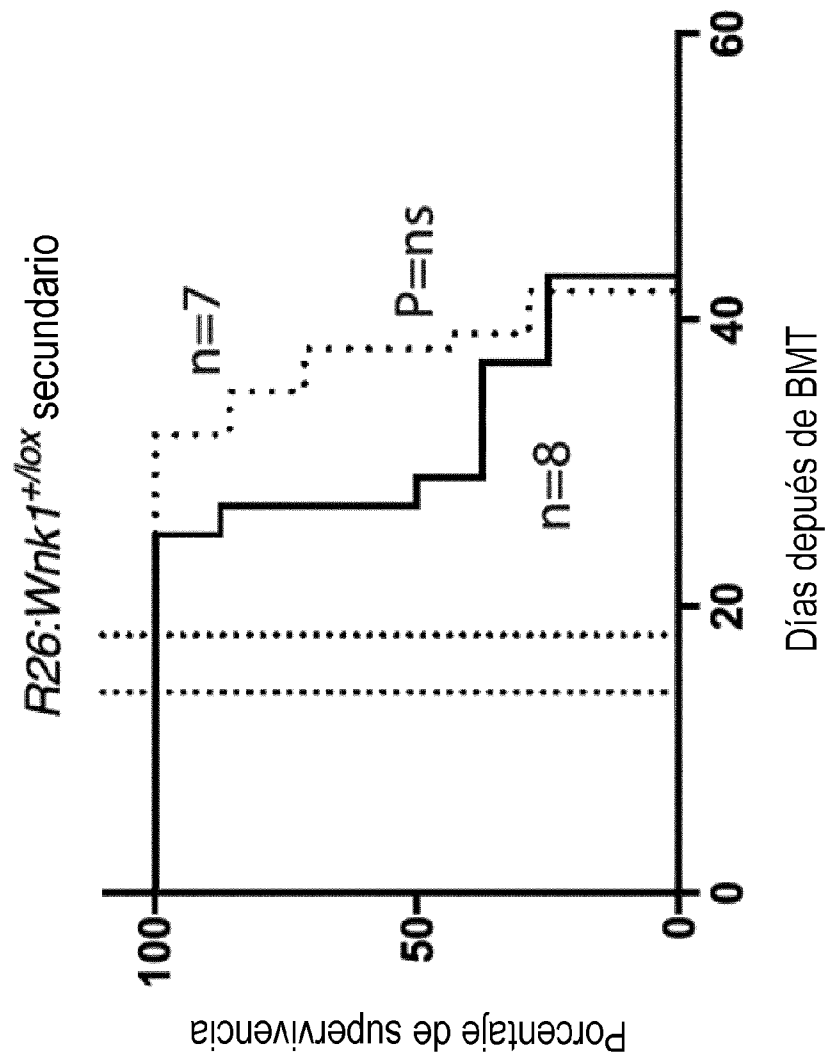


Fig. 3A

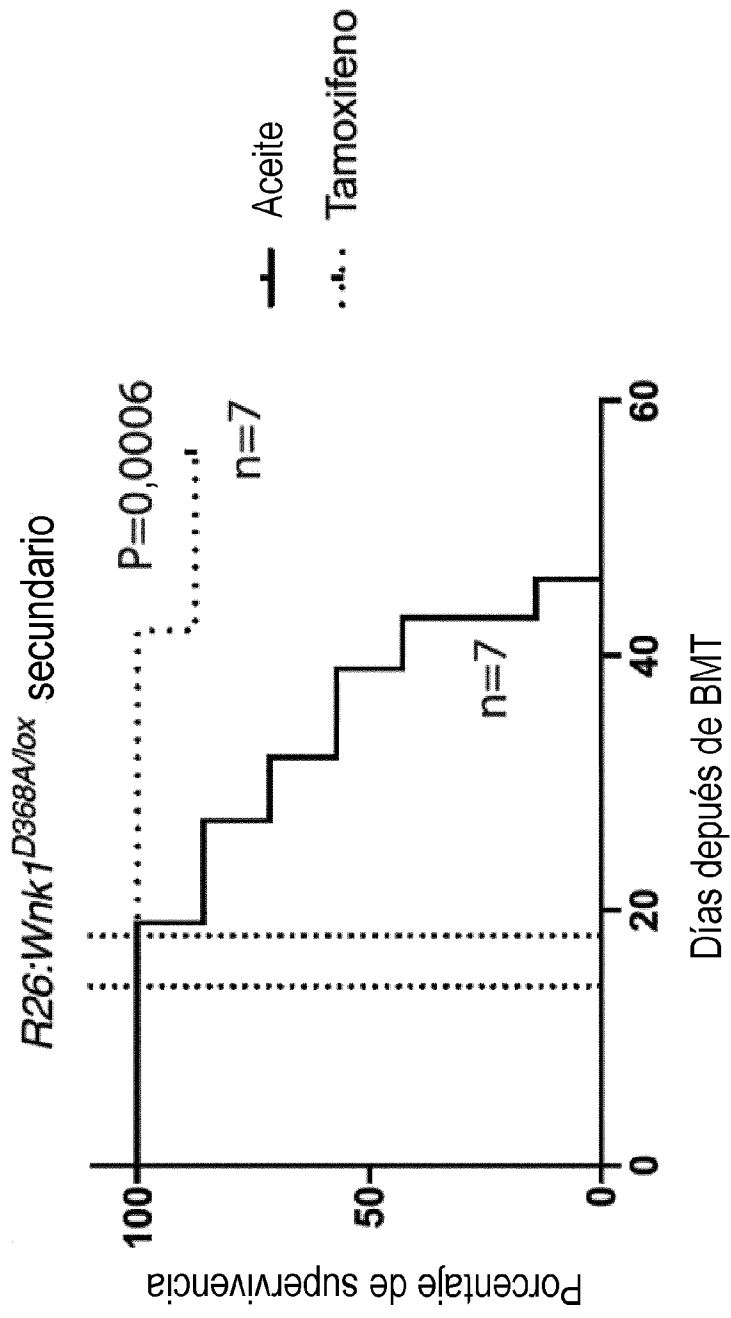


Fig. 3B

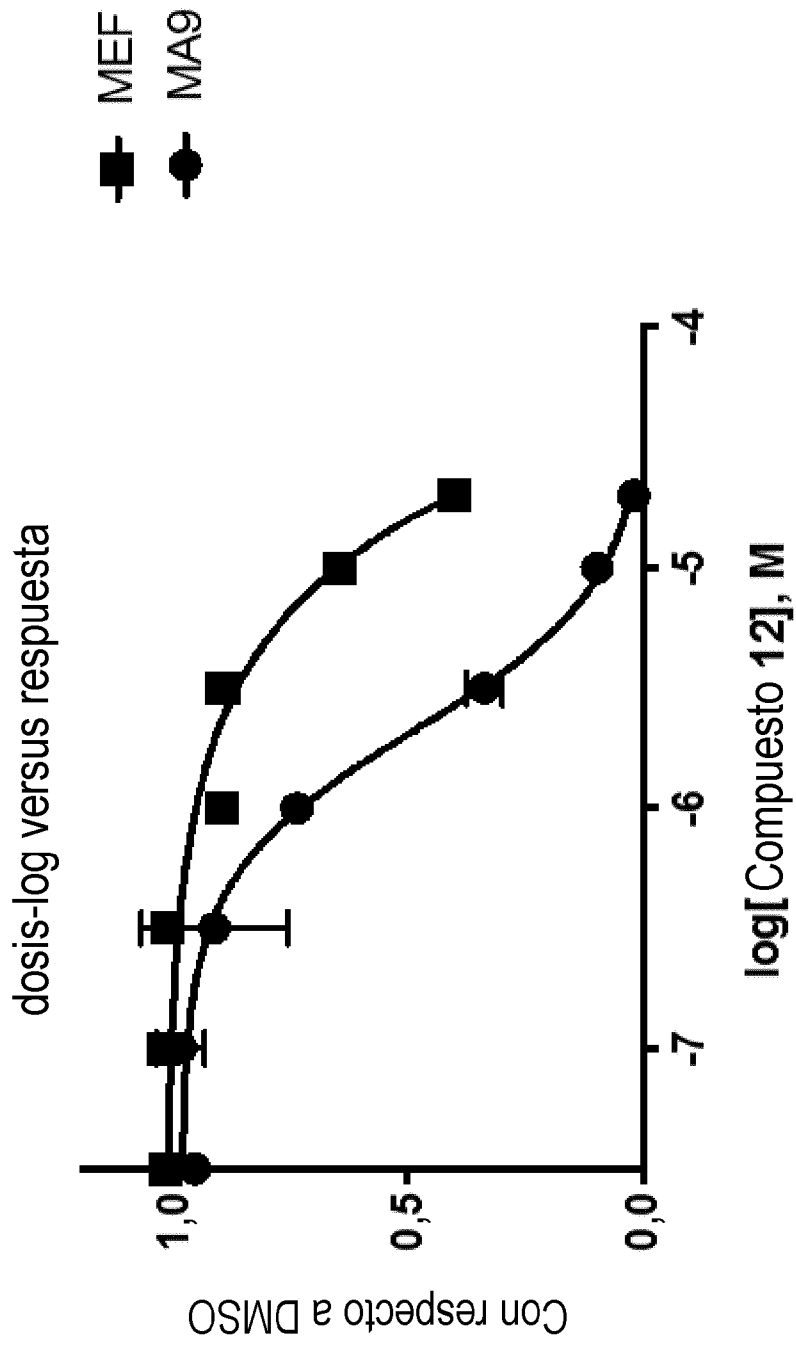


Fig. 4A

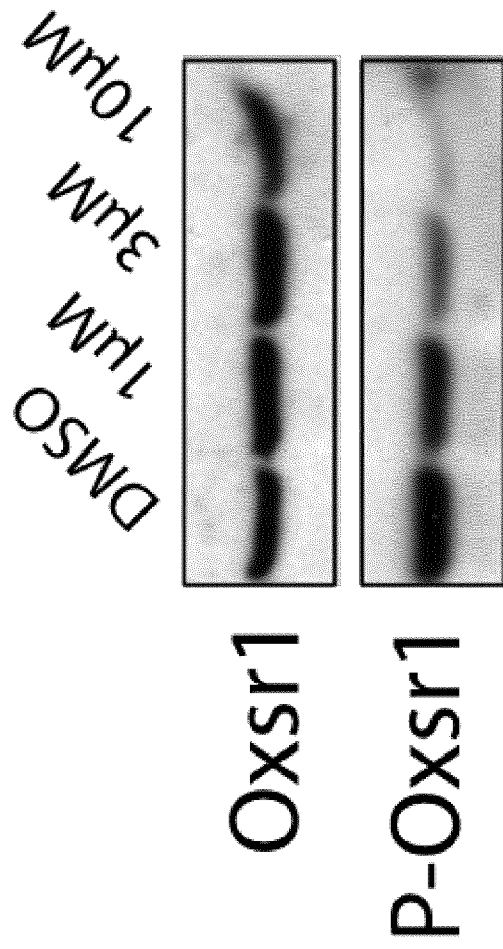


Fig. 4B

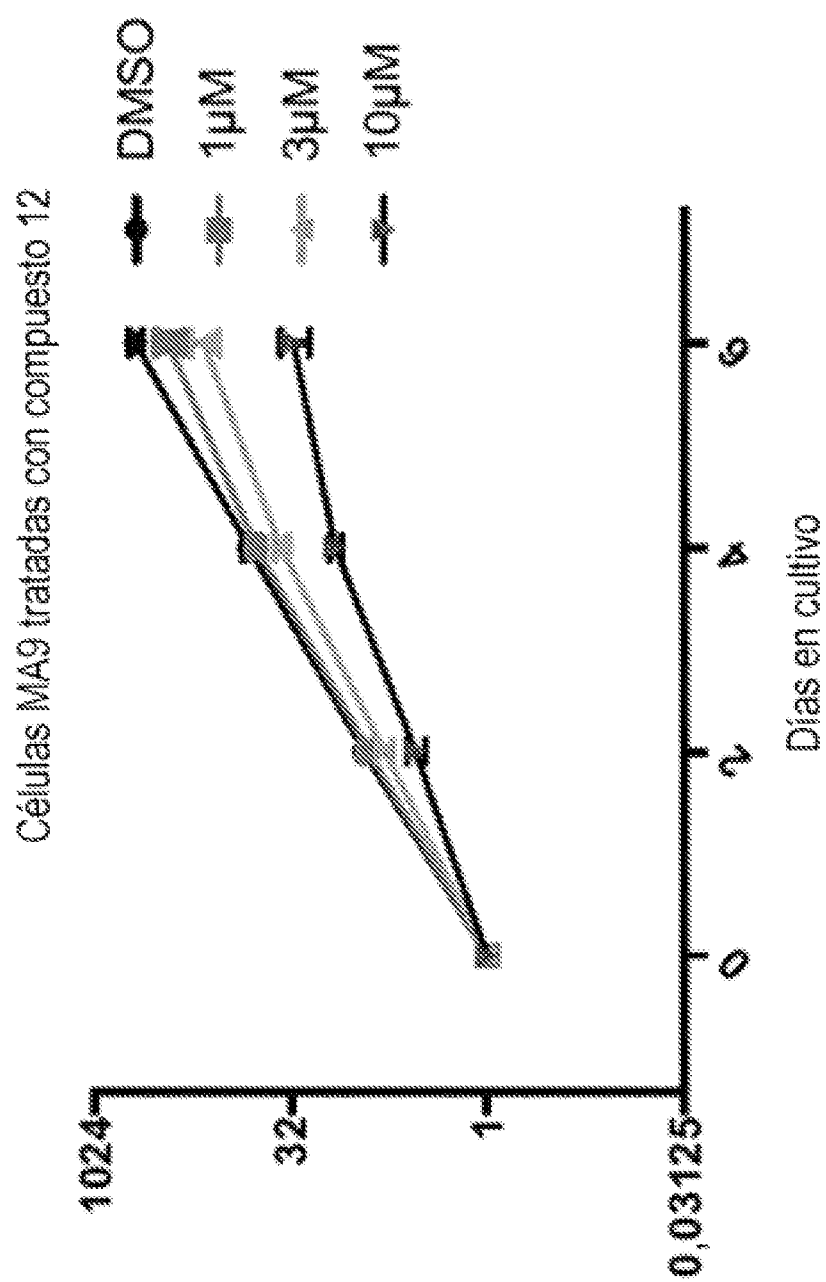


Fig. 4C

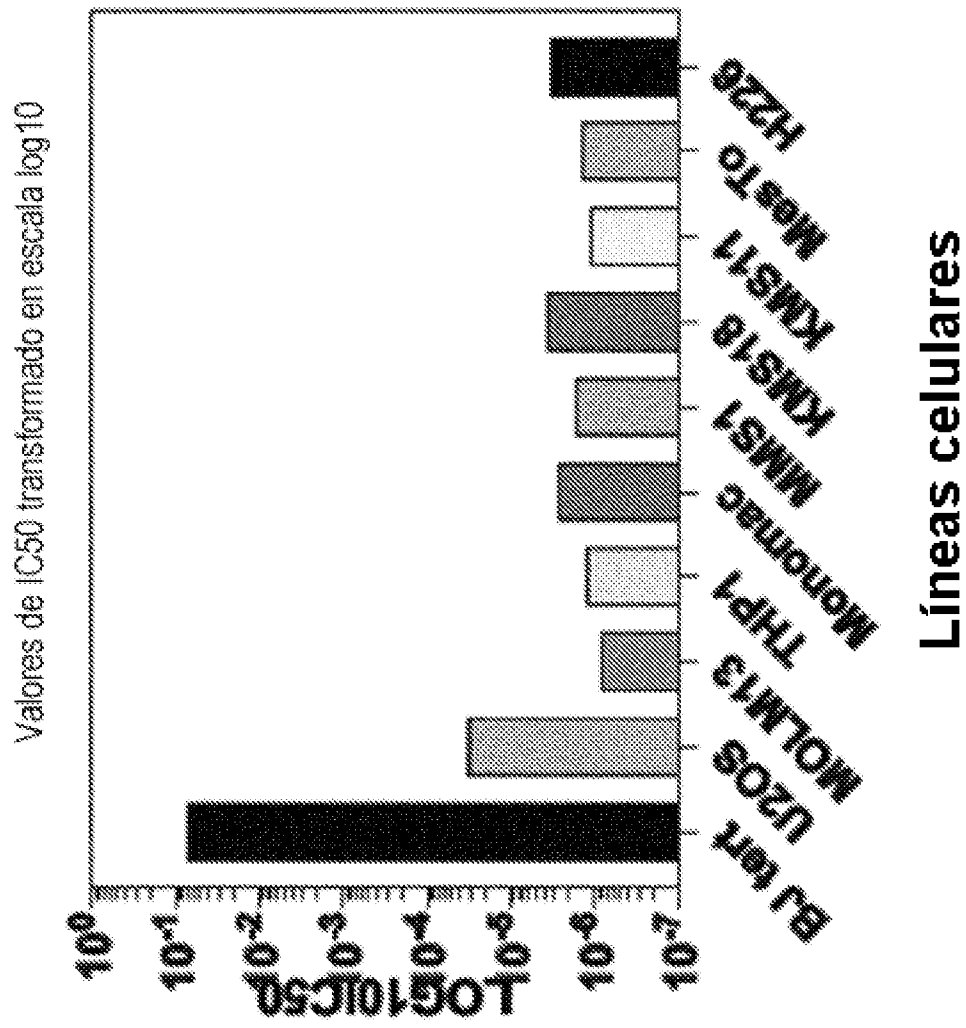


Fig. 5

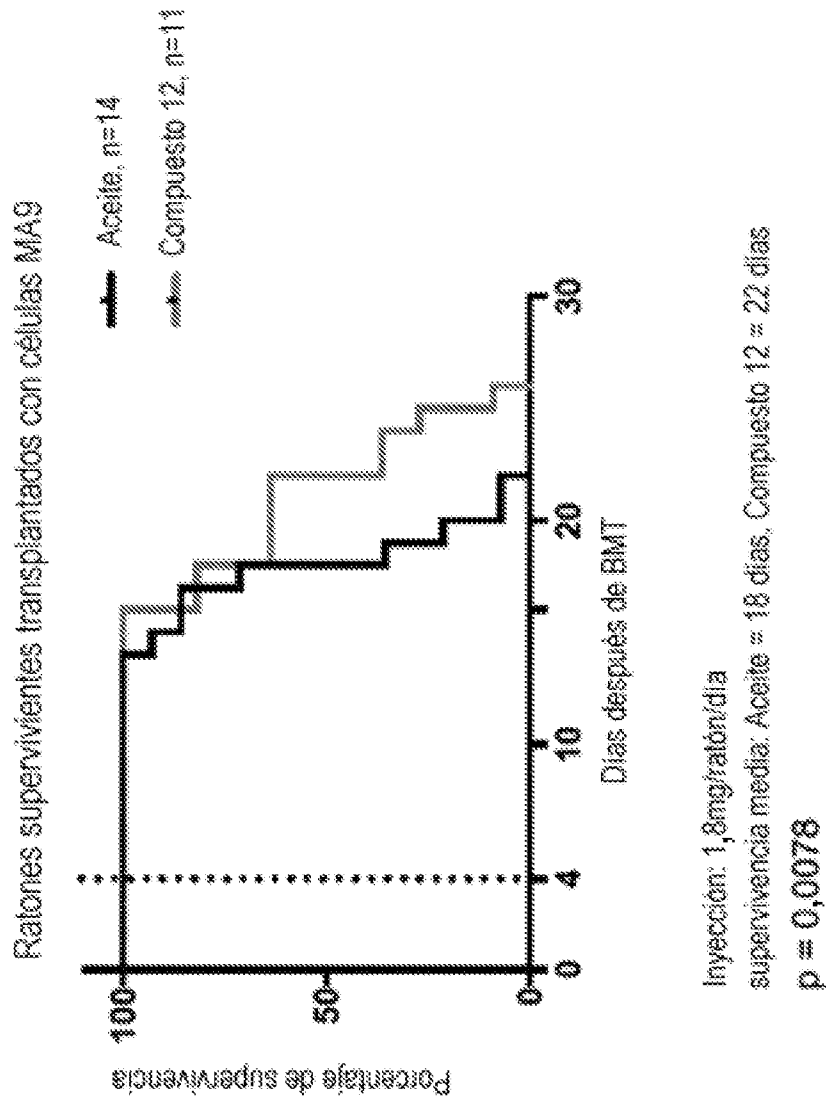


Fig. 6