

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 057**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 31/58** (2006.01)

**A61K 36/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008 E 08850574 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2231165**

54 Título: **Método para determinar la probabilidad de una respuesta terapéutica en la quimioterapia de cáncer con glicósido cardiaco**

30 Prioridad:

**13.11.2007 US 987501 P**

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

**18.07.2013**

73 Titular/es:

**PHOENIX BIOTECHNOLOGY INC. (100.0%)  
8626 TESORO DR., SUITE 801  
SAN ANTONIO, TX 78217, US**

72 Inventor/es:

**NEWMAN, ROBERT, A.;  
YANG, PEIYING y  
ADDINGTON, O., CRANDELL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 414 057 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

Método para determinar la probabilidad de una respuesta terapéutica en la quimioterapia de cáncer con glicósido cardiaco.

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método de determinación de la prognosis en la quimioterapia de cáncer con un glicósido cardiaco. En particular, la invención se refiere a un método para la determinación de la probabilidad de que una enfermedad o trastorno celular in vitro o in vivo que tenga una etiología asociada con una proliferación celular excesiva responda terapéuticamente al tratamiento con un glicósido cardiaco.

### Antecedentes de la invención

- 10 Muchas enfermedades y trastornos que tienen una etiología asociada a una proliferación celular excesiva son fatales. Los más comunes entre ellos son el cáncer y los tumores. Sin embargo, las enfermedades proliferativas no cancerosas también pueden constituir una amenaza para la vida, o producir una pérdida de calidad de vida. Éstas pueden incluir, por ejemplo: 1) enfermedades autoinmunes tales como la artritis inducida por antígeno y la encefalomielite alérgica, 2) enfermedades proliferativas inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide, la
- 15 artritis crónica juvenil de inicio sistémico, la osteoporosis y la soriasis, 3) enfermedades proliferativas del pecho que incluyen la enfermedad fibroquística, 4) enfermedades proliferativas de la próstata que incluyen la hiperplasia prostática (BPH), 5) enfermedades proliferativas del ojo, que incluyen la retinopatía diabética proliferativa, y 6) enfermedades proliferativas vasculares, que incluyen la aterosclerosis y la estenosis coronaria. Se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar terapias curativas o paliativas para estas enfermedades y trastornos; sin
- 20 embargo, no se ha desarrollado una terapia comprensiva o universalmente curativa, incluso a pesar de que se ha demostrado que numerosas estrategias de quimioterapia son efectivas contra varios cánceres, tumores y otros tipos de enfermedades proliferativas diferentes.

- Los agentes quimioterapéuticos son prescritos por los médicos individualmente o en combinación para desarrollar regímenes que se ajusten a las necesidades de los pacientes individuales. Tanto es así que un obstáculo clave en el
- 25 desarrollo de dichos regímenes a medida es la imprevisibilidad de la eficacia de los agentes quimioterapéuticos contra un cáncer específico o fenotipos tumorales específicos. Los médicos se ven obligados a enfrentarse a estas enfermedades mortales usando estrategias de ensayo-error. Deben basarse en la revisión histórica de los usos reconocidos o indicados de cada agente quimioterapéutico concreto y a partir de ahí especular o adivinar si un agente terapéutico individual particular, o una combinación de agentes terapéuticos, serán terapéuticamente
- 30 eficaces contra el cáncer o tumor que el médico pretende curar. Dicha estrategia convencional tiene un éxito limitado en la clínica.

- Los médicos necesitan un ensayo pronóstico que pueda predecir con un nivel razonable de certeza si un cáncer o fenotipo tumoral particular responderán terapéuticamente a un agente quimioterapéutico individual concreto o a una
- 35 combinación concreta de agentes terapéuticos. Este tipo de ensayo pronóstico es extremadamente útil para agentes quimioterapéuticos que tienen una historia de uso limitada, tal como aquellos que acaban de aparecer en el sector clínico. Sería extremadamente beneficioso para los médicos poder disponer de un ensayo pronóstico de este tipo para uno o más agentes quimioterapéuticos.

- Los estudios preclínicos y el examen retrospectivo de los datos de pacientes sugieren el valor potencial de los glicósidos cardiacos (por ej. Bufalina, digoxina, digitoxina, ouabaína y oleandrina), en el tratamiento de varios
- 40 cánceres que incluyen el cáncer de mama, de pulmón, de próstata y la leucemia, por ejemplo.

El documento WO 2007016176 describe un método para inhibir la proliferación de células cancerígenas que comprende el tratamiento de las células cancerosas con una cantidad efectiva de extracto de fluido supercrítico que comprende un glicósido cardiaco.

- Uno de los mecanismos farmacológicos de acción de los glicósidos cardiacos implica su capacidad para unirse a la
- 45 bomba de intercambio iónico, Na, K-ATPasa y para inhibir la actividad de esta enzima particular. La Na, K-ATPasa, la proteína transmembrana que cataliza el transporte activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática, es un receptor de glicósidos cardiacos bien establecido. Esta enzima hidroliza ATP y usa la energía libre para dirigir el transporte de  $\text{K}^+$  al interior de la célula y de  $\text{Na}^+$  al exterior de la célula, en contra de sus gradientes electroquímicos (Hauptman, P. J., Garg, R. y Kelly, R. A. Cardiac glycosides in the next millieum. Prog. Cardiovasc. Dis. 41: 247-254, 1999).
- 50

- La Na, K-ATPasa está compuesta por dos subunidades heterodiméricas, la subunidad catalítica  $\alpha$  y la subunidad glicosilada  $\beta$ . También existe una subunidad  $\gamma$ , pero no ha sido estudiada en detalle. La subunidad  $\alpha$  tiene sitios de unión para ATP,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y glicósidos cardiacos. La subunidad  $\beta$  actúa para estabilizar la subunidad catalítica  $\alpha$  y también puede desempeñar un papel regulador. Se han identificado cuatro isoformas  $\alpha$  diferentes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ) y tres isoformas  $\beta$  diferentes ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) en células de mamíferos. La expresión relativa de cada tipo se ve alterada
- 55 marcadamente en estados normales y de enfermedad. La expresión de las isoformas  $\alpha$  es específica del tipo de tejido y varía entre tejidos humanos y de roedor (Blanco, G. y Mercer, R. W. Isozymes of the Na, K-ATPase:

heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275 (Renal Physiol. 44): F633-F650, 1998). También se ha publicado una expresión alterada de las isoformas de Na, K-ATPasa en cánceres humanos tales como el cáncer renal, pulmonar, hepatocelular y de colon, en comparación con las de los correspondientes tejidos normales (Rajasekaran, S. A., Ball, W. J., Bander, N. H., Pardee, J. D. y Rajasekaran, A.K. Reduced expression of beta subunit of Na/K-APTase in human clear cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* 162: 574-580, 1999; Avila, J., Lecuona, E., Morales, M., Soriano, A., Alonso, T. y Martin-Vasallo, P. Opposite expression pattern of the human Na/K-ATPase beta-1 isoform in stomach and colon adenocarcinomas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 834: 633-635, 1997; Espineda, C., Seligson, D. B., Ball, W. J., Rao, J., Palotie, A., Horvath, S., Huang, Y., Shi, T y Rajasekaran, A. K. Analysis of the Na, K-ATPase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. *Cancer* 97: 1851868, 2003; Jung, M. H., Kim, S.C., Jeon, G. A., Kim, S. H., Kim, Y., Choi, K. S., Park, S. I., Joe, M. K. y Kimm, K. Identification of differentially expressed genes in normal and tumor human gastric tissue. *Genomics* 69: 281-286, 2000). Adicionalmente, la afinidad aparente de los glicósidos cardíacos por las diferentes isoformas  $\alpha$  es bastante diferente. La unión de glicósidos cardíacos a la isoforma  $\alpha 1$  es inferior a la que se produce con las isoformas  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , que son 250 veces, o más, más sensibles a la inhibición por este tipo de fármaco (Blanco, G. y Mercer, R. W. Isozymes of the Na, K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275 (Renal Physiol. 44): F633-F650, 1998). Sakai et al. (*FEBS Letters* 563: 151-154, 2004) han publicado que la expresión de la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  se incrementa en células de cáncer colorrectal humano en comparación con células colorrectales normales.

La oleandrina y la oleandrogenina inhiben la proliferación de células de cáncer de próstata humano a través de la inducción de apoptosis, que es debida, al menos en parte, a un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por la inhibición de Na, K-ATPasa (McConkey, D. J., Lin, Y., Nutt, L. K., Ozel, H. Z. y Newman, R. A. Cardiac glycosides stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 60: 3807-3812, 2000). La oleandrina y la oleandrogenina también inhiben la exportación de factor de crecimiento 2 de fibroblastos a través de la interacción con la membrana y la inhibición de la actividad de Na, K-ATPasa (Smith, J. A., Madden, T., Vijjeswarapu, M. y Newman, R. A. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (EGF-1) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirezol and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochem. Pharmacol.* 62: 469-472, 2001).

Aunque la subunidad  $\alpha 1$  de la Na, K-ATPasa está presente en muchos tejidos debido a que el complejo  $\alpha 1\beta 1$  es considerado como genes "domésticos", la  $\alpha 3$  se detecta predominantemente en tejidos excitables, córtex renal, médula y papila, así como en tejidos nerviosos.

La *Nerium oleander* es una planta ornamental distribuida ampliamente en el Asia subtropical, el suroeste de los Estados Unidos y el Mediterráneo. Sus propiedades médicas y toxicológicas son conocidas desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, se ha usado en el tratamiento de hemorroides, úlceras, lepra, mordeduras de serpiente e incluso para la inducción de abortos. La oleandrina, un componente importante del extracto de oleander, es un potente inhibidor del crecimiento de células tumorales humanas (Afaq F et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195:361-369, 2004). La muerte celular mediada por oleandrina está asociada al influjo de calcio, a la liberación de citocromo C desde las mitocondrias, a los procesos proteolíticos de caspasas 8 y 3, a la ruptura de poli(ADP-ribosa) polimerasa y a la fragmentación de ADN.

Se ha demostrado que la oleandrina es el principal componente citotóxico de la *Nerium oleander* (Newman, et al., *J. Herbal Pharmacotherapy*, vol. 13, pág. 1 - 15, 2001). La oleandrina es un glicósido cardíaco que es exógeno y normalmente no está presente en el organismo. La oleandrina produce la apoptosis en líneas de células tumorales humanas pero no en ratones (Pathak et al., *Anti-Cancer Drugs*, vol. 11, pág. 455-463, 2000), inhibe la activación de NF- $\kappa$ B (Manna et al., *Cancer Res.*, vol. 60, pág. 3838-3847, 2000) y media en la muerte celular en parte a través de la liberación mediada por calcio de citocromo C (McConkey et al., *Cancer Res.*, vol. 60, pág. 3807-3812, 2000). Recientemente se ha completado un ensayo de fase I de un extracto de oleander en agua caliente (es decir, Anvirezol<sup>TM</sup>) (Mekhail et al., *Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, pág. 82b, 2001). Se concluyó que los extractos de oleander pueden administrarse de forma segura en dosis de hasta 1,2 mL/m<sup>2</sup>-día. No se observaron toxicidades que limitaran la dosis.

Se ha publicado que la ouabaína, un glicósido cardíaco endógeno del organismo, potencia la radiosensibilidad *in vitro* de células A549 de carcinoma de pulmón humano, pero es ineficaz para modificar la radiorrespuesta de fibroblastos de pulmón humano normales (Lawrence, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 15, pág. 953-958, 1988). Posteriormente se ha demostrado que la ouabaína radiosensibiliza células tumorales humanas de diferentes tipos histológicos, que incluyen el carcinoma de células escamosas y el melanoma (Verheye-Dua et al., *Strahlenther. Onkol.*, vol. 176, pág. 186-191, 2000). El glicósido cardíaco oleandrina también tiene la capacidad de potenciar la sensibilidad de células frente a la acción citotóxica de radiación ionizante (Solicitud de Patente de EE.UU. N° 10/957.875 a nombre de Newman, et al., y Nasu et al., *Cancer Lett.* Vol 185, pág. 145-151, 2002). La Publicación de Solicitud de Patente N° 20050112059 a nombre de Newman et al. describen la mejora de la radioterapia en el tratamiento de cáncer mediante la administración de oleandrina.

Chen et al. (*Breast Cancer Research and Treatment* (2006), 96, 1-15) sugieren que los glicósidos cardíacos, tales como ouabaína y digitalis, podrían ser útiles para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de mama, ya que ambos son inhibidores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa y ambos son antagonistas de ER.

Smith et al. (Biochemical Pharmacology (2000), 62, 1-4) han publicado que el ANVIRZEL, y su componente clave de glicósido cardiaco, la oleandrina, inhiben la exportación de un factor de crecimiento tumoral, el factor de crecimiento 2 de fibroblasto (FGF-2), de las líneas de células de cáncer de próstata PC3 y DU145.

- 5 Newman et al. (J. Experimental Therapeutics and Oncology (2006), 5, 167-181) han publicado que la incubación de células BRO de melanoma maligno humano con oleandrina da como resultado una formación dependiente del tiempo de especies de oxígeno reactivas, radicales de aniones de superóxido, que median en la lesión mitocondrial, la pérdida de conjuntos de glutatona celular (GSH) y, en definitiva, en la muerte de células tumorales.

10 La extracción de glicósidos de plantas de la especie *Nerium* ha proporcionado ingrediente farmacológicamente/terapéuticamente activos a partir de la *Nerium oleander*. Entre éstos se encuentran la oleandrina, la nerina y otros compuestos de glicósido cardiaco. Los extractos de planta son útiles en el tratamiento de enfermedades de proliferación celular en animales. Los extractos de oleandrina obtenidos por extracción con agua caliente de *Nerium oleander*, vendidos bajo el nombre comercial ANVIRZEL™, se encuentran disponibles comercialmente y contienen la forma concentrada o la forma en polvo de un extracto de agua caliente de *Nerium oleander*.

- 15 El huachansu es un extracto obtenido de piel de sapo que comprende bufadienoloides, tales como la bufalina, un glicósido cardiaco. HuaChanSu es un medicamento aprobado para el tratamiento de cáncer en China. Se ha usado para tratar varios cánceres, que incluyen cáncer hepático, gástrico, de pulmón, de piel y de esófago.

20 En vista de la importante utilidad de los glicósidos cardiacos para tratar enfermedades y trastornos que tienen una etiología asociada a proliferación celular, sigue existiendo necesidad de un método para predecir la respuesta terapéutica de la enfermedad o trastorno frente a un glicósido cardiaco. En la técnica anterior no se describe o sugiere ningún método de este tipo.

### Resumen de la invención

En el sentido más amplio, la invención se refiere a la materia objeto tal como se define en las reivindicaciones anexas.

25 La invención proporciona un método para predecir la eficacia de un glicósido cardiaco o de una composición que contiene un glicósido cardiaco frente a un fenotipo particular de una enfermedad o trastorno que tiene una etiología asociada a una excesiva proliferación celular. Los inventores han descubierto que la sensibilidad o la capacidad de respuesta terapéutica de dicha enfermedad o trastorno frente al tratamiento con un glicósido cardiaco depende de la relación de expresión de subunidades de Na, K-ATPasa entre la isoforma  $\alpha 3$  y a la isoforma  $\alpha 1$  en células o tejidos que presentan la enfermedad o el trastorno proliferativo. En general, cuanto mayor es la relación de expresión de Na, K-ATPasa de la isoforma  $\alpha 3$  respecto a la de la isoforma  $\alpha 1$  en células o tejidos, más sensibles (con mayor capacidad de respuesta terapéutica) son dichas células a los glicósidos cardiacos. Es decir, cuanto mayor es la relación de isoforma  $\alpha 3$  (sensible al fármaco) respecto a la isoforma  $\alpha 1$  (insensible al fármaco), más sensible será dicha célula o dicho tejido frente a la inhibición de la proliferación ejercida por los glicósidos cardiacos.

35 Un aspecto de la invención proporciona un ensayo pronóstico *in vitro* útil para predecir la capacidad de respuesta terapéutica *in vivo* de una enfermedad o un trastorno, que presenta una etiología asociada a una excesiva proliferación celular, frente al tratamiento con un glicósido cardiaco o una composición que comprende un glicósido cardiaco, ensayo que comprende:

40 determinar la relación de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa en una muestra obtenida previamente, directa o indirectamente, a partir de un tejido celular enfermo *in vivo* de un sujeto con una enfermedad o trastorno que presenta una etiología asociada a una excesiva proliferación celular, comprendiendo la muestra una o más de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa; y

determinar la probabilidad de una respuesta terapéutica en el sujeto, donde el sujeto va a ser tratado con una dosis terapéuticamente relevante del glicósido cardiaco.

45 En algunas realizaciones: 1) el ensayo comprende además predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es superior o igual a al menos 1; 2) el ensayo además comprende predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al menos parcialmente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación se encuentra en el intervalo entre 0,5 y 1,0; 3) el ensayo además comprende predecir que el tejido celular no responderá terapéuticamente de manera sustancial al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es inferior a 0,3; 4) el ensayo también comprende además predecir que aquellos tejidos que tengan una relación de subunidades en el intervalo de 1 a 100 tendrán mayor capacidad para responder terapéuticamente que aquellos que tengan una relación de isoformas inferior a 1; 5) el ensayo comprende además predecir que aquellos tejidos en los que solo es detectable la isoforma  $\alpha 3$  y la isoforma  $\alpha 1$  no es detectable serán los que tengan mayor capacidad de responder terapéuticamente a glicósidos cardiacos; y/o 6) el ensayo comprende además predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es  $\geq 2$ ,  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 7$ ,  $\geq 9$ ,  $\geq 10$ ,  $\geq 15$ ,  $\geq 20$ ,  $\geq 25$ ,  $\geq 40$ ,  $\geq 50$ ,  $\geq 75$  ó  $\geq 100$ .

En algunas realizaciones, la probabilidad de que exista una respuesta terapéutica está relacionada con la relación de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa según la siguiente tabla:

Relación	Probabilidad de que exista una respuesta terapéutica en el sujeto
De 0,3 a menos de 0,5	De 20 a <30%
De 0,5 a menos de 1	De 30 a 50%
$\geq 1$	>50%
>10	>75%

En la tabla anterior, la respuesta terapéutica puede ser una respuesta terapéutica parcial o total, o puede estar retardada en el tiempo de progresión.

- 5 En algunas realizaciones: 1) la etapa de determinación comprende cuantificar el nivel de expresión de cada isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra *in vitro* o en muestra de biopsia y calcular su relación; 2) la etapa de determinación comprende determinar la cantidad de cada isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa respecto a la cantidad de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra *in vitro*, y calcular su relación; 3) el ensayo comprende además llevar a cabo un análisis estadístico de los datos a partir de los cuales se obtiene la relación; 4) la muestra es tejido celular, masa celular, lisato celular, preparaciones de membrana preparadas a partir de los mismos, o láminas histopatológicas de los mismos; 5) la muestra es una muestra *in vitro*; 6) la muestra comprende al menos dos isoformas de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa; 7) la muestra comprende al menos las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa; 8) el método comprende además lisar o romper las células o tejidos o muestras de biopsia o secciones de tejido fijas para examen histopatológico obtenidas previamente de tejido celular *in vivo* para formar la muestra; 9) el método comprende llevar a cabo un ensayo Western blot o un ensayo de tinción inmunohistoquímica con la muestra para determinar la cantidad y la expresión relativa de la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa respecto a la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra, y calcular la relación de las mismas; 10) el método que además comprende llevar a cabo un análisis radiométrico o densitométrico de un gel con el objetivo de determinar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa respecto al contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra; 11) el método comprende además llevar a cabo un análisis radiométrico o densitométrico de un gel para detectar la presencia y cuantificar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra; 12) comparar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y el de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra respecto al contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y/o de de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en una muestra de control positivo y/o en una muestra de control negativo; y/o 13) comparar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en una muestra de tejido en la que la se sabe que sólo se produce la expresión de una de las isoformas de subunidad  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  a modo de control.

- En algunas realizaciones: 1) el tejido celular enfermo se obtiene de un sujeto tal como un mamífero; 2) el tejido celular enfermo se obtiene de un humano, vaca, perro, gato, caballo, cerdo u otro animal doméstico, de valor comercial o no; 3) la enfermedad o trastorno que tiene una etiología asociada con una proliferación celular excesiva es un cáncer o tumor u otras enfermedades proliferativas que afectan negativamente en la calidad de vida humana o animal; y/o 4) el cáncer o tumor se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer adrenal cortical, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, metástasis ósea, sarcomas óseos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, linfoma no de Hodgkin, cáncer rectal, cáncer de esófago, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, tumor carcinoide gastrointestinal, enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer hepático, cáncer de pulmón (carcinomas de célula pequeña y de célula no pequeña), tumores carcinoides de pulmón, mesotelioma maligno, cáncer metastático, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, cáncer de cavidad nasal y paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, neoplasmas del sistema nervioso central, cáncer de cavidad oral y orofaríngea, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de pituitaria, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, cáncer del uréter; sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva o tumor de Wilm.

- El método comprende proporcionar información que especifica cómo llevar a cabo análisis para las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa; y/o 4) el método comprende proporcionar información que detalla cómo interpretar los datos pronósticos.

- Las enfermedades proliferativas son 1) enfermedades autoinmunes tales como artritis inducida por antígenos y encefalomiелitis alérgica; 2) enfermedades proliferativas inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, artritis crónica juvenil de inicio sistémico, osteoporosis y soriasis; 3) enfermedades proliferativas de la mama que incluyen la enfermedad fibroquística; 4) enfermedades proliferativas de la próstata que incluyen la hiperplasia prostática benigna (BPH); 5) enfermedades proliferativas del ojo que incluyen la retinopatía diabética proliferativa; y 6) enfermedades proliferativas vasculares que incluyen la aterosclerosis y la estenosis coronaria. En algunas realizaciones, se tratan simultáneamente dos o más enfermedades proliferativas.

Los cánceres que se cree que responden particularmente al tratamiento con glicósidos cardíacos, en base a investigación en laboratorio con líneas de células tumorales humanas, incluyen el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de vejiga, el sarcoma osteogénico, el cáncer de cerebro (glioblastoma multiforme) y el cáncer de colon. Los cánceres pueden ser de origen humano, no humano o animal.

5 En algunas realizaciones: 1) el glicósido cardíaco se selecciona del grupo que consiste en oleandrina, ouabaína, bufalina, digitoxina, digoxina, cinobufalina, cinobufagina y resibufogenina; 2) el glicósido cardíaco está presente en forma pura derivado mediante extracción de una fuente vegetal o animal, sintetizado o fabricado mediante modificación química (por ej. derivatización) de un glicósido cardíaco disponible; 3) el glicósido cardíaco está presente en un extracto; 4) el glicósido cardíaco está presente en una formulación o composición farmacéutica; 5) el glicósido cardíaco ha sido obtenido a partir de una masa de planta oleander; 6) la masa de planta oleander comprende la especie *Nerium*, tal como *Nerium oleander*, o la especie *Thevetia*, tal como *Thevetia nerifolia* (también conocida como oleander amarillo); y/o 7) el extracto de glicósido cardíaco se preparó mediante extracción con fluido supercrítico (SCF, del inglés "supercritical fluid extraction") opcionalmente en presencia de un modificador.

10 En algunas realizaciones: 1) el extracto de SCF comprende además al menos un agente farmacológicamente activo adicional además del glicósido cardíaco; 2) el agente activo adicional puede contribuir a la eficacia terapéutica del glicósido cardíaco cuando se administra el extracto a un sujeto; 3) el agente activo adicional actúa aditivamente o sinérgicamente para contribuir a la eficacia terapéutica del glicósido cardíaco; y/o el extracto se ha obtenido a partir de piel de sapo o de secreciones derivadas de la misma.

15 Otro aspecto de la invención proporciona el uso de un kit para llevar a cabo el ensayo pronóstico de la invención. El kit comprende: a) un primer anticuerpo primario que tiene una afinidad de unión por la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa; y b) un segundo anticuerpo primario que tiene una afinidad de unión por la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa. El kit se puede adaptar para uso en un ensayo electroforético de gel Western blot y/o para llevar a cabo un ensayo de tinción inmunohistoquímica.

20 El kit además comprende opcionalmente: a) una composición de lisis; b) una muestra de control positivo que comprende isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa; c) una muestra de control positiva que comprende isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa e isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa; d) una muestra de control negativo que comprende la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa y excluye la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa; e) un anticuerpo secundario, un IgG -HRP anti-ratón de cabra (que puede usarse, por ejemplo, para visualización de proteínas de interés); f) material de formación de gel adecuado para el análisis electroforético en gel; g) marcadores de peso molecular radiomarcados o coloreados (crómicos, capaces de generar una señal detectable visual o instrumentalmente); h) instrucciones de uso del kit y capacidades del ensayo pronóstico; i) densitómetro o radiómetro; j) medio líquido acuoso; k) kit de preparación de gel/membrana; l) disolución de bloqueo; m) tampón de lavado; n) materiales que comprenden un kit de análisis Western blot; u o) una combinación de los mismos.

25 En algunas realizaciones del uso del kit: a) el primer anticuerpo primario presenta afinidad de unión específica por la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa; b) el segundo anticuerpo primario presenta afinidad de unión específica por la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa; c) el anticuerpo secundario es peroxidasa de rábano de IgG  $\alpha$  de ratón de Cabra o comprende otros anticuerpos secundarios de especies diferentes a ratón activados contra IgG de ratón con un marcador apropiado unido, tal como peroxidasa de rábano; y/o d) los anticuerpos primarios son anticuerpos monoclonales.

30 En algunas realizaciones del uso del kit, el kit de ensayo de tinción inmunohistoquímica comprende: a) disolución de desenmascaramiento de antígeno (que puede ser de pH elevado o estar basada en ácido cítrico); b) tampón; c) material de parada de actividad de peróxido endógeno (que puede comprender peróxido de hidrógeno, opcionalmente en metanol); d) anticuerpo de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y/o anticuerpo de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa; e) anticuerpo IgG1 de ratón no inmune; f) reactivo de anticuerpo universal que comprende una mezcla de reactivos de IgG anti-conejo e IgG anti-ratón; g) colorante químico primario, tal como diaminobenzidina; h) un colorante químico contador general, tal como hematoxilina o eosina; i) colorante de orgánulo celular, tal como el usado para teñir núcleos (por ejemplo, bromuro de etidio, bisbenzimidazol o sulfato de aluminio y potasio) o mitocondrias (por ejemplo, rojo de seguimiento Mito, naranja de 10-nonil acridina); j) materiales que comprenden un kit de tinción inmunohistoquímica; o k) una combinación de dos o más de los mismos. Usando secciones adyacentes de tejidos o células, la tinción de la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  en la que se usan los anticuerpos primarios específicos apropiados para la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  y la isoforma de subunidad  $\alpha 3$ . Tal como se emplea en la presente memoria, un colorante de orgánulo celular específico es un agente o combinación de agentes usados para teñir específicamente un tipo particular de orgánulo (mitocondria, núcleo, nucléolo, aparato de golgi, vacuola, etc.) de una célula (humana, no humana o animal).

35 En algunas realizaciones, el ensayo de tinción inmunohistoquímica comprende las etapas de: a) proporcionar una muestra obtenida previamente a partir de tejido de mamíferos; b) teñir inmunohistoquímicamente las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa presente en la muestra; c) determinar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra; y d) determinar la

relación entre la isoforma  $\alpha 3$  y la isoforma  $\alpha 1$  presentes en la muestra.

En algunas realizaciones, el ensayo de tinción inmunohistoquímica comprende las etapas de: a) proporcionar una muestra obtenida previamente a partir de tejido de mamífero; b) llevar a cabo un procedimiento de recuperación de antígeno con el tejido; c) detener la actividad de peróxido endógena del tejido; d) exponer el tejido detenido a anticuerpos primarios anti-isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y/o anti-isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa; e) exponer el tejido tratado con anticuerpos a anticuerpos secundarios IgG anti-conejo, IgG anti-ratón o una combinación de los mismos; f) exponer el tejido tratado con IgG a colorante primario; g) exponer el tejido teñido a contra-colorante para formar un tejido teñido inmunohistoquímicamente; h) analizar el tejido teñido inmunohistoquímicamente visualmente o por medios fotométricos; e i) cuantificar la cantidad de las isoformas  $\alpha 3$  y/o  $\alpha 1$  presentes en el tejido de mamífero. La cuantificación de la tinción de anticuerpo de isoforma se puede realizar, por ejemplo, si el anticuerpo secundario está biotinilado. A continuación, se puede añadir Vectastatina ABC e incubarlo durante 30 minutos. Después de lavar las secciones teñidas, a continuación son incubadas con sustrato de diaminobenzidina para desarrollar un nivel adecuado de tinción. La cuantificación de los tejidos teñidos se puede llevar a cabo entonces manualmente evaluando la intensidad de la tinción, o electrónicamente usando captura de imágenes y escaneado digital por ordenador de los campos de interés. La cuantificación se puede facilitar adicionalmente usando software de imagen digital que se encuentre disponible comercialmente. En algunas realizaciones, el ensayo comprende además la etapa de: j) lavar el tejido resultante de la etapa a); k) lavar el tejido resultante de la etapa c); l) proporcionar secciones de control negativo (aquellas que no tengan tumor o cáncer) como control "no primario"; m) exponer las secciones de control negativo a un anticuerpo IgG1 de ratón no inmune; n) lavar el tejido resultante de la etapa e); o) lavar el tejido resultante de la etapa f); y/o lavar el tejido resultante de la etapa g). El lavado se puede llevar a cabo con agua, agua tamponada y/o TBS (Tris HCl aproximadamente 50 mM, NaCl aproximadamente 300 mM, Tween 20 aproximadamente al 0,1%, pH de aproximadamente 7,6).

La muestra de control positivo puede ser una preparación de tejido, masa celular, lisato celular o membrana, preparada a partir de éstos mediante biopsia u otro medio de escisión quirúrgica. La muestra de control negativo puede ser una preparación de tejido, masa celular, lisato celular o membrana, preparada a partir de éstos, que por análisis previos se ha determinado que no contiene isoforma  $\alpha 3$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa. En algunas realizaciones, el control negativo consiste en una masa celular de tejido tumoral de roedor (ratón o rata) o de células de ratón o rata cultivadas *in vitro*.

Se pueden emplear métodos analíticos que son medios alternativos para determinar la composición relativa y la relación de isoformas de subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa, de acuerdo con la invención para determinar la relación de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$ . Éstos pueden consistir, por ejemplo, en el uso de anticuerpos apropiados en un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o un sistema de tejido proteico o lisato celular. Alternativamente, es posible usar análisis Northern blot y técnicas relacionadas (por ej., rtPCR, reacción en cadena de polimerasa en tiempo real) para la medida de ARNm a diferentes isoformas de subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa. También se puede usar un ensayo de tinción inmunohistoquímica para cuantificar las cantidades de la isoforma  $\alpha 3$  y la isoforma  $\alpha 1$  de la subunidad  $\alpha$  presente en una muestra.

### Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente descripción y describen ejemplos de realizaciones de la invención reivindicada. El especialista en la técnica será capaz, en vista de estas figuras y de la descripción de la presente memoria, de llevar a cabo la invención sin experimentación indebida.

Figura 1A: muestra una fotografía de las bandas relevantes de un electroferograma de gel obtenido como parte de un análisis Western blot de líneas de células humanas y de ratón para la cuantificación relativa de las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa.

Figura 1B: muestra una representación de la concentración de oleandrina (nM) frente al porcentaje de inhibición del crecimiento celular para tumores humanos y de ratón.

Figura 2: muestra una fotografía de las bandas relevantes de electroferogramas de gel obtenidos como parte de un ensayo Western blot de células de colon humanas normales y malignas.

Figura 3A: muestra una representación de la concentración de oleandrina (nM) frente al porcentaje de inhibición de crecimiento celular para varias líneas celulares tumorales diferentes que varían en sus expresiones relativas de las isoformas de subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa.

Figura 3B: muestra un gráfico de barras de la IC50 media de la oleandrina para la inhibición de crecimiento celular en dos grupos diferentes de líneas celulares tumorales: un primer grupo que tiene una relación de subunidad  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$  superior a la unidad; y un segundo grupo que tiene una relación de subunidad  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$  inferior a la unidad.

Figura 4A: muestra una fotografía de las bandas relevantes de un electroferograma de gel obtenido como parte de un ensayo Western blot de células tumorales humanas transfectadas y no transfectadas.

Figura 4B: es un gráfico de barras que demuestra la expresión relativa de la isoforma  $\alpha 3$  en las células transfectadas

y no transfectadas de la Figura 4A.

Figura 4C: muestra una representación de la concentración de oleandrina (nM) frente al porcentaje de inhibición de crecimiento celular para las células de la Figura 4A.

5 Figura 5A: muestra una fotografía de las bandas relevantes de un electroferograma de gel obtenido como parte de un ensayo Western blot de células Panc-1 transfectadas y no transfectadas.

Figura 5B: es un gráfico de barras que demuestra la expresión relativa de la isoforma  $\alpha 3$  en las células transfectadas y no transfectadas de la Figura 5A.

Figura 5C: muestra una representación de la concentración de oleandrina (nM) frente al porcentaje de inhibición de crecimiento de células cancerígenas para las células de la Figura 5A.

10 Figuras 6A-6F: muestran fotografías de células cutáneas normales teñidas inmunohistoquímicamente de DI 13782.

Figuras 7A-7H: muestran fotografías de células cutáneas de melanoma teñidas inmunohistoquímicamente: las Figuras 7A-7B muestran células DI 15041; las Figuras 7C-7D muestran células DI 15832; las Figuras 7E-7F muestran células DI 15833; las Figuras 7G-7H muestran células DI 15834.

### Descripción detallada de la invención

15 La invención proporciona un método para predecir si un sujeto que padece una enfermedad o trastorno que tiene una etiología asociada a una proliferación celular excesiva recibirá un beneficio clínico contra la enfermedad o trastorno a través del tratamiento del sujeto con una composición que contiene glicósido cardiaco. El método se usa para determinar si la enfermedad o trastorno del sujeto responderá terapéuticamente al tratamiento con una composición que contiene un glicósido cardiaco. En otras palabras, el método se usa para determinar la probabilidad  
20 de una respuesta terapéutica en el sujeto después del tratamiento del mismo con una dosis relevante terapéuticamente (o dosis efectiva) de uno o más glicósidos cardiacos.

Resumidamente, una muestra obtenida de un tejido enfermo de un sujeto comprende una o más isoformas de las subunidades  $\alpha$  de Na, K-ATPasa del tejido enfermo y es evaluada como se describe en la presente memoria para determinar las cantidades o concentraciones relativas de las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  de la subunidad  $\alpha$  de la Na, K-ATPasa. A continuación se calcula la relación de las cantidades o concentraciones relativas. Si la relación de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$  es superior o igual a 0,3, el método predice una probabilidad incrementada de que la enfermedad o trastorno responda terapéuticamente al tratamiento con un glicósido cardiaco. Por ejemplo, si la relación se encuentra entre 0,3 y 0,45 +/- 0,05, entonces existe al menos un 20% o entre un 20% y menos de un 30% de probabilidad de que la enfermedad o trastorno responda al tratamiento con un glicósido cardiaco. Si la relación es inferior a 0,2 o inferior a 0,3, el método predice una probabilidad menor del 20% de que la enfermedad o trastorno responda terapéuticamente al tratamiento con el glicósido cardiaco. En general, cuanto mayor es la relación, mayor es la probabilidad de respuesta terapéutica. Por ejemplo, si la relación es de 0,5 - 0,95 +/- 0,05, entonces existe una probabilidad de al menos un 30% o entre 30% y 50% de que la enfermedad o trastorno responda al tratamiento con un glicósido cardiaco. Si la relación es superior o igual a 1 +/- 0,05, existe una probabilidad de al menos un 50% de que la enfermedad o trastorno responda al tratamiento con el glicósido cardiaco. Si la relación es superior a 10 +/- 0,05, existe al menos un 75% de probabilidad de que la enfermedad o trastorno responda al tratamiento con el glicósido cardiaco.

Por "responder terapéuticamente" se entiende que un sujeto que padece una enfermedad o trastorno disfrutará al menos uno de los siguientes beneficios clínicos como resultado del tratamiento con un glicósido cardiaco: alivio de la enfermedad o trastorno, reducción de la aparición de síntomas asociados a la enfermedad o trastorno, remisión parcial de la enfermedad o trastorno, remisión completa de la enfermedad o trastorno, o tiempo a progresión incrementado. En otras palabras, la respuesta terapéutica puede ser una respuesta terapéutica total o parcial, y el método se usa para determinar la probabilidad de una respuesta terapéutica, independientemente de si es una respuesta total o parcial.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, "tiempo a progresión" es el periodo o duración de tiempo después de que la enfermedad ha sido diagnosticada (o tratada) hasta que la enfermedad comienza a empeorar (tal como hasta que un tumor empieza a crecer o continua creciendo). Es el periodo de tiempo durante el cual el nivel de una enfermedad se mantiene sin ninguna progresión adicional de la enfermedad, y el periodo de tiempo finaliza cuando la enfermedad vuelve a progresar. La progresión de una enfermedad se determina mediante los "estadios" que sigue un sujeto que padece una enfermedad proliferativa celular antes de la terapia o al inicio de la misma. Por ejemplo, el tamaño, la localización y el número de tumores que tiene un sujeto se determinan antes de la terapia o al inicio de la misma. A continuación el sujeto es tratado con glicósido cardiaco, y se monitoriza periódicamente el tamaño y el número de tumores. En un momento posterior el tamaño y/o el número de tumores pueden aumentar, marcando de este modo la progresión de la enfermedad y la finalización del "tiempo a progresión". El periodo de tiempo durante el cual la enfermedad no progresó o durante el cual el nivel o la gravedad de la enfermedad no empeoraron es el "tiempo a progresión".



Cabe destacar que una respuesta terapéutica puede ser una respuesta terapéutica total o parcial a dosis relevantes terapéuticamente para un sujeto. En otras palabras, el nivel de respuesta terapéutica predicho se determina con una dosis que no sería fatal para un sujeto al cual se administra el glicósido cardiaco. Una dosis terapéuticamente relevante, por tanto, es una dosis terapéutica con la cual se observa una respuesta terapéutica de la enfermedad o trastorno al tratamiento con un glicósido cardiaco, y a la cual se puede administrar a un sujeto el glicósido cardiaco sin una cantidad excesiva de efectos secundarios no deseados o perjudiciales. Una dosis terapéuticamente relevante es no letal para un sujeto, aunque puede causar algunos efectos secundarios en el paciente. Es una dosis a la cual el nivel de beneficio clínico para un sujeto al que se administra el glicósido cardiaco excede el nivel de efectos secundarios perjudiciales experimentados por el sujeto debido a la administración del glicósido cardiaco. Una dosis terapéuticamente relevante variará de sujeto a sujeto según una variedad de principios farmacológicos, farmacodinámicos y farmacocinéticos establecidos. Sin embargo, una dosis terapéuticamente relevante (relativa, por ejemplo, a oleandrina) normalmente no excederá de 25, 100, 250, 500 ó 1000 microgramos de glicósido cardiaco/día o puede estar en el intervalo de 25-500 ó 25-1000 microgramos de glicósido cardiaco/día. Por lo tanto, el método de la invención se usa para predecir la capacidad de respuesta terapéutica de la enfermedad o trastorno cuando se administra a un sujeto una dosis terapéuticamente relevante. En la técnica es sabido que la cantidad real de fármaco requerida para proporcionar un objetivo de resultado terapéutico en un sujeto puede variar de sujeto a sujeto según los principios básicos de la farmacia.

Se puede administrar una dosis terapéuticamente relevante según cualquier régimen de dosificación usado habitualmente en el tratamiento de enfermedades o trastornos que tengan una etiología asociada a una proliferación celular excesiva. Se puede administrar una dosis terapéuticamente relevante una vez, dos veces, tres veces o más al día. Se puede administrar cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, bisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, mensualmente, cada dos meses, cada medio mes, cada tres meses, cada cuatro meses, cada medio año, anualmente, o de acuerdo a una combinación de cualquiera de las anteriores opciones. Por ejemplo, se puede administrar una dosis terapéuticamente relevante una vez al día durante una o más semanas.

Con "composición de lisis" se entiende uno o más agentes capaces de lisar la membrana de una célula para formar un lisato celular o la disolución completa del contenido celular. La composición de lisis puede comprender uno o más de los siguientes: medio líquido acuoso, agente tamponante, sal, agente quelante, tensioactivo, agente anti-espumante, inhibidor de proteasa y fosfatasa e inhibidor de ATPasa.

Tal como se emplea en la presente memoria en relación al uso de un kit, una "muestra de control positivo" comprende la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa. El control positivo además puede comprender la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa. Las cantidades o concentraciones de cada isoforma de subunidad se pueden conocer o predeterminar independientemente. La cantidad o concentración de isoforma de subunidad será suficiente para proporcionar una respuesta positiva a la presencia de la isoforma de subunidad, según se determine de acuerdo al método concreto usado en un ensayo para el cual se trata de un control positivo. Por ejemplo, en un ensayo Western blot, la cantidad o concentración de isoforma de subunidad del control positivo será suficiente para unirse con el correspondiente anticuerpo, de tal modo que cuando se determine la presencia de la subunidad, por ejemplo mediante determinación densitométrica o radiométrica, se obtenga una respuesta positiva para la presencia de la isoforma de subunidad. Para el ensayo de tinción inmunohistoquímica (tal como se detalla en el Ejemplo 27), la cantidad o concentración de isoforma de subunidad en el control positivo será la suficiente para permitir una fácil visualización y cuantificación cuando se aplique a un gel, se separe de otras proteínas usando electroforesis y a continuación se tiña mediante el uso de anticuerpos primarios y secundarios como se ha descrito previamente, o cuando se aplica a análisis cuantitativo mediante examen microscópico usando captura de imagen digital y software de análisis de imágenes cuantitativo. Si la se conoce o se predetermina la cantidad o concentración de isoforma de subunidad en la muestra de control antes del análisis, se puede relacionar el nivel de respuesta positiva con la cantidad o concentración, de tal modo que se proporciona una curva de calibrado para la isoforma de subunidad.

Si la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa está presente en la muestra de control positivo, la relación de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$  generalmente estará en el intervalo de 0,3 a 100, o superior. Los intervalos adecuados para la relación también incluyen entre 0,3 y 0,5, entre 0,5 y 1,0, entre 1,0 y 2,0 y entre 20 y 100.

Tal como se usa en la presente memoria en relación al uso del kit, una "muestra de control negativo" comprende la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa pero excluye la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa. La cantidad o la concentración de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  será la suficiente para proporcionar una respuesta positiva a la presencia de la isoforma, determinada según el método particular usado en un ensayo, tal como el ensayo Western blot, en el que se use como control negativo. La cantidad o la concentración pueden conocerse o predeterminarse y, cuando eso ocurre, se pueden usar para desarrollar una curva de calibrado para la isoforma.

Como parte de una validación del método y el uso del kit de la invención, los inventores llevaron a cabo evaluaciones preclínicas de una composición que contiene glicósido cardiaco para el tratamiento de varios fenotipos de cánceres y tumores. La evaluación se llevó a cabo usando modelos de animal *in vivo*, *ex-vivo*, *in vitro* y en xenoinjerto. Para cada fenotipo evaluado, se analizó una muestra celular de tejido o masa celular tal como se ha descrito en la presente memoria para determinar la relación de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa a isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa. Se observó una correlación entre los fenotipos que responden al

tratamiento con glicósido cardiaco y la relación de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa a isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa para todos los fenotipos de una serie de líneas celulares tumorales humanas. Se concluyó que un fenotipo de cáncer o tumor que responde terapéuticamente (o uno que tiene una probabilidad aumentada de presentar respuesta terapéutica) posee una relación de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa a isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa de al menos 0,3.

Se pueden usar células cancerígenas de roedor (rata o ratón) como muestra de control negativo. La Figura 1A muestra una película desarrollada contra el gel de un análisis Western blot de líneas celulares tumorales de roedor. Los datos de los inventores demuestran que todas las líneas celulares tumorales de roedor (ratón y rata) evaluadas hasta la fecha carecen de la isoforma de subunidad  $\alpha_3$  y que su proliferación *in vitro* no se ve inhibida significativamente por la incubación con glicósidos cardiacos (por ejemplo, ouabaína, oleandrina, bufalina, etc.). Las líneas celulares tumorales humanas generalmente son más sensibles al tratamiento con composición que contiene glicósido cardiaco que las células tumorales murinas (Figura 1B). Los inventores creen que esta diferencia en la capacidad de respuesta terapéutica se debe a las diferencias en la relación de las isoformas  $\alpha_3$  a  $\alpha_1$  de las dos especies diferentes, como se ha indicado anteriormente.

Cabe destacar que los anticuerpos contra la isoforma  $\alpha_3$  pueden adquirirse en una serie de casas comerciales, que incluyen Affinity Bioreagents (Golden, CO), Novus (Littleton, CO) o Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), todas las cuales mostraron una reactividad igual (es decir, la misma unión) con el epítipo de  $\alpha_3$  en una muestra de control positivo.

En humanos, la relación de isoforma  $\alpha_3$  a  $\alpha_1$  para la subunidad  $\alpha$  de la Na, K-ATPasa puede variar de acuerdo con la fuente y el estado de malignidad del tejido. Se tomaron muestras de tejido de colon normal y maligno de cada sujeto para un total de catorce individuos. Se determinó la relación de isoformas  $\alpha_3$  a  $\alpha_1$  para cada muestra de tejido como se ha descrito en la presente memoria. Los datos de la Figura 2 y de la tabla presentada a continuación demuestran una carencia relativa de isoforma  $\alpha_3$  en los tejidos normales, y la presencia de isoforma  $\alpha_3$  en aproximadamente el 66-70% de los tejidos malignos. Ambos tejidos, normales y malignos, contienen la isoforma de subunidad  $\alpha_1$ .

Sujeto	Tejidos de colon normales	Tejidos de colon tumorales
	Relación $\alpha_3/\alpha_1$	Relación $\alpha_3/\alpha_1$
1	0,0	0,0
2	0,02	0,64
3	0,03	0,07
4	0,01	0,04
5	0,03	0,0
6	0,0	0,56
7	0,0	3,4
8	0,0	6,0
9	0,0	100,0
10	0,0	0,0
11	0,0	6,2
12	0,0	0,83
13	0,0	0,36
14	0,0	0,00

La relación de isoformas  $\alpha_3$  a  $\alpha_1$  para la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa se determinó para varios fenotipos diferentes de cáncer y tumores humanos en líneas celulares cultivadas, así como en muestras reales de biopsias de tumores. Adicionalmente, se determinó la sensibilidad relativa de cada fenotipo frente al tratamiento con una composición que contiene un glicósido cardiaco usando datos derivados de experimentos de cultivo celular *in vitro*. Los datos correspondientes a una composición que contiene oleandrina se detallan en la siguiente tabla y en la Figura 3A.

Línea celular	Tipo de tumor	$\alpha 3/\alpha 1$	Respuesta <i>in vitro</i> a oleandrina?	IC <sub>50</sub> (nM)
MDA231	Mama	0,01	No*	N/A
BXPC3	Páncreas	0,29	No*	N/A
MCF7	Mama	0,2	No*	N/A
SUM149	Mama	0,3	Parcial**	22,5
HCT116	Colon	1,7	Parcial**	36,2
MiaPaca	Páncreas	1,5	Completa***	14,2
CACO2	Colon	4,6	Completa***	9,4
HT29	Colon	6,8	Completa***	15,6
LS174T	Colon	7,6	Completa***	20,7
BRO	Melanoma	11,5	Completa***	8,2
DOD-1	Colon	19,8	Completa***	19,6
PANC1	Páncreas	60	Completa***	6,1
Línea celular	Tipo de tumor	$\alpha 3/\alpha 1$	Respuesta <i>in vitro</i> a bufalina?	IC <sub>50</sub> (nM)
BXPC3	Páncreas	0,29	No*	N/A
MiaPaca	Páncreas	1,5	Completa***	2,1
PANC1	Páncreas	60	Completa***	1,2
*Denota menos del 50% de inhibición de crecimiento alcanzada a concentraciones de hasta 125 nM.				
**Denota una inhibición de crecimiento superior al 50% pero inferior al 75% alcanzada a 62 nM.				
***Denota más del 75% de inhibición de crecimiento alcanzada a 62 nM				

5 Tal como se define en las anteriores tablas, una “respuesta *in vitro*” denota la extensión a la cual se inhibe la proliferación de una línea de células tumorales dada con una concentración fija de fármaco (glicósido cardiaco) a lo largo de un periodo de tiempo definido. Una designación de “no respuesta” denota menos del 50% de inhibición de crecimiento en cualquiera de las múltiples concentraciones de fármaco evaluadas. Es decir, no se identificó ninguna concentración como un valor IC<sub>50</sub> (la concentración que produce la inhibición del crecimiento celular en un 50% a lo largo del periodo de tiempo establecido para el experimento). Por consiguiente, si dicha línea celular tumoral estuviera creciendo en un mamífero tal como un humano, es probable que el fármaco fuera ineficaz para producir una inhibición significativa del crecimiento tumoral. La designación de “respuesta parcial” de la Tabla anterior denota 10 la capacidad de un glicósido cardiaco dado tal como la oleandrina o la bufalina para inhibir la proliferación celular en más del 50% pero menos del 75%, respecto al crecimiento de células tumorales no tratadas. Por consiguiente, esto sería igual a una respuesta terapéutica parcial o menos que completa del tumor frente al glicósido cardiaco si se usara dicho producto para tratar el crecimiento tumoral en un mamífero tal como un humano. Finalmente, la designación de “respuesta completa” de la Tabla anterior denota una inhibición superior al 75% de la proliferación de células tumorales respecto a poblaciones de células tumorales no tratadas. Por consiguiente, es probable que se 15 pudiera lograr una inhibición total del crecimiento tumoral (o respuesta terapéutica completa) en un mamífero.

En base a los datos anteriores de relación de isoformas, el método predice que: 1) las líneas celulares MDA231, BXPC3 y MCF7 sustancialmente no responderían al tratamiento con una cantidad terapéuticamente relevante de glicósido cardiaco; 2) las líneas celulares SUM 149 y HCT116 presentarían al menos una respuesta parcial al tratamiento con una cantidad terapéuticamente relevante de glicósido cardiaco; y 3) las líneas celulares CACO2, HT29, LS174T, BRO, DOD-1 y PANC1 presentarían una respuesta terapéutica completa al tratamiento con una cantidad terapéuticamente relevante de glicósido cardiaco. 20

La Figura 3A muestra una representación de la concentración (nM) de oleandrina (proporcionada como oleandrina) frente al porcentaje de crecimiento de control. Los datos demuestran que las líneas celulares evaluadas pueden categorizarse en tres grupos diferentes según su respuesta al tratamiento con glicósido cardiaco, determinada a través de la inhibición relativa de la proliferación de las líneas celulares tumorales humanas: las células de Grupo I- que sufren una inhibición de crecimiento inferior al 50% se lograron a concentraciones de hasta 125 nM de glicósido cardiaco; las células de Grupo II- que sufre una inhibición de crecimiento igual o superior al 50% se lograron a 25

concentraciones de hasta 62 nM de glicósido cardiaco; y las células de Grupo III- que sufren una inhibición de crecimiento igual o superior al 75% se lograron a concentración de hasta 62 nM de glicósido cardiaco. Los ejemplos de líneas celulares para los grupos son: Grupo I- MDA231, BXP3, MCF-7; Grupo II- SUM149, BRO; Grupo III- Panc-1, CaCo2. Los datos de respuesta son los predichos por los datos de relación de isoformas. A fin de establecer la robustez del método y el uso del kit de la invención, se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos de respuesta celular. Los datos de la Figura 3B muestran la capacidad relativa de una composición que contiene oleandrina para inhibir la proliferación de células tumorales humanas *in vitro*. Los datos se muestran como la Media  $\pm$  SD. La inhibición de crecimiento mediada por oleandrina se examinó en diez líneas celulares (que representan una variedad de tumores sólidos) en las que el contenido de subunidad relativo de relación de isoformas  $\alpha 3/\alpha 1$  es  $>1,0$  y seis líneas celulares en las que la relación de isoformas  $\alpha 3/\alpha 1$  es  $<1,0$ . Los datos muestran que existe una diferencia de 8 veces (800%) entre ambos grupos. Es decir, en las líneas celulares en las que la relación de isoformas  $\alpha 3/\alpha 1$  es  $\geq 1,0$ , se observó que la oleandrina es un fármaco mucho más efectivo, en comparación con aquellos en los que la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  se expresa sólo de manera muy limitada. Los datos prueban que la relación de isoformas de subunidad  $\alpha 3/\alpha 1$  se puede usar para predecir la capacidad de respuesta de una línea celular cancerígena o tumoral frente al tratamiento con una composición que contiene glicósido cardiaco.

Una prueba adicional de la importancia relativa de la relación de isoformas  $\alpha 3/\alpha 1$  para la predictibilidad de una respuesta terapéutica por parte de un tejido maligno diana frente al tratamiento con un glicósido cardiaco se estableció como se indica a continuación. La regulación artificial a la baja de la expresión de la isoforma  $\alpha 3$  en células de cáncer pancreático humanas, es decir la manipulación del contenido de isoformas de subunidades de Na, K-ATPasa, se logró mediante la transfección de células con ARNsi (ARN silenciador) específico de la isoforma  $\alpha 3$ . Los datos demuestran una caída en la expresión de la isoforma  $\alpha 3$  (determinada mediante Western blot (Figura 4A)). La cuantificación de la expresión disminuida de  $\alpha 3$  mediante Western blot se detalla en la Figura 4B. La Figura 4C demuestra que las células transfectadas, en las que se ha reducido la expresión de  $\alpha 3$ , pierden su sensibilidad frente al tratamiento con oleandrina.

Una prueba adicional de la importancia relativa de la relación de isoformas  $\alpha 3/\alpha 1$  para la predictibilidad de una respuesta terapéutica por parte de un tejido maligno diana frente al tratamiento con un glicósido cardiaco se estableció a través de la transfección de células Panc-1 con la isoforma de subunidad  $\alpha 1$ . La isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa fue transfectada a células Panc-1, que normalmente carecen de expresión de  $\alpha 1$ . La muestra de control de la Figura 5A corresponde a células Panc-1 no transfectadas, y la muestra  $\alpha 1$ cDNA de la Figura 5A corresponde a células Panc-1 transfectadas con la isoforma de subunidad  $\alpha 1$ . Como resultado, se redujo la relación de  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$  en las células Panc-1 transfectadas (Figura 5B). A continuación, se evaluó la sensibilidad de las células Panc-1 transfectadas al tratamiento con oleandrina. La sensibilidad de dichas células transfectadas frente al tratamiento con oleandrina se redujo, como evidencia el desplazamiento del valor IC50 de la oleandrina desde 4,1 nM en las células Panc-1 no transfectadas hasta más de 50 nM en las células transfectadas con  $\alpha 1$  (Figura 5C). Por consiguiente, la actividad antiproliferativa de la oleandrina se redujo marcadamente en las células Panc-1 transfectadas con la isoforma de subunidad  $\alpha 1$ .

La detección y la cuantificación de las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  de la subunidad de Na, K-ATPasa también se pueden llevar a cabo mediante tinción inmunohistoquímica, tal como se detalla en el Ejemplo 27. Las células son teñidas inmunohistoquímicamente de tal modo que las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  se tiñen diferencialmente. El contenido de cada tipo de isoforma se cuantifica y se determina la relación de contenido de isoformas  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$ . La tinción inmunohistoquímica diferencial de las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  puede realizarse por diversos medios. En algunas realizaciones, se tiñe una muestra de tejido con dos colorantes diferentes, usándose un colorante de forma selectiva o específica para la isoforma  $\alpha 3$  y usándose el otro colorante de forma selectiva o específica para la isoforma  $\alpha 1$ . En algunas realizaciones, se obtienen dos muestras próximas pero diferentes a partir del mismo tejido y se tiñen, de tal modo que la primera muestra es tratada para teñir la isoforma  $\alpha 3$  y la segunda muestra es tratada para teñir la isoforma  $\alpha 1$ . A continuación se cuantifican las cantidades de las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$ , y entonces se determina la relación de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$ . En base a la relación se realiza una predicción de la probabilidad de respuesta terapéutica del tejido frente al tratamiento con glicósido cardiaco.

La cuantificación de la isoforma  $\alpha 3$  y la isoforma  $\alpha 1$  de la subunidad Na, K-ATPasa en una muestra teñida inmunohistoquímicamente (célula o lámina de tejido) puede realizarse a través de procedimiento manuales o automatizados. Éstos incluyen, aunque sin limitación, la graduación individual de la intensidad de tinción de áreas de conjunto de láminas teñidas adecuadamente (por ejemplo, usando observaciones visuales de intensidades de tinción relativas (por ejemplo, intensidades de 0-5 donde 0 es tinción no detectable y 5 representa una tinción intensa), a continuación recopilar las intensidades de tinción promedio de una número de conjuntos de regiones examinadas y comparar la tinción relativa de  $\alpha 3$  con la de las láminas teñidas para  $\alpha 1$ , y calcular la relación de  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$  en la muestra. Otra manera en la que se puede realizar la cuantificación de la tinción relativa de  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  (es decir, la relación de  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$  presente en una muestra) es a través del uso de un examen con microscopio de áreas de conjunto de láminas teñidas y del uso de software de análisis digital para determinar las intensidades de tinción relativas. Asimismo, se puede llevar a cabo un análisis de vídeo digital asistido por ordenador para determinar la tinción de isoforma relativa y para calcular una relación de intensidades de tinción de  $\alpha 3$  a  $\alpha 1$ , determinando con ello la relación de contenido de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$  en la muestra.

Por ejemplo, las Figuras 6A-6F muestran fotografías de células cutáneas normales procedentes de DI 13782. Las

Figuras 6A, 6C y 6E muestran la inmunorreactividad de la subunidad  $\alpha$  de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (teñida inmunohistoquímicamente). Las Figuras 6B, 6D y 6F muestran fotografías de las correspondientes secciones incubadas de IgG no inmunes (control). Se observaron fuertes niveles 2+ y 3+ de inmunorreactividad en todos los donantes de piel normal. El epitelio escamoso, el epitelio de folículo piloso, la membrana de base de las glándulas sebáceas, las bobinas de sudoración y los linfocitos mononucleares de los vasos sanguíneos fueron todos teñidos positivamente. El músculo piloerector fue débilmente inmunorreactivo.

Las Figuras 7A-7H muestran fotografías de células de melanoma. Las Figuras 7A, 7C, 7E y 7G muestran la inmunorreactividad de subunidad  $\alpha$  de  $\text{Na}/\text{K}$  ATPasa (teñida inmunohistoquímicamente). Las Figuras 7B, 7D, 7F y 7H muestran las correspondientes secciones incubadas con IgG (de control). Las Figuras 7A y 7B muestran células DI 15838. Las Figuras 7C y 7D muestran células DI 15840. Las Figuras 7E y 7F muestran células DI 15842. Las Figuras 7G y 7H muestran células DI 15844. Todas las muestras BCC fueron positivas para la subunidad  $\alpha$  de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa con grados variables de intensidad. Toda la inmunorreactividad se localizó en los núcleos y citoplasmas de las células tumorales. Después de una tinción inmunohistoquímica diferencial de los tejidos, se puede determinar la relación de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  a isoforma de subunidad  $\alpha 1$  y se puede realizar una predicción de la capacidad de respuesta terapéutica frente al tratamiento con glicósido cardiaco.

Se evaluó la relevancia del método de la presente invención frente a otro glicósido cardiaco. El huachansu es un extracto de piel de sapo que contiene glicósidos cardiacos conocidos como bufadienólicos. Se evaluó la capacidad de respuesta terapéutica de dos líneas celulares pancreáticas humanas (SW1990 y Panc-1) frente al tratamiento con huachansu. En base a los datos de las tablas anteriores, uno predeciría que la célula SW 1990 no respondería terapéuticamente a huachansu pero las células Panc-1 sí lo harían. Los datos de respuestas produjeron los resultados esperados.

Los ejemplos mostrados a continuación incluyen evidencias de la eficacia de los glicósidos cardiacos en el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con cáncer y tumores. El Ejemplo 21 incluye un caso de tratamiento de un paciente que presenta gastrinoma pancreático metastásico. El ensayo de prognosis, los métodos y el uso del kit se pueden emplear en combinación con uno o más ensayos, métodos y kits pronósticos o diagnósticos adicionales conocidos en la técnica de las enfermedades o trastornos que presentan una etiología asociada a una proliferación celular excesiva. Por ejemplo, si un médico pretende tratar a un sujeto que tiene cáncer o un tumor con una combinación de un glicósido cardiaco y otro agente quimioterapéutico o terapia de radiación, y se sabe que el fenotipo particular de cáncer o tumor, presentado por el sujeto, responde terapéuticamente al menos en parte al tratamiento con dicho agente quimioterapéutico adicional o a dicha terapia de radiación, entonces se puede usar la presente invención para determinar la probabilidad de que haya al menos una respuesta terapéutica parcial del cáncer o tumor del sujeto cuando sea tratado con glicósido cardiaco. Si los resultados indican que existe un aumento de la probabilidad de que el cáncer o tumor responda terapéuticamente al tratamiento con glicósido cardiaco, entonces el médico puede prescribir y/o administrar el tratamiento del cáncer o tumor con el glicósido cardiaco y otro agente terapéutico o terapia de radiación o una combinación de los mismos.

El glicósido cardiaco puede ser cualquier glicósido cardiaco que se sepa que posee actividad terapéutica en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que presenta una etiología asociada con una proliferación celular excesiva. El glicósido cardiaco puede estar presente en forma pura o como una mezcla con uno o más compuestos adicionales. El glicósido cardiaco puede estar presente como un extracto. El extracto se puede preparar mediante extracción con fluido supercrítico (SCF) usando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) o una forma químicamente modificada de dicho extracto (por ejemplo, un extracto que incluye etanol o que se preparó usando SCF  $\text{CO}_2$  y etanol). El extracto se puede obtener de material vegetal o animal. El material animal puede ser el exudado de un sapo (por ejemplo, *Bufo bufo*). El material vegetal puede ser una masa vegetal tal como la obtenida de la especie *Nerium*, tal como *Nerium oleander*, o de la especie *Thevetia*, tal como *Thevetia nerifolia* o *Thevetia peruviana* (conocida también como oleander amarilla). El proceso de extracción se puede llevar a cabo sobre un polvo seco de hojas de *Nerium oleander* preparadas de acuerdo a un proceso descrito en una Solicitud de Patente de EE.UU. provisional actualmente pendiente con número de serie 60/653.210, presentada el 15 de febrero de 2005 a nombre de Addington, o la Solicitud de Patente de EE.UU. con número de serie 11/340.016 presentada el 26 de enero de 2006 a nombre de Addington, la Solicitud de Patente de EE.UU. con número de serie 11/191.650 presentada el 28 de julio de 2006 (ahora Patente de EE.UU. N° 7.402.325 concedida el 22 de julio de 2008) a nombre de Addington, o la Solicitud de Patente Internacional PCT N° PCT/US06/29061 presentada el 26 de julio de 2006.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "oleandrina" se usa para indicar todas las formas conocidas de la oleandrina, a menos que se especifique lo contrario. La oleandrina puede estar presente en forma racémica, ópticamente pura u ópticamente enriquecida. El material vegetal de *Nerium oleander* puede obtenerse, por ejemplo, a partir de suministradores comerciales de plantas tales como Aldridge Nursery, Atascosa, Texas.

El extracto se puede obtener mediante extracción con fluido supercrítico modificada (por ejemplo, etanol) o sin modificar de una masa vegetal que contiene glicósido cardiaco. El extracto de fluido supercrítico puede comprender al menos un agente farmacológicamente activo que contribuye a la eficacia terapéutica del glicósido cardiaco cuando el extracto se administra a un sujeto. Puede contribuir aditivamente o sinérgicamente a la eficacia terapéutica del glicósido cardiaco.

El extracto se puede preparar mediante varios procesos diferentes. El extracto se puede preparar según el proceso desarrollado por el Dr. Huseyin Ziya Ozel (Patente de EE.UU. N° 5.135.745), que describe un procedimiento para la preparación del extracto de la planta en agua. El extracto acuoso contiene, según informes, varios polisacáridos con pesos moleculares que oscilan entre 2KD y 30 KD, oleandrina y oleandrogenina, odorside y neritaloside. Según se informa, los polisacáridos incluyen homopoligalacturonanos o arabinogalacturonanos ácidos. La Patente de EE.UU. N° 5.869.060 a nombre de Selvaraj et al. describe extractos de agua caliente de especies *Nerium* y los métodos para su producción. A continuación el extracto resultante puede liofilizarse para producir un polvo. La Patente de EE.UU. N° 6.565.897 (Publicación Pendiente de EE.UU. N° 20020114852 y la Publicación Internacional de PCT N° WO 2000/016793 a nombre de Selvaraj et al.) describe un proceso de extracción en agua caliente para la preparación de un extracto sustancialmente estéril. Erdemoglu et al. (J. Ethnopharmacol. (2003) Nov. 89(1), 123-129) describe resultados para la comparación de extractos acuosos y etanólicos de plantas, que incluyen *Nerium oleander*, en base a sus actividades anti-nociceptivas y anti-inflamatorias. Los extractos de disolvente orgánico de *Nerium oleander* son descritos por Adome et al. (extracto etanólico de Afr. Health), Begum et al. (Phytochemistry (1999) Feb. 50(3), 435-438; extracto metanólico), Zia et al. (extracto J. Ethnopharmacol. (1995) Nov. 49(1), 33-39; extracto metanólico), y Vlasenko et al. (Farmatsiia. (1972) Sept-Oct. 21(5), 46-47; extracto alcohólico). La Publicación de Solicitud de Patente Preconcedida de EE.UU. N° 20040247660 para Singh et al. describe la preparación de una formulación liposomal estabilizada de proteína de oleandrina para uso en el tratamiento de cáncer. La Publicación de Solicitud de Patente Preconcedida de EE.UU. N° 20050026849 a nombre de Singh et al. describe una formulación soluble en agua de oleandrina que contiene una ciclodextrina. La Publicación de Solicitud de Patente Preconcedida de EE.UU. N° 20040082521 a nombre de Singh et al. describe la preparación de formulaciones de nanopartículas estabilizadas de proteína de oleandrina a partir de extracto de agua caliente.

La extracción SCF se puede llevar a cabo en presencia de un modificador en el fluido supercrítico, tal como etanol, para potenciar la extracción de el(los) compuesto(s) de la masa vegetal. Los modificadores generalmente poseen una volatilidad entre la del fluido supercrítico y la del compuesto que va a ser extraído, y deben ser miscibles con el fluido supercrítico. En algunas realizaciones, el modificador es un líquido en condiciones ambientales. A modo de ejemplo, y sin limitación, se puede elegir un modificador del grupo que consiste en etanol, metanol, propanol, acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, etc.

El extracto es una mezcla de compuestos farmacológicamente activos, tales como oleandrina u otros glicósidos cardiacos, oleaside, y otras materias vegetales. El extracto de oleandrina procedente de un proceso de fluido supercrítico contiene en peso un intervalo teórico de entre 0,9% y 2,5% de oleandrina. Se han obtenido extractos de SCF que comprenden una cantidad variable de oleandrina. En una realización, el extracto de SCF comprende aproximadamente un 2% en peso de oleandrina.

Como queda evidenciado por los datos incluidos en la presente memoria, el extracto de SCF comprende una mezcla de varios componentes. Algunos de estos componentes incluyen oleandrina, oleaside A, oleandrogenina, neritaloside, odorside (Wang X, Plomley JB, Newman RA y Cisneros A. LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment, Analytical Chem. 72: 3547-3552, 2000), y otros componentes no identificados. Los componentes extraíbles mediante SCF no identificados del extracto de SCF parecen incluir al menos un componente farmacológicamente activo adicional que contribuye a la eficacia de la oleandrina del extracto de SCF. Es decir, al menos un componente extraíble por SCF adicional actúa aditiva o sinérgicamente con la oleandrina para producir la eficacia observada.

Es posible que los extractos también difieran en su eficacia relativa, según se ha determinado a través de la eficacia frente a varias líneas celulares tumorales. Incluso así, si un glicósido cardiaco está presente en una cantidad o concentración suficientemente elevada en el extracto como para ser capaz de preparar una dosis terapéuticamente relevante, entonces el extracto se considera parte de la invención. La tabla presentada a continuación resume parte de los datos de eficacia relativa correspondientes a tres formas diferentes del glicósido cardiaco oleandrina.

FÁRMACO	Células BRO de melanoma humano (IC <sub>50</sub> , μM)	Células PANC-1 de cáncer pancreático humano (IC <sub>50</sub> , μM)
Oleandrina pura	0,017*	0,01
Extracto en agua caliente, que comprende oleandrina y polisacáridos complejos	0,052	0,03
Extracto en CO <sub>2</sub> supercrítico, que comprende oleandrina y glicósidos cardiacos relacionados	0,007	0,004
*La IC <sub>50</sub> de los compuestos evaluados se presenta como concentraciones micromolares (μM) equivalentes de oleandrina en dichos extractos. Es decir, los datos representan aquella concentración de oleandrina como compuesto químico libre o como parte de un extracto necesaria para inhibir el crecimiento o la proliferación del crecimiento de células tumorales en comparación con células no tratadas en un 50%.		

Tal como se muestra en la tabla anterior, el valor IC<sub>50</sub> del extracto de CO<sub>2</sub> supercrítico es tan solo el 50% de la oleandrina sola tanto en células Panc-1 como BRO, lo que sugiere que el extracto de CO<sub>2</sub> supercrítico de oleander

es al menos dos veces más fuerte (más potente) que la oleandrina sola con respecto a la inhibición del crecimiento de células Panc-1 o BRO. En comparación, el extracto de agua caliente es el menos potente entre las tres entidades evaluadas. Los datos demuestran una potente citotoxicidad contra líneas celulares tumorales humanas por la oleandrina, así como por los extractos con la potencia relativa que se produce como se indica a continuación:

5 extracto de CO<sub>2</sub> supercrítico > oleandrina > extracto de agua caliente. Estos datos implican que la citotoxicidad del extracto de CO<sub>2</sub> supercrítico es debida probablemente a la presencia de al menos otro componente farmacológicamente activo en el extracto de SCF además de la oleandrina, y que la potencia del extracto de CO<sub>2</sub> supercrítico es mucho mayor (7,4 veces más) que la del extracto de agua caliente. Los datos demuestran claramente la mejora sustancial que se produce en la eficacia del extracto de SCF respecto al extracto de agua caliente e incluso sobre la oleandrina sola. La mejora de la eficacia excedió la mejora esperada que podría haberse obtenido en base solo al aumento de concentración de oleandrina en el extracto de SCF.

El glicósido cardíaco se puede formular en cualquier forma de dosis farmacéuticamente aceptable adecuada. Las formas de dosis particularmente útiles son la parenteral, la ótica, la oftálmica, la nasal, la inhalable, la bucal, la sublingual, la enteral, la tópica, la oral, la peroral y la inyectable. Las formas de dosis particulares incluyen formas de dosis sólidas o líquidas. Los ejemplos de formas de dosis adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, grageas, sobres, saquitos y otras formas de dosis similares conocidas por el especialista en la técnica de las ciencias farmacéuticas.

La cantidad de oleandrina incorporada en una dosis unitaria de la invención será al menos una o más formas de dosis y puede seleccionarse de acuerdo a principios conocidos de farmacia. Se contempla específicamente una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente relevante de compuesto terapéutico. Con el término "cantidad efectiva", se entiende que con respecto a, por ejemplo, compuestos farmacéuticos, se contempla una cantidad farmacéuticamente efectiva. Una cantidad farmacéuticamente efectiva es la cantidad de ingrediente activo que es suficiente para obtener la respuesta terapéutica requerida o deseada, o en otras palabras, la cantidad que es suficiente para provocar una respuesta biológica apreciable cuando se administra a un paciente. La respuesta biológica apreciable puede producirse como resultado de la administración de dosis unitarias sencillas o múltiples de una sustancia activa. Una dosis unitaria puede comprender una o más formas de dosis. Debe entenderse que el nivel de dosis específica para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la indicación que está siendo tratada, la gravedad de la indicación, la salud, edad, sexo y peso del paciente, la dieta, la respuesta farmacológica, la forma de dosis específica empleada y otros factores similares.

La dosis deseada para administración oral es de hasta 5 formas de dosis, aunque se pueden administrar desde una hasta diez formas de dosis. Los ejemplos de formas de dosis contienen 0,6 mg del extracto de SCF por forma de dosis, para un total de 0,6 a 60 mg (de 1 a 10 niveles de dosis) por dosis.

El glicósido cardíaco puede estar presente en una forma de dosis en una cantidad suficiente para proporcionar a un sujeto una dosis inicial de oleandrina de entre 12 y 1200 µg, o más o menos.

Para uso en el tratamiento de mamíferos, el glicósido cardíaco puede incluirse en una forma de dosis. Algunas realizaciones de la forma de dosis no son entéricas recubiertas y liberan su carga de glicósido cardíaco en un periodo de entre 0,5 y 1 hora o menos. Algunas formas de dosis son entéricas recubiertas y liberan su carga de cardíaco una vez pasado el estómago, tal como en el yeyuno, el íleo, el intestino delgado y/o el intestino grueso (colon). Las formas de dosis recubiertas entéricamente liberarán glicósidos cardíacos a la circulación sistémica en un plazo de 1-10 h después de la administración oral.

En base a datos preliminares de dosificación en animales, se anticipa que entre el 50 y el 75% de una dosis administrada de extracto de oleander será biodisponible oralmente proporcionando de 0,25 a 0,4 mg, de 0,1 a 50 mg, de 0,1 a 40 mg, de 0,2 a 40 mg, de 0,2 a 30 mg, de 0,2 a 20 mg, de 0,2 a 10 mg, de 0,2 a 5 mg, de 0,2 a 2,5 mg, de 0,2 a 2 mg, de 0,2 a 1,5 mg, de 0,2 a 1 mg, de 0,2 a 0,8 mg, de 0,2 a 0,7 mg o de 0,25 a 0,5 mg de oleandrina por forma de dosis. Para un volumen promedio de sangre en humanos adultos de 5 litros, la concentración anticipada de oleandrina en plasma estará en el intervalo de 0,05 a 2 ng/mL, de 0,005 a 10 ng/mL, de 0,005 a 8 ng/mL, de 0,01 a 7 ng/mL, de 0,02 a 7 ng/mL, de 0,03 a 6 ng/mL, de 0,04 a 5 ng/mL o de 0,05 a 2,5 ng/mL. La dosis diaria recomendada de oleandrina, presente en el extracto de SCF, generalmente está entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 50 mg dos veces al día ó entre aproximadamente 0,9 y 5 mg dos veces al día o aproximadamente cada 12 horas. La dosis puede estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 100 mg/día, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 80 mg/día, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 60 mg/día, entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 40 mg/día. La dosis máxima tolerada puede ser aproximadamente de 100 mg/día, aproximadamente 80 mg/día, aproximadamente 60 mg/día, aproximadamente 40 mg/día, aproximadamente 38,4 mg/día o aproximadamente 30 mg/día de extracto de oleander que contiene oleandrina, y la dosis efectiva mínima puede ser de aproximadamente 0,5 mg/día, aproximadamente 1 mg/día, aproximadamente 1,5 mg/día, aproximadamente 1,8 mg/día, aproximadamente 2 mg/día o aproximadamente 5 mg/día.

Un kit o composición como los descritos pueden incluir cualquier excipiente adecuado para uso analítico o farmacéutico.

Cabe destacar que un compuesto de la presente memoria podría poseer una o más funciones en la formulación de la invención. Por ejemplo, un compuesto podría servir como tensioactivo y disolvente miscible con agua, o como tensioactivo y disolvente inmiscible con agua.

5 Una composición líquida puede comprender uno o más vehículos líquidos farmacéuticamente o analíticamente aceptables. El vehículo líquido puede ser un vehículo acuoso, no acuoso, polar, no polar y/u orgánico. Los vehículos líquidos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, un disolvente miscible con agua, un disolvente inmiscible con agua, agua, un tampón y mezclas de los mismos.

10 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “disolvente soluble en agua” o “disolvente miscible con agua”, expresiones que se usan de manera intercambiable, se refieren a un líquido orgánico que no forma una mezcla bifásica con agua o es suficientemente soluble en agua para proporcionar una mezcla de disolvente acuoso que contiene al menos un cinco por ciento de disolvente sin separación de fases líquidas. El disolvente es adecuado para administración a humanos o animales. Los ejemplos de disolventes solubles en agua incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, PEG (poli(etilen glicol)), PEG 400 (poli(etilen glicol que tiene un peso molecular aproximado de aproximadamente 400), etanol, acetona, alcanol, alcohol, éter, propilen glicol, glicerina, triacetín, poli(propilen glicol), PVP (poli(vinil pirrolidona)), dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida, formamida, N,N-dimetilacetamida, piridina, propanol, N-metilacetamida, butanol, soluphor (2-pirrolidona), pharماسolve (N-metil-2-pirrolidona).

20 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “disolvente insoluble en agua” o “disolvente inmiscible con agua”, expresiones que se usan de manera intercambiable, se refieren a un líquido orgánico que forma una mezcla bifásica con agua o proporciona una separación de fases cuando la concentración de disolvente en agua excede el cinco por ciento. El disolvente es adecuado para administración a humanos o animales. Los ejemplos de disolventes insolubles en agua incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, triglicéridos de cadena media/larga, aceite de ricino, aceite de maíz, vitamina E, derivados de vitamina E, ácido oleico, ácidos grasos, aceite de oliva, softisan 645 (estearato adipato de Caprilato Diglicerilo / Caprato / Estearato / Hidróxido), miglyol, captex (Captex 350: Tricaprilato de Glicerilo / Caprato / triglicérido de Laurato; Captex 355: Tricaprilato de Glicerilo / triglicérido de Caprato; Captex 355 EP / NF: Tricaprilato de Glicerilo / triglicérido de cadena media de Caprato).

30 Los disolventes adecuados se enumeran en "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidance for industry Q3C Impurities: Residual Solvents" (1997), que hace recomendaciones sobre las cantidades de disolventes residuales que se consideran seguras en compuestos farmacéuticos. Los ejemplos de disolventes se presentan como disolventes de clase 2 ó de clase 3. Los disolventes de clase 3 incluyen, por ejemplo, ácido acético, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, terc-butilmetil éter, cumeno, etanol, etil éter, acetato de etilo, formiato de etilo, ácido fórmico, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, metil-1-butanol, metiletil cetona, metilisobutil cetona, 2-metil-1-propanol, pentano, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol o acetato de propilo.

35 Otros materiales que pueden usarse como disolventes inmiscibles con agua en la invención incluyen: Captex 100: Dicaprato de Propilen Glicol; Captex 200: Dicaprato / Dicaprato de Propilen Glicol; Captex 200 P: Dicaprato / Dicaprato de Propilen Glicol; *Dicaprilocaprato de Propilen Glicol*; Captex 300: Tricaprilato / Caprato de Glicerilo; Captex 300 EP / NF: Triglicéridos de Cadena Media de Tricaprilato / Caprato de Glicerol; Captex 350: Tricaprilato / Caprato / Laurato de Glicerilo; Captex 355: Tricaprilato / Caprato de Glicerilo; Captex 355 EP / NF: Triglicéridos de Cadena Media de Tricaprilato / Caprato de Glicerilo; Captex 500: Triacetín (Grado farmacéutico); Captex 800: Propilen Glicol Di (2-Etilhexanoato); Captex 810 D: Tricaprilato / Caprato / Linoleato de Glicerilo; Captex 1000: Tricaprato de Glicerilo; Captex CA: Triglicéridos de Cadena Media; Captex MCT-170: Triglicéridos de Cadena Media; Capmul GMO: Monooleato de Glicerilo; Capmul GMO-50 EP/NF: Monooleato de Glicerilo; Capmul MCM: Mono y Diglicéridos de Cadena Media; Capmul MCM C8: Monocaprato de Glicerilo; Capmul MCM C10: Monocaprato de Glicerilo; Capmul PG-8: Monocaprato de Propilen Glicol; Capmul PG-12: Monolaurato de Propilen Glicol; Caprol 10G100: Decaoleato de Decaglicerol; Caprol 3GO: Monooleato de Triglicerol; Caprol ET: Éster de Poliglicerol de Ácidos Grasos Mixtos; Caprol MPO: Dioleato de Hexaglicerol; Caprol PGE 860: Mono-, Dioleato de Decaglicerol.

50 Tal como se usa en la presente memoria, un “tensioactivo” se refiere a un compuesto que comprende restos hidrofílicos polares o cargados así como restos hidrofóbicos (lipofílicos) no polares; es decir, un tensioactivo es anfifílico. El término tensioactivo se puede referir a un compuesto o a una mezcla de compuestos. Un tensioactivo puede ser un agente solubilizante, un agente emulsionante o un agente dispersante. Un tensioactivo puede ser hidrofílico o hidrofóbico.

55 El tensioactivo hidrofílico puede ser cualquier tensioactivo hidrofílico adecuado para uso en composiciones farmacéuticas. Dichos tensioactivos pueden ser tensioactivos hidrofílicos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos, aunque actualmente se prefieren los tensioactivos hidrofílicos no iónicos. Tal como se ha discutido anteriormente, dichos tensioactivos hidrofílicos no iónicos generalmente presentarán valores de HLB superiores a aproximadamente 10. Las mezclas de tensioactivos hidrofílicos también quedan dentro del alcance de la invención.

De forma similar, el tensioactivo hidrofóbico puede ser cualquier tensioactivo hidrofóbico adecuado para uso en composiciones farmacéuticas. En general, los tensioactivos hidrofóbicos adecuados presentarán un valor de HLB inferior a aproximadamente 10. Las mezclas de tensioactivos hidrofóbicos también quedan dentro del alcance de la



invención.

Los ejemplos de solubilizante adecuado adicional incluyen: alcoholes y polioles, tales como etanol, isopropanol, butano, alcohol bencílico, etilen glicol, propilen glicol, butanodioles e isómeros de los mismos, glicerol, pentaeritritol, sorbitol, manitol, transcitol, dimetil isosorbida, polietilen glicol, polipropilen glicol, polivinilalcohol, hidroxipropil metilcelulosa y otros derivados de celulosa, ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina; éteres de polietilen glicoles que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 200 a aproximadamente 6000, tal como éter de PEG de alcohol tetrahidrofurfurílico (glicofurol, disponible comercialmente en BASF con el nombre comercial Tetraglycol) o metoxi PEG (Union Carbide); amidas, tales como 2-pirrolidona, 2-piperidona, caprolactama, N-alquilpirrolidona, N-hidroxiálquilpirrolidona, N-alquilpiperidona, N-alquil-caprolactama, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona; ésteres, tales como propionato de etilo, tributilcitrato, trietilcitrato de acetilo, citrato de tributilo de acetilo, trietilcitrato, oleato de etilo, caprilato de etilo, butirato de etilo, triacetin, monoacetato de propilen glicol, diacetato de propilen glicol, caprolactona y sus isómeros, valerolactona y sus isómeros, butirolactona y sus isómeros; y otros solubilizantes conocidos en la técnica, tales como dimetil acetamida, dimetil isosorbida (Arlasolve DMI (IC!)), N-metil pirrolidonas (Pharmasolve (ISP)), monooctanoína, dietilen glicol nonoetil éter (disponible en Gattefosse con el nombre comercial Transcutol), y agua. También se describen mezclas de solubilizantes.

Excepto cuando se indique, los compuestos mencionados en la presente memoria se encuentran disponibles fácilmente en suministradores comerciales estándar.

La composición de líquido transparente es transparente visualmente a simple vista, ya que contiene menos de un 5%, menos de un 3% o menos de un 1% en peso de sólidos suspendidos en base al peso total de la composición.

Aunque no es necesario, una composición o kit como los descritos pueden incluir un agente quelante, un conservante, un anti-oxidante, adsorbentes, agente acidificante, agente alcalinizante, agente antiespumante, agente tamponante, colorante, electrolito, sal, estabilizante, modificador de la tonicidad, diluyente, otro excipiente farmacéutico, o una combinación de los mismos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “antioxidante” pretende indicar un agente que inhibe la oxidación y que por tanto se usa para prevenir el deterioro de las preparaciones por procesos oxidativos. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, ácido ascórbico, palmitato ascórbico, Vitamina E, derivado de Vitamina E, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, ascorbato sódico, bisulfito sódico, sulfoxilato de formaldehído sódico, metabisulfito sódico y otros materiales similares conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usan en la presente memoria, el término agente quelante pretende indicar un compuesto que quela iones metálicos en disolución. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen EDTA (etilendiaminotetraacetato tetrasódico), DTPA (dietilenetriaminopentaacetato pentasódico), HEDTA (sal trisódica de ácido N-(hidroxietil)-etilendiaminotriacético), NTA (nitrilotriacetato trisódico), etanoldiglicina disódica ( $\text{Na}_2\text{EDG}$ ), dietanoglicina sódica ( $\text{DEGNa}$ ), ácido cítrico y otros compuestos conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “adsorbente” pretende indicar un agente capaz de retener otras moléculas sobre su superficie a través de medios físicos o químicos (quimisorción). Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, carbón vegetal en polvo y activado y otros materiales conocidos por el especialista en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “agente alcalinizante” pretende indicar un compuesto usado para proporcionar un medio alcalino. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, disolución de amoníaco, carbonato amónico, dietanolamina, monoetanolamina, hidróxido potásico, borato sódico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, hidróxido sódico, trietanolamina y trolamina, y otros conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “agente acidificante” pretende indicar un compuesto usado para proporcionar un medio ácido. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, ácido acético, aminoácidos, ácido cítrico, ácido fumárico y otros ácidos alfa-hidroxi, ácido clorhídrico, ácido ascórbico y ácido nítrico, y otros conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “agente antiespumante” pretende indicar un compuesto, o compuestos, que previene o reduce la cantidad de espuma que se forma sobre la superficie de la composición de relleno. Los agentes antiespumantes adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, dimethicone, SIMETHICONE, octoxynol y otros conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “agente tamponante” pretende indicar un compuesto usado para resistir un cambio de pH al diluir o añadir un ácido o un álcali. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, metafosfato potásico, fosfato potásico, acetato sódico monobásico y citrato sódico anhidro y deshidratado, y otros materiales conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “diluyente” o “relleno” pretende indicar sustancias inertes

usadas como rellenos para crear la masa deseada, las propiedades de fluidez deseadas y las características de compresión deseadas en la preparación de comprimidos y cápsulas. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, fosfato cálcico dibásico, caolín, lactosa, sacarosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, carbonato cálcico precipitado, sorbitol y almidón, y otros materiales conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “conservante” pretende indicar un compuesto usado para prevenir el crecimiento de microorganismos. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol de feniletilo, nitrato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico, thimerosal, metacresol, cloruro de miristilgamma picolinio, benzoato potásico, sorbato potásico, benzoato sódico, propionato sódico, ácido sórbico, thymol, y parabenos de metilo, etilo, propilo o butilo, y otros conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “colorante” pretende indicar un compuesto usado para conferir color a preparaciones farmacéuticas. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, Rojo FD&C N° 3, Rojo FD&C N° 20, Amarillo FD&C N° 6, Azul FD&C N° 2, Verde FD&C N° 5, Naranja FD&C N°5, Rojo FD&C N° 8, caramelo y óxido de hierro (negro, rojo, amarillo), otros colorantes FD&C y agentes colorantes naturales tales como extracto de piel de uva, polvo rojo de remolacha, beta-caroteno, annato, carmín, cúrcuma, pimentón, combinaciones de los mismos y otros materiales similares conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “estabilizante” pretende indicar un compuesto usado para estabilizar un agente activo frente a procesos físicos, químicos o bioquímicos que de otro modo reducirían la actividad terapéutica del agente. Los estabilizantes adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, albúmina, ácido siálico, creatinina, glicina y otros aminoácidos, niacinamida, acetiltriptofonato sódico, óxido de cinc, sacarosa, glucosa, lactosa, sorbitol, manitol, glicerol, polietilen glicoles, caprilato sódico y sacarina sódica, y otros conocidos por los especialistas en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “modificador de tonicidad” pretende indicar un compuesto, o compuestos, que puede usarse para ajustar la tonicidad de la formulación líquida. Los modificadores de tonicidad adecuados incluyen glicerina, lactosa, manitol, dextrosa, cloruro sódico, sulfato sódico, sorbitol, trehalosa y otros conocidos por los especialistas en la técnica.

Los Ejemplos 3 y 6 describen un ejemplo de forma de dosis en cápsulas. El Ejemplo 12 describe un ejemplo de forma de dosis en comprimidos.

La composición descrita también puede incluir aceites tales como aceites fijos, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva; ácidos grasos tales como ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico; y ésteres de ácido graso tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácido graso y glicéridos de ácido graso acetilado. La composición también puede incluir alcoholes tales como etanol, isopropanol, alcohol de hexadecilo, glicerol y propilen glicol; cetales de glicerol tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol; éteres tales como poli(etilen glicol) 450; hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y petrolato; agua; un tensioactivo farmacéuticamente adecuado, un agente de suspensión o un agente de emulsión; o mezclas de los mismos.

Debería entenderse que los compuestos usados en la técnica de la formulación farmacéutica generalmente cumplen una variedad de funciones o propósitos. Por tanto, si un compuesto mencionado en la presente memoria se menciona solo una vez o se usa para definir más de un término de la presente memoria, no debería entenderse que su propósito o función se limita únicamente a el(los) propósito(s) o función(es) citados.

Uno o más de los componentes de la formulación pueden estar presentes en su forma de base libre o en forma de sal farmacéutica o analíticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, “sal farmacéutica o analíticamente aceptable” se refiere a un compuesto que ha sido modificado haciéndolo reaccionar con un ácido según sea necesario para formar un par ligado iónicamente. Los ejemplos de sales aceptables incluyen las sales convencionales no tóxicas formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales no tóxicas adecuadas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfónico, sulfámico, fosfórico, nítrico y otros conocidos por los especialistas en la técnica. Las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como aminoácidos, acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, y otros conocidos por los especialistas en la técnica. Se pueden encontrar listas de otras sales adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, página 1418.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que, dentro del alcance del juicio médico sensato, son adecuados para uso en contacto con tejidos de seres humanos y animales y sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, o cualquier otro problema o complicación, unido a una relación beneficio/riesgo razonable.

En vista de la anterior descripción y de los ejemplos mostrados a continuación, el especialista en la técnica será

capaz de llevar a la práctica la invención tal cual se reivindica sin realizar experimentación innecesaria. Lo presentado a continuación se entenderá mejor en referencia a los siguientes ejemplos que detallan determinados procedimientos para la preparación de realizaciones de la presente invención. Todas las referencias hechas a dichos ejemplos tienen fines ilustrativos. Los siguientes ejemplos no deberían considerarse exhaustivos, sino meramente ilustrativos solo de algunas de las múltiples realizaciones contempladas por la presente invención.

La oleandrina y el MTT son adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). BODIPY-oleandrina, Mito-Tracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos, éster de acetoximetilo de calceína (CAM) y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se obtienen de Molecular Probes-Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). El anticuerpo anti- $\beta$ -actina también se adquirió en Sigma.

Las células de cáncer pancreático humano: Panc-1, BxPC3, MiaPaca; las líneas de células de cáncer de colon humano: CaCO-2, DOD-1, HCT-116, HT29, RKO y LST174; las células B16 de melanoma de roedor; las células de cáncer de mama humano: SUM 149, MCF-7 y MDA231; las células de cáncer oral humano: SCC9 y CAL-27; y las células de cáncer de ovario humano ES3, TOV 1120 y SKOV, y las células A549 y H1299 de cáncer de pulmón de célula no pequeña humano se obtienen en el American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantienen en una atmósfera humidificada que contiene un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células BRO de melanoma humano fueron obsequio de la Stehlin Foundation (Houston, TX). Las líneas celulares derivadas de diferentes orígenes epiteliales se cultivan rutinariamente en medio de cultivo de tejido (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) (Tabla 1) suplementadas con un 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado térmicamente (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), 50 IU/mL de penicilina y 50  $\mu$ g/mL de estreptomina, y L-glutamina 2 mM de GIBCO (Invitrogen).

### Ejemplo Comparativo 1

Extracción en fluido supercrítico de hojas de oleander en polvo

*Método A. Con dióxido de carbono.*

Las hojas de oleander en polvo fueron preparadas recolectando, lavando y secando material de hojas de oleander, a continuación haciendo pasar el material de hojas de oleander a través de un aparato de trituración y deshidratación tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 5.236.132, 5.598.979, 6.517.015 y 6.715.705. El peso de material de partida usado fue de 3,94 kg.

El material de partida se combinó con CO<sub>2</sub> puro a una presión de 300 bar (30 MPa, 4351 psi) y a una temperatura de 50°C (122°F) en un dispositivo extractor. Se usaron un total de 197 kg de CO<sub>2</sub>, para proporcionar una relación de disolvente a materia prima de 50:1. La mezcla de CO<sub>2</sub> y la materia prima se hizo pasar entonces a través de un dispositivo separador, lo que cambió la presión y la temperatura de la mezcla y separó el extracto del dióxido de carbono.

El extracto (65 g) se obtuvo en forma de material marrónáceo, pegajoso y viscoso que tiene una fragancia agradable. Probablemente el color se debía a la clorofila. Para una determinación exacta del rendimiento, los tubos y el separador fueron enjuagados con acetona y la acetona se evaporó para producir una adición de 9 g de extracto. La cantidad total de extracto fue de 74 g. En base al peso de material de partida, el rendimiento de extracto fue de 1,88%. El contenido de oleandrina en el extracto se calculó usando cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas para dar un valor de 560,1 mg, o un rendimiento de 0,76%.

*Método B. Con mezcla de dióxido de carbono y etanol*

Las hojas de oleander en polvo fueron preparadas recolectando, lavando y secando material de hojas de oleander, a continuación haciendo pasar el material de hojas de oleander a través de un aparato de trituración y deshidratación tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 5.236.132, 5.598.979, 6.517.015 y 6.715.705. El peso de material de partida usado fue de 3,85 kg.

El material de partida se combinó con CO<sub>2</sub> puro y un 5% de etanol como modificante a una presión de 280 bar (28 MPa, 4061 psi) y a una temperatura de 50°C (122°F) en un dispositivo extractor. Se usaron un total de 160 kg de CO<sub>2</sub> y 8 kg de etanol para proporcionar una relación de disolvente a materia prima de 43,6:1. La mezcla de CO<sub>2</sub>, etanol y materia prima se hizo pasar entonces a través de un dispositivo separador, lo que cambió la presión y la temperatura de la mezcla y separó el extracto del dióxido de carbono.

El extracto (207 g) se obtuvo tras la eliminación del etanol en forma de una masa viscosa verde oscura y pegajosa que obviamente contenía algo de clorofila. En base al peso de material de partida, el rendimiento de extracto fue de 5,38%. El contenido de oleandrina en el extracto se calculó usando cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas para dar un valor de 1,89 g, o un rendimiento de 2,1%.

### Ejemplo Comparativo 2

Extracción en agua caliente de hojas de oleander en polvo

Normalmente la extracción en agua caliente se usa para extraer oleandrina y otros componentes activos de hojas de oleander. Ejemplos de procesos de extracción en agua caliente pueden encontrarse en las Patentes de EE.UU. N°

5.135.745 y 5.869.060.

Se llevó a cabo una extracción con agua caliente usando 5 g de hojas de oleander en polvo. Se añadieron diez volúmenes de agua hirviendo (en peso respecto al material de partida de oleander) a las hojas de oleander en polvo y la mezcla se agitó constantemente durante 6 horas. A continuación la mezcla se filtró y se recogió el residuo de hoja y se volvió a extraer en las mismas condiciones. Los filtrados fueron combinados y liofilizados. La apariencia del extracto era marrón. El material del extracto seco pesó aproximadamente 1,44 g. Se disolvieron 34,21 mg del material de extracto en agua y se sometieron a análisis del contenido de oleandrina usando cromatografía de líquidos de alta presión y espectrometría de masas. Se determinó que la cantidad de oleandrina era de 3,68 mg. El rendimiento a oleandrina, en base a la cantidad de extracto, se calculó en 0,26%. La tabla presentada a continuación muestra una comparación entre los rendimientos de oleandrina para las dos extracciones con dióxido de carbono supercrítico del Ejemplo 1 y la extracción con agua caliente.

#### Comparación de Rendimientos

Medio de extracción	Rendimiento de oleandrina referido al peso total de extracto
Dióxido de carbono supercrítico: Ejemplo 1, Método A	0,76%
Dióxido de carbono supercrítico: Ejemplo 1, Método B	2,1%
Extracción con agua caliente: Ejemplo 2	0,26%

#### Ejemplo 3

Líneas celulares

Las células de cáncer pancreático humano: Panc-1, BxPC3, MiaPaca; las líneas de células de cáncer de colon humano: CaCO-2, DOD-1, HCT-116, HT29, RKO y LST174; las células B16 de melanoma de roedor; las células de cáncer de mama humano: SUM 149, MCF-7 y MDA231; las células de cáncer oral humano: SCC9 y CAL-27; las células de cáncer de ovario humano ES3, TOV 1120 y SKOV, y las células A549 y H1299 de cáncer de pulmón de célula no pequeña humano se obtienen en el American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantienen en una atmósfera humidificada que contiene un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células BRO de melanoma humano fueron obsequio de la Stehlin Foundation (Houston, TX). Las líneas celulares derivadas de diferentes orígenes epiteliales se cultivan rutinariamente en medio de cultivo de tejido (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) (Tabla 1) suplementadas con un 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado térmicamente (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), 50 IU/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin, y L-glutamina 2 mM de GIBCO (Invitrogen).

#### Ejemplo 4

*Determinación in vitro de la citotoxicidad.*

Las células fueron cultivadas en sus medios relevantes como se indica en la tabla presentada a continuación con una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo. Después de un periodo de incubación de 24 h, las células fueron tratadas con concentraciones diversas de oleandrina (entre 1 y 500 nM). Después de otras 72 h se determinó la inhibición de la proliferación celular mediante un ensayo MTT (23). Se registró la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y con una longitud de onda de referencia de 650 nm usando un Lector de Micro-placas V-Max de Molecular Devices, Inc. (Sunnyvale, CA). La extensión relativa de la inhibición de la proliferación celular debida a la presencia de una concentración dada de extracto de oleander o de otro extracto de planta que contiene un(os) compuesto(s) de glicósido cardiaco se puede derivar comparando el número de células tratadas y no tratadas después de un periodo de tiempo establecido para permitir el crecimiento celular (por ejemplo, 24-72 h).

Nombre de las células	Descripción de fenotipo	Medio de cultivo celular
PANC-1	Carcinoma pancreático humano	DMEM /10% FBS
BXPC3	Adenocarcinoma pancreático humano	RPMI 164/10% FBS/piruvato sódico (NaP)
MiaPaca	Adenocarcinoma pancreático humano	DMEM/ 10% FBS/2% suero equino
MDA 231	Cáncer de mama	DMEM/ 10% FBS
SUM 149	Cáncer de mama	F12/ 5% FBS/ HEPES/ insulina/ hidrocortisona
CaCO2	Carcinoma de colon	RPMI 1640 / 10% FBS
DOD-1	Carcinoma de colon	RPMI 1640 / 10% FBS

Nombre de las células	Descripción de fenotipo	Medio de cultivo celular
HCT 116	Carcinoma de colon	RPMI 1640 / 10% FBS
HT 29	Carcinoma de colon	RPMI 1640 / 10% FBS
LIS-174t	Carcinoma de colon	MEM / 10% FBS/ NaP/ NEAA
BRO	Leucemia linfoblástica aguda	MEM / 10% FBS/ NaP
SCC-9	Carcinoma de células escamosas de la boca	DMEM/ 10% FBS
CAL27	Carcinoma de células escamosas de la boca	DMEM/ 10% FBS
MCF-7	Cáncer de mama	MEM / 10% FBS /insulina/ hidrocortisona/ EGF

Nota: DMEM = Medio Eagle's Modificado de Dulbecco; MEM = Medio Esencial Mínimo; FBS = Suero bovino fetal; NEAA = aminoácidos no esenciales; EGF = factor de crecimiento epidérmico.

### Ejemplo 5

Determinación de la captación celular de glicósidos cardiacos

Se determinó la captación de oleandrina y ouabaína en células Panc-1 (la mayor relación de isoformas  $\alpha 3:\alpha 1$ ) y células BxPC3 (la menor relación  $\alpha 3:\alpha 1$ ) después de tratamiento con BODYPI-oleandrina, un análogo fluorescente de la oleandrina, mediante microscopía de fluorescencia. Se trataron las células en placas de 96 pocillos con oleandrina 0, 5, 20 y 50 nM durante 2h ó 24h. Los tratamientos se llevaron a cabo en suero fetal bovino de ternero al 0,5% en medio DMEM/F12. Las células fueron incubadas simultáneamente con Mito Tracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos (1  $\mu$ M), y DAPI (1 ng/mL), un colorante nuclear selectivo (Molecular Probes). La morfología nuclear, el ADN y la captación de colorante en mitocondrias fueron determinados mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio invertido Olympus IX-70. La adquisición de imágenes se consiguió usando una cámara de dispositivo acoplado cargado Quantix y el software IP Labs (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA). La alteración de la captación de oleandrina en células naturales y Panc-1 transfectadas con ARNsi de  $\alpha 3$  se determinó en células cultivadas sobre cubreobjetos recubiertos de laminina y tratados con BODIPY-oleandrina durante 1 h.

### Ejemplo 6

15 Determinación de la expresión de isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa

Las células fueron lavadas con PBS frío y rascadas para liberarlas de la presencia de tampón de lisis (MOPS 20 mM, EGTA 2 mM, EDTA 5 mM, NaF 30 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 40 mM, piruvato sódico 20 mM, Triton X-100 al 0,5% y ortovanadato sódico 1 mM con un cóctel inhibidor de proteasa). A continuación los lisatos celulares fueron sometidos a ultrasonidos en hielo durante 3 minutos, se incubaron durante otros 10 minutos a 4 °C antes de centrifugarse a 14.000 X g (10 min a 4°C). Se cuantificaron los niveles de proteínas mediante el ensayo de proteína BioRad Dc (BioRad, Inc., Hercules, CA). Se aplicaron niveles iguales de proteína (50  $\mu$ g) a geles premoldeados (BioRad) y a continuación se transfirieron sobre membranas de difluoruro de polivinilideno, según los métodos estándares. Después de un periodo de incubación de 1 a 2 h en tampón bloqueante de leche seca sin grasa preparado en disolución salina tamponada con Tris con un 0,1% de Tween 20, se sondearon las membranas con anticuerpos primarios de las isoformas  $\alpha 3$  (Affinity Bioreagents, Golden, CO) y  $\alpha 1$  (Upstate, Lake Placid, NY) diluidas 1:2.000 en tampón de bloqueo. Se visualizaron las bandas de proteínas mediante quimioluminiscencia usando el kit de detección ECL+ y hyper-film (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se utilizó una carga igual de muestra para análisis de Western blot a fin de determinar la presencia de  $\beta$ -actina. Se cuantificaron las bandas de proteínas usando el software Alpha DigiDoc 1000 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

### 30 Ejemplo Comparativo 7

Tratamiento de enfermedades relacionadas con la piel, tales como cánceres que incluyen, aunque sin limitación, la prevención del tratamiento de melanoma, carcinoma de célula basal y carcinoma de célula escamosa, así como enfermedades cutáneas inflamatorias no cancerosas, que incluyen, aunque sin limitación, queratosis actínica, soriasis y eczema.

35 El extracto de SCF se administra a un sujeto que padece una enfermedad cutánea proliferativa maligna o no maligna, tal como las citadas anteriormente. El extracto de SCF se administra en forma de crema o ungüento, o contenida en un parche dérmico que contiene entre 0,01 y 10 mg de extracto de SCF por dosis unitaria. Se administra al sujeto una dosis unitaria de hasta tres veces al día durante un periodo de 1 a 14 días o hasta que las enfermedades cutáneas entran en remisión. Es de esperar que dicho tratamiento alivie significativamente o elimine la inflamación y los procesos malignos que conducen a una progresión de la enfermedad. El sujeto debería

experimentar una reducción de la gravedad de la(s) lesión(es) dérmica(s) y la eventual resolución de la propia enfermedad dermatológica. Debería esperarse que las enfermedades malignas sean reducidas en velocidad de crecimiento o sean inhibidas frente a un aumento de la gravedad de la enfermedad. Se puede esperar una regresión real de lesiones malignas establecidas.

### 5 Ejemplo Comparativo 8

Prevención de enfermedades relacionadas con la piel tal como cánceres cutáneos

El extracto de SCF se administra a un sujeto que padece una predisposición a la formación de un cáncer de piel tal como los expuestos frecuentemente a radiación ultravioleta (de luz solar) o carcinógenos de compuestos químicos. El extracto de SCF se administra como una crema o un ungüento o está contenido en un parche dérmico que contiene entre 0,01 y 10 mg de extracto de SCF por dosis unitaria. El sujeto es administrado con una dosis unitaria hasta tres veces al día cada vez que se anticipa una exposición a un evento promotor de carcinógeno (exposición a luz solar). Dicha administración podría realizarse, por ejemplo, como un protector solar para bloquear la exposición a los UV de la luz solar y el extracto de SCF para la prevención de la inducción de tumores en el tejido dérmico. Cabría esperar que dicho uso de SCE en un producto dérmico bloqueara la formación y/o la promoción de una enfermedad cutánea maligna o de trastornos cutáneos no malignos, donde la proliferación conduce a un empeoramiento del proceso de enfermedad (por ejemplo, queratosis actínica, soriasis y/o eczema).

### Ejemplo Comparativo 9

Tratamiento de tumores sólidos en humanos y otros animales vertebrados.

El extracto de SCF de plantas o animales que contiene glicósidos cardíacos puede usarse para tratar cánceres del recto, el ano, tejidos colorrectales, tejidos de cabeza y cuello, tejido esofágico, pulmón (carcinomas tanto de célula no pequeña como de célula pequeña), mama, estómago, páncreas, próstata, hígado, riñón, vejiga, uréter, tejido ovárico, tumores carcinoides, sarcomas de hueso, mesotelioma y neoplasmas del sistema nervioso central.

Se administra el extracto de SCF a un sujeto que padece enfermedades malignas sólidas tales como las mencionadas anteriormente. El extracto de SCF se administró como forma de dosis oral que contiene entre 1 y 50 mg de extracto de SCF por unidad de dosis. Se administra a un sujeto una dosis unitaria de hasta dos veces al día durante un periodo de 28 días/ciclo de tratamiento. Pueden requerirse hasta tres ciclos de tratamiento. El sujeto debería experimentar que el crecimiento tumoral frena su velocidad de proliferación o retrocede. Se puede producir la completa resolución del tumor. La terapia con extracto de SCF puede usarse como agente único o combinada con quimioterapia citotóxica o tratamiento con radiación, o puede combinarse con una inmunoterapia apropiada sin provocar una interferencia innecesaria con el efecto antitumoral deseado de la terapia convencional.

### Ejemplo 10

Comparación de citotoxicidad de extracto de agua caliente de *Nerium oleander* con un extracto de SCF preparado usando CO<sub>2</sub> supercrítico en dos líneas celulares tumorales humanas.

El potencial citotóxico de ambos extractos se compara directamente con el de la oleandrina. Las muestras contenían las mismas cantidades de oleandrina incluso aunque su concentración de oleandrina difería debido a la concentración de oleandrina presente en los extractos.

Se llevaron a placa células BRO (melanoma humano) y Panc-1 (cáncer pancreático humano) (8 x 10<sup>3</sup>/pocillo) en una placa de 96 pocillos y se dejó unir durante una noche. A continuación se añadió el fármaco o los extractos a las células. Después de 72 h de incubación, se determinó la proliferación celular (referida a células de control no tratadas) mediante el método de tinción de violeta cristal.

### Ejemplo 11

Análisis HPLC de disoluciones que contienen oleandrina

Las muestras (patrón de oleandrina, extracto de SCF y extracto de agua caliente) fueron analizadas en HPLC (Waters) usando las siguientes condiciones: columna C18 Symmetry (5,0 µm, 150 x 4,6 mm D.I.; Waters); fase móvil de MeOH:agua = 54:46 (v/v) y caudal 1,0 mL/min. La longitud de onda de detección se fijó a 217 nm. Las muestras se prepararon disolviendo el compuesto o extracto en una cantidad fija de disolvente de HPLC para lograr una concentración objetivo de oleandrina aproximada.

### Ejemplo 12

Evaluación de la actividad anti-vírica de un extracto de SCF

El ensayo consiste en determinar la capacidad relativa del extracto de oleander o de un control positivo (AZT) para inhibir la proliferación de tinción ROJO de VIH-1 en células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMCs). Las células infectadas son expuestas al fármaco o al extracto durante 48 h. El ensayo se usa para

determinar la IC<sub>50</sub> del extracto de oleander (la concentración de extracto que produce un 50% de inhibición de proliferación vírica) frente a la concentración de extracto capaz de matar las PBMC humanas. De hecho, se trata de una determinación del índice terapéutico del extracto. Esencialmente se trata de determinar si el extracto puede matar al VIH-1 sin matar a la propia célula PBMC o no.

- 5 Se debería observar una IC<sub>50</sub> contra la proliferación vírica de aproximadamente 5,0 µg/mL o menos, mientras que la concentración requerida para matar células no debería haberse alcanzado ni siquiera para concentraciones tan elevadas como 100 µg/mL. Los datos obtenidos sugieren que el extracto de oleander debería ser útil en términos de inhibir la proliferación vírica del VIH-1 o la capacidad de infección del virus alojado en las células PBMC.

**Ejemplo 13**

- 10 Transfección de células Panc-1 con ARNsi de α3

Las células Panc-1 fueron llevadas a placa en placas de 6 y 48 pocillos y se dejaron unir durante una noche. La transfección temporal de moléculas de ARNsi de α3 se llevó a cabo usando el Agente de Transfección de Amina siPORTTM (Ambion, Austin, TX) y ARN silenciador de α3 0,4 µM (Santa Cruz Biotech.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron tratadas con oleandrina entre 10 y 15 50 nM durante 48 h. Se recolectó la proteína de las placas de 6 pocillos para análisis Western blot y se llevó a cabo la determinación de la viabilidad mediante tinción Calcién AM.

**Ejemplo 14**

Determinación de la expresión de α3 y α1 en tejidos de biopsia normales y de colon

- 20 Se obtuvieron biopsias de tejidos tumorales y mucosas de colon normales congelados repentinamente y se pulverizaron usando un mortero enfriado en nitrógeno líquido. Las muestras fueron expuestas a tampón de lisis como se ha indicado anteriormente. A continuación los lisatos fueron sometidos a ultrasonidos en hielo durante 34 minutos, incubados a 4 °C durante 10 minutos y centrifugados a 14.000 rpm (10 min a 4 °C) seguido del análisis de Western blot de las isoformas α3 y α1 de la subunidad α como se ha descrito previamente.

**Ejemplo 15**

- 25 Análisis estadístico

Se usó el test *t* de Student para determinar las diferencias estadísticas entre varios grupos experimentales; se consideró que un valor de *P*<0,05 era significativo.

**Ejemplo 16**

Determinación de la sensibilidad de anticuerpo de α3

- 30 Para comparar la sensibilidad de los diferentes anticuerpos de α3, se cargaron cantidades iguales de los mismos lisatos de muestras de control positivas y negativas en 3 geles premoldeados (BioRad, Inc., Hercules, CA) y a continuación se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno, según métodos estándares. Después de 1-2 h de incubación en tampón de bloqueo de leche seca sin grasa al 5% en disolución salina tamponada con Tris con un 0,1% de Tween 20 (TBS-T), las membranas fueron evaluadas con anticuerpos de α3 de Sigma (St. Louise, MO), 35 de Affinity Bioreagents (Golden, CO) y de Novus (Littleton, CO), cada una a una dilución de 1:2000 en tampón de bloqueo. Se visualizaron las bandas de proteína mediante quimioluminiscencia, usando el kit de detección Chemiglow West y Alpha Imager (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). Las bandas de proteína fueron cuantificadas y comparadas entre los tres anticuerpos, usando software Alpha DigiDoc 1000 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). Se ilustró una carga igual de muestras mediante análisis de Western Blot para β-Actina. Los 40 datos indican que la sensibilidad de todos los anticuerpos seleccionados de α3 es sustancialmente la misma.

Fuente de anticuerpos monoclonales de α3	Densidad media*
Affinity Bioreagents	45174
Novus	41110
Sigma	44572

\*La densidad media se calculó en base a la densidad absoluta de cada banda dividida por el área definida que se cuantifica mediante Alpha DigiDoc 1000.

**Ejemplo 17**

Uso de un kit para llevar a cabo el ensayo pronóstico

Este kit se puede usar de acuerdo al método de la invención para llevar a cabo un ensayo pronóstico usando una

## ES 2 414 057 T3

técnica de Western blot, tal como se detalla en el Ejemplo 18.

### 1. Composición de lisis

	5 mL	De la disolución de reserva concentración de:
Tris HCl 20 mM pH 8,0	100 µL	1 M
NaCl 137 mM	685 µL	1 M
Glicerol al 10%	500 µL	
EDTA 5 mM	25 µL	1 M
NP-40 al 1%	50 µL	
Cóctel Inhibidor de Proteasa (Sigma, N° Cat. P8340)	50 µL	
Ortovanadato de Na 1 mM	50 µL	100 mM
H <sub>2</sub> O	3540 µL	

### 2. Anticuerpos primarios: (1:2000 en disolución de bloqueo)

Alpha 3 (Affinity Bioreagents N° cat. MA3-915)

5 Alpha 1 (Upstate N° cat. 05-369)

### 3. Anticuerpo secundario: IgG HRP anti-ratón de cabra (Santa Cruz N° cat. Sc-2005)

### 4. Preparación de Gel/Membrana:

Geles al 7,5-10% (BioRad Precast)

Tampón de muestra BioRad Laemmli (N° cat. 161-0737)

10 Marcador de peso molecular (N° cat. 161-0318)

Tampón de elución (BioRad 10X Tris/glicina/SDS) (N° cat. 161-0732)

Membranas (BioRad PVDF)

Tampón de transferencia:

	3,03 g	Tris (concentración final – 25 mM)
15	14,4 g	Glicina (concentración final – 0,192 mM)
	200 mL	Metanol (20%)
	hasta 1 L de H <sub>2</sub> O	

### 5. Disolución de bloqueo: 5% de leche en TBS (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM)

### 6. Tampón de lavado: TBS-T (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%)

20 8. Células de control positivo: lisato celular de células Panc-1 de cáncer pancreático

9. Células de control negativo: células B16 de melanoma de ratón

10. Folleto que incluye el protocolo detallado para el análisis Western blot de las isoformas de la subunidad α.

## Ejemplo 18

Preparar muestras de tejido celular

25 *Método A. A partir de pellet de células*

Obtener un pellet de células que contenga entre 2 y 4 millones de células. Enjuagar con disolución fisiológica equilibrada (PBS) para eliminar el medio. Añadir 100 µL de tampón de lisis. Mantener frío (en hielo) en todo momento. Continuar a la etapa de ultrasonidos del Ejemplo 18.

*Método B. A partir de células en placa*



Cultivar entre 1,2 y 1,5 millones de células en placas de cultivo de tejido de 100 mm durante 24 h. Decantar con cuidado y descartar el medio de crecimiento celular. Enjuagar la placa 2 veces con 1 mL de PBS. Añadir 100 µL de tampón de lisis, rascas las células de la placa y recolectar en tubos. Mantener frío (en hielo) en todo momento. Continuar a la etapa de ultrasonidos del Ejemplo 18.

5 *Método C. A partir de tejido*

Moler tejido congelado. Colocar el tejido molido en tubos. Añadir 100 µL de tampón de lisis frío a un mínimo de 5 mg de tejido molido. Mantener frío (en hielo) en todo momento. Continuar a la etapa de ultrasonidos del Ejemplo 18.

**Ejemplo 19**

Determinación del contenido de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  en la muestra mediante Western blot

10 El siguiente procedimiento es meramente un modo en el que se puede emplear el método de la invención para detectar y cuantificar el contenido de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa en una muestra. El orden de las etapas puede modificarse según sea necesario.

*Análisis Western blot*

1. Someter a ultrasonidos el lisato celular a la vez que se enfría, tal como con un baño enfriado con hielo.
- 15 2. Girar el lisato a 4°C durante 10 minutos a 14.000 rpm.
3. Recolectar el sobrenadante –mantener en hielo en todo momento.
4. Determinar los niveles de proteínas mediante el ensayo de proteína. (Véase las indicaciones del BioRad® Protein Assay Kit).
5. Preparar las muestras para cargar en gel en base al ensayo de proteínas (50 µg de proteína por pocillo).
- 20 a. Preparar un lisato de control positivo y negativo junto con las muestras.
  - i. Control positivo: lisato de proteínas de Panc-1
  - ii. Control negativo: lisato de proteínas de B16 ó Panc-2
- b. Añadir tampón de muestra laemmli (LSB) a las muestras y a los controles (véanse las indicaciones de LBS)
- c. Calentar las muestras y los controles a 95°C durante 5 minutos.
- 25 d. Girar las muestras
6. Cargar geles.
7. Eluir el gel a 200 voltios hasta que el colorante avance desde el fondo del gel.
8. Transferir a 100 voltios durante 1-2 horas.
9. Bloquear la membrana entre 30 minutos y 1 h en tampón de bloqueo a temperatura ambiente.
- 30 10. Incubar la membrana durante una noche a 4°C.
11. Lavar la membrana con un tampón de lavado:
  - 3 lavados rápidos, 1 lavado de 15 min, 2 lavados de 10 min
12. Incubar la membrana durante 45 minutos a 1 h en anticuerpo II<sup>o</sup> a temperatura ambiente.
13. Lavar la membrana con tampón de lavado:
  - 35 3 lavados rápidos, 1 lavado de 15 min, 2 lavados de 10 min
14. Incubar la membrana durante 5 minutos en ECL+ (Amersham N<sup>o</sup> cat. RPN2132).
15. Exponer la membrana a película (Amersham N<sup>o</sup> cat. RPN3114k) y desarrollar en la máquina de desarrollo de película.
- 40 16. Captar una imagen de la película expuesta con un sistema de imágenes Alpha Imager, usando el software Alpha Digi Doc (o su sistema de imagen actual).
17. Usando la aplicación Spot Denso de las herramientas de análisis de Alpha Digi Doc, seleccionar las bandas

correspondientes a imágenes de Alfa 1 y Alfa 3.

18. Obtener el Valor de Densidad Integrado (IDV) para cada banda.

19. Calcular la relación de la isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$ .

### Ejemplo 20

5 Método RT-PCR para la determinación de ARNm correspondiente a subunidades alfa específicas de Na, K-ATPasa

Se usó el reactivo RNA STAT-60 (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX) para extraer el ARN total, que fue tratado con ADNasa I antes de su uso en un análisis de reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR). Se transcribió inversamente un microgramo de ARN con virus RT de tumor mamario de ratón (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Se amplificaron secuencias  $\alpha 3$  de 371 pb con el set de cebadores  $\alpha 3$ -NKA3VSAS-2-F 5'-NNNNNNNNNN-3' (directo) y -R 5'-NNNNNNNN-3' (inverso). Estos sets de cebadores y otros fueron diseñados y verificados usando Oligo 6.7 Molecular Biology Insights (Cascade, CO). Se usaron pares de cebadores (5'-CAGCTCTGGAGAACTGCTG-3'; 5'-GTGTACTIONCAGTCTCCACAGA-3') en el análisis de RT-PCR para detectar ARNm de GAPDH.

### Ejemplo Comparativo 21

15 Evaluación clínica de la combinación de un extracto que contiene glicósido cardiaco con otros fármacos anticancerígenos para el tratamiento de gastrinoma pancreático metastásico

Lo siguiente es un caso de historia en la que un paciente que padece gastrinoma pancreático metastásico fue tratado con un extracto que contenía glicósido cardiaco.

Un hombre de sesenta y tres años de edad se presentó en la clínica M.D. Anderson Cancer Center el 30 de agosto de 2002 con la sospecha de una enfermedad pancreática. El Escáner CT reveló una masa en la cola del páncreas. El 17 de septiembre de 2002 el paciente comenzó a auto-administrarse un fármaco experimental que contenía glicósidos cardiacos, principalmente oleandrina. El 9 de octubre de 2002 el paciente fue diagnosticado con un tumor de células de isleta bien diferenciadas en el páncreas. Se recomendó al paciente ocho ciclos de quimioterapia de Adriamicina, estreptozocina y 5-FU, seguidos de tres ciclos de estreptozocina y 5-FU. El 13 de noviembre de 2002, el paciente comenzó la terapia recomendada a la vez que continuaba con la auto-administración del fármaco que contenía oleandrina. El 23 de julio de 2003 el paciente concluyó el régimen recomendado de quimioterapia. No se observó ningún cambio en su diagnosis original. El paciente no recibió quimioterapia a partir del 23 de julio de 2003. El paciente continuó auto-administrándose el extracto que contenía glicósidos cardiacos después de la finalización del régimen de quimioterapia. La última información sobre el paciente, del 16 de febrero de 2007, lo describe con una enfermedad radiológicamente estable. El paciente continúa auto-administrándose el extracto que contiene glicósido cardiaco, tal como oleandrina, y está asintomático presentando un 100% en la escala de Kamofsky.

### Ejemplo Comparativo 22

Evaluación clínica de un extracto que contiene glicósido para el tratamiento de adenocarcinoma

Un hombre de 35 años de edad experimentó dolor y congestión en su abdomen después de ingerir comidas normales. Se presentó a una clínica privada y se le practicó un escáner de tomografía asistida por ordenador (CAT) de abdomen espiral. Entre las conclusiones se observó un incremento volumétrico de la cabeza del páncreas, una heterogeneidad en la densidad de parénquima, y múltiples linfadenopatías en el sitio anterior de la cabeza del páncreas. Un examen mediante imagen de resonancia magnética (MRI) confirmó dichas observaciones. El mismo día se le practicó una biopsia de aspiración de aguja fina asistida por ultrasonidos. El examen de ultrasonidos demostró una masa tumoral de 39 x 33 mm en la cabeza del páncreas. Un examen histopatológico del espécimen biopsiado reveló el diagnóstico de adenocarcinoma. Se recomendó un curso de quimioterapia, pero el paciente lo declinó.

Un mes después, el paciente comenzó a auto-administrarse una terapia de extracto botánico que contenía cantidades muy pequeñas de oleandrina. Las imágenes de RM del abdomen superior obtenidas en el primer mes demostraron una lesión que retenía contraste de 35 x 25 mm en la cabeza del páncreas. También se observaron numerosas linfadenopatías, de las cuales la más grande fue de 5 mm, en el sitio anterior de la cabeza del páncreas y en el sitio posterior de antro del estómago.

Las imágenes de MRI obtenidas tres meses después demostraron que el tumor de la cabeza del páncreas medía 30 x 25 mm. La dosis de extracto que contenía pequeñas cantidades de oleandrina fue aumentada a partir de este momento. Tres semanas después se realizó una centelleografía ósea. No se observó nada destacable para enfermedad metastásica. Las imágenes MRI abdominales superiores e inferiores obtenidas siete semanas después demostraron que la masa tumoral de la cabeza del páncreas y todas las linfadenopatías eran indicativas de remisión. Un MRI abdominal superior e inferior obtenida dos meses después, no fue destacable en adenocarcinoma pancreático y/o linfadenopatías. Se realizó un seguimiento de MRI abdominal superior e inferior cuatro meses

después. Continuaba sin ser destacable en adenocarcinoma pancreático y enfermedad metastásica.

En marzo de 2007 el paciente continúa en remisión.

**Ejemplo 23**

Cultivo de células cancerígenas y tumorales

5 El siguiente procedimiento se puede modificar según se necesite para optimizar el cultivo de células cancerígenas específicas o tumorales. Se adquirieron células cancerígenas pancreáticas humanas Panc-1 del American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10-15% (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), y 2,5 µg/mL de antimicótico (Fungizone; Invitrogen) a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. La inhibición relativa de la proliferación celular mediante oleandrina y Adriamicina se determinó después de 72 h de exposición continua al fármaco de una serie de concentraciones para cada fármaco. Se usó el ensayo MTT como se ha descrito previamente (Mosmann, 1983) para determinar el crecimiento celular respecto a la proliferación de células Panc-1 no tratadas. Las células fueron expuestas a no tratamiento (controles), oleandrina o Adriamicina durante 72 h antes de determinar el crecimiento celular.

**Ejemplo 24**

15 Tinción celular

Se usó el siguiente procedimiento para teñir células con naranja de acridina.

Las células fueron teñidas con 1 µg/mL de naranja de acridina durante 15 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas a partir de las placas, recolectadas en PBS con FBS y analizadas mediante citometría de flujo.

20 **Ejemplo 25**

Análisis de ciclo celular

Se usó el siguiente procedimiento para determinar el ciclo celular.

25 Las células Panc-1 fueron tratadas con oleandrina (0, 20 y 40 µM) durante 72 h, tripsinizadas, fijadas con etanol al 70% a 4°C, teñidas con yoduro de propidio usando un set de reactivo de análisis citométrico de flujo de ADN celular (Roche), y a continuación fueron analizadas para determinar el contenido de ADN mediante FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los datos fueron analizados mediante software Cell Quest (Becton Dickinson). Para cada muestra se analizaron al menos 100.000 células.

**Ejemplo Comparativo 26**

30 Evaluación clínica de un extracto que contiene glicósido cardiaco para el tratamiento de cáncer de pulmón de célula no pequeña

Un hombre de ochenta años fue diagnosticado con un cáncer de pulmón de célula pequeña en el lóbulo superior izquierdo. Se recomendó al paciente una terapia de radiación seguida de un curso de quimioterapia. Siete semanas después, el paciente comenzó con la terapia de radiación y completó la terapia en 24 días. A continuación el paciente comenzó un régimen de cinco agentes quimioterapéuticos en seis días y lo completó ocho meses después. 35 Veinte siete días antes de completar el régimen, se presentó en la clínica para verificar el diagnóstico anterior de cáncer de pulmón de célula pequeña del lóbulo superior izquierdo. Se realizó un escáner PET de todo el cuerpo que permitió concluir la existencia de un área grande de actividad hipermetabólica anormal que implicaba al lóbulo superior izquierdo consistente con la malignidad conocida del paciente. Adicionalmente, áreas discretas de actividad hipermetabólica que implicaban el hilio derecho y el mediastino anterior probablemente reflejaron una implicación nodal. Un escáner CT del torso confirmó una densidad de tejido blando de 5 cm en el lóbulo superior izquierdo. Se inició un régimen quimioterapéutico posterior. Al cabo de un mes, la quimioterapia se detuvo debido a intolerancia por parte del paciente. Una semana después, se realizó un escáner CT del torso para comparar. Se observó una masa de tejido blando de aproximadamente 4 cm en el segmento posterior del lóbulo superior izquierdo. Se observó una disminución de intervalo en la masa total del lóbulo superior izquierdo. Al cabo de cinco semanas, el paciente 45 comenzó con la auto-administración de un extracto botánico que contenía oleandrina. Al cabo de tres meses, se comparó un escáner de torso PA y lateral con el escáner anterior, y se observó que la densidad de la masa tumoral del lóbulo superior izquierdo no había cambiado. Un año después, se comparó un escáner de torso PA y lateral con las observaciones de un escáner de tres meses antes, y se determinó que la densidad de la masa tumoral, que medía aproximadamente 4 cm, del lóbulo superior izquierdo por encima del hilio no había cambiado.

50 El paciente continuó auto-administrándose el extracto botánico que contenía la oleandrina. Al cabo de cuatro meses, se le practicó un escáner CT del torso con contraste IV. Se observó una disminución de tamaño de aproximadamente un 20% en la masa central de lóbulo superior izquierdo. A día de hoy el paciente continúa auto-administrándose el extracto botánico que contiene oleandrina y presenta una elevada puntuación de Karnofsky. Los

datos clínicos sugieren que el extracto botánico tiene un beneficio terapéutico, ya que se produjeron cambios de tamaño en la masa central muchos meses después de la última quimioterapia del paciente.

### Ejemplo 27

Determinación del contenido de isoformas de la subunidad  $\alpha$  en la muestra mediante tinción inmunohistoquímica

- 5 El siguiente procedimiento es meramente un modo alternativo en el que se puede emplear el método de la invención para detectar y cuantificar el contenido de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa en una muestra. El orden de las etapas se puede modificar según sea necesario. Los materiales usados en este ensayo se pueden obtener de Vector Laboratories (Burlingame, CA, o Peterborough, Inglaterra).

#### *Análisis inmunohistoquímico*

- 10 Se usaron secciones congeladas de tejidos humanos. Las secciones fueron desparafinadas con 3 cambios de xileno (de 5 minutos cada uno), rehidratadas en una serie de etanol descendente (99% x 2, 90% x 2, 5 minutos cada una), y enjuagadas bien con agua destilada. Se completó la metodología de recuperación de antígeno mediada por calor mediante incubación de las secciones durante 3 x 5 minutos en una disolución en ebullición de disolución desensambradora de antígeno Vector (Vector-AMS), alto pH (Vector Laboratories N° de catálogo H-3301).

- 15 Después de la recuperación del antígeno, las secciones fueron lavadas en Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, 0,1%, pH 7,6 (TBS) durante 2 x 5 minutos. Se detuvo la actividad de peróxido incubando las secciones durante 20 minutos en peróxido de hidrógeno al 0, % (v/v) en metanol, seguido de lavado en TBS durante 10 minutos.

- 20 Las secciones fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpo anti-isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa (Sigma-Aldrich N° cat. A273) diluido en suero de caballo normal al 2,5% (v/v) (NHS al 2,5%) en TBS a 4  $\mu$ g/mL. Las secciones del control negativo fueron incubadas con un anticuerpo IgG1 de ratón no inmune (Biostat Diagnostics, N° cat. 093101) a 4  $\mu$ g/mL o en NHS al 2,5% (control "no primario").

- 25 Después del lavado en TBS durante 2 x 5 minutos, las secciones fueron incubadas con reactivo de anticuerpo universal Vector ImmPress™ (una mezcla de reactivos de IgG anti-conejo e IgG anti-ratón; Vector Laboratories Ltd., N° cat. MP-7500) durante 30 minutos. A continuación las secciones fueron lavadas durante 2 x 5 minutos e incubadas con sustrato de diaminobencidina (DAB), con monitorización hasta que se hubiera desarrollado un nivel adecuado de tinción. La reacción cromagénica se detuvo sumergiendo las láminas en agua destilada.

Después de la cromagénesis, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas en una serie ascendente de etanoles (90-99-100%), aclaradas en dos cambios de xileno y cubiertas con un cubreobjetos con DePex.

- 30 Se incluyó un control de ensayo que demuestra la inmunorreactividad de la citoqueratina en mucosa de colon para validar los reactivos de ImmPress™ y los reactivos cromagénicos. Se incluyó un control "no primario" para determinar la unión no específica del anticuerpo secundario y de otros reactivos de ensayo. Se analizaron las secciones teñidas, y se capturaron imágenes digitales adecuadas usando un microscopio Olympus BX51 con una cámara Leica DFC290.

- 35 En las Figuras 6A-6F y 7A-7H se muestran fotografías de células teñidas inmunohistoquímicamente. La cuantificación de las isoformas de la subunidad se puede realizar como se ha descrito en la presente memoria. Después de la determinación de la relación del contenido de isoforma  $\alpha 3$  respecto al contenido de isoforma  $\alpha 1$  en la muestra, se realiza una determinación de la probabilidad de una respuesta terapéutica para el tratamiento con glicósido cardíaco.

40

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método *in vitro* útil para predecir la capacidad de respuesta terapéutica *in vivo* de una enfermedad o trastorno, que presenta una etiología asociada a una proliferación celular excesiva, frente a un tratamiento con un glicósido cardiaco o una composición que comprende una glicósido cardiaco, método que comprende:

5            determinar la relación de expresión de isoforma  $\alpha 3$  a isoforma  $\alpha 1$  de subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa en una muestra de tejido celular enfermo obtenida previamente de manera directa o indirecta a partir de tejido celular *in vivo* de un sujeto con una enfermedad o trastorno que tiene una etiología asociada a una proliferación celular excesiva, comprendiendo dicha muestra una o más isoformas de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa; y

10           determinar la probabilidad de una respuesta terapéutica en el sujeto, donde el sujeto debe ser tratado con una dosis terapéuticamente relevante de glicósido cardiaco;

              donde la enfermedad o trastorno es cáncer, un tumor, artritis inducida por antígeno, encefalomiелitis alérgica, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil de inicio sistémico, osteoporosis, soriasis, enfermedad fibroquística, hiperplasia prostática benigna, retinopatía diabética, aterosclerosis o estenosis coronaria.

15           2.- El método de la reivindicación 1 que además comprende: predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es superior o igual a al menos 1, o predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al menos parcialmente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación está dentro del intervalo de 0,5 a 1,0, o predecir que el tejido celular sustancialmente no responderá terapéuticamente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es inferior a 0,3, o predecir que los tejidos enfermos que tengan una relación de isoformas de subunidad  $\alpha$  dentro del intervalo de 1 a 100 tendrán mayor capacidad de responder terapéuticamente que aquellos que tengan una relación de isoformas de subunidad  $\alpha$  inferior a 1, o predecir que los tejidos en los que solo se detecta isoforma  $\alpha 3$  y no se detecta isoforma  $\alpha 1$  serán los que presenten mayor capacidad de respuesta terapéutica a los glicósidos cardiacos.

20           3.- El método de la reivindicación 1, que además comprende predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al menos parcialmente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es  $\geq 2$ , o predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al menos parcialmente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es  $\geq 10$ , o predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al menos parcialmente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es  $\geq 25$ , o predecir que el tejido celular responderá terapéuticamente al menos parcialmente al tratamiento con un glicósido cardiaco si la relación es  $\geq 75$ .

25           4.- El método de la reivindicación 1, en el que la probabilidad de que se produzca una respuesta terapéutica al menos parcial está relacionada con la relación de la isoforma  $\alpha 3$  a la isoforma  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa de acuerdo a la siguiente tabla:

Relación	Probabilidad de que exista una respuesta terapéutica en el sujeto
0,3 – 0,45 $\pm$ 0,05	De 20 a <30%
0,5 – 0,95 $\pm$ 0,05	De 30 a 50%
$\geq 1 \pm 0,05$	>50%
>10	>75%

30           5.- El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación de la relación comprende cuantificar el nivel de expresión de la isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa y de la isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra *in vitro* o en la muestra de biopsia, y calcular su relación, o la etapa de determinar la relación comprende la determinación de la cantidad de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa respecto de la cantidad de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra *in vitro*, y calcular su relación.

35           6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra es tejido celular, masa celular, lisato celular, preparaciones de membrana preparadas a partir de éstos, o láminas de histopatología fijas de las mismas.

40           7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra comprende al menos dos isoformas de la subunidad  $\alpha$  de la Na, K-ATPasa, o la muestra comprende al menos las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  de la subunidad  $\alpha$  de la Na, K-ATPasa.

45           8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además comprende: lisar o romper las células, tejidos o muestras de biopsia; o fijar las secciones de tejido para examen histopatológico obtenidas previamente a partir de tejido celular enfermo *in vivo* para formar la muestra, o llevar a cabo un ensayo Western blot y/o un ensayo de tinción inmunohistoquímica sobre la muestra para determinar la cantidad y la expresión relativa de isoforma de subunidad  $\alpha 3$  de Na, K-ATPasa respecto de isoforma de subunidad  $\alpha 1$  de Na, K-ATPasa en la muestra; y calcular su relación.

- 5 **9.-** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende: llevar a cabo un análisis radiométrico o densitométrico de un gel a fin de determinar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa respecto al contenido de isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa en la muestra, o llevar a cabo un análisis radiométrico o densitométrico de un gel a fin de detectar la presencia y la cantidad de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa y la de isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa en la muestra.
- 10 **10.-**El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende: comparar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa y el de isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa en la muestra respecto del contenido de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa y/o el de isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa en una muestra de control positivo y/o en una muestra de control negativo, o comparar el contenido de isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa y el de isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa en una muestra de tejido en la que se sepa que sólo se da una de las dos subunidades,  $\alpha_3$  o  $\alpha_1$ , como control.
- 15 **11.-**El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además comprende: proporcionar información que especifique cómo llevar a cabo los análisis de las isoformas  $\alpha_1$  y  $\alpha_3$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa, y/o que además comprende proporcionar información que detalle cómo interpretar los datos pronósticos.
- 15 **12.-**El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el glicósido cardiaco se selecciona del grupo que consiste en oleandrina, ouabaína, bufalina, digitoxina, digoxina, cinobufalina, cinobufagina y resibufogenina.
- 20 **13.-**El uso de un kit para llevar a cabo un método pronóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo dicho kit:
- 20 a) un primer anticuerpo primario que tiene afinidad de unión para la isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa; y
- b) un segundo anticuerpo primario que tiene afinidad de unión para la isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa.
- 25 **14.-**El uso de la reivindicación 13 en el que el kit comprende además: a) una composición de lisis; b) una muestra de control positivo que comprende la isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa; c) una muestra de control positivo que comprende la isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa y la isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa; d) una muestra de control negativo que comprende la isoforma de subunidad  $\alpha_1$  de Na, K-ATPasa y que excluye la isoforma de subunidad  $\alpha_3$  de Na, K-ATPasa; e) un anticuerpo secundario, HRP de IgG  $\alpha$  anti-ratón de cabra (que puede usarse por ejemplo para la visualización de proteínas de interés); f) material formador de gel adecuado para el análisis electroforético de gel; g) marcador radiomarcado; h) instrucciones de uso del kit y eficacia del método pronóstico; i) densitómetro o radiómetro; j) medio líquido acuoso; k) kit de preparación de gel/membrana; l) disolución de bloqueo; m) tampón de lavado; n) materiales que comprende un kit de análisis de Western blot; u o) una combinación de los mismos.
- 30 **15.-**El uso de la reivindicación 13 ó 14, en el que el anticuerpo secundario es peroxidasa de rábano de IgG  $\alpha$  anti-ratón de cabra o comprende otros anticuerpos secundarios de especies diferentes al ratón activadas contra IgG de ratón con un marcador apropiado unido, tal como peroxidasa de rábano.
- 35 **16.-**El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, en el que la muestra de control positivo se selecciona del grupo que consiste en tejido, masa celular, lisato celular y preparaciones de membrana preparadas a partir de los mismos, donde la muestra de control positivo se obtiene previamente mediante biopsia u otros medios de escisión quirúrgica.
- 40 **17.-**El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la muestra de control negativo se selecciona del grupo que consiste en tejido, masa celular o lisato celular y preparaciones de membrana preparadas a partir de los mismos, que no contengan la isoforma  $\alpha_3$  de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa.
- 45 **18.-**El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende medios alternativos para determinar la composición relativa de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa y su relación de isoformas, donde los medios alternativos comprenden: el uso de anticuerpos en un ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima) o un sistema de tejido de proteína o de lisato celular; el uso de análisis Northern blot y técnicas relacionadas (por ejemplo, rt-PCR) para la medida de ARNm para diferentes isoformas de subunidad de Na, K-ATPasa; o el uso de un ensayo de tinción inmunohistoquímica.
- 50 **19.-**El uso de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, comprendiendo además dicho kit medios alternativos para determinar la composición relativa de la subunidad  $\alpha$  de Na, K-ATPasa y su relación de isoformas, donde los medios alternativos comprenden: el uso de anticuerpos en un ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima) o un sistema de tejido de proteína o de lisato celular; el uso de análisis Northern blot y técnicas relacionadas (por ejemplo, rt-PCR) para la medida de ARNm para diferentes isoformas de subunidad de Na, K-ATPasa; o el uso de un ensayo de tinción inmunohistoquímica.
- 55

Figura 1A

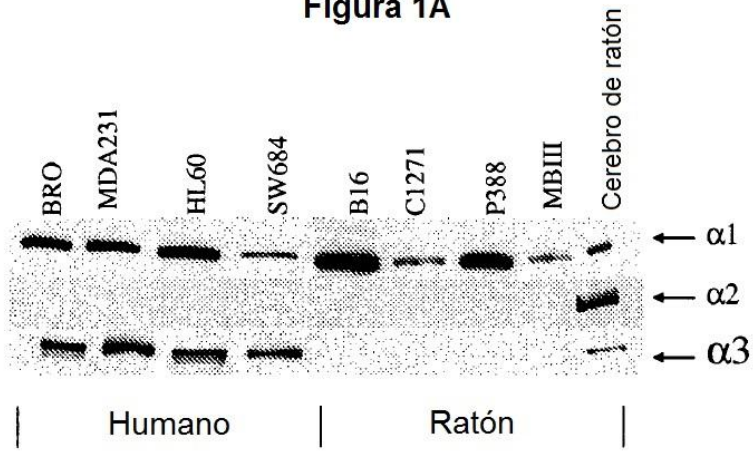
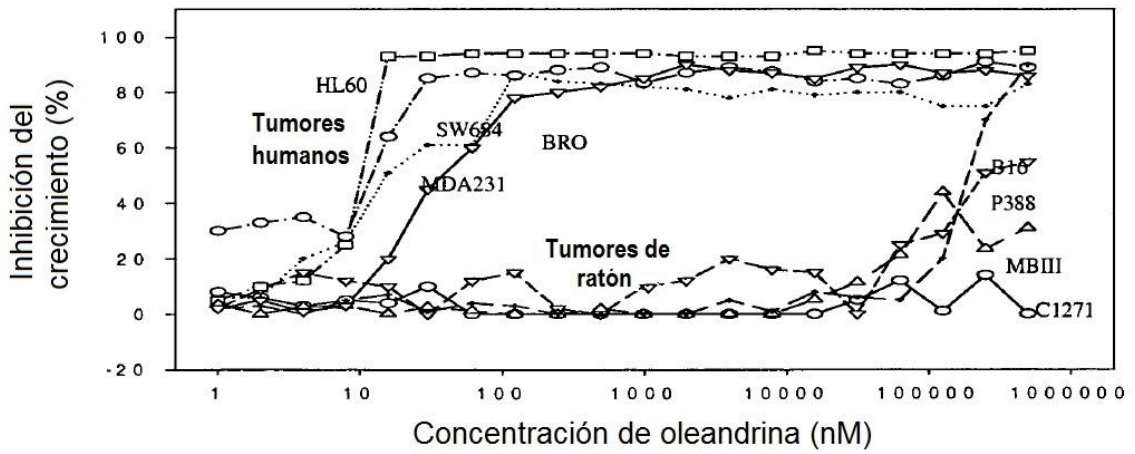
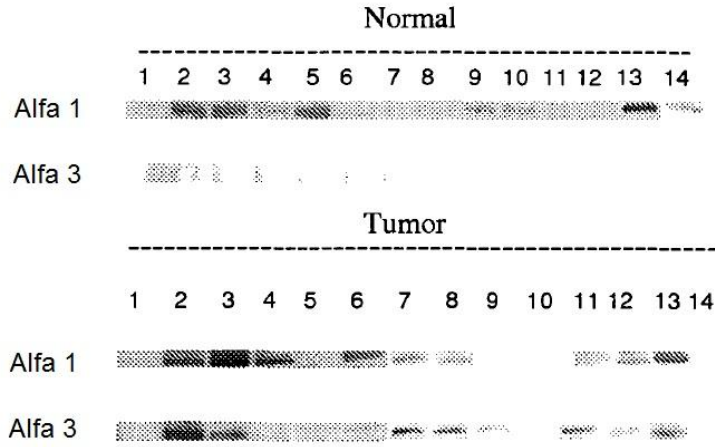


Figura 1B



**Figura 2**



**Figura 3A**

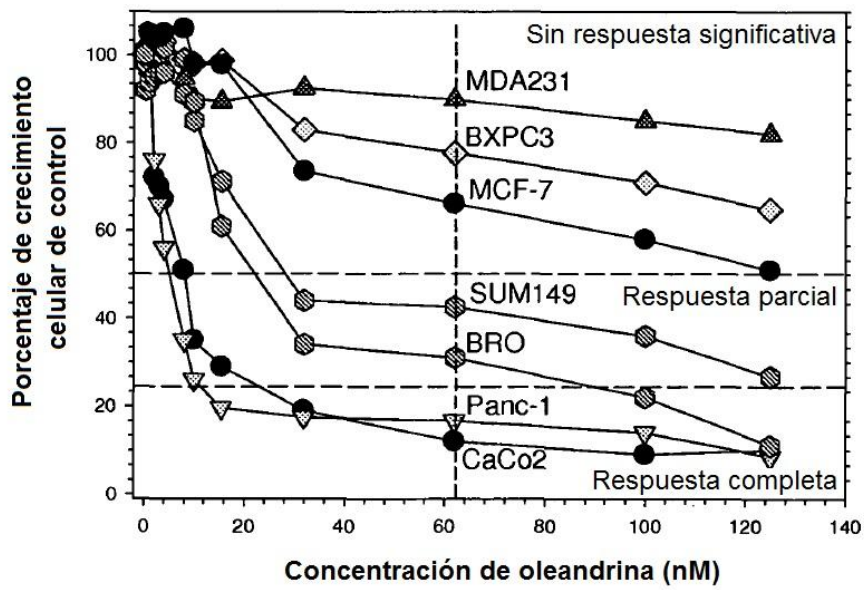




Figura 3B

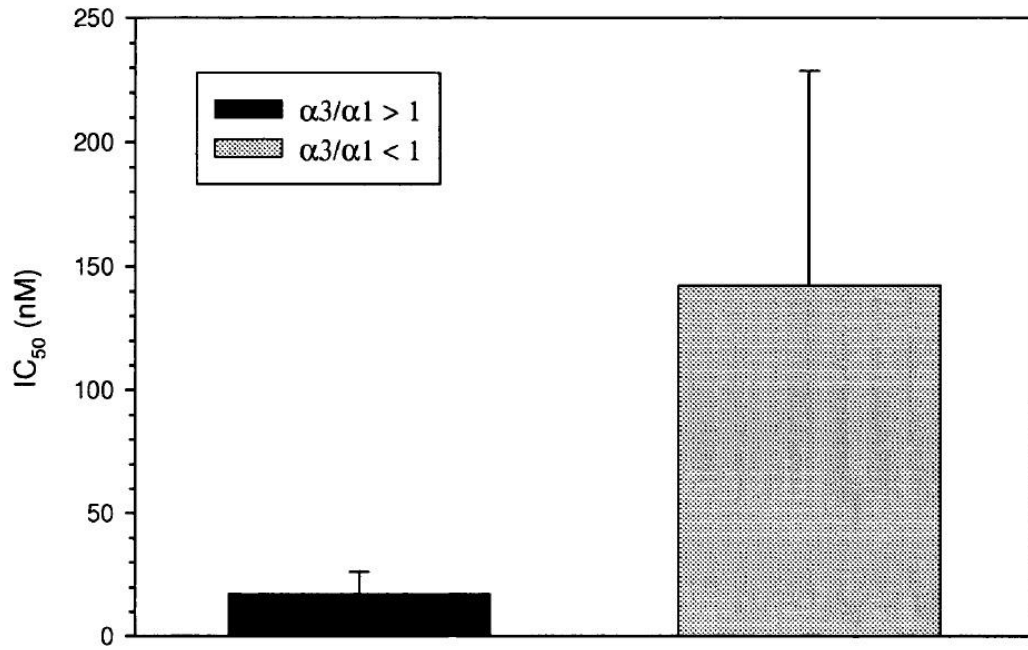


Figura 4A

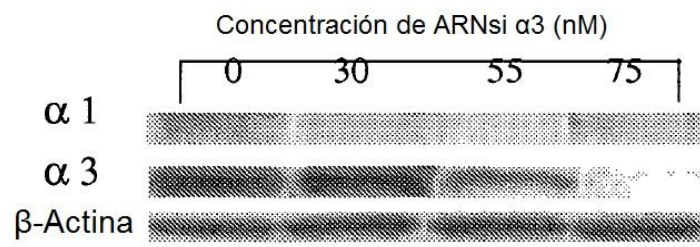


Figura 4B

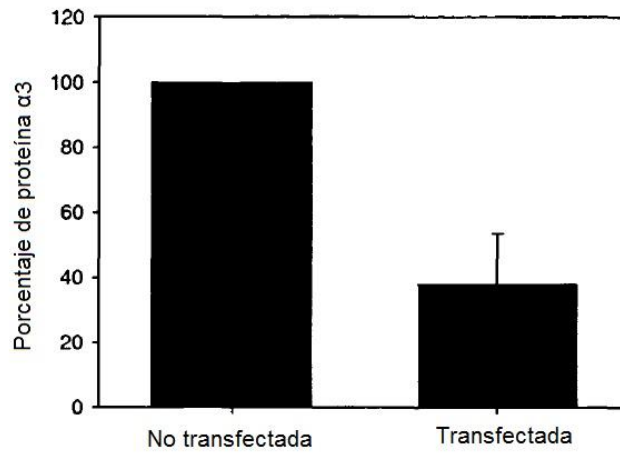


Figura 4C

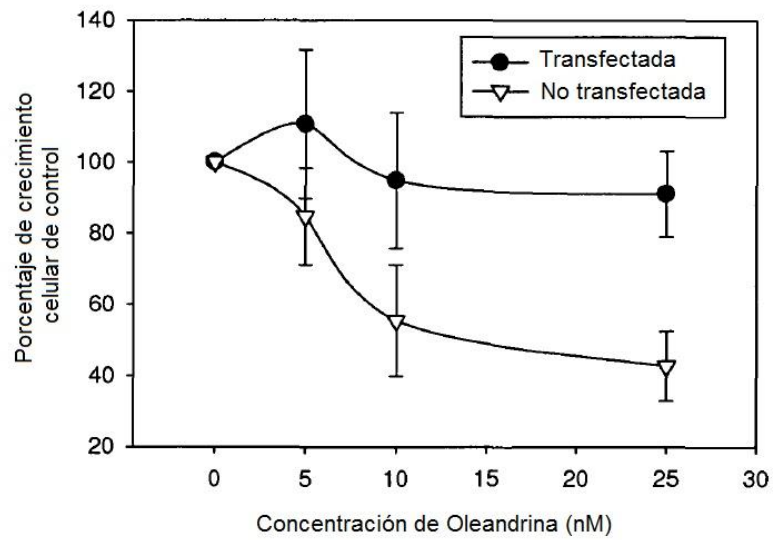


Figura 5A

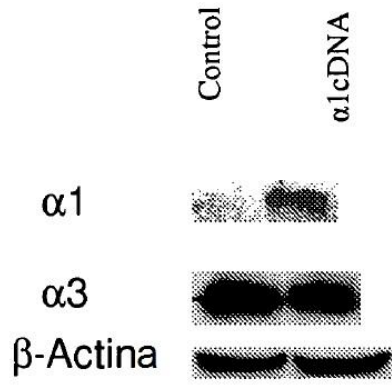


Figura 5B

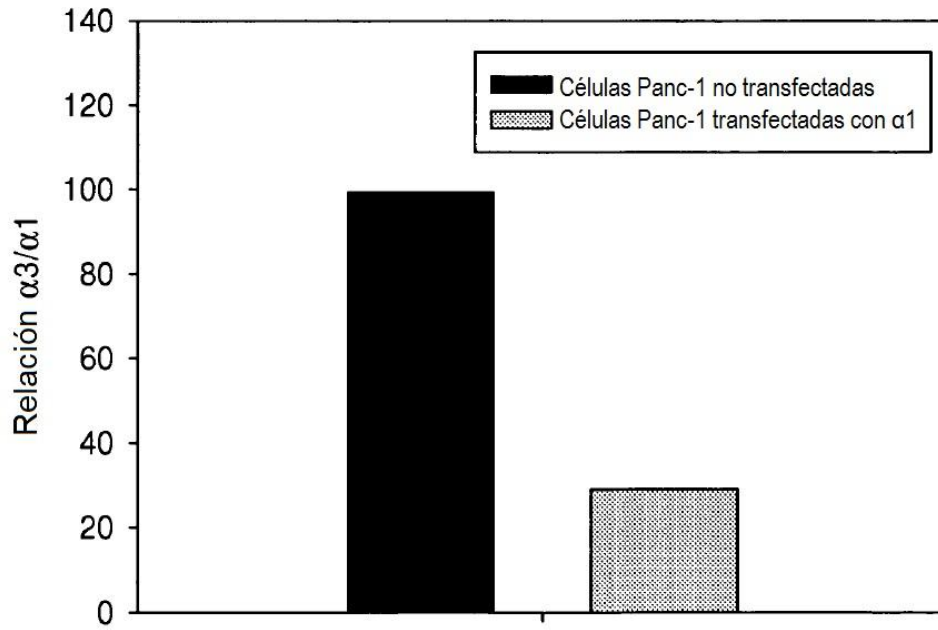
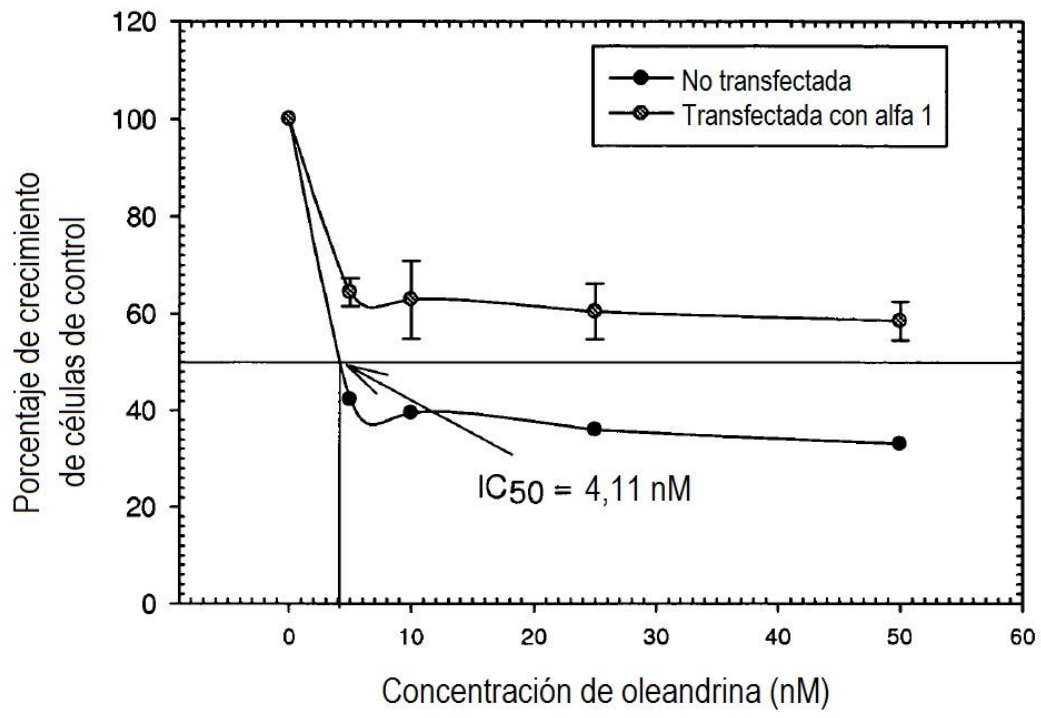
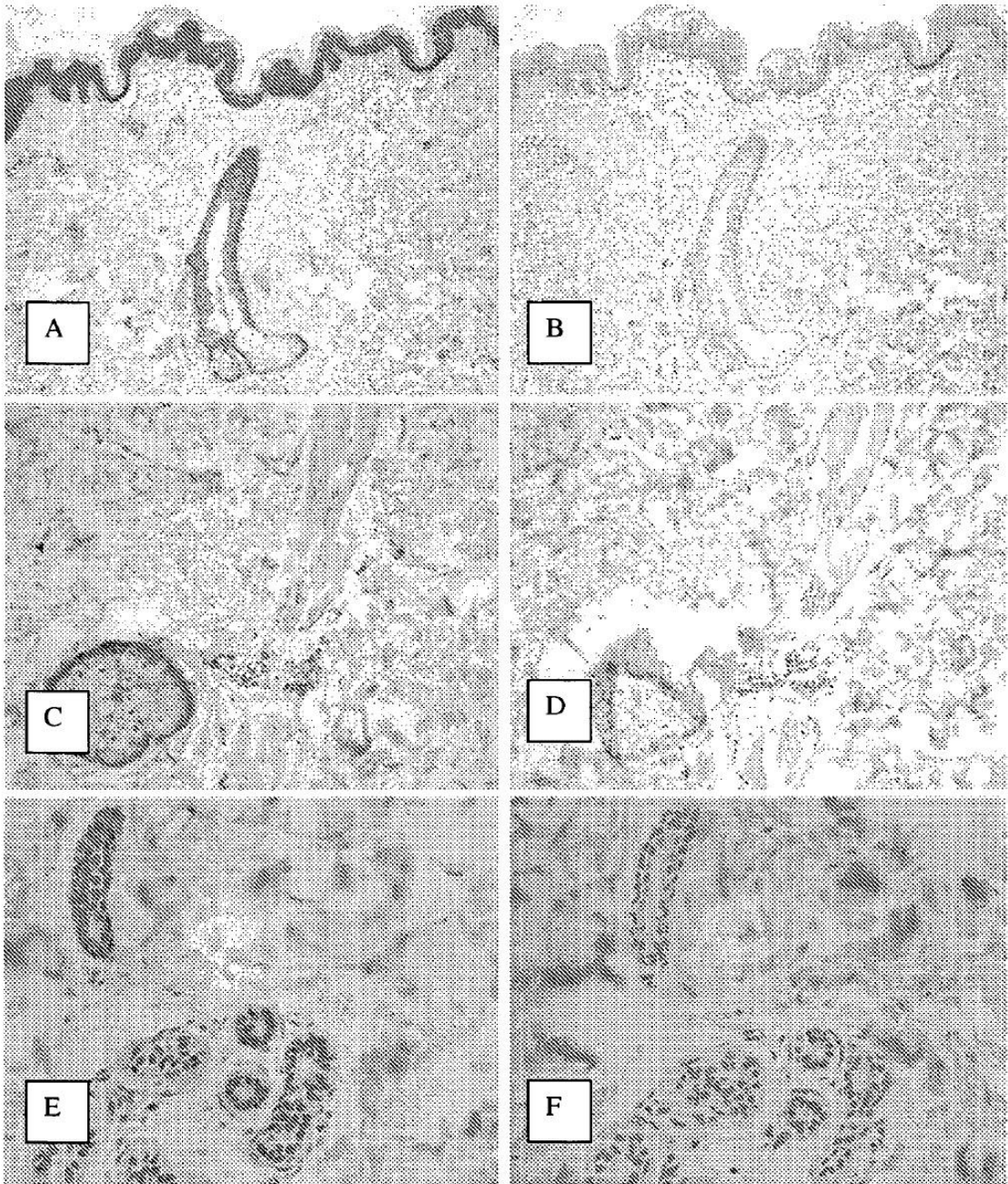


Figura 5C



**Figura 6**



**Figura 7**

