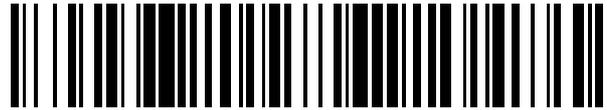


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 358**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/52** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11838813 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2635288**

54 Título: **Tratamiento de tumores corticotropos hipofisarios usando R-roscovitina**

30 Prioridad:

**06.05.2011 US 201161483223 P**  
**03.11.2010 US 409756 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.09.2015**

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)**  
**8700 Beverly Boulevard**  
**Los Angeles, CA 90048, US**

72 Inventor/es:

**MELMED, SHLOMO y**  
**LIU, NING-AI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 545 358 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

Tratamiento de tumores corticotropos hipofisarios usando R-roscovitina

La presente invención se refiere al tratamiento de tumores hipofisarios y condiciones de enfermedad relacionadas.

### Antecedentes

5 A pesar de ser pequeños (< 2 mm) y frecuentemente indetectables por IRM, los tumores corticotropos hipofisarios están asociados a morbididades significativas y mortalidad debido a la hipersecreción de glucocorticoides suprarrenales (Gc) en respuesta a la producción de ACTH tumoral autónoma<sup>1</sup>. El tratamiento de referencia para la enfermedad de Cushing consiste en resección tumoral hipofisaria transesfenoidal, radiación dirigida a la hipófisis, suprarrenalectomía y/o supresión médica de la producción de cortisol de la glándula suprarrenal. Mientras que la resección de tumores secretores de ACTH transesfenoidal produce el 30-70 % de tasa de cura quirúrgica, la tasa de reaparición de adenoma es alta<sup>2</sup>. Las eficacias de otras modalidades terapéuticas están limitadas por factores tales como la lenta respuesta terapéutica, desarrollo de insuficiencia hipofisaria y crecimiento tumoral hipofisario incontrolado frente a la resección o inhibición<sup>2,3</sup> de la glándula suprarrenal. La farmacoterapia eficaz que se dirige directamente al crecimiento de tumores corticotropos y/o la producción de ACTH sigue siendo un reto importante<sup>4</sup>.

15 La pituitaria es altamente sensible a las alteraciones del ciclo celular<sup>5,6</sup>. Los tumores hipofisarios adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas oncógenas y supresoras de tumores, que producen la proliferación incontrolada, señales reguladoras neuroendocrinas anómalas y alteración del medio humoral, mediado directamente o indirectamente por cinasas dependientes de ciclinas (CDK)<sup>5,7</sup> desreguladas. Aunque las mutaciones del gen CDK no se han identificado fácilmente en tumores hipofisarios humanos, la expresión en exceso de ciclinas y la desregulación de inhibidores de CDK son características comunes de adenomas hipofisarios, que indica que la activación de CDK tiene importantes implicaciones patológicas y posibles terapéuticas<sup>8,9</sup>.

25 Están siendo evaluados inhibidores de CDK de molécula pequeña para la terapia contra el cáncer, algunos de los cuales han conducido a ensayos clínicos para linfoma, cánceres de pulmón y nasofaríngeos<sup>10,11</sup>. Sin embargo, estudios preclínicos de inhibidores de CDK están frecuentemente obstaculizados por el requisito de gran cantidad de fármaco, y prolongada duración de la administración para observar la posible eficacia. Aunque el espectro genético de las mutaciones asociadas a tumores y/o su contexto celular pueden dictar dependencia de CDK específica, pueden no haber sido probados inhibidores de CDK particulares en los tipos de tumor más apropiados *in vivo*<sup>11,12</sup>. Modelos animales que dan lugar fielmente a tumores hipofisarios humanos permitirían la rápida y eficaz prueba para identificar inhibidores de CDK de molécula pequeña con potencia óptima.

30 Independientemente del origen del linaje celular, los tumores hipofisarios expresan casi invariablemente en exceso el gen transformante de tumores hipofisarios (PTTG), que codifica una securina que se une a separasa en el complejo de APC, y gobierna fielmente la segregación de cromosomas durante la mitosis<sup>13</sup>. PTTG se aisló originalmente de células de tumor hipofisario de rata<sup>14</sup>. El desequilibrio de la abundancia de PTTG intracelular conduce a alteración del ciclo celular y formación neoplásica, causando inestabilidad cromosómica y aneuploidía, y también transición G1/S y G2/M anómala por desregulación transcripcional de la expresión de ciclinas<sup>13,15-20</sup>. Por otra parte, la expresión en exceso de PTTG también desencadena la parada irreversible del ciclo celular en los tumores que expresan hormona de crecimiento hipofisaria (GH) y gonadotropina (LH, FSH), activando las vías de senescencia específica del linaje, que contribuye a la propensión benigna de tumores hipofisarios<sup>13,21</sup>.

40 Musat et al. (2010) *Molecular and Cellular Endocrinology* Vol 326 (No. 1-2) p25-29 proporcionan un resumen de la función de ciclinas (y sus proteínas relacionadas) en la tumorigénesis hipofisaria mientras que Lamberts et al. (2008) *Pituitary* Vol 12 (no. 3) p261-264 desvelan estrategias de tratamiento para tumores hipofisarios agresivos.

Sigue existiendo la necesidad en la materia de métodos alternativos y/o mejorados para tratar tumores hipofisarios y particularmente tumores corticotropos hipofisarios.

### Resumen de la invención

45 Diversas realizaciones de la presente invención proporcionan olomucina y R-roscovitina o sales de la misma para su uso en un método para tratar un tumor corticotropo hipofisario, suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH y/o tratar enfermedad de Cushing. El método puede comprender: proporcionar una composición que comprende un inhibidor selectivo de CDK/ciclina; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición a un sujeto mamífero en necesidad de tratamiento para un tumor corticotropo hipofisario, suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o tratar enfermedad de Cushing para tratar el tumor corticotropo hipofisario, suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o tratar enfermedad de Cushing.

55 En diversas realizaciones, el sujeto mamífero puede estar en necesidad de tratar un tumor corticotropo hipofisario y el tumor corticotropo hipofisario se trata. En ciertas realizaciones, el tumor corticotropo es un tumor corticotropo que

expresa en exceso PTTG. En otras realizaciones, el sujeto mamífero puede estar en necesidad de suprimir la ACTH y/o niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH y la ACTH y/o los niveles de corticosterona en el adenoma hipofisario secretor de ACTH son suprimidos. En otras realizaciones más, el sujeto mamífero puede estar en necesidad de inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH y el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH se inhibe. En diversas realizaciones, el sujeto mamífero puede estar en necesidad de tratar enfermedad de Cushing y la enfermedad de Cushing se trata.

La olomucina y la R-roscovitina son inhibidores selectivos de CDK/ciclina y análogos de purina sustituidos en 2,6,9. En diversas realizaciones preferidas, el inhibidor selectivo de CDK/ciclina es R-roscovitina o sales de la misma.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada, tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, diversas características de realizaciones de la invención.

### Breve descripción de las figuras

Se ilustran realizaciones a modo de ejemplos en las figuras referenciadas. Se pretende que las realizaciones y figuras desveladas en el presente documento se consideren ilustrativas en vez de restrictivas.

La Figura 1 representa la patología hipofisaria de peces cebra transgénicos zPttg, Tg:Pomc-zPttg según diversas realizaciones de la presente invención. (A) Generación de peces Tg:Pomc-zPttg. Arriba, representación esquemática del transgén Pomc-zPttg. Abajo, expresión hipofisaria de zPttg en pez cebra Tg:Pomc-zPttg 72 horas después de la fecundación (hpf). Se cruzaron peces cebra transgénicos Tg:Pomc-zPttg F1 con peces cebra no mutantes, produciendo embriones F2 con el 50 % de la progenie positiva (panel izquierdo, Tg) y el 50 % negativa (panel derecho, WT) para la expresión de zPttg hipofisaria evaluada por el análisis *in situ* de montaje completo. Vista ventral, anterior a la izquierda. (B) Embriones Tg:Pomc-Pttg mostraron elevada expresión de *Tpit/Tbx19*, pero no un cambio significativo de la expresión de *Pit-1* por análisis *in situ* de montaje completo 48 hpf. Se indican sondas de ARNm antisentido en la esquina inferior derecha de cada panel. Paneles superiores, vista lateral; paneles central e inferior, vista ventral, anterior a la izquierda. (C) Embriones Tg:Pomc-Pttg;POMC-eGFP presentaron elevada señal de eGFP hipofisaria, y son más resistentes a la retroalimentación negativa de glucocorticoides que hermanos negativos para Tg:Pomc-Pttg. Se generaron embriones transgénicos dobles (Tg:Pomc-Pttg;POMC-eGFP) criando peces Tg:Pomc-Pttg con una línea transgénica establecida POMC-eGFP, en la que la expresión de eGFP es accionada por el mismo promotor *zPomc*. La intensidad de fluorescencia de células positivas para POMC-GFP se midió en embriones vivos después del tratamiento con dexametasona 4 dpf. (D) Tinción hipofisaria con hematoxilina/eosina (paneles superiores) e inmunohistoquímica de ACTH (paneles inferiores) de secciones derivadas de peces WT y transgénicos Tg:Pomc-Pttg (Tg) a los 20 meses de edad. Las puntas de flecha indican células que expresan ACTH mitóticas neoplásicas. (E) La hipófisis de Tg:pomc-pttg presentó elevado número de células que co-expresan PCNA y ACTH. Imágenes hipofisarias confocales representativas de inmunohistoquímica de fluorescencia que detectan expresión de PCNA (rojo) y ACTH (verde) en Tg:Pomc-Pttg (a-c) y WT (d-f). Se contratiñeron portaobjetos de parafina con DAPI (azul). En b y c, las puntas de flecha indican células productoras de ACTH que co-expresan PCNA intra-nuclear. AP, hipófisis anterior; IP, pars intermedia. P, hipófisis; barra de escala, 50  $\mu$ m. (g) (media  $\pm$  EE, n = 500 células contadas por hipófisis, dos hipófisis por grupo; \*P = 0,05). AP, hipófisis anterior; IP, pars intermedia. P, hipófisis (barra de escala, 50  $\mu$ m.)

La Figura 2 muestra que los peces cebra transgénicos Tg:Pomc-Pttg desarrollan hipercortisolismo, agravada resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática y cardiomiopatía según diversas realizaciones de la presente invención. (A) Peces Tg:pomc-pttg (panel superior, Tg) mostraron expansión de células esteroideogénicas como se representa por la tinción con hematoxilina/eosina de portaobjetos de parafina de cabezas de riñón. Se disponen células esteroideogénicas de glucocorticoides de pez cebra como capas de células epiteliales (puntas de flecha) en asociación con la vena cardinal posterior de la cabeza renal (PCV) 28. Peces Tg:pomc-pttg también mostraron acumulación de células de la sangre dentro de la PCV, que no se observó en WT (panel inferior, WT). (B) Peces Tg:pomc-pttg mostraron elevados niveles de niveles de glucosa en sangre en ayunas y postprandial. Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa en 72 peces Tg:pomc-pttg y WT. Los peces cebra fueron alimentados a voluntad con pienso de dieta regular durante una hora (columna gris) después de 16 horas de ayunas. Se midió la glucosa en sangre en diferentes momentos de tiempo después de volver a alimentarse con pienso. Los niveles de glucosa se presentan como media  $\pm$  EE (ABC, p < 0,0001). (C) Pruebas de tolerancia a la insulina en peces Tg:pomc-pttg y WT. Después de 20 horas de ayunas, los peces cebra se inyectaron intraperitonealmente con insulina (0,1 unidad/100 mg) y se midieron los niveles de glucosa en sangre 30 y 60 min después de la inyección de insulina (n = 24, media  $\pm$  EE, \*, p<0,01). (D) La tinción con Oil red O (ORO) de secciones de hígado revela acumulación de lípidos hepáticos en transgénicos Tg:Pomc-pttg. (E) Se puntuaron la distribución e intensidad del área de la tinción con ORO hepática (media  $\pm$  EE, \*, p<0,01). (F) Los peces cebra Tg:Pomc-Pttg presentaron efusión pericárdica significativa e hipertrofia ventricular. Arriba, peces cebra Tg:Pomc-pttg (Tg) con acumulación de fluido pericárdico macroscópica (flecha) en comparación con no mutantes (WT) a los 24 meses. Centro, tinción con hematoxilina/eosina de sección transversal del cuerpo central; abajo, aumento alto (20x) que muestra hipertrofia ventricular del corazón. Tg, Tg:Pomc-Pttg; WT, no mutante. Pc, espacio pericárdico; h, corazón. Barra de escala, 50  $\mu$ m.

La Figura 3 representa la prueba de fármacos *in vivo* en peces cebra Tg:Pomc-Pttg según diversas realizaciones de la presente invención. (A) La expresión en exceso de Pttg dirigida por el promotor *Pomc* de pez cebra indujo la regulación por incremento de ciclina E en hipófisis transgénica Tg:Pomc-Pttg a los 3 meses. Se ensayaron niveles de ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real y se corrigieron para  $\beta$ -actina (media  $\pm$  EE de expresión relativa, n = 30 hipófisis para cada grupo). (B) Análisis de transferencia Western de células AtT20 de tumor corticotropo de ratón transfectadas con un ARNip de control o de PTTG. (C) Tratamiento *in vivo* de embriones Tg:Pomc-Pttg;Pomc-eGFP con diferentes inhibidores de CDK de molécula pequeña (50  $\mu$ M) o 0,2 % de DMSO como control de 18-40 hpf. Se trataron 100-150 embriones con cada compuesto de uno en uno. Imágenes representativas de embriones vivos se muestran con morfología macroscópica (paneles derechos) y células positivas para Pomc-GFP hipófisarias a gran aumento (paneles izquierdos) 40 hpf. Los embriones se expusieron a defecto del desarrollo temprano desarrollado por flavopiridol antes de que se produjera la ontogenia de células POMC hipófisarias. (D) Se analizaron la expresión relativa de la fluorescencia de Pomc-eGFP hipófisaria usando Velocity 5.2 (Improvisation) (media  $\pm$  EE de la expresión relativa, n = 7 embriones aleatoriamente elegidos de 100-150 embriones de cada grupo). (E) La R-roscovitina suprime específicamente la expansión de células POMC hipófisarias que expresan en exceso zPttg 18-40 hpf. Se generaron embriones Tg:Pomc-Pttg;Prl-RFP transgénicos criando peces Tg:Pomc-Pttg con una línea transgénica PRL-RFP previamente generada, en la que RFP se dirigió a lactótrofos hipófisarios por un promotor de *prolactina* de pez cebra<sup>35</sup>. Imágenes de microscopía fluorescente representativas de la expresión de POMC-eGFP (a y b) y PRL-RFP (c y d) hipófisarias en embriones Tg:Pomc-Pttg;Pomc-eGFP y Tg:Pomc-Pttg;Prl-RFP vivos tratados con 0,2 % de DMSO (a y c) o R-roscovitina 50  $\mu$ M (b y d). (F) Se analizaron la expresión relativa de fluorescencia de POMC-eGFP o PRL-RFP hipófisarias usando Velocity 5.2 (Improvisation) (media  $\pm$  EE de la expresión relativa, n = 10 embriones aleatoriamente elegidos de 100-150 embriones de cada uno grupo). Los resultados representan uno de tres experimentos similares. Barra de escala, 50  $\mu$ m. \* $p$ <0,02; \*\*,  $p$ <0,00005.

La Figura 4 representa la inhibición *in vitro* de células de tumor corticotropo de ratón por R-roscovitina según diversas realizaciones de la presente invención. (A) El tratamiento de la línea de células AtT20 de tumor secretor de ACTH hipófisaria de ratón con R-roscovitina ( $1-2 \times 10^{-5}$  M) condujo a un número reducido de células viables a las 24 y 48 horas, como se representa por el ensayo de proliferación de células Wst-1 (media  $\pm$  EE, \*\*,  $p$  <0,01). (B) Análisis de transferencia Western de extractos de proteína derivados de células AtT20 tratadas con vehículo o R-roscovitina. (C) El tratamiento con R-roscovitina (10  $\mu$ M) de células AtT20 durante 48 horas indujo la senescencia como se indica por la elevada expresión de  $\beta$ -galactosidasa. (D) Concentración de ACTH por radioinmunoensayos (RIA) de medio de cultivo de células AtT20 tratadas con vehículo o R-roscovitina (media  $\pm$  EE, \*\*,  $p$  <0,01, \*\*\*,  $p$  <0,001). (E) Análisis de transferencia Western de extractos de proteína derivados de células AtT20 tratadas con o sin R-roscovitina. La R-roscovitina inhibe la expresión de ACTH de proteínas en células AtT20. Vehículo, 0,2 % de DMSO.

La Figura 5 representa la acción *in vivo* de R-roscovitina en adenomas corticotropos de ratón según diversas realizaciones de la presente invención. Ratones sin pelo atímicos se inocularon subcutáneamente con células AtT20 de tumor corticotropo ( $1 \times 10^5$  células). Tres días después de la inyección de células tumorales, los ratones se aleatorizaron para recibir tanto R-roscovitina (150 mg/kg) como vehículo por sonda nasogástrica oral dos veces al día, 5 días a la semana. Después de 3 semanas de tratamiento, se diseccionaron xenoinjertos de tumor AtT20 de cada animal y (A) los volúmenes tumorales disminuyeron en animales tratados con R-roscovitina. (B) Análisis de transferencia Western de especímenes de tumor representativos, que mostraron disminución de la expresión de proteínas ACTH y PCNA en tumores tratados con R-roscovitina en comparación con controles. (C) Tumores corticotropos tratados con R-roscovitina mostraron disminución de los números de células que co-expresan PCNA y ACTH. Imagen de microscopía de fluorescencia representativa de inmunohistoquímica que detecta expresión de PCNA (rojo) y ACTH (verde) en tumores de control (a-c) y tratados con R-roscovitina (d-f). Se contratiñeron portaobjetos de criosección con DAPI (azul). (D) Se recogió sangre de cada animal para la medición de los niveles de ACTH en plasma y de corticosterona en suero. El tratamiento con R-roscovitina se asoció a la reducción de niveles de ACTH y corticosterona en sangre (media  $\pm$  E.E., n = 13-14 ratones para cada grupo, \*\*,  $p$  < 0,01).

La Figura 6 representa el alineamiento de secuencias de aminoácidos de PTTG humano, de ratón, *Xenopus* y pez cebra. La explotación de la base de datos de ensamblaje del genoma de pez cebra ([http://www.ensembl.org/Danio\\_erio](http://www.ensembl.org/Danio_erio); T. J. P. Hubbard et al., *Ensembl 2007 Nucleic Acids Res.* 2007 Vol. 35, edición de la base de datos: D610-D617) reveló una secuencia de ADNc que codifica una proteína hipotética de 182 aa (nº de acceso de GenBank XM\_689974). La secuencia de polipéptidos putativa comparte el 76 % de homología de aa con PTTG humano (nº de acceso de GenBank NM\_004219), con una caja D del extremo N conservada y región rica en prolina hidrófoba del extremo C. Residuos idénticos están sombreados en negro, residuos similares en gris. La caja D conservada está recuadrada.

### Descripción de la invención

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); y Sambrook y Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed., Cold Spring Harbor

Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) proporcionan a un experto en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no está limitada de ninguna forma a los métodos y materiales descritos.

“Tumor hipofisario”, como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, adenoma lactotrópico o prolactinoma, adenoma secretor de ACTH, adenomas somatotrópicos, adenoma corticotrópico, adenoma gonadotrópico, adenomas tirotrópicos y adenoma de células nulas.

“Mamífero”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia*, que incluye, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios superiores y especies de simios inferiores; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o sexo particular. Así, sujetos adultos y recién nacidos, además de fetos, tanto masculinos como femeninos, pretenden estar incluidos dentro del alcance de este término.

“Cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a aquella cantidad que puede lograr resultados beneficiosos en un sujeto mamífero con un tumor hipofisario, un tumor corticotropo hipofisario, un adenoma hipofisario secretor de ACTH y/o o un sujeto mamífero con enfermedad de Cushing. Puede determinarse una cantidad terapéuticamente eficaz basándose en un individuo y se basará, al menos en parte, en consideración de las características fisiológicas del mamífero, el tipo de sistema de administración o la técnica terapéutica usada y el tiempo de administración con respecto a la progresión de la enfermedad.

Descrito en el presente documento, los inventores informan de la generación de un pez cebra transgénico estable con expresión en exceso de zPttg dirigida a linajes de proopiomelanocortina hipofisaria (POMC) (corticotropos y melanotropos). Larvas de Tg:Pomc-Pttg desarrollan patologías tempranas que reflejan tumores corticotropos que incluyen corticotropos neoplásicos con resistencia a Gc parcial, y alteraciones metabólicas inducidas por la hipercortisolemia en pez transgénico adulto. Aprovechando la patología de corticotropos anteriormente observada, combinada con la expresión específica de linaje de POMC hipofisaria de un indicador fluorescente en larvas transparentes vivas, se probaron inhibidores de CDK de molécula pequeña, que conducen a la identificación de R-roscovitina contra corticotropos que expresan en exceso PTTG. Efectos inhibidores de la R-roscovitina sobre células de tumor corticotropo se validaron posteriormente en un modelo de ratón *in vivo* e *in vitro*, soportando el uso de inhibidores de CDK selectivos como terapia eficaz para la enfermedad de Cushing.

El diámetro promedio de tumores corticotropos hipofisarios humanos es 6 mm<sup>37</sup>, y a pesar del uso de muestreo de senos petrosos para establecer hipersecreción de ACTH hipofisaria, hasta el 40 % de los tumores corticotropos no son visibles en IRM, planteando retos significativos para la resección quirúrgica<sup>38</sup>. Por otra parte, tumores corticotropos grandes menos comúnmente encontrados pueden afectar estructuras críticas circundantes, dificultando así la completa resección del tumor. Además, la amplia resección quirúrgica puede producir daño significativo a tejido hipofisario normal que conduce a hipoparatiroidismo en la mayoría de estos pacientes. El dilema diagnóstico y terapéutico planteado por la enfermedad de Cushing se complica adicionalmente por morbididades metabólicas y cardiovasculares significativas, y mortalidad asociada a hipercortisolismo crónico incontrolado<sup>1</sup>.

El desarrollo de fármacos dirigidos a tumores para enfermedad de Cushing es un reto importante, ya que sigue siendo enigmática la patogénesis de los adenomas corticotropos. Se han desarrollado inhibidores de proteínas cinasas farmacológicas que pueden controlar el crecimiento celular y metabolismo, bloquear la progresión del ciclo celular, modular la transcripción e inducir la apoptosis en células cancerosas para terapias tumorales dirigidas basadas en el mecanismo y no genotóxicas<sup>10,11</sup>. Recientemente, se han sugerido proteínas cinasas, por ejemplo, la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (HER) y cinasas dependientes de ciclinas como dianas terapéuticas para tumores hipofisarios<sup>8,39,40</sup>. Aunque las respuestas tumorales a inhibidores de proteínas cinasas son selectivas, y pueden ser dictadas por mutaciones específicas y/o el contexto de tumor celular, la prueba preclínica está dificultada por las malas predictibilidades con respecto a la patofisiología molecular de los tumores que se evalúan. Modelos animales que reflejan exactamente la patogénesis molecular de la enfermedad humana y permiten la rápida lectura no invasiva de la inhibición celular de tumores facilitarían la prueba de fármacos contra tumores corticotropos.

Aquí, los inventores informan de la generación de peces cebra transgénicos de la línea germinal que expresan en exceso zPttg dirigido a células POMC hipofisarias, como modelo de animal vertebrado pequeño de enfermedad de Cushing. Aunque el fenotipo de hipercortisolismo se observó en pez cebra Tg:Pomc-Pttg adulto de 3 meses de edad, la expansión de corticotropos hipofisarios con resistencia parcial a retroalimentación negativa de glucocorticoides ya se detectó dentro de los 2 primeros días del desarrollo embrionario de peces cebra transgénicos estables. Además, la hipófisis de Tg:Pomc-Pttg demuestra un rasgo característico de adenomas corticotropos humanos, es decir, la regulación por incremento de ciclina E y la interrupción de la fase G1/S. Las características moleculares y las patologías tempranas de tumores corticotropos en peces transgénicos Tg:Pomc-Pttg permitió el

entendimiento de mecanismos subyacentes a la patogénesis de la enfermedad, y también probar la eficacia de fármacos *in vivo*.

La expresión en exceso de ciclina E está asociada a la transición de G1/S interrumpida que contribuye al desarrollo y progresión de carcinomas de mama, leucemia y linfomas<sup>31</sup>. En la hipófisis, la expresión de ciclina E está preferencialmente regulada por incremento en adenomas corticotropos en comparación con tumores que aparecen de otros linajes, cuyos mecanismos quedan por ser completamente definidos<sup>32,41,42</sup>. En un subgrupo de adenomas corticotropos, la regulación por incremento de ciclina E se asoció a pérdida de expresión de Brg1, sugiriendo la presencia de reguladores de ciclina E adicionales en corticotropos<sup>27</sup>. Estos resultados muestran que la expresión en exceso del PTTG corticotropo induce a la ciclina E, mientras que el ARNip de PTTG suprime la expresión de ciclina E en células de tumor corticotropo murino (Figura 3). PTTG se expresa en exceso en más del 90 % de tumores hipofisarios que incluyen adenomas corticotropos<sup>13</sup>. Además de inducir la transición de G1/S y G2/M anómala mediante la desregulación transcripcional de la expresión de ciclina<sup>13,15-18</sup>, causando inestabilidad cromosómica y aneuploidía, la expresión en exceso de PTTG hipofisario activa las vías de senescencia específica de linaje que desencadenan la parada irreversible del ciclo celular en tumores que expresan hormona de crecimiento (GH) y gonadotropina (LH, FSH)<sup>13,20,21</sup>. La regulación por incremento de ciclina E corticotropa puede representar otra vía para efectos específicos de linaje hipofisario inducidos por PTTG, aunque todavía no está claro si PTTG regula la expresión de ciclina E directa o indirectamente.

La regulación por incremento de ciclina E corticotropa contribuye a la re-entrada en el ciclo celular de corticotropos diferenciados e inestabilidad de centrosomas<sup>9</sup>. Para investigar la importancia clínica de la desregulación de ciclina E en adenomas corticotropos, se realizó la prueba de fármacos *in vivo* en embriones Tg:Pomc-Pttg usando compuestos de molécula pequeña conocidos con diferentes espectros de selectividad inhibitoria de CDK/ciclina. Estos resultados indicaron la inhibición de corticotropos que expresan en exceso PTTG por los análogos de purina sustituidos en 2,6,9, olomucina y R-roscovitina, demostrando la última una mayor eficacia *in vivo* (Figura 3). Efectos inhibidores de corticotropos de R-roscovitina se validaron adicionalmente en tumores corticotropos de ratón (Figura 4 y 5). La R-roscovitina detiene las fases G1/S o G2/M mediante la inhibición de CDK1/2 compitiendo por sitios de unión a ATP<sup>12</sup>, inhibición de la transcripción dependiente de ARN polimerasa II y acción selectiva contra CDK2/ciclina<sup>43,44</sup>. La molécula está actualmente sometándose a ensayos clínicos para varios tumores malignos, y la vía de dosificación oral y los efectos secundarios relativamente leves de la R-roscovitina hacen factible el tratamiento diario a largo plazo de la enfermedad de Cushing.

Estos resultados sugieren que la actividad antitumoral de R-roscovitina en adenomas corticotropos implica vías mediadas por CDK2/ciclina y Rb, independientes de p53 (Figura 4). Los resultados tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que la R-roscovitina también suprime la expresión/producción de ACTH (Fig. 4 y 5), sugiriendo otros mecanismos reguladores, además del crecimiento celular mediado por CDK2/ciclina E. Uno de los posibles mecanismos puede implicar la inhibición de las vías de señalización de receptores de CRH en células tumorales corticotropas, ya que análogos de purina trisustituidos en 2,6,9 se han desarrollado como antagonistas de receptores de CRH que presentan posible actividad ansiolítica y antidepressiva<sup>45</sup>. El cribado *in vivo* adicional de bibliotecas de moléculas pequeñas con pez transgénico Tg:Pomc-Pttg puede conducir a la identificación de compuestos con efectos duales más potentes que se dirigen tanto al crecimiento de tumores corticotropos como a la producción de ACTH.

Los inventores han mostrado en el presente documento que un inhibidor de CDK/ciclina particular puede suprimir el crecimiento tumoral hipofisario y la producción de hormonas (por ejemplo, inhibidor de CDK2/ciclina E contra tumor corticotropo). Aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, los inventores creen que la supresión es mediante linaje celular y/o mecanismos específicos de inhibidores de CDK. Por tanto, otros tipos de inhibidor de CDK/ciclina también pueden ser capaces de inhibir un tipo diferente de tumores hipofisarios, tales como tumores somatotropos. Como tal, el uso de inhibidores de CDK/ciclina para tratar tumores hipofisarios se incluye en las realizaciones de la presente invención.

Según la invención, se proporciona una composición que comprende olomucina y R-roscovitina o sales de la misma para su uso como un medicamento para administración, en una cantidad terapéuticamente eficaz, a un sujeto mamífero en necesidad de tratar un tumor corticotropo hipofisario, suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o tratar enfermedad de Cushing para tratar el tumor hipofisario corticotropo, suprimir los niveles de ACTH y/o niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o tratar enfermedad de Cushing.

Estos métodos pueden comprender: proporcionar una composición que comprende un inhibidor selectivo de CDK/ciclina y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto mamífero para tratar el tumor hipofisario, para suprimir la ACTH y/o niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, para inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o para tratar enfermedad de Cushing.

La olomucina y la R-roscovitina son inhibidores selectivos de CDK/ciclinas. Ejemplos de otros inhibidores de CDK/ciclinas se proporcionan en las Tablas 1-3.

Tabla 1. Inhibidores peptídicos de CDK/ciclinas

Inhibidores de CDK	Aminoácidos	Secuencia	SEC ID Nº:	Diana
P21	15-40	No informada	-	CDK2/ciclina E
P21	58-77	No informada	-	CDK2/ciclina E
P21	17-33	ACRRLFGPVDSEQLSRD	3	CDK2/ciclina E
P21	63-77	AWE RVRGLGLPKLY	4	CDK2/ciclina E
P21	141-160	KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS	5	PCNA y CDK4/ciclina D1
P21	141-160	KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS	6	CDK4/ciclina D1
P21	141-160	KRRQTS ATDFYHSKRRLIFS	7	CDK4/ciclina D1
P21	139-164	GRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSK RKP	8	CDK2/ciclina E
P21	141-160	KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS	9	CDK2/ciclina E y PCNA
P21	141-160	KRRATSMTDFYHSKRRLIFS	10	CDK2/ciclina E
P21	141-160	KRRQTSATDFYHSKRRLIFS	11	CDK2/ciclina E
P21	141-160	KRRQTSMTDFYHSKRRLIAS	12	CDK2/ciclina E
P21	139-164	GRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSK RKP	13	CDK2/ciclina E
P21	139-164	GRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSK RKP	14	CDK2/ciclina E
P21	139-164	GRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSK RKP	15	CDK2/ciclina E
P21	152-159	HAKRRLIF	16	CDK2/ciclina A
P16	84-103	DAAREGFLDTLVVHRAGAR	17	CDK4 y CDK6
E2F	87-94	PVKRRLDL	18	Cdk2/ciclina A-E2F
Rb	864-880	SNPPKPLKRFDIE	19	CDK2/ciclina A
P27		Ala-Ala-Abu*-Arg-Lys-Leu-Phe-Gly**	20	CDK2/ciclina A
Rb2/p130	641-673	Spa 310	-	CDK2
Ciclina A	285-306	TYTKKQVLRMEHLVLKVLTFDL	21	CDK2/ciclina A
Ciclina A	285-306	TYTKKQVLRMEHLVLKVLTFDL	22	CDK2/ciclina A
CDK2/ciclina A		NBI1: RWIMYF-NH <sub>2</sub>	23	Ciclina A

Tabla 2. Clases de inhibidores competitivos de CDK ATP y el compuesto más representativo de cada categoría. \* en ensayo clínico de fase I/II

Inhibidores de CDK/ciclinas	IUPAC	Diana
<b>Derivados de flavonoides</b>		
Flavopiridol*	2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-((3S,4S)-3-hidroxi-1-metilpiperidin-4-il)-4H-cromon-4-ona	CDK2-4-6-9
P-276-00*	No informado	CDK2-1-4
<b>Derivados de purina</b>		
(R)-roscovitina*	6-(bencilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)butan-1-ol	CDK1-2-5-7-9
olomucina	No informado	
NU2058	No informado	CDK2-1

Inhibidores de CDK/ciclinas	IUPAC	Diana
<b>Derivados de tiazol</b>		
SNS-032*	N-(5-((5-terc-butiloxazol-2-il)metiltio)tiazol-2-il)piperidin-4-carboxamida	CDK2-7-9
<b>Derivados de diaminopirimidina</b>		
R-547*	No informado	CDK1/ciclina B CDK2/ciclina CDK4/ciclina D1
<b>Derivado de piridina</b>		
PD-0332991 *	1-(2-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-ilamino)-8-ciclopentil-5-metilquinazolin-6-il)etanona	CDK4-6
<b>Derivado de pirazol</b>		
AT-7519 N*	4-(2,6-diclorobenzamido)-N-(piperidin-4-il)-1H-pirazol-3-carboxamida	CDK1-2-7-9
<b>Hidroxiestaurosporina</b>		
UCN-01 N	No informado	CDK2, pRb
<b>Derivados de indirubina</b>	indirubin-3-oxima sustituida en 5,5'	CDK1-2
<b>Derivados de indol</b>		
Indol-3 carbinol	(1H-indol-3-il)metanol	ciclina D1, ciclina E, CDK2-4-6, p15, p21, p27
<b>Derivados de paulona</b>	dihidro-indolo-benzazepinas	CDK (no específicas)
<b>Derivados de himenialdisina</b>		
Himenialdisina	No informado	CDK, GSK-3, ch1

Tabla 3. Otros inhibidores de CDK/ciclinas de molécula pequeña comercialmente disponibles

Inhibidores de CDK/ciclinas	IUPAC	Diana
SU 9516	No informado	CDK2-1-4
BML-259	No informado	CDK5-2
Purvalanol A	No informado	CDK2-5-4
Riuidina	No informado	CDK4
AG-024322	No informado	CDK1-2-4
Fascaplisina	No informado	CDK4

En diversas realizaciones, el tumor hipofisario es un tumor corticotropo hipofisario. En diversas realizaciones, el tumor corticotropo es un tumor corticotropo que expresan en exceso PTTG. En diversas realizaciones, el adenoma hipofisario secretor de ACTH es un tumor corticotropo hipofisario. En diversas realizaciones, el sujeto mamífero es un sujeto humano.

Pueden proporcionarse olomucina y R-roscovitina como composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una olomucina, R-roscovitina o una sal de la misma. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, además de para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

Composiciones farmacéuticas que comprenden olomucina, R-roscovitina o una sal de la misma pueden formularse para la administración mediante cualquier vía de administración. “Vía de administración” puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, aerosol, nasal, oral, transmucosa, transdérmica, parenteral o enteral. “Parenteral” se refiere a una vía de administración que está generalmente asociada a inyección, que incluye intraorbital, infusión, intrarterial, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal. Mediante la vía parenteral, las composiciones pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o como polvos liofilizados. Mediante la vía parenteral, las composiciones pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones para infusión o para inyección. Mediante la vía enteral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas de gel, comprimidos recubiertos de azúcar, jarabes, suspensiones, disoluciones, polvos, gránulos, emulsiones, microesferas o nanoesferas o vesículas de lípidos o vesículas de polímero que permiten la liberación controlada.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. “Vehículo farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que participa en llevar o transportar un compuesto de interés de un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el vehículo puede ser una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulamiento líquido o sólido, o una combinación de los mismos. Cada componente del vehículo debe ser “farmacéuticamente aceptable” porque debe ser compatible con los otros componentes de la formulación. También debe ser adecuado para su uso en contacto con cualquier tejido u órgano con el que pueda ponerse en contacto, que significa que no debe llevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas también pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para administración por vía oral. Pueden añadirse vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para potenciar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, dihidratado, alabastro, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, goma arábiga, agar o gelatina. El vehículo también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Las preparaciones farmacéuticas se preparan siguiendo las técnicas convencionales de la farmacia que implican moler, mezclar, granular y comprimir, cuando sea necesario, para formas de comprimido; o moler, mezclar y envasar para formas de cápsula de gelatina dura. Si se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de un jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Una formulación líquida tal puede administrarse directamente p.o. o envasarse en una cápsula de gelatina blanda.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa es aquella cantidad de la composición que dará los resultados más eficaces en términos de eficacia de tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen, pero no se limitan a, las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo de enfermedad y etapa, condición física general, sensibilidad a una dosificación dada y tipo de medicación), la naturaleza del vehículo farmacéuticamente aceptable o vehículos en la formulación, y la vía de administración. Un experto en las ciencias clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante experimentación rutinaria, por ejemplo, monitorizando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosificación consecuentemente. Para orientación adicional véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000).

Dosificaciones típicas de olomucina, R-roscovitina o sal de la misma pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante donde se usan compuestos terapéuticos conocidos, y también como se indica por el experto por las respuestas *in vitro* o respuestas en modelos animales. Tales dosificaciones normalmente pueden reducirse hasta aproximadamente un orden de magnitud en la concentración o cantidad sin perder la actividad biológica relevante. Así, la dosificación real dependerá del criterio del médico, la condición del paciente y la eficacia del método terapéutico basándose, por ejemplo, en la sensibilidad *in vitro* de las células cultivadas primarias relevantes o muestra de tejido histocultivada, tal como tumores malignos biopsizados, o las respuestas observadas en los modelos animales apropiados, como se ha descrito previamente.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Hasta el punto de que se mencionan materiales específicos, es simplemente para fines de ilustración y no pretende limitar la invención. Un experto en la materia puede desarrollar medios equivalentes o reactantes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

## Ejemplo 1

La expresión en exceso de PTTG transgénico estable dirigido a células POMC hipofisarias induce rápidamente patologías tempranas de enfermedad de Cushing

5 Como etapa inicial hacia la identificación de novedosas dianas para terapia de enfermedad de Cushing, se creó un modelo de pez cebra de tumores corticotropos hipofisarios. Dada la secuencia de proteínas de PTTG de pez cebra altamente conservada (Figura 6), y aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, los inventores creen que el PTTG de pez cebra presenta propiedades conservadas que implican desregulación del ciclo celular en la formación de tumores hipofisarios<sup>22</sup>. Para probar esto, los inventores dirigieron la expresión en exceso de PTTG a linajes de POMC hipofisarias bajo el control del promotor *zPomc*. Se co-inyectaron embriones de la etapa de una a dos células con ARNm de transposasa y un casete de transposición Tol2 que flanquea un promotor proximal *zPomc* fusionado con un ADNc de *zPttg* de longitud completa. El análisis de ARN *in situ* de montaje completo en embriones de la generación F2 confirmó la expresión en exceso de *zPttg*, que coincidió temporal y espacialmente con la ontogenie de células POMC hipofisarias (Figura 1A y <sup>23</sup>). Se mantuvieron tres líneas transgénicas independientes, y la transmisión mendeliana estable para la expresión de *Pomc-Pttg* está presente durante más de cinco generaciones.

Para investigar el efecto de la expresión en exceso de *zPttg* sobre el desarrollo del linaje de POMC hipofisarias embrionarias, los inventores analizaron factores de transcripción hipofisarios altamente conservados como marcadores para tanto linaje hipofisario no de POMC (*Pit-1*) como de POMC (*Tpit/Tbx-19*)<sup>24-26</sup>. 2 días después de la fecundación (dpf), larvas Tg:*Pomc-Pttg* demostraron elevada expresión de *Tpit/Tbx-19* hipofisaria, pero no se alteró la expresión de *Pit-1* (Figura 1B), que indica expansión específica de linaje de POMC temprana. También se generaron embriones transgénicos dobles (Tg:*Pomc-Pttg*;POMC-eGFP) criando pez cebra Tg:*Pomc-Pttg* en una línea transgénica previamente establecida, POMC-GFP, en la que la expresión de eGFP se dirigió a células POMC hipofisarias por el mismo promotor *zPomc*, representando así un marcador específico de linaje de POMC<sup>23</sup>. Larvas transgénicas dobles vivas (Tg:*Pomc-Pttg*;POMC-eGFP) presentaron expansión del linaje de POMC como se demuestra por la elevada expresión de eGFP hipofisaria (Figura 1C).

Los corticotropos hipofisarios son un componente crítico del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HPA) que media en la respuesta a estrés mediante la producción de Gc de la glándula suprarrenal estimulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y posteriormente estimulada por ACTH hipofisaria. Los Gc ejercen retroalimentación negativa sobre la expresión y secreción de ACTH derivada de CRH y POMC para restaurar la homeostasis de HPA tras el estrés. En tumores corticotropos humanos, la hipersecreción de ACTH es parcialmente resistente a la regulación de la retroalimentación negativa de Gc, agravando adicionalmente el hipercortisolismo incontrolado<sup>27</sup>. Para investigar la integridad de la vía de retroalimentación negativa de Gc en corticotropos Tg:*Pomc-Pttg*, embriones de pez cebra vivos se expusieron a medio de cultivo que contenía dexametasona a partir de 10 horas después de la fecundación (hpf). La expresión de eGFP hipofisaria se suprimió en larvas de POMC-GFP expuestas a dexametasona  $10^{-7}$  M 4 días después de la fecundación (dpf), pero no en larvas transgénicas dobles (Tg:*Pomc-Pttg*;POMC-eGFP), que solo presentaron inhibición de la expresión de eGFP hipofisaria en respuesta a concentraciones de dexametasona 10 veces mayores ( $10^{-6}$  M) (Figura 1 C), sugiriendo disminución de la sensibilidad de Gc de corticotropos Tg:*Pomc-Pttg*. Así, los corticotropos Tg:*Pomc-Pttg* desarrollan rápidamente la patología distintiva de la enfermedad de Cushing dependiente de ACTH en el plazo de 4 días desde el desarrollo embrionario, es decir, resistencia parcial a glucocorticoides.

En peces Tg:*Pomc-Pttg* adultos (20 meses de edad), la inmunohistoquímica reveló células hipofisarias de aspecto neoplásico abierto con una alta relación nuclear/citoplásmica, nucléolos distintos y citoplasma basófilo que se tiñó fuertemente para ACTH en dos de seis hipófisis Tg:*Pomc-Pttg* analizadas, que se parecen morfológicamente a adenomas secretores de ACTH hipofisarios humanos, mientras que ninguna de las seis hipófisis WT mostró un fenotipo similar (Figura 1D). Hipófisis de pez cebra WT presentaron un índice de PCNA global del  $2,3 \pm 0,9$  % frente al  $3,1 \pm 1,3$  % en Tg:*Pomc-Pttg* (media  $\pm$  EE,  $p = 0,6$ ), mientras que células productoras de ACTH en la hipófisis Tg:*Pomc-Pttg* mostraron índice de PCNA elevado en comparación con WT ( $2,8 \pm 0,1$  % frente al  $1,8 \pm 0,2$  %, media  $\pm$  EE,  $p = 0,05$ ) (Figura 1E), sugiriendo G1/S alterado en corticotropos neoplásicos como resultado de la expresión en exceso de *zPttg*.

## Ejemplo 2

Hipercortisolismo y alteración metabólica en pez cebra Tg:*Pomc-Pttg*

Se probó si los cambios en células corticotropas neoplásicas observados en pez cebra Tg:*Pomc-Pttg* conducen a secreción de ACTH autónoma y posterior hipercortisolismo. Debido a que está técnicamente impedida la medida de niveles de ACTH en plasma o de cortisol en suero por la cantidad muy limitada de sangre obtenible de cada pez cebra adulto (~5  $\mu$ l), los inventores midieron el contenido de cortisol total en peces cebra Tg:*Pomc-Pttg* de la misma edad y peso y sus hermanos negativos para transgén. A los 3 meses de edad, el pez Tg:*Pomc-Pttg* adulto mostró el 40 % de aumento de contenido de cortisol frente a los hermanos WT ( $1,4 \pm 0,2$   $\mu$ g/l/mg frente a  $1,0 \pm 0,2$   $\mu$ g/l/mg,  $n=12$  para cada grupo, media  $\pm$  EE,  $p<0,01$ ). Se realizaron secciones histológicas de riñón de pez cebra para identificar células esteroideogénicas de glucocorticoide de pez cebra<sup>28</sup>. El pez Tg:*Pomc-Pttg* demostró elevadas

capas de células epiteliales intra-renales que rodeaban la vena cardinal posterior en comparación con WT, de acuerdo con hiperplasia suprarrenal estimulada por ACTH (Figura 2A).

Para determinar el impacto metabólico del hipercortisolismo en pez cebra Tg:Pomc-Pttg, peces Tg:Pomc-Pttg y WT adultos se sometieron a 16 horas de ayuno, seguido de alimentación a voluntad de dieta regular durante una hora. El pez cebra Tg:Pomc-Pttg presentó niveles coherentemente mayores de niveles de glucosa en sangre en ayunas y postprandial que el pez cebra WT ( $96 \pm 9$  frente a  $65 \pm 10$  mg/dl, media  $\pm$  D.E.,  $p < 0,0001$ ) (Figura 2B), demostrando tanto tolerancia a la glucosa en ayunas como postprandial atenuada. Debido a que los peces teleosteos son intolerantes a la glucosa debido a respuestas periféricas mitigadas a la insulina<sup>29</sup>, y los glucocorticoides inducen resistencia a la insulina en mamíferos, se evaluó la sensibilidad a la insulina probando respuestas de glucosa en sangre a la insulina intraperitonealmente administrada. Aunque los peces WT demostraron una respuesta brusca 30 minutos después de la inyección de una dosis de insulina relativamente alta (0,1 unidad/100 mg) ( $p < 0,01$ ), los peces Tg:Pomc-Pttg no mostraron cambio significativo de los niveles de glucosa en sangre durante hasta 90 minutos después de la inyección de insulina (Figura 2C). El contenido de lípidos hepáticos, como se detecta por la tinción con oil-Red-O, aumentó en peces Tg:Pomc-Pttg (Figura 2D y E), sugiriendo adiposidad visceral debido a la elevada resistencia a la insulina. Finalmente, el hipercortisolismo crónico ejerce efectos miocárdicos específicos que conducen a un aumento del espesor de la pared ventricular con posterior disfunción sistólica y diastólica que contribuye a alto riesgo de insuficiencia cardíaca en pacientes con enfermedad de Cushing<sup>1,30</sup>. Reflejando el estado hipercortisolémico crónico debido a la expresión en exceso de PTTG corticotropo, se observó un espectro de hipertrofia cardíaca en peces Tg:Pomc-Pttg (24 meses) de etapa tardía, con elevado espesor de la pared del corazón que implica tanto zonas trabeculares como compactas de la cámara ventricular individual (Figura 2F). Cuatro de 18 peces transgénicos Tg:Pomc-Pttg también demostraron la co-existencia de efusión pericárdica abierta (Figura 2F, paneles superiores). Tomados conjuntamente, la expresión en exceso de PTTG dirigido a corticotropo en pez cebra Tg:pomc-pttg produce hipercortisolismo dependiente de ACTH y alteraciones metabólicas que imitan las características de enfermedad de Cushing de mamífero.

### 25 Ejemplo 3

La expresión en exceso de PTTG corticotropo induce ciclina E

Estudios previos indicaron que PTTG facilita la transición de G1/S actuando coordinadamente con Sp1 para regular por incremento la expresión de ciclina D en células de coriocarcinoma humano<sup>17</sup>. Para entender el mecanismo para la expresión en exceso de PTTG corticotropo de pez cebra que induce la transición alterada de G1/S (Figura 1), se analizó la expresión de reguladores clave del ciclo celular de G1/S por PCR en tiempo real en hipófisis Tg:Pomc-Pttg y WT adultas. Mientras que la expresión de ciclina D, p21 y p27 hipofisarias no fueron diferentes entre WT y Tg:Pomc-Pttg, los niveles de ARNm de ciclina E fueron superiores al doble en la hipófisis Tg:Pomc-Pttg (Figura 3A). La regulación por incremento de ciclina E se ha asociado a malos resultados clínicos en tumores malignos humanos<sup>31</sup>. En hipófisis adulta, la ciclina E es indetectable en células normales, mientras que se regula preferencialmente por incremento en tumores de linaje(s)<sup>32</sup> corticotropo(s), pero no otros. En células POMC hipofisarias murinas, la expresión en exceso de ciclina E colabora con la mutación nula p27kip1 para aumentar la proliferación celular, inestabilidad de centrosomas y formación de tumores<sup>9</sup>. La ciclina E regulada por incremento también está asociada a pérdida de Brg1 observada en  $\sim 1/3$  de los adenomas corticotropos humanos<sup>9</sup>. Niveles de ARNm de ciclina E hipofisaria potenciados observados en pez Tg:Pomc-Pttg pueden no representar la expresión de proteínas; sin embargo, el tamaño mínimo de la hipófisis de pez cebra adulto ( $< 1$  mm) impidió técnicamente el análisis de la expresión de proteínas por transferencia Western. Por tanto, se determinó si PTTG regula la expresión de ciclina E en células AtT20 de mamífero (murinas) de tumor corticotropo que expresan abundantes proteínas PTTG y ciclina E endógenas. La supresión de la expresión de PTTG endógeno con un ARNip específico de PTTG produjo disminución de la expresión de ciclina E y niveles de p27kip1 potenciados (Figura 3B), mientras que no cambió la expresión de p21 (Figura 3B). Estas observaciones sugieren que la regulación por incremento de PTTG de ciclina E y la regulación por disminución de p27kip1 en células hipofisarias de tumor corticotropo se producen independientemente de p21.

### Ejemplo 4

Prueba in vivo de inhibidores de CDK/ciclinas en pez cebra Tg: Pomc-Pttg

La diferenciación de células POMC hipofisarias de pez cebra empieza en la cresta neural anterior 20 hpf, y se completa dentro de la hipófisis madura 48 hpf 23. Dentro de los primeros días del desarrollo embrionario, los peces transgénicos mostrados aquí recapitulan características distintivas de la enfermedad de Cushing, es decir, expansión corticotropa específica de linaje con resistencia parcial a glucocorticoides (Figura 1). La alteración de G1/S observada, regulación por incremento de ciclina E y cambios corticotropos neoplásicos condujo al cribado de inhibidores de CDK de molécula pequeña con diferentes espectros de selectividad inhibitoria, que incluyen flavopiridol (CDK 4/6, 2, 1, 9), R-roscovitina (CDK 2, 1)<sup>33</sup>, olomucina (CDK 2, 1)<sup>33</sup>, PD-0332991 (CDK 4/6) y CAY10572 (CDK 7)<sup>34</sup>. Embriones transgénicos dobles Tg:Pomc-Pttg;POMC-eGFP se expusieron a cada compuesto añadido al medio de cultivo del embrión. Aunque el flavopiridol retardó el desarrollo embrionario temprano antes de que se produjera la ontogenie corticotropa, el tratamiento *in vivo* de embriones de pez cebra con R-roscovitina, olomucina, PD-0332991 y CAY10572 a partir de 18 hpf no provocó defecto del crecimiento evidente 40 hpf (Figura

3C). Sorprendentemente, los embriones tratados con R-roscovitina presentaron aproximadamente el 40 % de reducción en la expresión de POMC-eGFP hipofisaria en comparación con los controles ( $1,0 \pm 0,08$  frente a  $0,6 \pm 0,09$ , media  $\pm$  E.E.,  $n = 7$  para cada grupo,  $p < 0,02$ ) (Figuras 3C y D). También se observó una modesta reducción de aproximadamente el 20 % de la expresión de POMC-eGFP en el grupo tratado con olomucina ( $1,0 \pm 0,08$  frente a  $0,8 \pm 0,07$ , media  $\pm$  E.E.,  $n = 7$  para cada grupo,  $p = 0,07$ ), mientras que PD-0332991 y CAY10572 no provocaron cambio significativo en la expresión de POMC-eGFP hipofisaria en comparación con controles (Figuras 3C y D).

Para determinar la especificidad de la acción de R-roscovitina contra células POMC que expresan en exceso zPttg, se generó otra línea transgénica doble (Tg:Pomc-Pttg;Prl-RFP) criando peces Tg:Pomc-Pttg con una línea transgénica PRL-RFP previamente generada, en la que RFP se dirigió a lactótopos hipofisarios por un promotor 35 de *prolactina* de pez cebra. El tratamiento *in vivo* entre 18 y 48 hpf de embriones Tg:Pomc-Pttg;Prl-RFP y Tg:Pomc-Pttg;POMC-eGFP con R-roscovitina no reveló efecto sobre la expresión de Prl-RFP ( $1,0 \pm 0,08$  frente a  $1,0 \pm 0,09$ , media  $\pm$  E.E.,  $n = 9$  para cada grupo,  $p = 0,3$ ), pero sí una reducción superior al 50 % de la expresión de POMC-eGFP ( $1,0 \pm 0,07$  frente a  $0,5 \pm 0,05$ , media  $\pm$  E.E.,  $n = 10$  para cada grupo,  $p < 0,000005$ ) en comparación con grupos de control (Figuras 3E y F).

### Ejemplo 5

#### Acción de R-roscovitina en células tumorales corticotropas de ratón

La olomucina y la roscovitina son purinas trisustituidas en 2,6,9 estructuralmente relacionadas que producen la parada de G1/S o G2/M compitiendo por los sitios de unión de ATP sobre CDK1 y CDK2. El isómero de R-roscovitina (R-roscovitina, CYC202) es un más inhibidor de CDK2/ciclina potente y selectivo, y los corticotropos murinos son altamente sensibles a las vías del ciclo celular mediado por CDK2/ciclina E alterado<sup>9</sup>. La regulación por incremento de ciclina E conduce a la reentrada en el ciclo celular de células POMC diferenciadas y también inactiva p27<sub>kip1</sub>, potenciando adicionalmente la progresión del ciclo celular<sup>9</sup>. Además, p27<sub>kip1</sub> protege células POMC hipofisarias diferenciadas de la reentrada en el ciclo celular, mientras que p57<sup>Kip2</sup> se requiere para la salida del ciclo celular de células precursoras hipofisarias<sup>36</sup>. Dada la potencia *in vivo* de R-roscovitina contra corticotropos que expresan en exceso Pttg de pez cebra (Figura 3), los inventores estudiaron su efecto sobre las vías del ciclo celular mediado por CDK2/ciclina E en células tumorales hipofisarias que secretan ACTH de ratón (Figura 4).

El tratamiento con R-roscovitina ( $1-2 \times 10^{-5}$  M) condujo a un reducido número de células a las 24 horas (Figura. 4A). El análisis de transferencia Western de extractos de proteína derivados de células tratadas con R-roscovitina reveló la evidencia de parada del ciclo celular que incluye expresión reducida de ciclina E, elevada de p27<sub>kip1</sub>, p57<sup>Kip2</sup> y p21<sub>cip1</sub>, además de fosforilación de Thr821 reducida de Rb (Figura. 4B). El tratamiento con R-roscovitina también indujo características senescentes a las 48 horas como se evidencia por la elevada expresión de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 4C).

De acuerdo con la reducida viabilidad celular, la disminución de concentraciones de ACTH se detectó en medio de cultivo derivado de células AtT20 tratadas con R-roscovitina (Figura 4D). El análisis de transferencia Western de extractos de proteína derivados de células AtT20 tratadas con R-roscovitina mostró expresión de ACTH suprimida (Figura 4E). Estos resultados indican que la R-roscovitina se dirige a la progresión del ciclo celular mediado por cdk2/ciclina E, y también inhibe la expresión de proteínas ACTH corticotropas.

### Ejemplo 6

#### R-roscovitina inhibe el crecimiento de tumores corticotropos *in vivo* y expresión de ACTH

Para establecer adicionalmente la acción de R-roscovitina sobre tumores corticotropos *in vivo*, ratones sin pelo atímicos (6 ~ 8 semana de edad) se inyectaron subcutáneamente con células AtT20 de tumor corticotropo ( $1 \times 10^5$  células). Tres días después de la inyección de células tumorales, 29 de los 30 ratones habían desarrollado tumores subcutáneos pequeños ( $\sim 2-3$  mm<sup>3</sup>) pero visibles, y se aleatorizaron para recibir tanto R-roscovitina (150 mg/kg) como vehículo por sonda nasogástrica oral dos veces al día durante cinco días cada semana. Después de tres semanas, la R-roscovitina produjo  $\sim 50$  % de reducción de peso de xenoinjertos de tumor diseccionados ( $40,0 \pm 4,7$  mg frente a  $21,0 \pm 2,6$  mg, media  $\pm$  E.E.,  $n = 13-14$  para cada grupo,  $p < 0,02$ ) (Figura. 5A).

De acuerdo con las observaciones *in vitro*, los análisis de transferencia Western y de inmunohistoquímica de especímenes de tumor mostraron expresión de proteínas ACTH y PCNA suprimida por R-roscovitina (Figura 5B y C). Ratones tratados con R-roscovitina mostraron  $>50$  % de reducción en niveles de ACTH en plasma ( $1256 \pm 596$  pg/ml frente a  $596 \pm 103$  pg/ml, media  $\pm$  E.E.,  $n = 13-14$  para cada grupo,  $p < 0,01$ ), y  $\sim 50$  % de reducción en niveles de corticosterona en suero ( $1046 \pm 109$  ng/ml frente a  $561 \pm 72$  ng/ml, media  $\pm$  E.E.,  $n = 13-14$  para cada grupo,  $p < 0,005$ . Regresión lineal entre ACTH y corticosterona:  $r = 0,9425$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 5D).]. Los altos niveles de ACTH en plasma iniciales pueden representar secreción de tumor, además de respuestas inducidas por estrés durante la eutanasia con CO<sub>2</sub>.

### Ejemplo 7

#### Generación de peces cebra transgénicos Tg:pomc-pttg

Se identificó la secuencia EST de PTTG de pez cebra buscando con Blast la base de datos del genoma de pez cebra de la página web del Instituto Sanger (número de acceso de GenBank XM\_689974). Se usaron un par de cebadores correspondientes a las secuencias codificantes de 5' y 3' de ADNc de zPttg, zPttg1: 5'-AACGCTGGAC-CTTAGCGAAGACT-3' (SEC ID N°: 1) y zPttg2: 5'-TACTAGAACAGGTTTCTTTATTTTCTTGCGTG-3' (SEC ID N°: 2), para la amplificación por PCR para generar un ADNc de zPttg que contenía una secuencia codificante completa. Se usó un casete de transposón tol2 para generar el transgén Tg:pomc-pttg, y se generaron peces fundadores transgénicos como se ha descrito previamente<sup>23</sup>. Brevemente, se purificaron productos de PCR de la construcción de transgén Tg:pomc-pttg (sin ADN de vector) usando un kit GENE CLEAN III (Bio 101, Vista, CA) y se resuspendieron en Tris 5 mM, EDTA 0,5 mM, KCl 0,1 M a una concentración final de 100 µg/ml. Embriones fecundados de pez cebra no mutante se inyectaron en la etapa de una célula. Se llevaron a cabo microinyecciones cinco veces para generar aproximadamente 300 embriones supervivientes. Peces fundadores inyectados se aparearon con peces no mutantes y su progenie.

Se analizaron dos líneas de transgénicos Tg:pomc-pttg y mostraron características metabólicas similares. Todos los datos representados se derivan de la progenie transgénica F2 y F3.

Mantenimiento de pez cebra y tratamientos con fármaco *in vivo*. Se mantuvieron embriones de pez cebra y se criaron como se ha descrito<sup>23</sup>. Se disolvió dexametasona (Sigma) en agua destilada, se disolvieron R-roscovitina (Selleck Chemicals), flavopiridol (Selleck Chemicals), PD0332991 (Selleck Chemicals), olomucina (Cayman Chemical Co.) y CAY10578 (Cayman Chemical Co.) en 0,2 % de DMSO a una concentración madre de 1 mM, y se diluyó en medio de pez inmediatamente antes de añadir a embriones vivos en las etapas indicadas.

#### Ejemplo 8

Hibridación *in situ* de montaje completo de ARN

Se subclonó un producto de PCR de zPttg de pez de cebra de 1,0 kb en el vector pCR4-TOPO, que posteriormente se linealizó por NotI y se transcribió con T3 polimerasa para generar ARNm antisentido de zPttg. Se generó ARNm antisentido de Pit-1 como se ha descrito<sup>46</sup>. La identificación y aislamiento de Tpit de pez cebra por búsqueda con Bioinformatic de la base de datos del genoma de pez cebra ([http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio); T. J. P. Hubbard et al., *Ensembl 2007 Nucleic Acids Res.* 2007 Vol. 35, edición de la base de datos: D610-D617), seguido de análisis de secuencias de ADN de productos de PCR aislados, se describen por separado. Se realizaron hibridaciones de ARN *in situ* de embriones de pez cebra de montaje completo como se ha descrito<sup>47</sup>.

#### Ejemplo 9

#### 30 Histología e inmunohistoquímica

Se fijaron cabezas de pez cebra adulto en 4 % de paraformaldehído durante la noche y se incorporaron en parafina. Se realizaron tinción H&E e inmunohistoquímica sobre secciones de 5 µM. Se usó la técnica del complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos anti-ACTH humana de conejo (1:100; National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; y A. F. Parlow, Harbor-University of California, Los Angeles, Medical Center, Los Angeles, CA). Para análisis de inmunofluorescencia, se diseccionaron hipófisis y se fijaron. Las tinción de anticuerpos para PCNA (1:100; Abcam) y ACTH (1:100) fue seguida de anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa 488 o colorante fluorescente Alexa 568 (Abcam).

#### Ejemplo 10

#### 40 Microscopía fluorescente y obtención de imágenes confocales

Se examinaron embriones WT y transgénicos en diversas etapas de desarrollo bajo un filtro de isotiocianato de fluoresceína en un microscopio Axioplan-2 (Carl Zeiss). Se generaron imágenes de embriones vivos con una cámara de vídeo Axiocam (Carl Zeiss). Se midió la intensidad de fluorescencia de células positivas para POMC-GFP por la función del área de interés en el software Openlab (Improvision). Para la obtención de imágenes confocales, se capturaron imágenes en una serie Z usando microscopio confocal TCS SP (Leica Microsystems). Se detectó GFP en un intervalo espectral de 507 a 550 nm, RFP de 585 a 690 nm y DAPI de 460 a 480 nm. Se prepararon imágenes usando Leica LCS lite, Volocity 5.2 (Improvision) y Photoshop 7.0 (Adobe). Se midieron la intensidad y el área de GFP y RFP hipofisarias usando Volocity 5.2 (Improvision). Tinción de lípidos. Se tiñeron criosecciones de hígado con oil redO (Sigma-Aldrich) por protocolo del fabricante. La tinción de lípidos se puntuó basándose en la distribución del área (>50 % de células positivas, 2 puntos; <50 % pero >10 %, 1 punto; < 10 %, 0 puntos) e intensidad [fuerte, gotitas de lípidos grandes (tamaño de célula), 2 puntos; débil, gotitas de lípidos pequeñas (más pequeño que el tamaño de la célula), 1 punto; negativo, 0 puntos].

#### Ejemplo 11

Niveles de glucosa en sangre y pruebas de tolerancia a la insulina

5 Para la medición de la glucosa en sangre, se anestesiaron peces cebra adultos en 0,04 % de metanosulfonato de tricaina antes de la sección de la cola, y se aplicaron 2 µl de sangre de la cola a una tira reactiva de glucómetro (OneTouch Ultra). Para la prueba de tolerancia a la insulina, peces cebra adultos se administraron con inyección de insulina peritoneal a una concentración de 0,1 U/100 mg de peso corporal, seguido de medición de la glucosa en sangre en diferentes momentos de tiempo.

#### Ejemplo 12

##### Radioinmunoensayo de cortisol

10 Se congelaron criogénicamente peces en nitrógeno líquido, se guardaron a -80 °C, se homogeneizaron sobre hielo con un micromolinillo (Eppendorf), a continuación se extrajeron con 500 µl de etanol frío. Después de la centrifugación durante 10 min a 1.000 × g a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se evaporó y el sedimento resultante se resuspendió en 25 µl de tampón calibrador cero para radioinmunoensayo de cortisol (Siemens). Se contó la radiactividad y los resultados se calcularon por COBRA II Auto Gamma (Perkin-Elmer).

#### Ejemplo 13

##### Ratones

15 Se realizaron experimentos animales según las pautas del Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional del Cedars-Sinai. Se inocularon células AtT20 de tumor corticotropo de ratón ( $\sim 1 \times 10^5$ ) s.c. en ratones nu/nu hembra de 6 semanas de edad. Tres días después de la inoculación de células tumorales, los animales se aleatorizaron para recibir R-roscovitina 150 mg/kg dos veces al día o vehículo por sonda nasogástrica oral durante 5 d cada semana. Después de 3 semanas de tratamiento, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>, y los tumores se diseccionaron, se pesaron y se congelaron criogénicamente para análisis adicional.

#### Ejemplo 14

##### Cultivo celular y transfección

25 Se cultivaron células AtT20 de tumor corticotropo de ratón en DMEM complementado con 10 % de FBS a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h, seguido de tratamiento de R-roscovitina o vehículo (0,2 % de DMSO). Las células se recuperaron diariamente con R-roscovitina y se mantuvieron en medio durante hasta 48 h. Las transfecciones con ARNip se realizaron en 70 % al 80 % de células confluentes usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante.

#### Ejemplo 15

##### Análisis de transferencia Western

30 Se prepararon muestras de proteína en tampón RIPA (Sigma), se separaron sobre geles de Bis-Tris NuPAGE Novex (Invitrogen) y se transfirieron sobre membrana de PVDF (Millipore) antes de la transferencia con anticuerpo primario [ciclina E, 1:500 (Abcam); PTTG, 1:1.000 (Abcam); β-actina, 1:5.000 (Sigma); y p21, 1:1.000, p27, 1:500, p57, 1:1.000, pRb821, 1:1.000 (Santa Cruz Biotechnology)] a 4 °C durante la noche. Después de lavarse con 0,5 % de Tween-20 en solución salina tamponada con Tris, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se desarrollaron usando reactivos de detección de transferencia Western ECL (GE Healthcare).

#### Ejemplo 16

##### Análisis estadístico

40 Se calculó el valor de p de niveles de cortisol corporal total por prueba de la t de Student para datos independientes. Las diferencias de grupos en los niveles de glucosa se evaluaron por ANOVA.

#### Referencias

1. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* May 2008;93(5):1526-1540.
2. Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul 2008;93(7):2454-2462.
3. Assie G, Bahurel H, Coste J, et al. Corticotroph tumor progression after adrenalectomy in Cushing's Disease: A reappraisal of Nelson's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan 2007;92(1):172-179.
4. Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, et al. Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan 2009;94(1):115-122.

5. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* Dec 2003;112(11):1603-1618.
6. Moons DS, Jirawatnotai S, Parlow AF, Gibori G, Kineman RD, Kiyokawa H. Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology.* Aug 2002;143(8):3001-3008.
- 5 7. Melmed S. Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* Nov 2009;119(11):3189-3202.
8. Sotillo R, Renner O, Dubus P, et al. Cooperation between Cdk4 and p27kip1 in tumor development: a preclinical model to evaluate cell cycle inhibitors with therapeutic activity. *Cancer Res.* May 1 2005;65(9):3846-3852.
9. Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, et al. Cooperation between Cyclin E and p27Kip1 in Pituitary Tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* Jul 21 2010.
- 10 10. Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol.* Apr 10 2006;24(11):1770-1783.
11. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* Mar 2009;9(3):153-166.
- 15 12. Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* Mar 2005;23(3):329-336.
13. Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev.* Apr 2007;28(2):165-186.
14. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* Apr 1997;11(4):433-441.
- 20 15. Marangos P, Carroll J. Securin regulates entry into M-phase by modulating the stability of cyclin B. *Nat Cell Biol.* Apr 2008;10(4):445-451.
16. Romero F, Multon MC, Ramos-Morales F, et al. Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res.* Mar 15 2001;29(6):1300-1307.
- 25 17. Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene.* Aug 16 2007;26(38):5596-5605.
18. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science.* Jul 16 1999;285(5426):418-422.
19. Bernal JA, Roche M, Mendez-Vidal C, Espina A, Tortolero M, Pintor-Toro JA. Proliferative potential after DNA damage and non-homologous end joining are affected by loss of securin. *Cell Death Differ.* Jan 2008;15(1):202-212.
- 30 20. Kim D, Pemberton H, Stratford AL, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) induces genetic instability in thyroid cells. *Oncogene.* Jul 14 2005;24(30):4861-4866.
21. Chesnokova V, Zonis S, Kovacs K, et al. p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* Nov 11 2008;105(45):17498-17503.
- 35 22. Donangelo I, Gutman S, Horvath E, et al. Pituitary tumor transforming gene overexpression facilitates pituitary tumor development. *Endocrinology.* Oct 2006;147(10):4781-4791.
23. Liu NA, Huang H, Yang Z, et al. Pituitary corticotroph ontogeny and regulation in transgenic cefrafish. *Mol Endocrinol.* May 2003;17(5):959-966.
24. Camper SA, Saunders TL, Katz RW, Reeves RH. The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics.* Nov 1990;8(3):586-590.
- 40 25. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell.* Mar 23 2001;104(6):849-859.
26. Liu J, Lin C, Gleiberman A, et al. Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul 17 2001;98(15):8674-8679.
- 45 27. Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, et al. Role of Brg1 and HDAC2 in GR transrepression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev.* Oct 15 2006;20(20):2871-2886.
28. Hsu HJ, Lin G, Chung BC. Parallel early development of cefrafish interrenal glands and pronephros: differential control by wt1 and flb. *Development.* May 2003;130(10):2107-2116.

29. Alexander EL, Dooley KC, Pohajdak B, Xu BY, Wright JR, Jr. Things we have learned from tilapia islet xenotransplantation. *Gen Comp Endocrinol*. Sep 1 2006;148(2):125-131.
30. Muiesan ML, Lupia M, Salvetti M, et al. Left ventricular structural and functional characteristics in Cushing's syndrome. *J Am Coll Cardiol*. Jun 18 2003;41(12):2275-2279.
- 5 31. Iida H, Towatari M, Tanimoto M, Morishita Y, Kodera Y, Saito H. Overexpression of cyclin E in acute myelogenous leukemia. *Blood*. Nov 1 1997;90(9):3707-3713.
32. Jordan S, Lidhar K, Korbonits M, Lowe DG, Grossman AB. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *Eur J Endocrinol*. Jul 2000;143(1):R1-6.
- 10 33. De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem*. Jan 15 1997;243(1-2):518-526.
34. Montagnoli A, Valsasina B, Croci V, et al. A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. *Nat Chem Biol*. Jun 2008;4(6):357-365.
- 15 35. Liu NA, Liu Q, Wawrowsky K, Yang Z, Lin S, Melmed S. Prolactin receptor signaling mediates the osmotic response of embryonic cefrafish lactotrophs. *Mol Endocrinol*. Apr 2006;20(4):871-880.
36. Bilodeau S, Roussel-Gervais A, Drouin J. Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells. *Mol Cell Biol*. Apr 2009;29(7):1895-1908.
- 20 37. Woo YS, Isidori AM, Wat WZ, et al. Clinical and biochemical characteristics of adrenocorticotropin-secreting macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 2005;90(8):4963-4969.
38. Invitti C, Pecori Giraldo F, de Martin M, Cavagnini F. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. Study Group of the Italian Society of Endocrinology on the Pathophysiology of the Hypothalamic-Pituitary- Adrenal Axis. *J Clin Endocrinol Metab*. Feb 1999;84(2):440-448.
- 25 39. Fukuoka H, Ben-Shlomo A, Mamelak A, et al. Inhibition of EGF Receptor (EGFR) Signaling in Cushing's Disease: A Novel Pathway for Abrogating STAT3 Regulation of ACTH. *Endocrine Society Annual Meeting*. San Diego, California 2010.
40. Fukuoka H, Vlotides G, Cooper O, Mizutani J, Ren S, Melmed S. Her2/Neu Receptor Signaling in Rat and Human Prolactinoma Cells: Novel Strategy for Targeted Prolactinoma Therapy. *Endocrine Society Annual Meeting*. San Diego, California 2010.
- 30 41. De Martino I, Visone R, Wierinckx A, et al. HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas. *Cancer Res*. Mar 1 2009;69(5):1844-1850.
42. Quereda V, Malumbres M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol*. Feb 2009;42(2):75-86.
- 35 43. Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P. The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res*. Jan 1 2004;64(1):262-272.
44. McClue SJ, Blake D, Clarke R, et al. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer*. Dec 10 2002;102(5):463-468.
- 40 45. Legraverend M, Grierson DS. The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg Med Chem*. Jun 15 2006;14(12):3987- 4006.
46. Bilodeau S, Roussel-Gervais A, Drouin J (2009) Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells. *Mol Cell Biol* 29:1895-1908.
- 45 47. Camper SA, Saunders TL, Katz RW, Reeves RH (1990) The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics* 8:586-590.

Diversas realizaciones de la invención se describen anteriormente en la Descripción detallada. Aunque estas descripciones describen directamente las realizaciones anteriores, se entiende que aquellos expertos en la materia pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las realizaciones específicas mostradas y descritas en el presente documento. Cualquiera de tales modificaciones o variaciones que se encuentran dentro del alcance de la presente descripción también pretende estar incluida en ella. A menos que se indique específicamente, es la intención de los

inventores que a las palabras y frases en la especificación y reivindicaciones se les den los significados habituales y normales para aquellos expertos en las materia(s) aplicable(s).

5 La descripción anterior de diversas realizaciones de la invención conocidas para el solicitante en el momento de la presentación de la solicitud se ha presentado y está prevista para los fines de ilustración y descripción. La presente descripción no pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa desvelada y son posibles muchas modificaciones y variaciones en vista de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones descritas sirven para explicar los principios de la invención y su aplicación práctica y para permitir que otros expertos en la materia utilicen la invención en diversas realizaciones y con diversas modificaciones como son adecuadas para el uso particular contemplado. Por tanto, se prevé que la invención no se limite a las realizaciones particulares desveladas para llevar a cabo la invención.

10 Se entenderá por aquellos expertos en la material que, en general, los términos usados en el presente documento están generalmente previstos como términos "abiertos" (por ejemplo, el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye, pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye, pero no se limita a", etc.).

15 **Listado de Secuencias**

<110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER  
MELTED, Shlomo  
LIU, Ning-Ai

<120> TRATAMIENTO DE TUMORES CORTICOTROPOS HIPOFISARIOS USANDO R-ROSCOVITINA

20 <130> 67789-303W00

<150> 61/409.756

<151> 03-11-2010

<150> 61/483.223

<151> 06-05-2011

25 <160> 27

<170> Patent In versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Pez cebra

<400> 1

aacgctggac cttagcgaag act 23

<210> 2

<211> 32

35 <212> ADN

<213> Pez cebra

<400> 2

tactagaaca ggtttcttta ttttctgcg tg 32

<210> 3

40 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

45 <400> 3

**Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg**  
**1 5 10 15**

**Asp**

<210> 4  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> construcción sintética

<400> 4

**Ala Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr**  
**1 5 10**

10 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

15 <400> 5

**Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Leu Ile Phe Ser**  
**20**

20 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

<400> 6

**Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Leu Ile Phe Ser**  
**20**

25 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

30 <400> 7

**Lys Arg Arg Gln Thr Ser Ala Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Leu Ile Phe Ser**  
**20**

35 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 8

**Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys**  
**1 5 10 15**

**Arg Arg Leu Ile Phe Ser Lys Arg Lys Pro**  
**20 25**

5

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> construcción sintética

<400> 9

**Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Leu Ile Phe Ser**  
**20**

15

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

20

<400> 10

**Lys Arg Arg Ala Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Leu Ile Phe Ser**  
**20**

25

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 11

**Lys Arg Arg Gln Thr Ser Ala Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Leu Ile Phe Ser**  
**20**

30

<210> 12

<211> 20

<212> PRT





**Ala Ala Xaa Arg Lys Leu Phe Gly**  
**1 5**

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 21

**Thr Tyr Thr Lys Lys Gln Val Leu Arg Met Glu His Leu Val Leu Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Leu Thr Phe Asp Leu**  
**20**

10 <210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> construcción sintética

<400> 22

**Thr Tyr Thr Lys Lys Gln Val Leu Arg Met Glu His Leu Val Leu Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Leu Thr Phe Asp Leu**  
**20**

<210> 23

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 23

**Asn Asx Ile Arg Trp Ile Met Tyr Phe**  
**1 5**

25 <210> 24

<211> 202

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 24

ES 2 545 358 T3

Met Ala Thr Leu Ile Tyr Val Asp Lys Glu Asn Gly Glu Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Arg Val Val Ala Lys Asp Gly Leu Lys Leu Gly Ser Gly Pro Ser Ile  
 20 25 30

Lys Ala Leu Asp Gly Arg Ser Gln Val Ser Thr Pro Arg Phe Gly Lys  
 35 40 45

Thr Phe Asp Ala Pro Pro Ala Leu Pro Lys Ala Thr Arg Lys Ala Leu  
 50 55 60

Gly Thr Val Asn Arg Ala Thr Glu Lys Ser Val Lys Thr Lys Gly Pro  
 65 70 75 80

Leu Lys Gln Lys Gln Pro Ser Phe Ser Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys  
 85 90 95

Thr Val Lys Ala Lys Ser Ser Val Pro Ala Ser Asp Asp Ala Tyr Pro  
 100 105 110

Glu Ile Glu Lys Phe Phe Pro Phe Asn Pro Leu Asp Phe Glu Ser Phe  
 115 120 125

Asp Leu Pro Glu Glu His Gln Ile Ala His Leu Pro Leu Ser Gly Val  
 130 135 140

Pro Leu Met Ile Leu Asp Glu Glu Arg Glu Leu Glu Lys Leu Phe Gln  
 145 150 155 160

Leu Gly Pro Pro Ser Pro Val Lys Met Pro Ser Pro Pro Trp Glu Ser  
 165 170 175

Asn Leu Leu Gln Ser Pro Ser Ser Ile Leu Ser Thr Leu Asp Val Glu  
 180 185 190

Leu Pro Pro Val Cys Cys Asp Ile Asp Ile  
 195 200

<210> 25  
 <211> 199  
 <212> PRT  
 <213> Ratón  
 5  
 <400> 25

ES 2 545 358 T3

Met Ala Thr Leu Ile Phe Val Asp Lys Asp Asn Glu Glu Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Arg Leu Ala Ser Lys Asp Gly Leu Lys Leu Gly Thr Gly Val Lys Ala  
20 25 30

Leu Asp Gly Lys Leu Gln Val Ser Thr Pro Arg Val Gly Lys Val Phe  
35 40 45

Asn Ala Pro Ala Val Pro Lys Ala Ser Arg Lys Ala Leu Gly Thr Val  
50 55 60

Asn Arg Val Ala Glu Lys Pro Met Lys Thr Gly Lys Pro Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Lys Gln Pro Thr Leu Thr Gly Lys Lys Ile Thr Glu Lys Ser Thr Lys  
85 90 95

Thr Gln Ser Ser Val Pro Ala Pro Asp Asp Ala Tyr Pro Glu Ile Glu  
100 105 110

Lys Phe Phe Pro Phe Asn Pro Leu Asp Phe Glu Ser Phe Asp Leu Pro  
115 120 125

Glu Glu His Gln Ile Ser Leu Leu Pro Leu Asn Gly Val Pro Leu Met  
130 135 140

Thr Leu Asn Glu Glu Arg Gly Leu Glu Lys Leu Leu His Leu Gly Pro  
145 150 155 160

Pro Ser Pro Leu Lys Thr Pro Phe Leu Ser Trp Glu Ser Asp Pro Leu  
165 170 175

Tyr Ser Pro Pro Ser Ala Leu Ser Thr Leu Asp Val Glu Leu Pro Pro  
180 185 190

Val Cys Tyr Asp Ala Asp Ile  
195

<210> 26

<211> 188

<212> PRT

5 <213> *Xenopus*

<400> 26

ES 2 545 358 T3

Met Ala Thr Val Val Phe Val Asp Gln Glu Asn Gly Asp Val Gly Ser  
1 5 10 15

Ala Leu His Lys Asp Arg Gly Met Phe Leu Ser Ser Lys Thr Gln Ser  
20 25 30

Arg Lys Ala Val Ala Ser Leu Pro Gly Lys Val Phe Gly Lys Ser Glu  
35 40 45

Met Val Ser Lys Pro Ser Arg Lys Ala Leu Gly Asn Val Asn Lys Gln  
50 55 60

Ile Leu Pro Lys Thr Ala Ala Thr Ala Gln Lys Ser Asp Leu Lys Gln  
65 70 75 80

Lys Ser Thr Val Pro Ile Gly Lys Lys Val Cys Ser Ser Lys Gln Pro  
85 90 95

Val Lys Asp Leu Tyr Pro Glu Ile Glu His Phe Val Pro Tyr Asn Pro  
100 105 110

Leu Asp Phe Glu Ser Phe Asp Val Pro Glu Asp His Lys Leu Ser His  
115 120 125

Leu Cys Leu Ala Gly Val Ser Leu Leu Val His Glu Asn Glu Val Ala  
130 135 140

Arg Phe Asn Ala Leu Thr Asp Ile Gln Leu Cys Pro Leu Glu Met Pro  
145 150 155 160

Ser Leu Asn Met Val Ser Asp Tyr Leu Pro Phe Ile Ala Ala Leu Asp  
165 170 175

Asp Ile Thr Val Asp Leu Pro Pro Val Glu Asp Tyr  
180 185

<210> 27  
<211> 182  
<212> PRT  
5 <213> Pez cebra

<400> 27

Met Glu Thr Met Ile Tyr Met Asp Gln Glu Asn Gly Arg Leu Met Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Ile Lys Ser Arg Gln Asn Arg Leu His Ser Ala Pro Asp Gln  
20 25 30

ES 2 545 358 T3

Cys Leu Arg Thr Pro Leu Asn Gly Lys Ala His Leu Gly Ala Pro Leu  
 35 40 45

Gln Ser Ser Arg Lys Ala Leu Gly Val Ile Asn Lys Ile Val Asn Gln  
 50 55 60

Thr Ser Ser His Glu Ala Glu Glu Lys Thr Lys Pro Ala Glu Ala Lys  
 65 70 75 80

Cys Lys Val Pro Thr Pro Leu Pro Thr Glu Glu Leu Pro Glu Ile Glu  
 85 90 95

Lys Phe Phe Pro Tyr Asn Pro Ser Glu Phe Glu Cys Tyr Ser Val Pro  
 100 105 110

Asp Glu Val Tyr Leu Ser Arg Phe Ser Leu Ala Gly Leu Gly Lys Gln  
 115 120 125

Thr Trp Leu Pro Ala Ser Pro Val Glu Glu Phe Ile Glu Pro Cys Leu  
 130 135 140

Pro Leu Ser Pro Leu Lys Met Pro Lys Glu Val Glu Tyr Gly Asp Glu  
 145 150 155 160

Val Glu Ala Phe Leu Gln Thr Ile Asn Glu Leu Thr Glu Val Asp Leu  
 165 170 175

Pro Pro Glu Cys Asp Phe  
 180

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende olomucina o R-roscovitina o sales de la misma para su uso como medicamento para administración, en una cantidad terapéuticamente eficaz, a un sujeto mamífero en necesidad de tratar un tumor corticotropo hipofisario, suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o tratar enfermedad de Cushing para tratar el tumor corticotropo hipofisario, suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH, inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH o tratar enfermedad de Cushing.
- 10 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto mamífero necesita tratar un tumor corticotropo hipofisario y el tumor corticotropo hipofisario se trata.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto mamífero necesita suprimir la ACTH y/o los niveles de corticosterona en un adenoma hipofisario secretor de ACTH y la ACTH y/o los niveles de corticosterona en el adenoma hipofisario secretor de ACTH se suprimen.
- 15 4. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto mamífero necesita inhibir el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH y el crecimiento de un adenoma hipofisario secretor de ACTH se inhibe.
5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto mamífero necesita tratar enfermedad de Cushing y la enfermedad de Cushing se trata.
- 20 6. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende R-roscovitina o sales de la misma.

Fig. 1

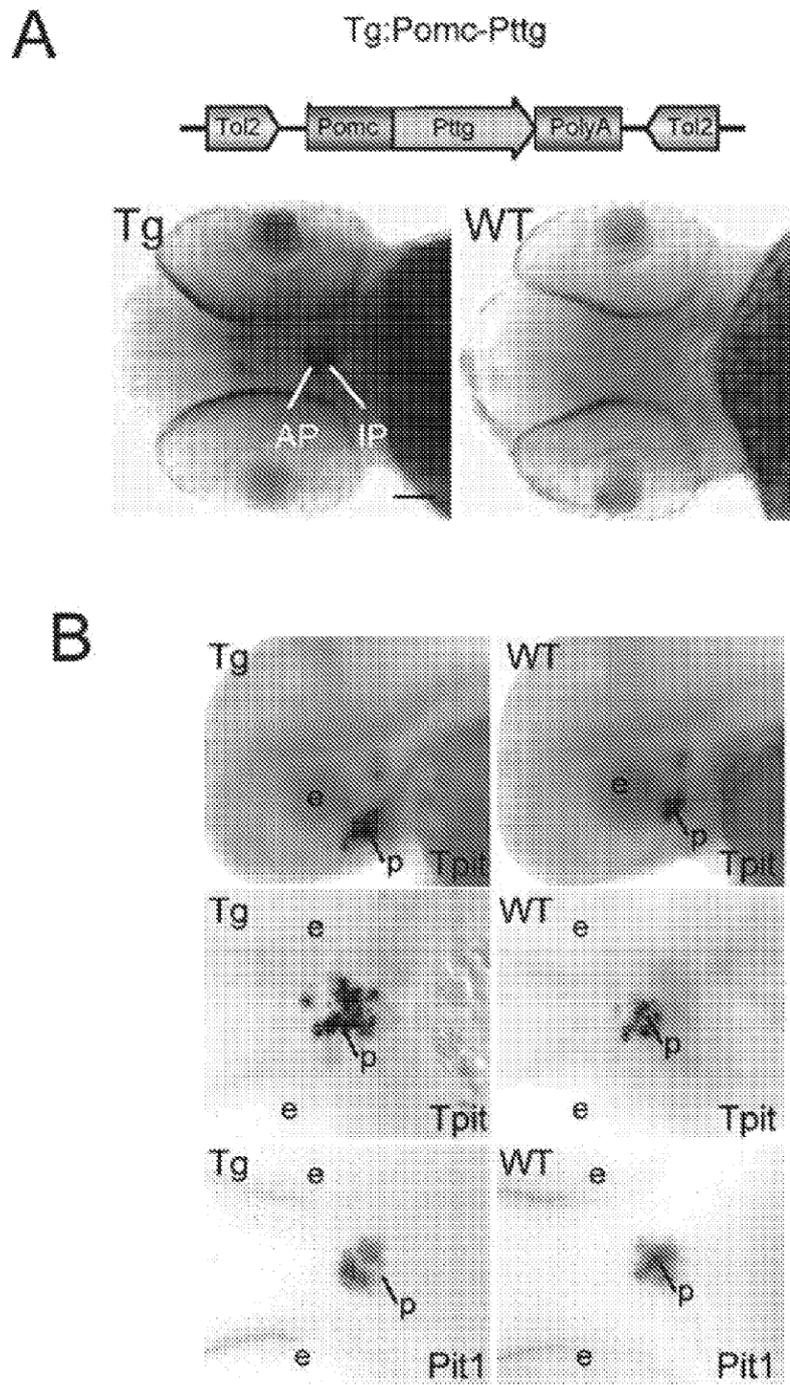


Fig. 1

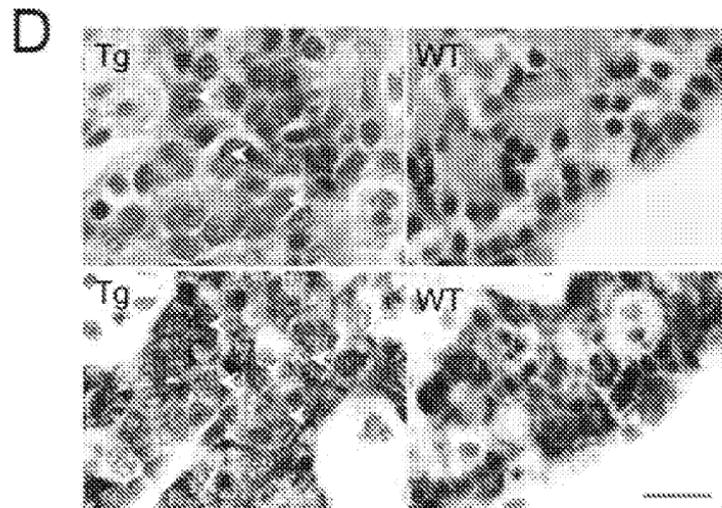
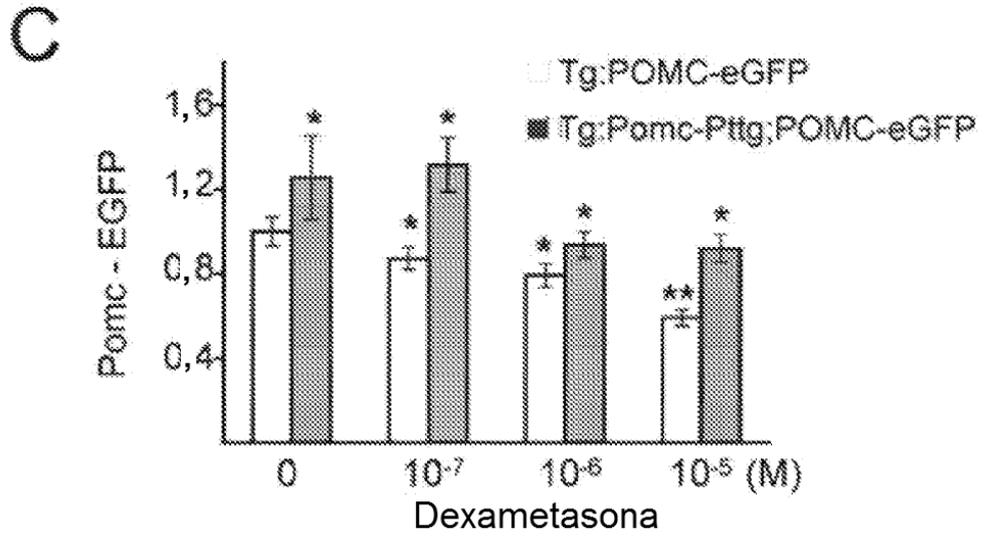


Fig. 1

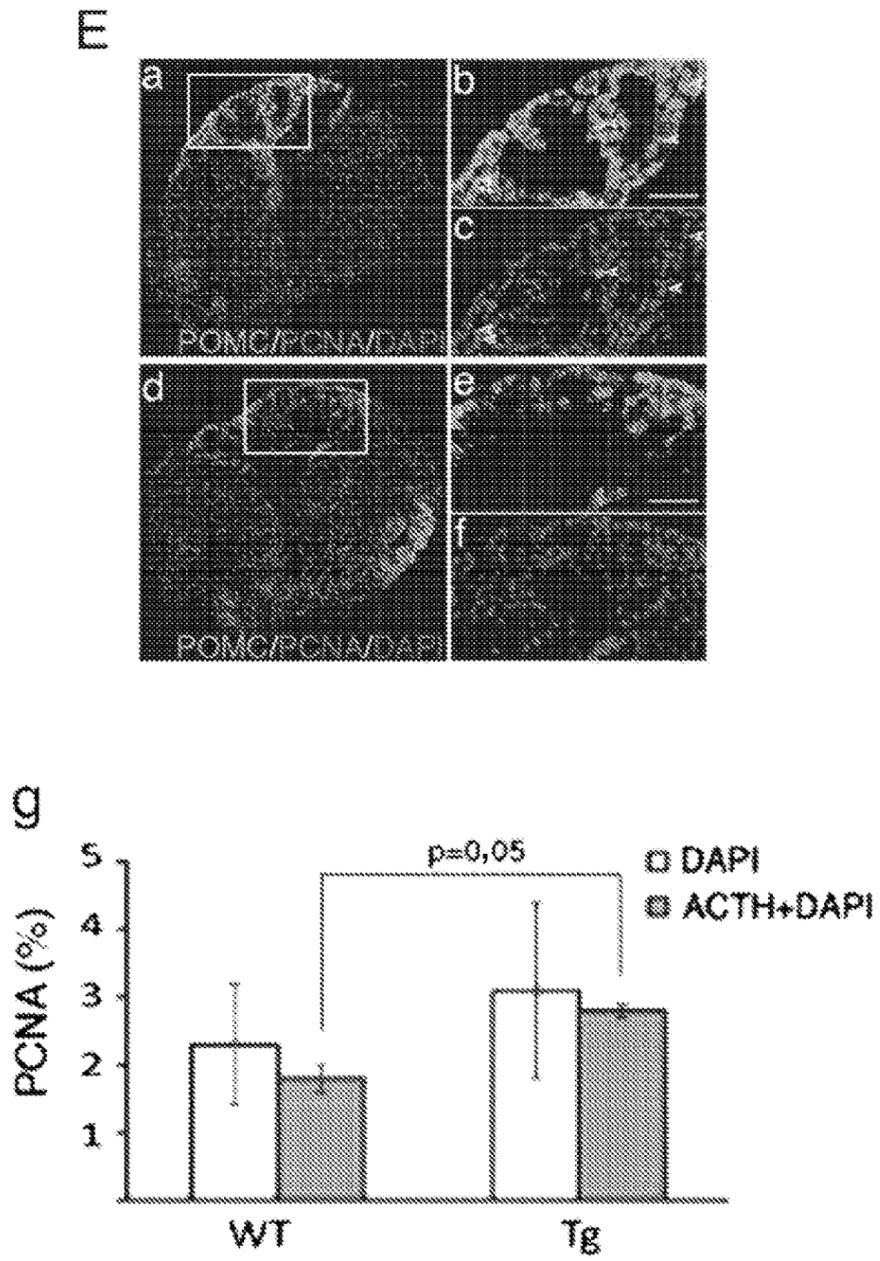


Fig. 2

A

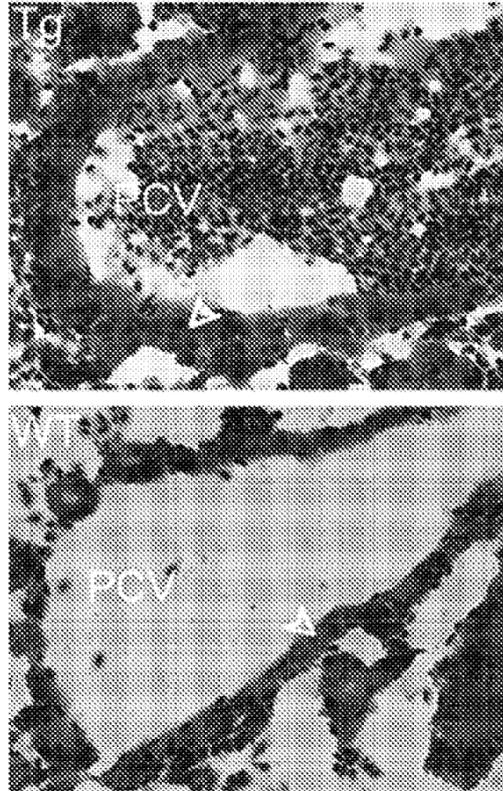


Fig. 2

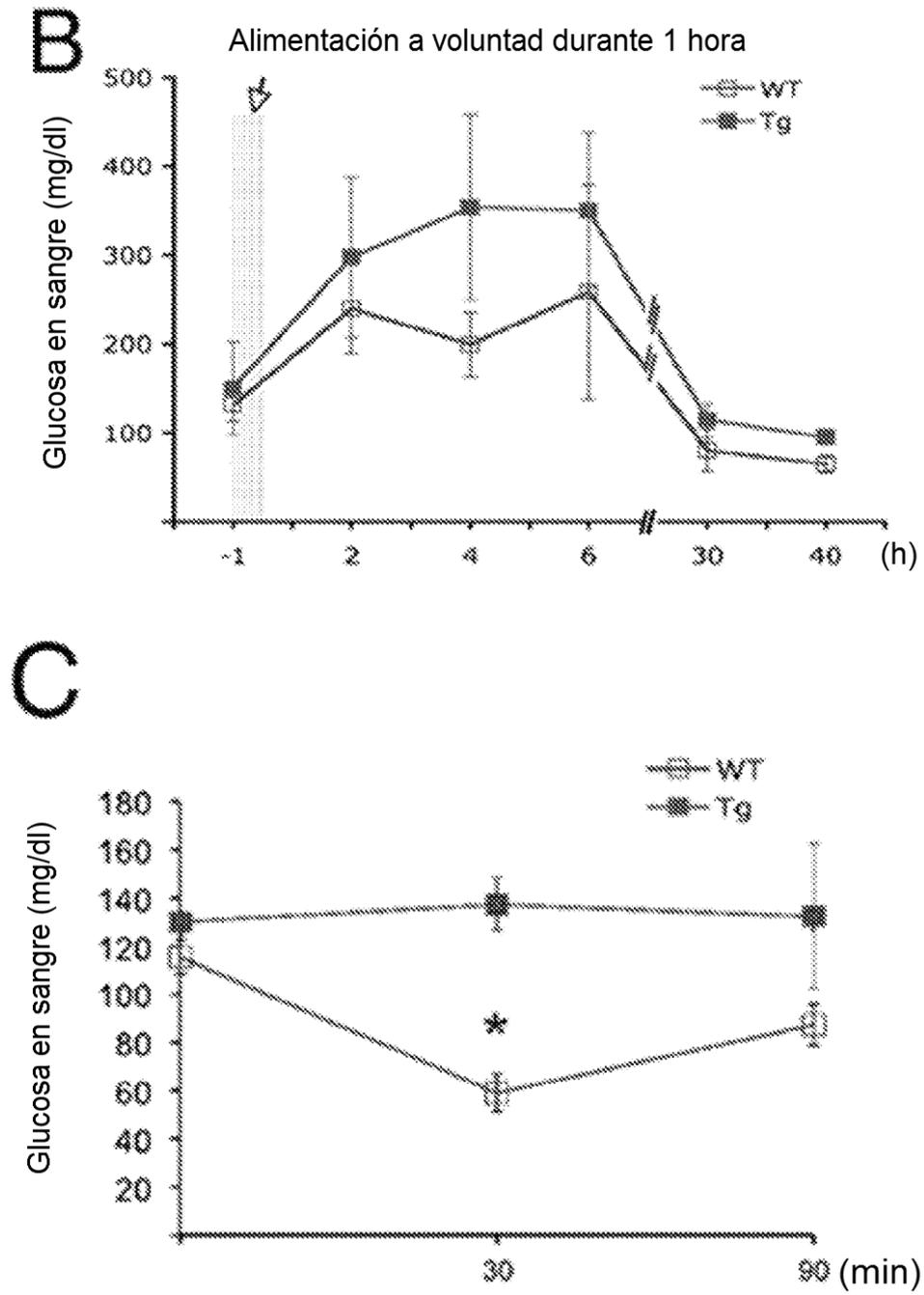


Fig. 2

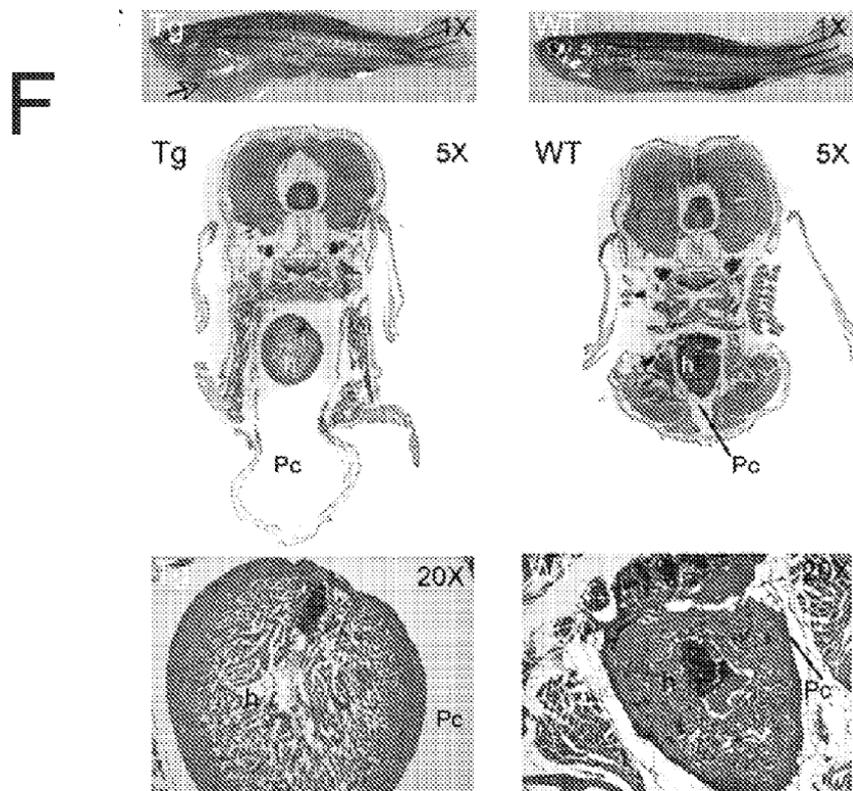
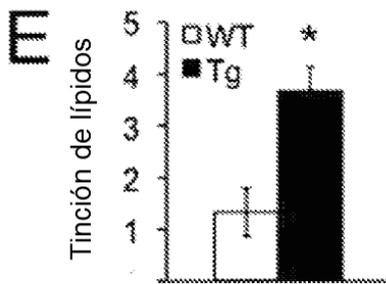
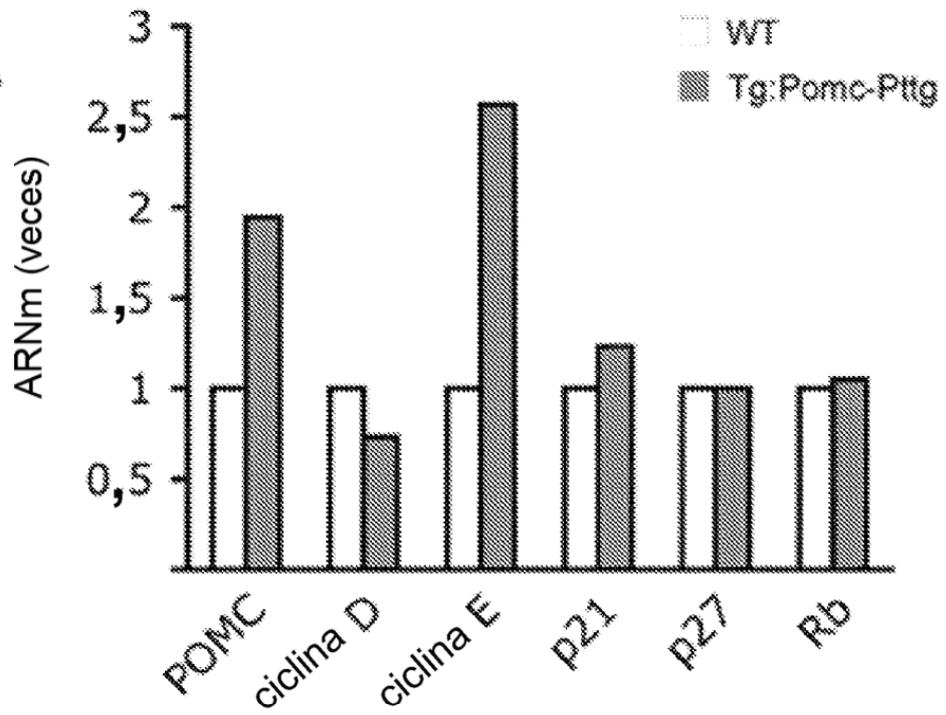


Fig. 3

**A**



**B**

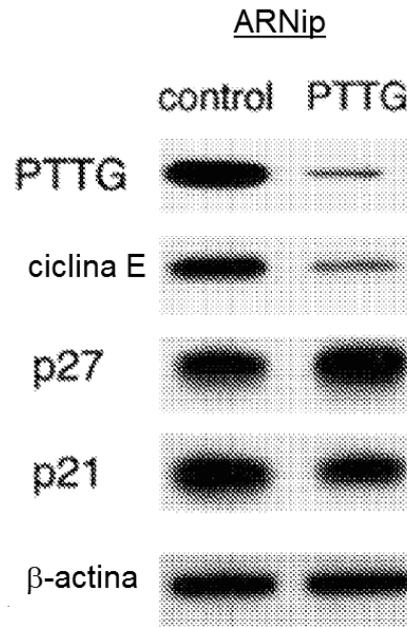


Fig. 3

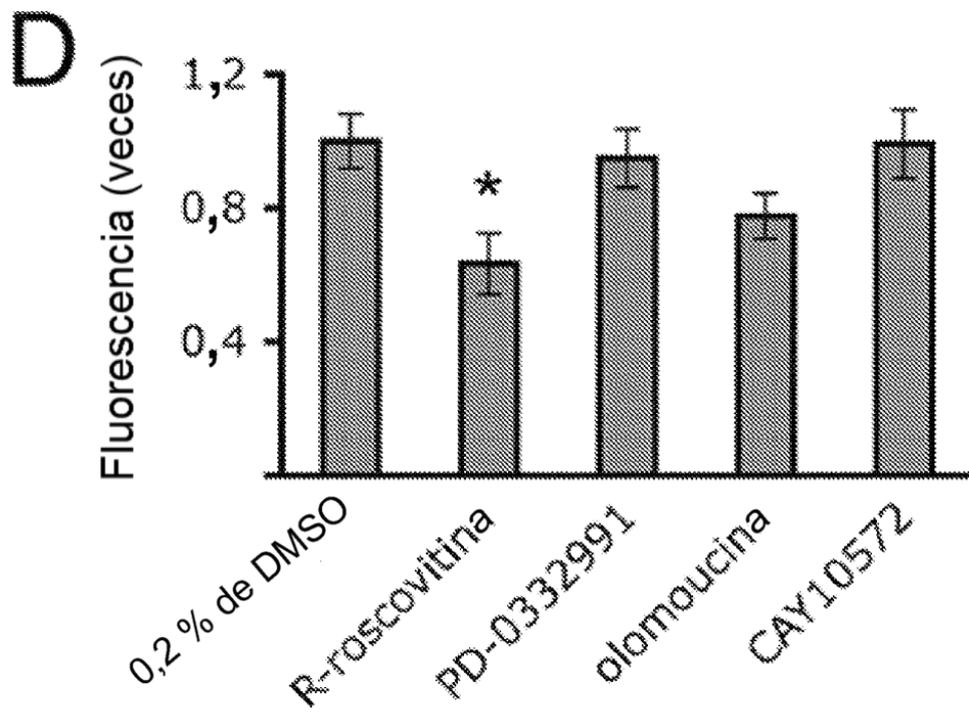
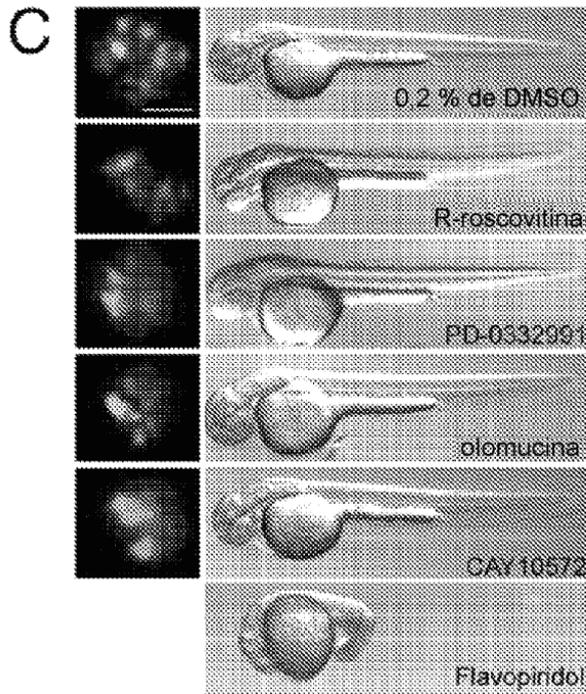


Fig. 3

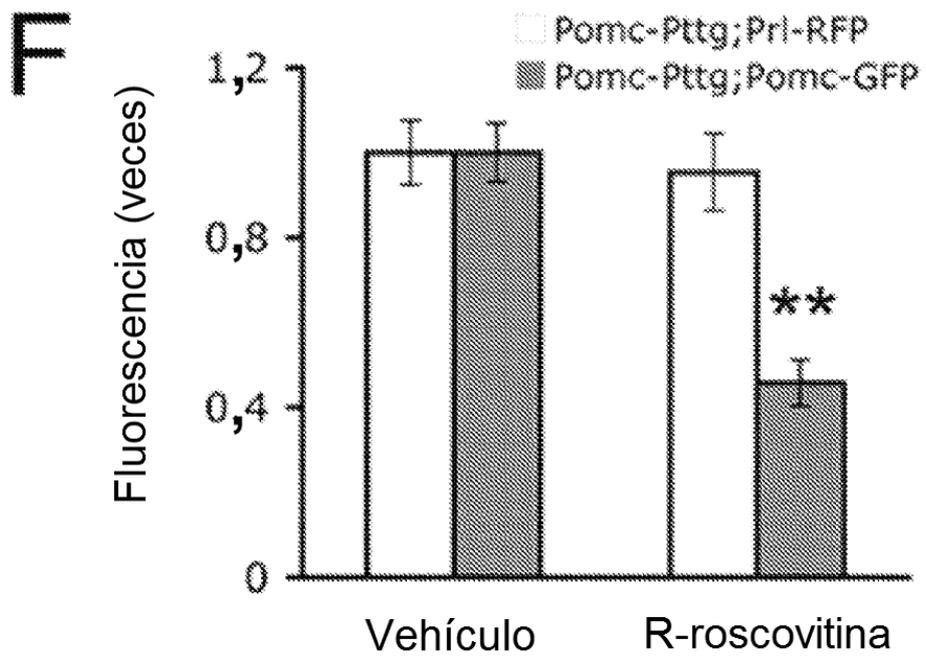
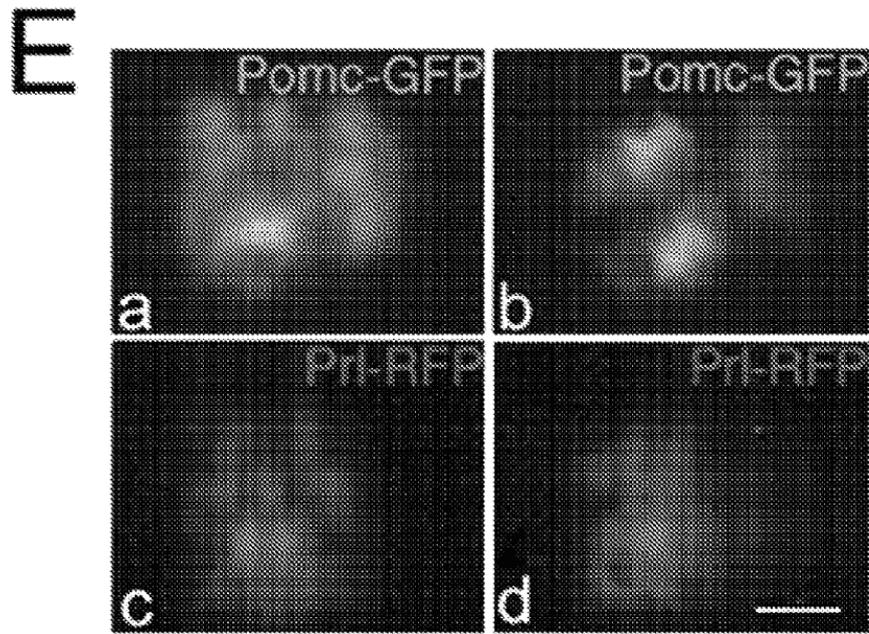


Fig. 4

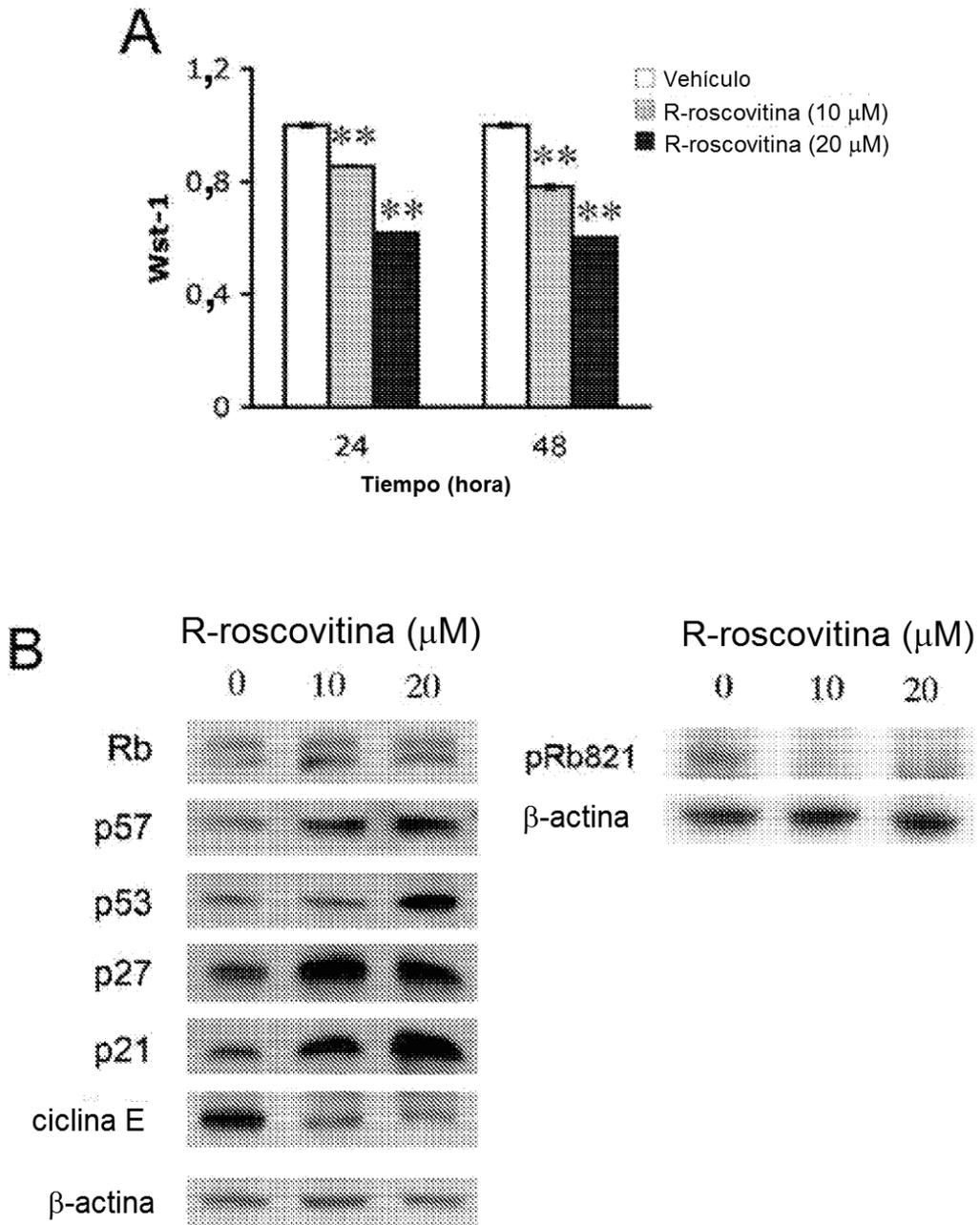
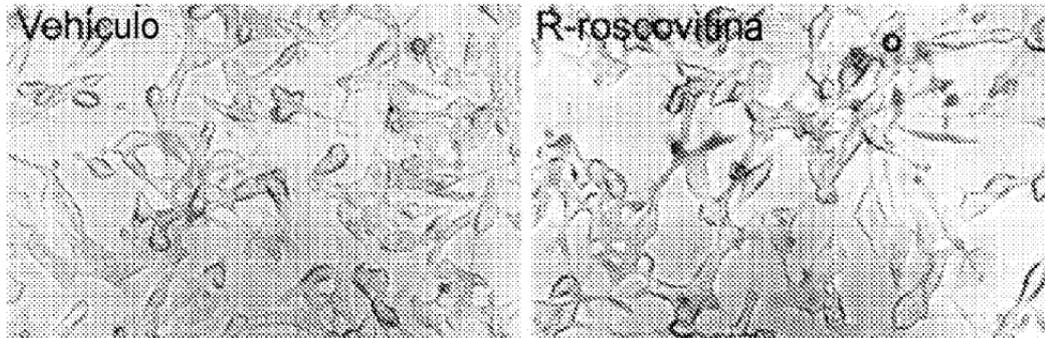
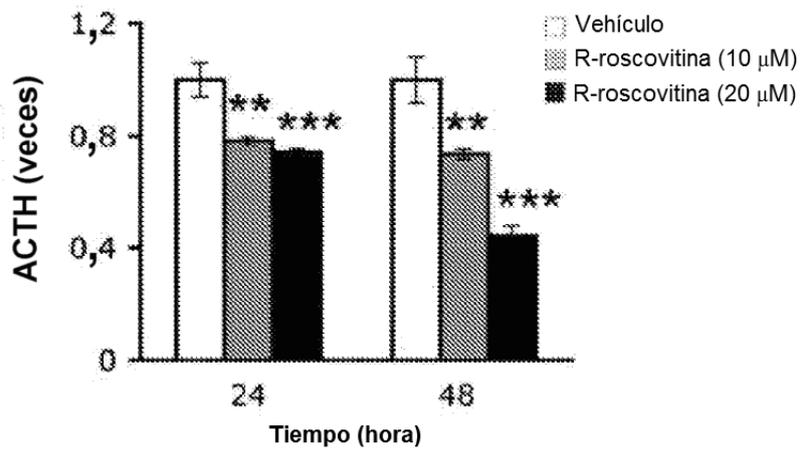


Fig. 4

**C**



**D**



**E**

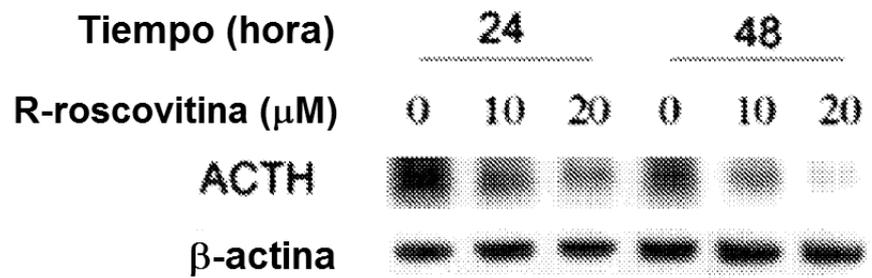
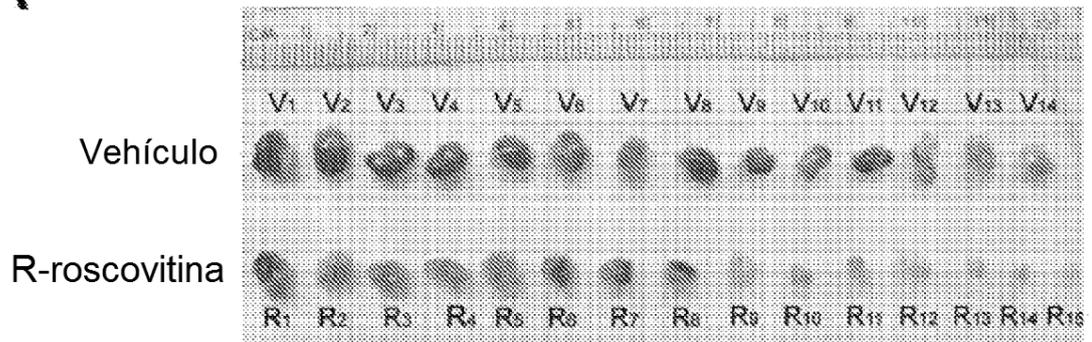


Fig. 5

**A**



**B**

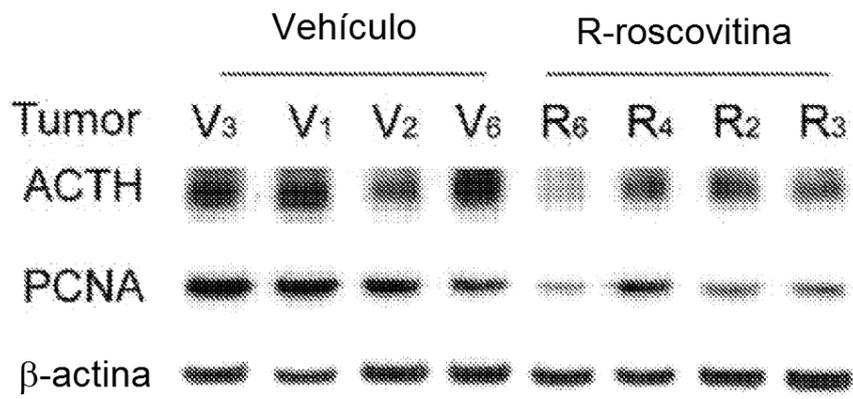
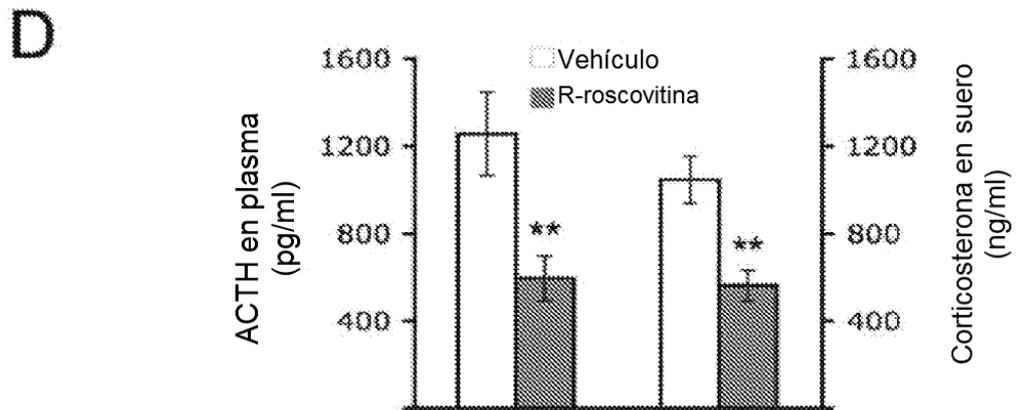
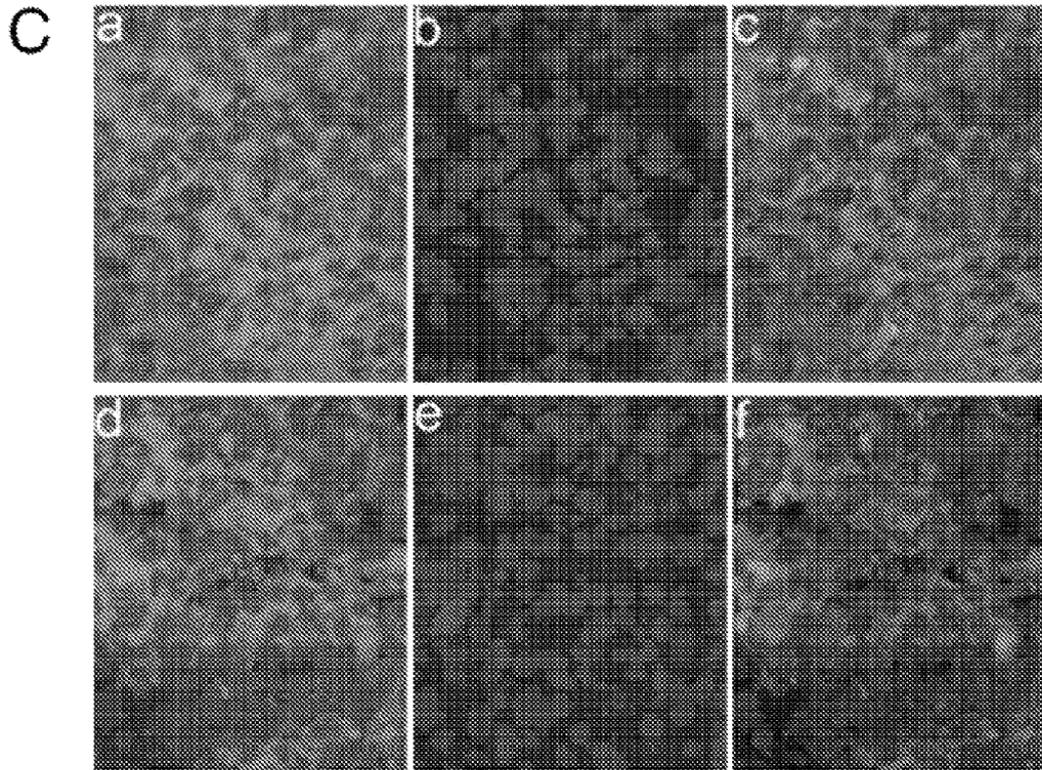


Fig. 5



SEC ID N°: 24	Humano	<b>MATLIYVDKENGEPGTRVAKDGLKLGSGPSIKALDGRSQVST</b>
SEC ID N°: 25	Ratón	<b>MATLIFVBDKNEEPGRRLASKDGLKFGTG--VKALDGLQVST</b>
SEC ID N°: 26	Xenopus	<b>MATVVEVDOENGDVGSALHKDRGMFHS---KTQSRKAVASL</b>
SEC ID N°: 27	Pez cebra	<b>METMIYMDOENGRIMTPAIKSRQNRHHS-----APDQCIRT</b>
	Humano	<b>PRFCKTFDAPPAIPKATRKAALGTVNRAATEKSVKTKGPKLQKQKP</b>
	Ratón	<b>PRVCKVE-NAPAVPKASRKALGTVNRAEKPMTGKPLQPKQP</b>
	Xenopus	<b>P--CKVFGKSEMVSQPSRKALGNVN---KQILPKTAATAQKS</b>
	Pez cebra	<b>PLNGKAHLGAPL--QS SRKALGVIN-----KIVNQTS</b>
	Humano	<b>SFSAKKMTEKTVKAKSSVPASDDAYPEIEKFFPNPLDFESEF</b>
	Ratón	<b>TLTGKKITTEKSTKTOSSVPAPDDAYPEIEKFFPNPLDFESEF</b>
	Xenopus	<b>DLKQKSTVPIGKKVCSSKQPVKDLYPEIEHREVPYNPLDFESRD</b>
	Pez cebra	<b>HEAEKTKPAEAKCKVPTTELPTEELPEIEKFFPNPSEFEFCYS</b>
	Humano	<b>LPEEHQIAHLPLSGVPLMILDEERELEKLFQ-LGPPSPRVKMPS</b>
	Ratón	<b>LPEEHQISLLPNCVPLMTLINEERGLEKLLH-LGPPSPRLKTRF</b>
	Xenopus	<b>VPEDHKLHLCLAGVSLLVHENEVAREFNALTDI-QLCRLEMPS</b>
	Pez cebra	<b>VPDEVYLSRFSLAGLGKQTLWLPASPVEEFIEPCLPLSPLKMPK</b>
	Humano	<b>PPWESNLLQSPSSILSTL-DVELPPVCCDIDI</b>
	Ratón	<b>LSWESDPLYSPPSASTL-DVELPPVCYDADI</b>
	Xenopus	<b>LNMVSDYI-PFIAADDDI-TVDLPPVEDY</b>
	Pez cebra	<b>EVEYGDEVEAFLLQTLNETVVDLPPVCEDF*</b>

Fig. 6