

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 805**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/EP2012/050819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO2012098208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12700827 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2666015**

54 Título: **Uso de estatmina como un biomarcador de la respuesta de fármacos a furazanobenzimidazoles**

30 Prioridad:

**21.01.2011 EP 11151674**

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

**27.06.2017**

73 Titular/es:

**BASILEA PHARMACEUTICA AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 487  
4005 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LANE, HEIDI ALEXANDRA y  
BACHMANN, FELIX**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 619 805 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

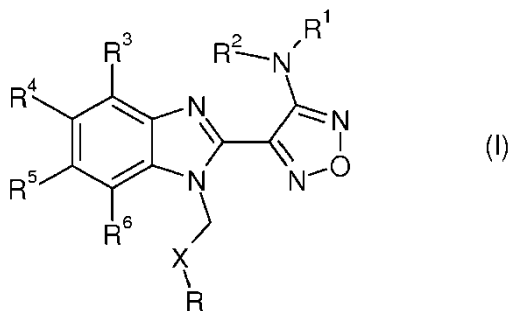
Uso de estatmina como un biomarcador de la respuesta de fármacos a furazanobenzimidazoles

La presente invención se refiere al uso ex vivo de estatmina como un biomarcador para predecir la respuesta de una enfermedad tal como una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, a un compuesto de fórmula general I tal como 3-(4-{1-[2-(4-amino-fenil)-2-oxo-etil]-1H-benzoimidazol-2-il}-furazan-3-ilamino)propionitrilo (BAL27862). En otros aspectos se refiere a métodos y kits, así como a compuestos para uso en un método de tratamiento que implican el uso del biomarcador.

Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto de la célula y se componen de heterodímeros de tubulina alfa y beta. Los agentes que fijan como objetivo los microtúbulos se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos citotóxicos más eficaces que tienen un amplio espectro de actividad. Agentes desestabilizantes de microtúbulos (p. ej., los alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina y vinorelbina) se utilizan, p. ej., en el tratamiento de varios tipos de tumores malignos hematológicos tales como leucemia linfoblástica y linfoma, así como tumores sólidos tales como el cáncer de pulmón. Agentes estabilizadores de los microtúbulos (p. ej., los taxanos tales como paclitaxel, docetaxel) se utilizan, por ejemplo, en el tratamiento de tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, de pulmón y cáncer de próstata.

Sin embargo puede producirse una resistencia a estos agentes fijadores como objetivo de microtúbulos conocidos. La resistencia puede ser inherente o puede ser adquirida después de la exposición a estos agentes. Tal resistencia, por lo tanto, impacta sobre las tasas de supervivencia de los pacientes, así como opciones de regímenes de tratamiento. Se han identificado varios mecanismos potenciales de resistencia, e incluyen defectos en las dianas de microtúbulos tales como concentraciones elevadas de beta-tubulina subtipo III y mutaciones adquiridas en beta-tubulina subtipo I que se sabe reducen la unión de taxano. Además, se ha sugerido que defectos en otras proteínas celulares se asocian con la resistencia a determinados agentes que fijan como objetivo microtúbulos tales como la sobre-expresión de glicoproteína P (P-gp, también conocida como proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 o MDR1). Este tipo de factores puede entonces ser utilizado como biomarcadores de resistencia a estos agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales.

Una clase de agentes desestabilizantes de microtúbulos descubierta relativamente reciente son compuestos abarcados por la fórmula dada a continuación:



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxi-alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi; y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o cianoalquilo inferior;  
 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;  
 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;  
 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxi;  
 5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

o en donde

R representa fenilo o piridinilo

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, haloalquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferioralquilo inferior, aciloxialquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferioralcoxi inferior, fenilalcoxi inferior, alquil inferiorcarboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferiorcarbonilamino, alquil inferiorcarbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferiorcarbonilo, carboxi, alcoxi inferiorcarbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

15 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa oxígeno;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o cianoalquilo inferior;  
 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;  
 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;  
 20 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxi;

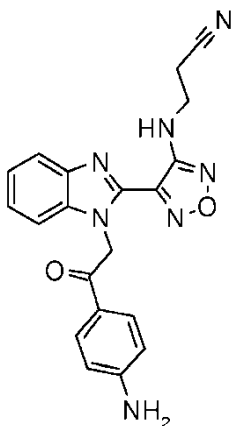
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

25 Estos compuestos se describen en el documento WO2004/103994 A1. Estos compuestos han demostrado detener allí la proliferación de células tumorales e inducir la apoptosis.

La síntesis de compuestos de fórmula I se describe en el documento WO2004/103994 A1, en general, en las páginas 29-35, y en concreto en las páginas 39-55. Se pueden preparar tal como se describe o por un método análogo a los procesos descritos en el mismo.

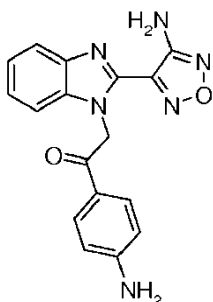
30 Un compuesto que cae dentro de esta clase, conocido como BAL27862, y mostrado en el documento WO2004/103994 A1 como ejemplo 58, tiene la estructura química y el nombre dado a continuación:



Nombre químico: 3-(4-{1-[2-(4-amino-fenil)-2-oxo-etil]-1H-benzimidazol-2-il}-furan-3-ilamino)-propionitrilo.

O en esta memoria como Compuesto A

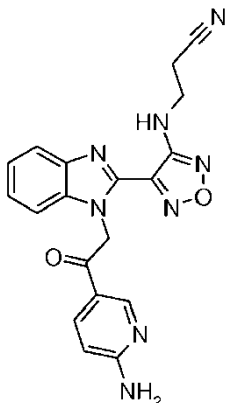
Otros compuestos ejemplificados en el documento WO2004/103994 A1 como ejemplos 50 y 79, respectivamente, tienen las estructuras y nombres químicos que se indican a continuación:



Nombre químico: 2-[2-(4-amino-furazan-3-il)-benzoimidazol-1-il]-1-(4-amino-fenil)-etanona

5 o en esta memoria como Compuesto B

y



Nombre químico: 3-(4-{1-[2-(6-amino-piridin-3-il)-2-oxo-etil]-1H-benzoimidazol-2-il}-furazan-3-ilamino)-propionitrilo

o en esta memoria como Compuesto C.

- 10 BAL27862 tiene actividad a lo largo de un amplio panel de modelos experimentales de xenoinjertos de tumores sólidos. Además de ello, la actividad se mantiene incluso en contra de modelos de tumores que han sido seleccionados en cuanto a la resistencia a agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales (incluyendo los desestabilizadores de microtúbulos de alcaloides de la vinca y los estabilizadores de microtúbulos paclitaxel y epotilona B). La actividad de BAL27862 no se ve afectada por la sobre expresión de la bomba de P-gp en ningún
- 15 modelos sometido a ensayo *in vitro*, ni en xenoinjertos de tumores mamarios humanos. Adicionalmente, BAL27862 retuvo su actividad a pesar de las concentraciones elevadas de beta-tubulina subtipo III y mutaciones en tubulina subtipo I (véase el póster "Actividad in vitro del nuevo agente activo tubulina BAL27862 en MDR1(+) y MDR1(-) de variantes de cáncer de mama y de ovario humano, seleccionadas en cuanto a la resistencia a taxanos", presentado en la 101ª Reunión Anual de 2010).
- 20 Por lo tanto, la actividad de BAL27862 no se ve afectada por un cierto número de factores que confieren resistencia a los agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales.

Además de ello, se sabe que los compuestos de fórmula general I tienen un efecto diferente en el fenotipo de las células en comparación con otros agentes que fijan como objetivo microtúbulos, incluyendo otros desestabilizadores de microtúbulos (véase el póster "BAL27862: Un Nuevo Agente Anticáncer que Disocia Microtúbulos y Crea un

Fenotipo Celular Distinto", presentado en el Simposio EORT-NCI-AACR de 2009). La presente solicitud también muestra que el tratamiento con un compuesto de fórmula general I induce un fenotipo de microtúbulos consistente en líneas celulares tumorales derivadas de una diversidad de órganos, por ejemplo, pulmón, cuello uterino y mama, como se ve en la Figura 1. La tinción de los microtúbulos en estas células con un anticuerpo anti-tubulina alfa demuestra que en lugar de las fibras del huso mitótico de células no tratadas, solamente son visibles las estructuras en forma de puntos en las células tratadas. Este mismo efecto se muestra también utilizando compuestos C y B en las Figuras 2A y 2B, respectivamente, en la línea celular de cáncer de pulmón A549. Sin embargo, es muy distinto del observado con los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos vinblastina, colchicina, paclitaxel y nocodazol tal como se ve en las Figuras 3B, 3C, 3D y 4, respectivamente. Los microtúbulos se tiñeron con un anticuerpo anti-tubulina alfa y las células se vieron en un aumento de 1000 x (Figuras 3, 4). Para las células tratadas con BAL27862, son visibles múltiples estructuras en forma de puntos, mientras que, en marcado contraste, los otros fármacos convencionales producen estructuras filamentosas de microtúbulos o estructuras agregadas de microtúbulos densas. Estas diferencias a nivel fenotípico, en dosis de compuestos considerados óptima en términos de efecto antiproliferativo indican una diferencia en el modo de acción a nivel molecular.

Además, se sabe que BAL27862 provoca un fenotipo dominante de microtúbulos en presencia de los otros agentes que fijan como objetivo microtúbulos (véase también el póster "BAL27862: Un Nuevo Agente contra el Cáncer que Disocia Microtúbulos y Crea un Fenotipo Celular Distinto"). La presente solicitud también muestra que el tratamiento con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol por sí solo inducía los fenotipos de microtúbulos característicos de estos agentes (Figuras 5A, 5D, 5G, 6C-6F, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento de combinación con BAL27862 durante las últimas 4 horas dio lugar a la interrupción de estos fenotipos; a pesar de la presencia continua de vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol (Figuras 5B, 5E, 5H, 6G-6J, respectivamente). En contraste, el tratamiento primero con BAL27862 y posteriormente durante 4 horas en combinación con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol no tuvo impacto alguno en la generación del fenotipo compatible con el tratamiento con BAL27862 (Figuras 5C, 5F, 5I, 6K-6N, respectivamente).

Todos estos datos demuestran que BAL27862 afecta a la biología de los microtúbulos de una manera diferente que los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos.

El documento WO 2005/120520 examinó la sensibilidad de cánceres (en particular, gliomas) al agente alquilante de ADN CCNU, ya sea solo o en forma de su tratamiento de combinación PCV, a diferentes concentraciones de estatmina. Se observó una sinergia en la combinación "concentración menor de estatmina + eficacia de CCNU", y se concluyó que las concentraciones de estatmina pueden predecir la sensibilidad de glioma maligno a CCNU. También se sometió a ensayo la sensibilidad al agente desestabilizador de microtúbulos vincristina a diferentes concentraciones de estatmina, pero no se observó sinergia con la combinación "concentración menor de estatmina + eficacia de vincristina".

Por lo tanto, a partir de la información acerca de los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos, las predicciones no pueden hacerse respecto a si, o cómo, genes particulares están implicados en la acción de los compuestos de fórmula general I.

Un objeto de la presente invención es identificar factores que estén asociados con la respuesta a compuestos de fórmula I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, por ejemplo, para identificar los factores asociados con la resistencia a los compuestos de fórmula general I, en particular BAL27862 o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define más adelante.

Sorprendentemente, se ha encontrado que estatmina se puede utilizar como un biomarcador de la respuesta al tratamiento con un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define más adelante.

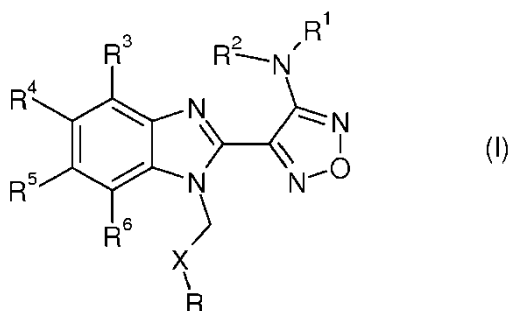
En una realización preferida de la invención, concentraciones relativamente altas de estatmina en una muestra de tumor se asocian con una resistencia inherente a BAL27862

A la estatmina humana se la ha asignado por el Comité de Nomenclatura de Genes Humanos el número de Identificación HGNC ID: 6510 y Entrez Gene ID 3925. El nombre estatmina fue propuesto por Sibel et al., tras estudios de la proteína en cerebros de ratas, procediendo el nombre del griego "estamos" que significa relevo. (Sobel A, Boutterin MC, Beretta L, Chneiweiss H, Doye V, Peyro-Saint-Paul H., J Biol Chem. 5 de marzo de 1989;264(7):3765-72. "Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin).").

La estatmina es también conocida como estatmina 1; STMN1. oncoproteína 18; OP18; prosolina; metablulina; fosfoproteína p18 asociada a leucemia; LAP18; Lag; PP17; fosfoproteína 19; PP19; PR22; C10rf215; FLJ32206; MGC138869; MGC138870 y SMN: Por motivos de simplicidad, en esta memoria se utilizará el término estatmina para abarcar todos los sinónimos previamente mencionados y se refiere a esta entidad tanto al nivel del ácido nucleico (p. ej., ARNm, ADNc, ADN) como de proteínas (incluyendo isoformas y formas modificadas post-traducción de la proteína expresada) según se apropiado.

En seres humanos, el gen estatmina está localizado en el cromosoma 1. Secuencias de proteínas que codifican la isoforma a y la isoforma b de la estatmina están disponibles a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), número de acceso NP\_005554 y NP\_001138926, respectivamente. Estas isoformas se muestran también aquí en SEQ ID número 1 (NP\_005554.1) y SEQ ID número 2 (NP\_001138926.1). Para la isoforma a de estatmina se conocen múltiples variantes de transcritos de ARNm.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso ex vivo de estatmina como un biomarcador para predecir la respuesta a un compuesto, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula general I,



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi; y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxialcoxi inferior;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxi;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los derivados farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o una amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

o en donde

R representa fenilo o piridinilo

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en

donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

5 X representa oxígeno;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxil-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxi;

10 y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los derivados farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

15 La respuesta es de una enfermedad en un sujeto. Preferiblemente, la respuesta puede ser para el tratamiento, es decir, para el tratamiento con el compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

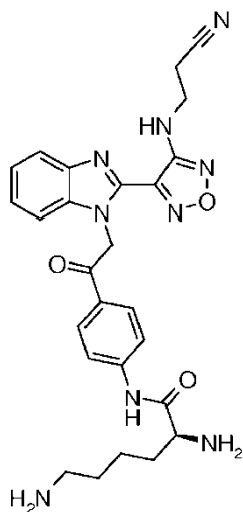
El biomarcador estatmina se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo humano o animal, tomadas preferentemente del organismo humano.

20 En una realización preferida, la invención se refiere al uso *ex vivo* de estatmina como un biomarcador para predecir la resistencia de una enfermedad en un sujeto a un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos como se define anteriormente.

El derivado farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en una sal, solvato, pro-fármaco, sal de un pro-fármaco, polimorfo e isómero de un compuesto de fórmula general I. Los pro-fármacos son ésteres y amidas hidrolizables in vivo del compuesto de fórmula (I), preferiblemente ésteres y amidas de aminoácidos de origen natural, pequeños péptidos o hidroxilácidos pegilados. Más preferiblemente, el pro-fármaco es una amida formada a partir de un grupo amino presente en el grupo R del compuesto de fórmula general I y el grupo carboxi de glicina, alanina o lisina.

25

De manera particularmente preferible el compuesto es



30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente una sal hidrocloreto del mismo, lo más preferiblemente una sal dihidrocloreto del mismo.

Otro aspecto de la presente invención según se define en las reivindicaciones se refiere a un método para predecir la respuesta de una enfermedad en un sujeto a un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define anteriormente, que comprende las etapas de:

- 5
- a) medir una concentración de estatmina en una muestra pre-obtenida del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración; y
  - b) comparar el valor o los valores de la etapa a) con un valor estándar o un conjunto de valores estándar. Detalles adicionales de este método se especifican en la reivindicación 18.

Además, preferiblemente la respuesta que se prevé es la resistencia.

10 La medición de una concentración o concentraciones de estatmina se lleva a cabo ex-vivo en una muestra o muestras pre-obtenidas del sujeto. Pre-obtenidas se refiere al hecho de que la muestra se obtiene antes de someterla a cualquier método que implique la medición de la concentración del biomarcador, y pre-obtenidas no ha de entenderse como en relación con el tratamiento.

Una mayor concentración de estatmina en la muestra del sujeto con relación al valor estándar o conjunto de valores estándares predice resistencia.

15 La enfermedad es cáncer. De manera especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer colorrectal (es decir, incluyendo el cáncer de colon y cáncer rectal), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores malignos hematológicos, melanoma y sarcomas. De manera más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer  
20 cervical, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y melanoma.

En esta memoria también se describe un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende medir una concentración de estatmina en una muestra del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración, y tratar el sujeto con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, si la concentración de estatmina en dicha muestra no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares.  
25

Estatmina se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, en donde una concentración de estatmina en una muestra del sujeto se mide para obtener un valor o valores que representan esta concentración, y el sujeto es tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se define anteriormente, si la concentración de estatmina no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares.  
30

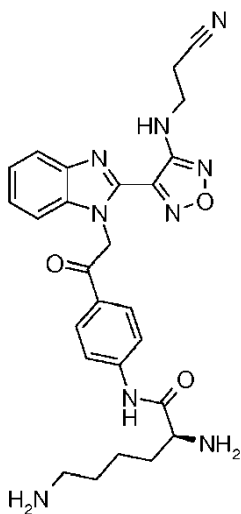
La medición de una concentración de estatmina se lleva a cabo ex-vivo en una muestra pre-obtenida del sujeto.

En esta memoria también se describe un método de tratar una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, disminuyendo primero la concentración de estatmina en un sujeto que tiene una muestra con una mayor concentración de estatmina en comparación con una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándares y, a continuación, tratar al sujeto con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se define anteriormente.  
35

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un kit según se define en las reivindicaciones para predecir la respuesta a un compuesto de fórmula I general o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para medir la concentración de estatmina en una muestra. El kit también comprende un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores estándares con los que la concentración de estatmina en la muestra se compara como se define en las reivindicaciones.  
40

El kit también comprende un compuesto de fórmula I o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo tal como se define arriba o de la siguiente fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos  
45





Nombre químico: [4-(2-[2-[4-(2-ciano-etilamino)-furazan-3-il]-benzoimidazol-1-il]-acetil)-fenil]-amida del ácido S-2,6-diamino-hexanoico

En una realización particularmente preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal dihidrocloruro.

- 5 En una realización preferida, los reactivos en el kit comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para estatmina, y un reactivo detector. De manera especialmente preferida el reactivo de captura es un anticuerpo. La enfermedad se predice para ser resistente al tratamiento con dicho compuesto cuando estatmina es mayor en relación con un valor estándar o un conjunto de valores estándares. En una realización preferida, el módulo de comparador está incluido en las instrucciones de uso del kit. En otra realización preferida, el módulo de comparador está en forma de un dispositivo de visualización.
- 10

Realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas. La invención, sin embargo, no ha de entenderse limitada a estas formas de realización.

### **Breve Descripción de las Figuras**

- 15 Figura 1: Muestra el tratamiento de líneas celulares de tumores humanos de diferentes histotipos con BAL27862 50 nM. Los microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M fueron teñidos después de 24 horas de tratamiento con BAL27862 50 nM o vehículo de control

- Fig. 1A y 1B: células de NSCLC A549;  
 Fig. 1C y 1D: células de cáncer cervical HeLa;  
 Fig. 1E y 1F: células de cáncer de mama SKBR3  
 Tratamiento con control de vehículo: Figuras 1A, 1C y 1E,  
 tratamiento con BAL27862: Figuras 1B, 1D y 1F.
- 20

Figura 2: Muestra el tratamiento de células de NSCLC A549 con los Compuestos B y C. Los microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después de 24 horas de tratamiento con 80 nM o 20 nM de los Compuestos B y C, respectivamente. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros.

- 25 Fig. 2A: tratamiento con 20 nM de Compuesto C  
 Fig. 2B: tratamiento con 80 nM de Compuesto B

- Figura 3: Muestra una comparación del tratamiento de células con BAL27862 en comparación con los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después de 24 horas de tratamiento con 50 nM de A: BAL27862; B: vinblastina; C: colchicina; D: paclitaxel. Pilas de imágenes tomadas cada 1 µm, se procesaron utilizando el software ImageJ.
- 30

Figura 4: Muestra una comparación del tratamiento de células de NSCLC A549 con BAL27862 en comparación con nocodazol. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M fueron teñidos después de 24 h de tratamiento con diversas concentraciones de nocodazol (B, C y D) y BAL27862 (E, F y G). A: control, B: Nocodazol 50 nM, C: Nocodazol 100 nM, D: Nocodazol 200 nM, E: BAL27862 20 nM; F: BAL27862 30 nM y G: BAL27862 50 nM. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros. Se muestran imágenes representativas de los fenotipos de microtúbulos observados.

5

Figura 5: Muestra una combinación de tratamiento con BAL27862 y agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después del tratamiento durante los tiempos indicados más adelante. Se utilizaron vinblastina 50 nM, colchicina 50 nM y paclitaxel 25 nM. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros.

10

Fig. 5A: Tratamiento con vinblastina durante 24 horas;  
 Fig. 5B: Tratamiento con vinblastina durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862;  
 Fig. 5C: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales vinblastina;  
 Fig. 5D: Tratamiento con colchicina durante 24 horas;  
 Fig. 5E: Tratamiento con colchicina durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862;  
 Fig. 5F: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales colchicina;  
 Fig. 5G: Tratamiento con paclitaxel durante 24 horas;  
 Fig. 5H: Tratamiento con paclitaxel durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862;  
 Fig. 5I: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales paclitaxel.

15

20

Figura 6: Muestra una combinación de tratamiento con BAL27862 y nocodazol. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después del tratamiento durante los tiempos indicados más adelante. Se utilizaron BAL27862 25 nM y nocodazol a las concentraciones indicadas a continuación. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros.

25

Figo. 6A: Tratamiento con control durante 24 horas;  
 Figo. 6B: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas;  
 Figo. 6C: Tratamiento con nocodazol 50 nM durante 24 horas;  
 Figo. 6D: Tratamiento con nocodazol 100 nM durante 24 horas;  
 Figo. 6E: Tratamiento con nocodazol 150 nM durante 24 horas;  
 Figo. 6F: Tratamiento con nocodazol 200 nM durante 24 horas;  
 Fig. 6G: Tratamiento con nocodazol 50 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;  
 Fig. 6H: Tratamiento con nocodazol 100 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;  
 Fig. 6I: Tratamiento con nocodazol 150 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;  
 Fig. 6J: Tratamiento con nocodazol 200 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;  
 Fig. 6K: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 50 nM;  
 Fig. 6L: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 100 nM;  
 Fig. 6M: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 150 nM;  
 Fig. 6N: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 200 nM;

30

35

Figura 7: Extractos de proteínas preparados a partir de cáncer gástrico derivado del paciente (Fig. 7A) y cáncer de pulmón (Fig. 7B) y tumores de melanoma (Fig. 7C) obtenidos de ratones xenoinjertados por vía subcutánea, y se analizaron por inmunotransferencia para la expresión de estatmina, con actina incluida como control de carga. Tres tumores independientes se analizaron en cada caso (1 - 3). La resistencia a BAL27862, paclitaxel y vinblastina y la sensibilidad es tal como se define en la Tabla 1.

40

Figura 8: Análisis inmunohistoquímico de concentraciones de estatmina en un tumor gástrico xenoinjertado derivado del paciente. GXF 251: sensible a BAL27862; GXF 97: resistente a BAL27862. La resistencia y la sensibilidad a BAL27862, paclitaxel y vinblastina se definen en la Tabla 1.

45

Figura 9: Curva estándar para la cuantificación por ELISA de estatmina en suero humano mezclado con estatmina recombinante. (Véase la Figura 10). Eje Y = Densidad Óptica a 450 nm, eje X = concentración de estatmina (ng/mL),  $y = 0,2723x + 0,2806$ ,  $R^2 = 0,9314$ .

50

Figura 10: Análisis ELISA y suero humano mezclado con estatmina. Las concentraciones reales medidas (eje y) se calcularon en base a la curva estándar en la Figura 9.

Figura 11: Muestra que para estatmina, las concentraciones de proteínas en células tumorales se reflejan por sus niveles de expresión. Figura 11A: Se prepararon muestras a partir de líneas celulares HeLa, H460 y A549 y en éstas se realizó una RT-PCR cuantitativa para medir los niveles de ARN. Los resultados de HeLa se establecieron en 100%, y el gráfico muestra los niveles de expresión de ARN en las muestras de H460 y A549 con relación a los valores HeLa. Figura 11B: Se prepararon extractos de proteínas de células enteras a partir de los mismos pasajes de las líneas celulares HeLa, H460 y A549 y luego se analizaron mediante inmunotransferencia para la expresión de la proteína estatmina. Las concentraciones de activa actúan como un control de carga.

Figura 12A: Muestra la secuencia de proteínas de la isoforma a de estatmina [Homo sapiens] (SEQ ID No. 1)

Figura 12B: Muestra la secuencia de proteínas de la isoforma b de estatmina [Homo sapiens] (SEQ ID No. 2)

Figura 13: Muestra la secuencia de ácidos nucleicos de estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 3 (SEQ ID No. 3).

Figura 14: Muestra la secuencia de ácidos nucleicos de estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 2 (SEQ ID No. 4).

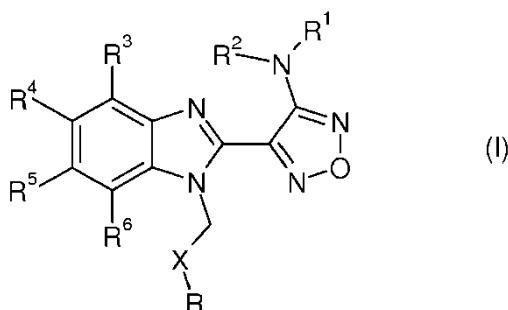
Figura 15: Muestra la secuencia de ácidos nucleicos de estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 1 (SEQ ID No. 5).

Figura 16: Muestra la secuencia de ácidos nucleicos de estatmina 1 de Homo sapiens (STMN1), variante de transcrito 4 (SEQ ID No. 6).

### **Descripción Detallada**

#### **Compuestos de fórmula I**

Los compuestos de acuerdo con la invención están representados por la fórmula general I:



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo  
 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre  
 25 alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialquilo inferior, hidroxi-alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carbonilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;  
 30 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;  
 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;  
 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;  
 35 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxi;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los derivados farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

o en donde

- 5 R representa fenilo o piridinilo,  
 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en  
 10 donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;  
 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;  
 X representa oxígeno;
- 15 R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;  
 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;  
 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;  
 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxi;  
 y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los derivados farmacéuticamente aceptables se  
 20 seleccionan del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto;

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

- 25 Heterociclilo designa preferiblemente un anillo saturado, parcialmente saturado o insaturado, mono- o bi-cíclico que contiene 4-10 átomos que comprenden uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, que puede estar, a menos que se especifique lo contrario, enlazado a carbono o nitrógeno, en el que un átomo de nitrógeno del anillo puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo inferior, amino-alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior y acilo, y un átomo de carbono del anillo puede estar sustituido con alquilo inferior, amino-alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior, heteroarilo, alcoxi inferior, hidroxialquilo inferior u oxo. Ejemplos de heterociclilo son pirrolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, dioxolanilo y tetrahidropiranilo.

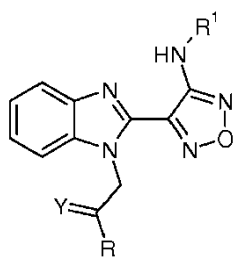
Acilo designa, por ejemplo, alquilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, arilcarbonilo, aril-alquil inferior-carbonilo o heteroarilcarbonilo. Acilo inferior es preferiblemente alquil inferior-carbonilo, en particular propionilo o acetilo.

- 35 Preferiblemente, el compuesto de fórmula general I se define como en donde R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, acetilo, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:

- 4-(1-fenacil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,  
 4-[1-(4-bromofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina oxima,  
 40 N-{4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il}-acetamida,  
 4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina  
 4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(3-hidroxipropil)-amina,  
 4-[1-(3-amino-4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina  
 4-[1-(3-metoxi-4-metoximetoxi-fenacilo)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,  
 45 y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, tal como se define anteriormente.

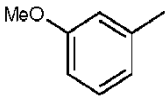
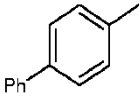
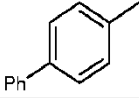
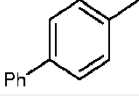
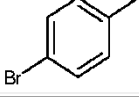
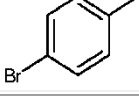
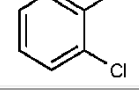
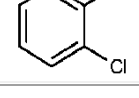
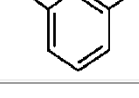
En otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:



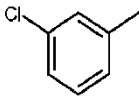
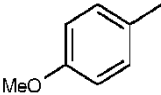
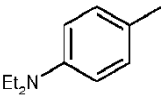
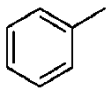
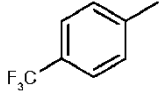
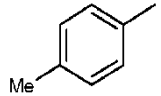
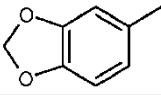
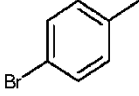
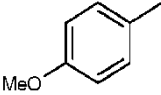
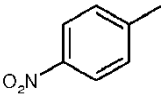
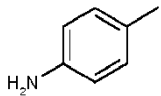
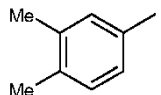
en donde  
R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

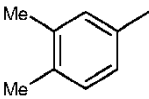
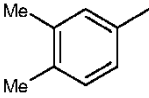
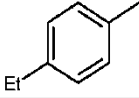
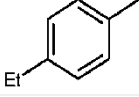
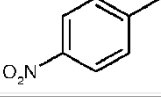
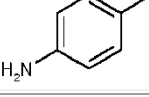
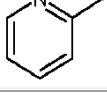
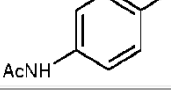
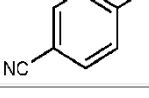
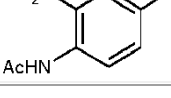
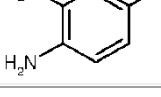
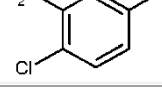
R	Y	R <sup>1</sup>
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H

ES 2 619 805 T3

R	Y	R <sup>1</sup>
		
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOMe	H
	O	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H

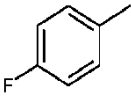
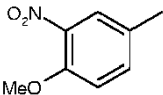
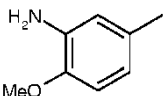
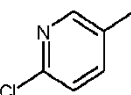
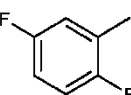

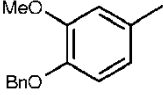
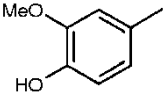
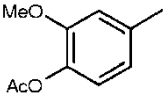
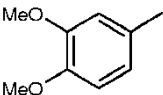
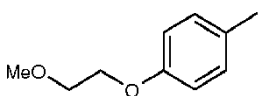
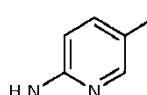
ES 2 619 805 T3

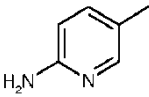
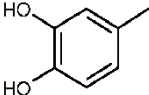
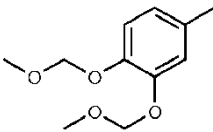
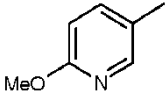
R	Y	R <sup>1</sup>
		
	NOMe	H
	O	H
	O	Ac
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	O	H

R	Y	R <sup>1</sup>
		
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H



## ES 2 619 805 T3

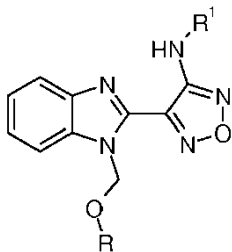
R	Y	R <sup>1</sup>
	O	H
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H

R	Y	R <sup>1</sup>
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente.

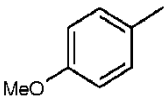
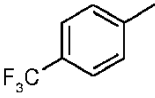
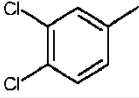
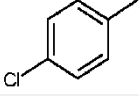
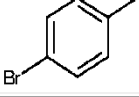
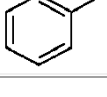
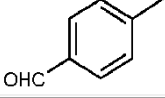
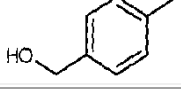
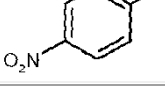
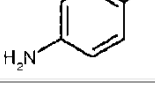
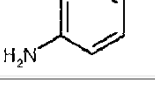
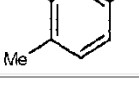
Aún en una realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:

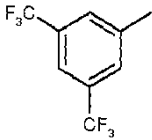
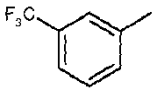
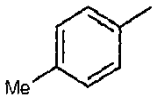
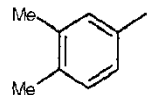
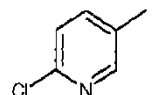
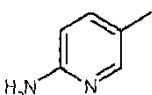
- 5 4-(1-fenoximetil-1H-benzimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,  
 4-[1-(4-fluorofenoximetil)-1H-benzimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,  
 4-[1-(3,4-dimetilfenoximetil)-1H-benzimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina  
 y compuestos representados por la fórmula:



en donde R y R<sup>1</sup> son como se definen a continuación

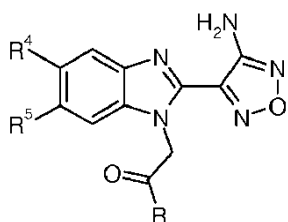
R	R <sup>1</sup>
	H
	H
	H

R	R <sup>1</sup>
	
	H
	H
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	H
	H
	H
	H
	H
	H
	H

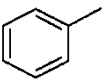
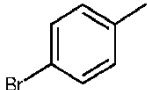
R	R <sup>1</sup>
	
	H
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	H
	H

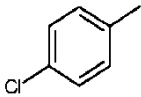
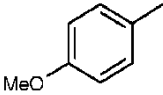
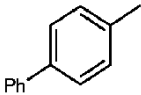

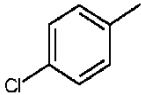
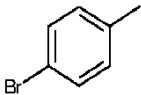
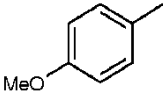
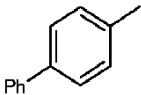
o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente.

En aún otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I es:



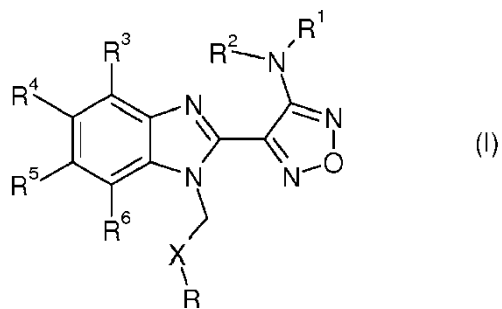
5 en donde R, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son como se definen a continuación

R	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
	Me	Me
	Me	Me

R	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
	Me	Me
	Me	Me
	Me	Me
	OMe	OMe
	OMe	OMe
	OMe	OMe
	OMe	OMe
	OMe	OMe

o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente.

Más preferiblemente, el compuesto es un compuesto de fórmula general I



5 en donde

R representa fenilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo inferior, alcoxi inferior, amino, acetilamino, halógeno y nitro;  
y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con amino o halógeno;

5 X representa un grupo C=O;

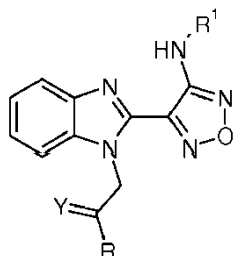
R<sup>1</sup> representa hidrógeno o ciano- alquilo inferior;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente,

10 y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

De manera especialmente preferida, el compuesto está representado por la siguiente fórmula



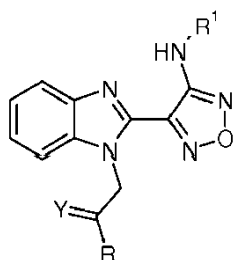
en donde R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

15

R	Y	R <sup>1</sup>
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente.

De manera más especialmente preferida, el compuesto está representado por la siguiente fórmula

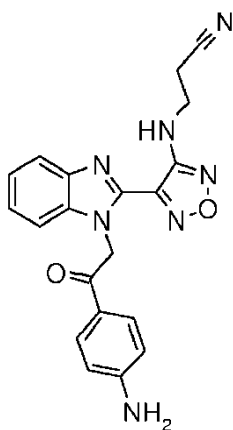


en donde R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

R	Y	R <sup>1</sup>
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente.

5 De manera particularmente preferida, el compuesto es



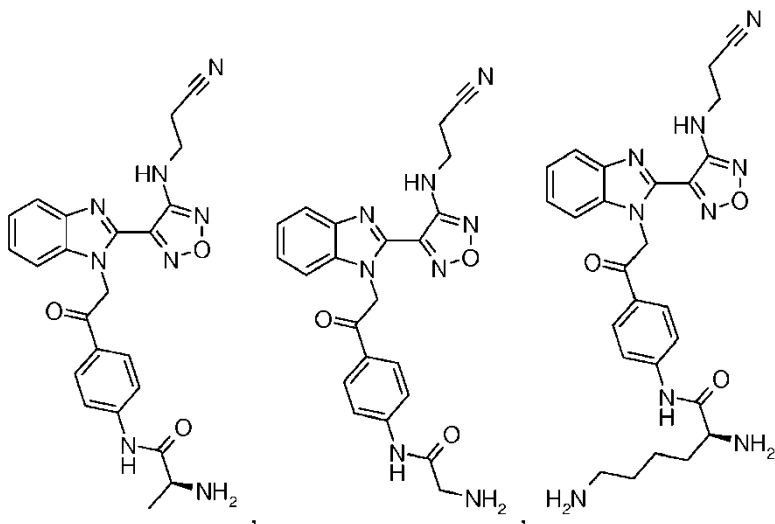
o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente.

10 El término derivado o derivados en la frase "derivado farmacéuticamente aceptable" o "derivados farmacéuticamente aceptables" de compuestos de fórmula general I se refiere a sales, solvatos y complejos de los mismos y a solvatos y complejos de sales de los mismos, así como a pro-fármacos tal como se define anteriormente, y polimorfos y también sales de pro-fármacos de los mismos. En una realización más preferida, se refiere a sales y pro-fármacos, así como a sales de pro-fármacos de los mismos.

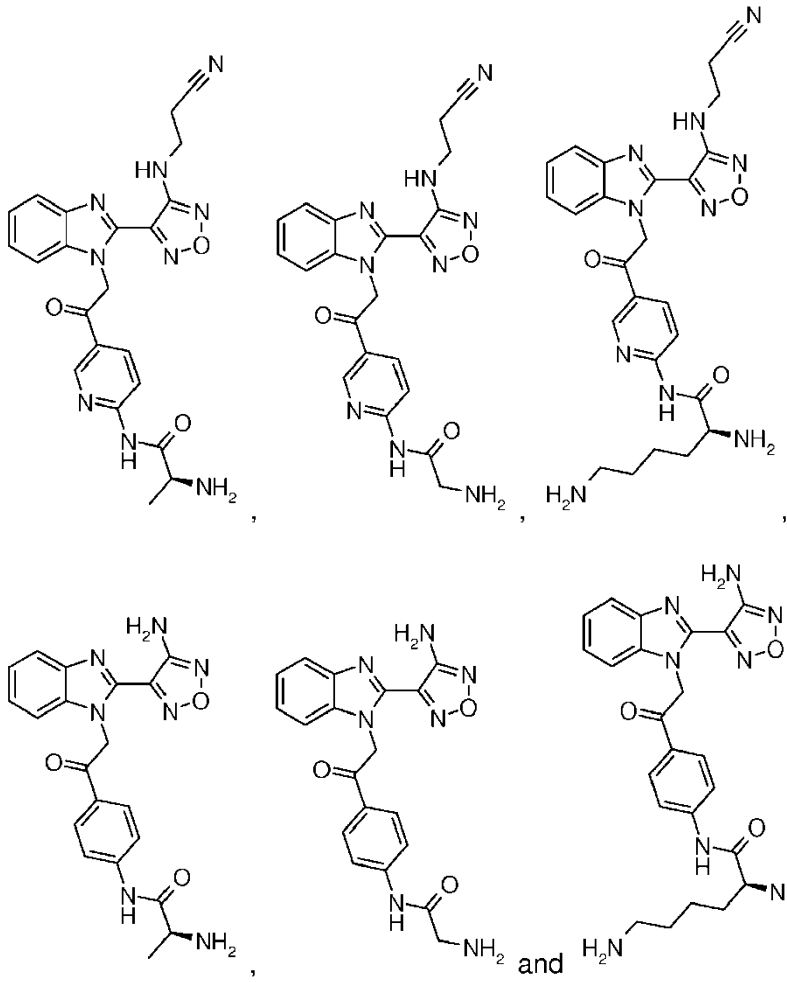
- Las sales son preferiblemente sales por adición de ácidos. Las sales se forman, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos de fórmula (I) con un átomo de nitrógeno de carácter básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos halogenados tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, los ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adipico, pimélico ácido, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metano- o etano-sulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido 2-, 3- ó 4-metilbencenosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico, u otros ácidos protónicos orgánicos tales como ácido ascórbico.
- El compuesto de fórmula (I) se puede administrar en forma de un pro-fármaco que se descompone en el cuerpo humano o animal para dar el compuesto de la fórmula I. Los pro-fármacos son ésteres y amidas hidrolizables in vivo de un compuesto de la fórmula I. Pro-fármacos particulares considerados son ésteres y amidas de aminoácidos que se producen de forma natural y ésteres o amidas de péptidos pequeños, en particular péptidos pequeños que consisten en hasta cinco, preferiblemente en dos o tres aminoácidos, así como ésteres y amidas de hidroxiaácidos pegilados, preferiblemente ácido hidroxi-acético y ácido láctico. Ésteres de pro-fármacos se forman a partir de la función ácido del aminoácido o el extremo C del péptido y grupo o grupos hidroxilo adecuados en el compuesto de fórmula I. Amidas de pro-fármacos se forman a partir de la función amino del aminoácido o el extremo N del péptido y grupo o grupos carboxi adecuados en el compuesto de fórmula I, o de la función ácido del aminoácido o el extremo C del péptido y grupo o grupos amino adecuados en el compuesto de fórmula I. De manera particularmente preferida, las amidas de pro-fármacos se forman a partir del o de los grupos amino presentes en el grupo R de fórmula I.

Más preferiblemente, el pro-fármaco se forma por la adición de glicina, alanina o lisina al compuesto de fórmula I.

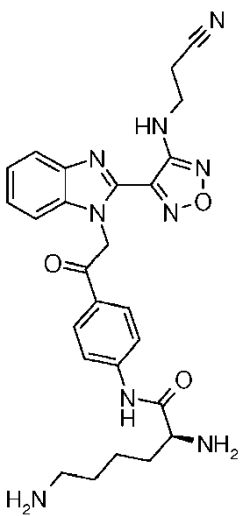
Incluso más preferiblemente, el compuesto de fórmula general I está en forma de un pro-fármaco seleccionado de los compuestos de fórmulas:



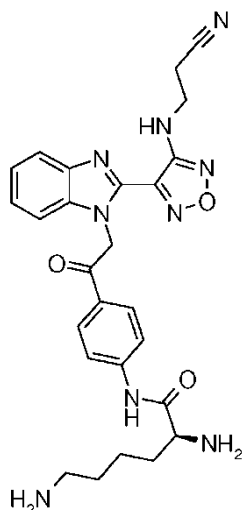




En una realización especialmente preferida, el compuesto está en forma de un pro-fármaco que tiene la siguiente fórmula

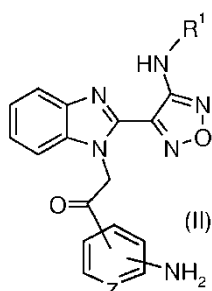


En una realización más especialmente preferida, el compuesto de acuerdo con la invención es una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal hidrocioruro, lo más preferiblemente una sal dihidrocioruro, de un compuesto de la siguiente fórmula



5 El metabolito farmacéuticamente activo in vivo en este caso es BAL27862.

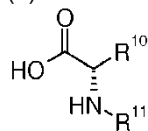
Estos pro-fármacos se pueden preparar mediante procedimientos que son conocidos per se, en particular, un procedimiento en el que un compuesto de fórmula (II)



(II)

10 en donde R<sup>1</sup> se define como para la fórmula (I) y Z es CH o N, o un derivado de un compuesto de este tipo que comprende grupos funcionales en forma protegida, o una sal del mismo

(1) se acila con un aminoácido de fórmula (III)



en donde

15 R<sup>10</sup> se selecciona de hidrógeno (Gly); metilo (Ala) y aminobutilo protegido (Lys) y

R<sup>11</sup> es un grupo protector adecuado de amino, y

(2) cualesquiera grupos protectores en un derivado protegido del compuesto resultante se separan para producir un pro-fármaco del compuesto (II) tal como se muestra arriba y, si se desea,

20 (3) dicho pro-fármaco se convierte en una sal mediante tratamiento con un ácido, o una sal de un compuesto de fórmula (II) se convierte en el correspondiente compuesto libre de fórmula (II) o en otra sal, y/o una mezcla de compuestos de productos isoméricos se separa en los isómeros individuales.

La acilación de un compuesto de fórmula (II) con un aminoácido de fórmula (III) se lleva a cabo de una manera conocida per se, habitualmente en presencia de un disolvente aprótico polar o dipolar adecuado, con enfriamiento o calentamiento según se requiera, por ejemplo en un intervalo de temperaturas de aproximadamente menos 80°C a aproximadamente más 150°C, más preferiblemente de menos 30°C a más 120°C, especialmente en un intervalo de aproximadamente alrededor de 0°C a la temperatura de reflujo del disolvente utilizado. Opcionalmente se añade una base adecuada, en particular una base aromática tal como piridina o colidina o una base de amina terciaria tal como trietilamina o diisopropiletilamina, o una sal inorgánica de carácter básico, p. ej., carbonato de potasio o de sodio.

La acilación puede llevarse a cabo en las condiciones utilizadas para la formación de amidas conocida per se en la química de los péptidos, p. ej., con agentes activantes para el grupo carboxi tales como carbodiimidas tales como N,N'-dietil-, N,N'-dipropil-, N,N'-diisopropil-, N,N'-diclohexil-carbodiimida e hidrocloreto de N-(3-dimetilaminoisopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), o con agentes tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HATU), tetrafluoroborato de 2-(2-oxo-1-(2H)piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TPTU), opcionalmente en presencia de bases, catalizadores o co-reactivos adecuados. El grupo carboxi puede también ser activado como haluro de acilo, preferiblemente como cloruro de acilo, p. ej., por reacción con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, o como anhídrido simétrico o asimétrico, p. ej., por reacción con halogenoformiatos tales como cloroformiato de etilo, opcionalmente en presencia de bases, catalizadores o co-reactivos adecuados.

Si uno o más de otros grupos funcionales, por ejemplo carboxi, hidroxilo o amino, están o necesitan ser protegidos en un compuesto de fórmula (II) o (III), debido a que no deben formar parte de la reacción, éstos son grupos protectores tales como los que se emplean normalmente en la síntesis de amidas tales como, en particular compuestos peptídicos, cefalosporinas, penicilinas, derivados de ácidos nucleicos y azúcares, que son conocidos por personas expertas. Grupos protectores adecuados para grupos amino son, por ejemplo, carbamato de t-butilo, carbamato de bencilo o carbamato de 9-fluorenilmetilo.

Los grupos protectores pueden estar ya presentes en precursores y deben proteger a los grupos funcionales en cuestión frente a reacciones secundarias no deseadas tales como alquilaciones, acilaciones, eterificaciones, esterificaciones, oxidaciones, solvolisis y reacciones similares. Es una característica de los grupos protectores que se prestan fácilmente, es decir, sin reacciones secundarias no deseadas, a la separación, típicamente por solvolisis, reducción, fotólisis o también por actividad enzimática, por ejemplo bajo condiciones análogas a las condiciones fisiológicas, y que no están presentes en los productos finales. El especialista conoce, o puede establecer fácilmente, qué grupos protectores son adecuados con las reacciones mencionadas anteriormente en esta memoria y de aquí en adelante.

La protección de grupos funcionales de este tipo mediante tales grupos protectores, los propios grupos protectores, y sus reacciones de separación se describen, por ejemplo, en libros de referencia estándares para la síntesis de péptidos y en libros especiales sobre grupos protectores tales como J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en "Methoden der organischen Chemie" (Methods of organic chemistry), Houben-Weyl, 4ª edición, Volumen 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, y en T. W. Greene, G. M. Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, Nueva York, 2006.

#### 40 Enfermedad

Los compuestos de fórmula general I han demostrado detener la proliferación celular e inducir la muerte celular, por ejemplo por apoptosis.

La desregulación de la proliferación celular, o la falta de una muerte celular apropiada, tiene una amplia gama de implicaciones clínicas. Un cierto número de enfermedades asociadas con una desregulación de este tipo implican hiperproliferación, inflamación, remodelación y reparación de tejidos. Indicaciones familiares en esta categoría incluyen cánceres, restenosis, hiperplasia neointimal, angiogénesis, endometriosis, trastornos linfoproliferativos, patologías relacionadas con el trasplante (rechazo del injerto), poliposis, pérdida de la función neural en el caso de remodelación de tejidos y similares.

El cáncer se asocia con tasas de proliferación celular y muerte celular anormales. Dado que la apoptosis es inhibida o retrasada en la mayoría de los tipos de enfermedades proliferativas, neoplásicas, la inducción de la apoptosis es una opción para el tratamiento del cáncer, especialmente en tipos de cáncer que muestran resistencia a la quimioterapia clásica, la radiación y la inmunoterapia (Apoptosis and Cancer Chemotherapy, Hickman y Dive,

comps., Blackwell Publishing, 1999). También en enfermedades y patologías autoinmunes y relacionadas con el trasplante se puede utilizar compuestos que inducen la apoptosis para restablecer los procesos de muerte celular normal y, por lo tanto, pueden erradicar los síntomas y podrían curar las enfermedades. Otras aplicaciones de compuestos que inducen la apoptosis pueden ser la restenosis, es decir, la acumulación de células de la musculatura lisa vascular en las paredes de las arterias, y en infecciones persistentes provocadas por un fallo de erradicar células infectadas por bacterias y virus. Además, la apoptosis puede ser inducida o restablecida en células epiteliales, en células endoteliales, en las células de la musculatura y en otras que han perdido contacto con la matriz extracelular.

Un compuesto de acuerdo con la fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se puede usar para el tratamiento profiláctico o especialmente terapéutico del cuerpo humano, en particular para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, enfermedad autoinmune, patología relacionada con el trasplante y/o enfermedad degenerativa. Ejemplos de tales enfermedades neoplásicas incluyen, pero no se limitan a neoplasias epiteliales, neoplasias de células escamosas, neoplasias de células basales, papilomas de células de transición y carcinomas, adenomas y adenocarcinomas, neoplasias anaxiales y fanera, neoplasias mucoepidermoides, neoplasias quísticas, neoplasias mucinosas y serosas, neoplasias ducales, lobulares y medulares, neoplasias de células acinares, neoplasias epiteliales complejas, neoplasias gonadales especializadas, paragangliomas y tumores del glomus, nevus y melanomas, tumores de tejido blando y sarcomas, neoplasias fibromatosas, neoplasias mixomatosas, neoplasias lipomatosas, neoplasias miomatosas, neoplasias mixtas complejas y estromales, neoplasias fibroepiteliales, neoplasias tipo sinoviales, neoplasias mesoteliales, neoplasias de células germinales, neoplasias trofoblásticas, mesonefomas, tumores de los vasos sanguíneos, tumores de los vasos linfáticos, neoplasias óseas y condromatosas, tumores de células gigantes, tumores óseos misceláneos, tumores odontogénicos, gliomas, neoplasias neuroepiteliomatosas, meningiomas, tumores de la vaina nerviosa, tumores de células granulares y sarcomas de las partes blandas alveolares, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, otras neoplasias linforreticulares, tumores de células plasmáticas, tumores de mastocitos, enfermedades inmunoproliferativas, leucemias, trastornos mieloproliferativos misceláneos, trastornos linfoproliferativos y síndromes mielodisplásicos.

Los compuestos de fórmula I general o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden utilizar para tratar enfermedades autoinmunes. Ejemplos de tales enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a lupus eritematoso cutáneo sistémico, discoide o subagudo, artritis reumatoide, síndrome antifosfolípido, CREST, esclerosis sistémica progresiva, enfermedad mixta del tejido conjuntivo (síndrome de Sharp), síndrome de Reiter, artritis juvenil, enfermedad de aglutinina fría, crioglobulinemia mixta esencial, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, poliartritis crónica, miastenia grave, esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillan-Barre, dermatomiositis/polimiositis, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica, neutropenia, diabetes mellitus tipo I, tiroiditis (incluida la enfermedad de Hashimoto y de Grave), enfermedad de Addison, síndrome poliglandular, pénfigo (vulgar, foliáceo, sebáceo y vegetante), penfigoide ampoloso y cicatricial, penfigoide gestacional, epidermólisis ampolosa adquirida, enfermedad de IgA lineal, liquen escleroso y atrófico, enfermedad de Dühring, psoriasis vulgar, guttata, psoriasis pustular generalizada y pustular localizada, vitiligo, alopecia areata, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, todas las formas de glomerulonefritis, hemorragia pulmonar (síndrome de Goodpasture), nefropatía por IgA, anemia perniciosa y gastritis autoinmune, enfermedades inflamatorias del intestino (incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), enfermedad de Behcet, enfermedad celiaca-bebedero, uveítis autoinmune, miocarditis autoinmune, orquitis granulomatosa, aspermatogénesis sin orquitis, fibrosis pulmonar idiopática y secundaria, enfermedades inflamatorias con una posibilidad de patogénesis autoinmune tal como pioderma gangrenoso, liquen ruber, sarcoidosis (incluyendo Lofgren y de tipo cutánea/subcutánea), granuloma anular, reacción inmunológica alérgica tipo I y tipo IV, asma bronquial, polinosis, dermatitis atópica, de contacto y por el aire, vasculitis de grandes vasos (arteritis de células gigantes y de Takayasu), vasculitis de vasos de tamaño mediano (poliarteritis nodosa, enfermedad de Kawasaki), vasculitis de vasos pequeños (granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg Strauss, polangiitis microscópica, púrpura de Henoch Schoenlein, vasculitis crioglobulinémica esencial, angiitis cutánea leucoclastica), síndromes de hipersensibilidad, necrólisis epidérmica tóxica (síndrome de Stevens-Johnson, eritema multiforme), enfermedades debidas a los efectos secundarios de los fármacos, todas las formas de efectos cutáneos, específicos para órganos y sistémicos debidos al tipo I-vu (clasificación de Coombs) formas inmunológicas de reacción, patologías relacionadas con el trasplante tales como enfermedad de injerto aguda y crónica frente a huésped e injerto frente a huésped, que implican todos los órganos (piel, corazón, riñón, médula ósea, ojo, hígado, bazo, pulmón, músculo, sistema nervioso central y periférico, tejido conjuntivo, hueso, vasos sanguíneos y linfáticos, sistema genito-urinario, oídos, cartilago, sistema linfático primario y secundario incluyendo médula ósea, ganglios linfáticos, timo, tracto gastrointestinal, incluyendo oro-faringe, esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto, incluidas partes de los órganos anteriormente mencionados hasta la concentración y subestructuras de células individuales, p. ej., células madre).

De manera particularmente preferible, la enfermedad es una enfermedad neoplásica o autoinmune. En una realización especialmente preferida, la enfermedad es cáncer.

5 Ejemplos de cánceres en términos de los órganos y partes del cuerpo afectadas incluyen, pero no se limitan al  
 10 cáncer de mama, cuello uterino, ovario, colon, recto, (incluyendo colon y recto es decir, cáncer colorrectal), pulmón  
 (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas cáncer, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de  
 15 pulmón de células grandes y mesotelioma), sistema endocrino, hueso, glándula adrenal, timo, hígado, estómago,  
 intestino (incluyendo el cáncer gástrico), páncreas, médula ósea, tumores malignos hematológicos, (tales como  
 linfoma, leucemia, mieloma o tumores malignos linfoides), vejiga, tracto urinario, riñones, piel, tiroides, cerebro,  
 cabeza, cuello, próstata y testículos. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de  
 20 mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de  
 páncreas, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores  
 malignos hematológicos, melanoma y sarcomas. De manera especialmente preferida, el cáncer se selecciona del  
 grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y melanoma. De manera  
 25 más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de pulmón y  
 melanoma.

### Muestras

La medición de la concentración de estatmina se puede realizar *in vitro*, en una muestra de tejido biológico derivada  
 del sujeto. La muestra puede ser cualquier material biológico separado del cuerpo tal como, por ejemplo, tejido  
 20 normal, tejido tumoral, líneas celulares, sangre entera, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático,  
 células tumorales circulantes, lisado celular, lisado tisular, orina y aspirados. Preferiblemente, la muestra se deriva  
 de tejido normal, tejido tumoral, líneas celulares, células tumorales circulantes, suero, plasma o sangre entera. Más  
 preferiblemente, la muestra se deriva de tejido tumoral, células tumorales circulantes o suero. En una realización  
 particularmente preferida, la muestra se deriva de tejido tumoral. Por ejemplo, la concentración de estatmina se  
 25 puede medir en una muestra de tejido tumoral reciente, congelada o fijada en formalina/embebida en parafina. En  
 otra realización particularmente preferida, la muestra se deriva de suero.

La muestra se pre-obtiene del sujeto antes de que la muestra sea sometida a las etapas del método que implican  
 medir la concentración del biomarcador. Los métodos para la separación de la muestra son bien conocidos en la  
 técnica, y puede ser separada, por ejemplo, del sujeto por biopsia, por ejemplo, mediante biopsia por punción,  
 30 biopsia de núcleo o biopsia con aguja fina de aspiración, biopsia endoscópica o biopsia superficial. Una muestra de  
 sangre entera, plasma o suero puede ser recogida por punción venosa y puede ser procesada adicionalmente de  
 acuerdo con técnicas estándares. Las células tumorales circulantes también pueden obtenerse a partir de sangre  
 sobre la base de, por ejemplo, el tamaño (p. ej., ISET - Aislamiento por Tamaño de las Células Tumorales del  
 Epitelio) o el enriquecimiento celular inmunomagnético (p. ej., Cellsearch®, Veridex, Raritan, NJ)

### Comparación de la muestra

35 El sujeto puede ser humano o animal. Preferiblemente, el sujeto es humano.

El biomarcador estatmina se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo humano o animal, tomada  
 preferentemente del cuerpo humano. La muestra o muestras se pre-obtienen del cuerpo humano o animal,  
 preferiblemente se pre-obtienen del cuerpo humano antes de que la muestra se someta a las etapas del método que  
 implica medir la concentración del biomarcador.

40 Un biomarcador es, en general, una sustancia que se utiliza como un indicador de una respuesta biológica,  
 preferiblemente como un indicador de la susceptibilidad a un tratamiento dado, que en la presente solicitud es el  
 tratamiento con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particularmente preferida, concentraciones elevadas de estatmina en la muestra con respecto a  
 un valor estándar o conjunto de valores estándar predice resistencia.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, un aumento o concentraciones relativamente altas o altas o mayores en  
 relación con una concentración estándar o conjunto de concentraciones estándares significa la cantidad o  
 concentración del biomarcador en una muestra es detectablemente mayor en la muestra con relación a la  
 concentración estándar o conjunto de concentraciones estándares. Esto abarca al menos un incremento de, o una  
 50 concentración mayor que, aproximadamente 1% con relación al estándar, preferiblemente al menos un aumento de  
 aproximadamente 5% con relación al estándar. Más preferiblemente, es un incremento de, o una concentración

mayor que, al menos aproximadamente 10% con relación al estándar. De manera más particularmente preferida, es un incremento de, o una concentración mayor que, al menos aproximadamente 20% con relación al estándar. Por ejemplo, un incremento de, o una concentración mayor que, puede incluir, pero no se limita a, al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 50%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 100%, aproximadamente 150% o aproximadamente 200% o más con respecto a la norma.

5

Preferiblemente, concentraciones más altas de estatmina en una muestra o muestras

i) con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándares de sujetos con el mismo histotipo del tumor; o

10

ii) con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándares a partir de células o tejidos normales o fluido corporal;

son predictivas de resistencia.

La medición de una concentración de estatmina se lleva a cabo ex-vivo en una muestra pre-obtenida del sujeto. Además, preferiblemente la respuesta que ha de ser predicha es la resistencia.

15

De manera especialmente preferida, concentraciones más altas de estatmina en una muestra o muestras con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándares de sujetos con el mismo histotipo del tumor son predictivas de resistencia.

20

En una realización preferida, para el caso ii) en el que la medición se compara en una muestra o muestras con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándares tomados de células o tejido normales, el valor estándar o conjunto de valores estándares se puede establecer a partir de una muestra de células normales (p. ej., no tumorales), tejido o fluido corporal. Tales datos se pueden reunir de una población de sujetos con el fin de desarrollar el valor estándar o el conjunto de valores estándares.

25

En otra realización preferida, para el caso i) en el que la medición se compara en una muestra o muestras con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándares tomados de muestras de sujetos con el mismo histotipo de tumor que la muestra con la que se ha de comparar, el valor estándar o conjunto de valores estándares se establecen a partir de muestras tomadas de una población de sujetos con ese tipo de cáncer. Las muestras de estos sujetos estándares se pueden derivar, por ejemplo, del tejido tumoral o de células tumorales circulantes, suero, plasma o sangre entera, siempre que el origen de la muestra sea consistente entre el patrón y la muestra a comparar. El valor estándar o conjunto de valores estándares se establece ex-vivo de muestras pre-obtenidas, que puede ser de líneas celulares o, preferiblemente, de material biológico de al menos un sujeto y más preferiblemente de una media de sujetos (p. ej.,  $n = 2$  hasta 1000 o más). El valor estándar o conjunto de valores estándares puede entonces ser correlacionado con los datos de respuesta de las mismas líneas celulares, o mismos sujetos, al tratamiento con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. A partir de esta correlación, se puede establecer un módulo de comparador, por ejemplo, en forma de una escala o sistema de puntuación relativo, incluyendo opcionalmente los valores de corte o umbrales, que indique las concentraciones de biomarcador asociadas con un espectro de niveles de respuesta para el compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. El espectro de niveles de respuesta puede comprender la sensibilidad relativa con la actividad terapéutica del compuesto, (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad terapéutica. En una realización preferida, este módulo de comparador comprende un valor de corte o conjunto de valores que predice resistencia al tratamiento.

30

35

40

45

Por ejemplo, si se utiliza un método inmunohistoquímico para medir la concentración de estatmina en una muestra, los valores estándares pueden estar en forma de un sistema de puntuación. Un sistema de este tipo podría tener en cuenta el porcentaje de células en las que está presente la tinción para la estatmina. El sistema también puede tener en cuenta la intensidad relativa de la tinción en las células individuales. Los valores estándares o el conjunto de valores estándares de la concentración de estatmina pueden entonces correlacionarse con datos que indican la respuesta, especialmente la resistencia del sujeto o tejido o línea celular a la actividad terapéutica de un compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. Tales datos pueden entonces formar parte de un módulo de comparador.

5 La respuesta es la reacción de las líneas celulares o, preferiblemente, del sujeto, o más preferiblemente de la enfermedad en un sujeto, a la actividad terapéutica de un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. El espectro de niveles de respuesta puede comprender la sensibilidad con respecto a la actividad terapéutica del compuesto (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad terapéutica. Los datos de respuesta pueden ser monitoreados, por ejemplo, en términos de: tasas de respuesta objetiva, tiempo hasta la progresión de la enfermedad, progresión de la supervivencia libre y la supervivencia global.

La respuesta de una enfermedad cancerosa se puede evaluar utilizando criterios bien conocidos por una persona en el campo del tratamiento del cáncer, por ejemplo, pero no restringido a,

10 directrices de criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST), Fuente: Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: directriz RECIST revisada (versión 1.1). Eur J Cancer.2009; 45:228-47;

15 RANO Criteria for High-Grade Gliomas, Fuente: Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R, Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. J Clin Oncol. 2010;28(11):1963-72;

20 CA-125 Rustin Criteria for Ovarian Cancer Response, Fuente: Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, Eisenhauer E, Sagae S, Greven K, Vergote I, Cervantes A, Vermorken J. Re: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). J Natl Cancer Inst. 2004; 96(6):487-8;

y

25 PSA Working Group 2 Criteria for Prostate Cancer Response, Source: Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, Eisenberger MA, Higano C, Bubley GJ, Dreicer R, Petrylak D, Kantoff P, Basch E, Kelly WK, Figg WD, Small EJ, Beer TM, Wilding G, Martin A, Hussain M; Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. J Clin Oncol. 2008;26(7):1148-59.

30 La resistencia se asocia con que no existe una reducción observable y/o medible en, o en ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células anormales, preferiblemente células cancerosas; o ausencia de las células anormales, preferiblemente células cancerosas; para enfermedades cancerosas: reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, reducido a cierto grado y preferiblemente detenido) de un crecimiento ulterior del tumor; reducción en las concentraciones de los marcadores tumorales tales como PSA y CA-125, inhibición (es decir, se redujo hasta cierto punto y preferiblemente se detuvo) de la infiltración de células cancerosas en otros órganos (incluyendo la extensión del cáncer en el tejido blando y los huesos); inhibición (es decir, se redujo hasta cierto punto y preferiblemente se detuvo) de la metástasis tumoral; alivio de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; y morbilidad y mortalidad reducidas.

40 En una realización preferida, resistencia significa que no hay reducción observable y/o medible en, o ausencia de, uno o más de los siguientes criterios: reducción del tamaño del tumor; inhibición del crecimiento ulterior del tumor, inhibición de la infiltración de células cancerosas en otros órganos; e inhibición de la metástasis tumoral.

En una realización más preferida, resistencia se refiere a uno o más de los siguientes criterios: ninguna reducción en el tamaño del tumor; ninguna inhibición del crecimiento ulterior del tumor, ninguna inhibición de la infiltración de células cancerosas en otros órganos; y ninguna inhibición de la metástasis tumoral.

45 La medición de los criterios de resistencia anteriormente mencionados es de acuerdo con las directrices clínicas bien conocidas por una persona en el campo del tratamiento del cáncer tales como las enumeradas anteriormente para la medición de la respuesta de una enfermedad cancerosa.

La respuesta también puede ser establecida mediante la evaluación in vitro de la proliferación celular y/o la muerte celular. Por ejemplo, los efectos sobre la muerte o la proliferación celular pueden ser evaluados in vitro por uno o más de los siguientes ensayos bien establecidos: A) tinción nuclear con colorante Hoechst 33342 que proporciona

información sobre la morfología nuclear y la fragmentación de ADN que son distintivos de la apoptosis. B) Ensayo de unión a anexina V que refleja el contenido de fosfatidilserina de la bicapa lipídica externa de la membrana plasmática. Este evento se considera un distintivo temprano de la apoptosis. C) Ensayo TUNEL (ensayo de marcaje de extremo de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal), un método de fluorescencia para evaluar las células sometidas a apoptosis o necrosis mediante la medición de la fragmentación del ADN marcando el extremo terminal de ácidos nucleicos. D) ensayo de proliferación MTS que mide la actividad metabólica de las células. Las células viables son metabólicamente activas, mientras que las células con una cadena respiratoria comprometida muestran una actividad reducida en esta prueba. E) ensayo de tinción con cristal violeta, en donde los efectos sobre el número de células se controlan mediante la tinción directa de los componentes celulares. F) ensayo de proliferación que monitorea la síntesis de ADN a través de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). Pueden determinarse directamente efectos inhibitorios sobre el crecimiento/la proliferación. G) Ensayo YO-PRO que implica un colorante de ácidos nucleicos de cianina monomérica, fluorescente e impermeable a la membrana, que permite el análisis de la muerte (p. ej., apoptosis) de las células sin interferir en la viabilidad celular. También se pueden analizar efectos globales sobre el número de células después de la permeabilización celular. H) Tinción con yoduro de propidio para la distribución del ciclo celular que muestra alteraciones en la distribución entre las diferentes fases del ciclo celular. Se pueden determinar puntos que detienen el ciclo celular. I) Ensayos de crecimiento independiente del anclaje tales como ensayos del brote de colonias que evalúan la capacidad de las suspensiones de células individuales para crecer en colonias en agar blando.

En una realización preferida en relación con la determinación de la resistencia in vitro, resistencia significa que no hay disminución en la tasa de proliferación de células anormales y/o reducción en el número de células anormales. Más preferiblemente, resistencia significa que no hay disminución de la tasa de proliferación de células cancerosas y/o ninguna reducción en el número de células cancerosas. La reducción en el número de células anormales, preferiblemente cancerosas, se puede producir a través de una diversidad de mecanismos de muerte celular programados y no programados. La apoptosis, la muerte celular programada independiente de caspasas y la muerte celular autofágica son ejemplos de la muerte celular programada. Sin embargo los criterios de muerte celular implicados en formas de realización de la invención no se han de tomar como limitados a ningún mecanismo de la muerte celular.

### Estatmina

Como se describió anteriormente, el término estatmina se utiliza en esta memoria para abarcar todos los sinónimos y las isoformas anteriormente mencionados y se refiere a esta entidad tanto en el nivel de ácido nucleico como de proteína, según proceda. Los niveles de ácido nucleico se refieren, por ejemplo, a ARNm, ADNc o ADN, y el término proteína incluye la secuencia de polipéptidos o proteína traducida y formas después modificadas post-traducción de los mismos.

Ejemplos preferidos de la secuencia de proteína de estatmina (estatmina humana) se enumeran en SEQ. ID NO. 1 y 2 (isoforma a y b, respectivamente). Sin embargo, el término estatmina también abarca homólogos, formas mutantes, variantes alélicas, isoformas, variantes de corte y empalme, y equivalentes de estas secuencias. Los homólogos humanos, las formas mutantes, variantes alélicas, isoformas, variantes de corte y empalme y equivalentes de estas secuencias son realizaciones más preferidas. Más preferiblemente abarca secuencias que tienen al menos aproximadamente 75% de identidad, en especial preferiblemente al menos una identidad de aproximadamente 85%, con especial preferencia al menos una identidad de aproximadamente 95%, y de manera más particularmente preferida una identidad de aproximadamente 99% con cualquiera de las secuencias representadas por la SEQ. ID NO. 1 ó 2. En una realización especialmente preferida, estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que se representa en el nivel de proteínas por SEQ ID NO. 1 o 2 o secuencias que tienen una identidad de al menos 95% con cualquiera de estas secuencias, preferentemente una identidad de al menos 99% con cualquiera de estas secuencias. En una realización particularmente preferida, estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que se representa en el nivel de proteínas por la SEQ ID NO. 1 o secuencias que tienen una identidad de al menos 95% con esta secuencia, preferentemente una identidad de al menos 99%. En una realización más particularmente preferida, estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que está representada en el nivel de proteínas por SEQ ID NO. 1 ó 2. En una realización aún más particularmente preferida, estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que se representa en el nivel de proteínas por SEQ ID NO. 1.

Se conocen múltiples variantes de corte y empalme del gen estatmina humano. Ejemplos preferidos de secuencias de ácidos nucleicos de estatmina (estatmina humana) son accesibles a través de la Referencia de secuencia del NCBI NM\_005563; NM\_203399; NM\_203401 y NM\_001145454 y se enumeran en SEQ ID NO. 3 (NM\_005563.3); NO. 4 (NM\_203399.1); NO. 5 (NM\_203401.1) y NO. 6 (NM\_001145454.1) (Figuras 13-16),



respectivamente. Estas son las variantes de transcritos 1-4 de estatmina 1 de Homo sapiens (STMN1). Las variantes de transcritos 1, 2 y 3 codifican la isoforma a, mientras que la variante de transcrito 4 codifica la isoforma b.

5 El término estatmina también abarca modificaciones, variantes más degeneradas de dichas secuencias, complementos de dichas secuencias y oligonucleótidos que se hibridan a una de dichas secuencias. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. Más preferiblemente abarca secuencias que tienen una identidad de al menos aproximadamente 75% con dicha secuencia, de manera especialmente preferible una identidad de al menos aproximadamente 85%, de manera particularmente preferible una identidad de al menos aproximadamente 95% y de manera más particularmente preferida una identidad de aproximadamente 99%.

10 En aún otra realización preferida, estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que está representada en el nivel de ácido nucleico mediante una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 3, 4, 5 y 6, y secuencias que tienen una identidad de al menos 95% con estas secuencias, preferentemente una identidad de al menos 99% con estas secuencias. Más preferiblemente, la estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que está representada en el nivel de ácido nucleico mediante SEQ ID NO. 3, o  
15 secuencias que tienen una identidad de al menos 95% con esta secuencia, preferentemente una identidad de al menos 99% con esta secuencia. En una realización preferida adicional, estatmina es la entidad en los niveles de ácidos nucleicos o proteínas, que está representada en el nivel de ácido nucleico mediante una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 3, 4, 5 y 6.

#### Concentración de estatmina

20 La concentración de estatmina puede ensayarse en la muestra por medios técnicos bien conocidos por una persona experta. Puede ensayarse al nivel de transcripción o traducción.

En una realización preferida, se mide el nivel de ácido nucleico de estatmina, preferiblemente ARNm de estatmina. Ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica en la técnica que son adecuados para medir el nivel de estatmina al nivel de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a i) utilizar una sonda marcada que sea capaz de hibridarse a ARNm; ii) utilizar la PCR que implica uno o más cebadores basados en la secuencia génica de estatmina, por ejemplo, utilizando métodos de PCR cuantitativos utilizando sondas marcadas, p. ej., sondas fluorogénicas, tales como PCR en tiempo real cuantitativa; iii) micro-matrices; IV) transferencia northern; V) análisis en serie de la expresión génica (SAGE), READS (amplificación de enzimas de restricción de ADNcs digeridos), muestra diferencial y medición de microARN.

25

30 En una realización preferida, se mide la concentración de estatmina al nivel de proteínas. Ejemplos de métodos de análisis de expresión de proteínas conocidos en la técnica que son adecuados para medir la concentración de estatmina al nivel de proteínas incluyen, pero no se limitan a i) análisis de inmunohistoquímica (IHC), ii) transferencia western, iii) inmunoprecipitación iv) ensayo de inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA), v) radioinmunoensayo, vi) clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) vii) espectrometría de masas, incluyendo desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI, p. ej., MALDI-TOF) y desorción/ionización por láser  
35 potenciada en superficie (SELDI, p. ej., SELFI-TOF).

Los anticuerpos implicados en algunos de los métodos anteriores pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos de anticuerpos y/o diversos tipos de anticuerpos sintéticos, incluidos anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede estar marcado para permitir que sea detectado o sea susceptible de detección tras la reacción con una o más especies adicionales, por ejemplo, utilizando un anticuerpo secundario que está marcado o es capaz de producir un resultado detectable. Anticuerpos específicos para la forma estatmina de tubulina alfa están disponibles comercialmente de Epitomics, Abcam, Cell Signaling Technology, Inc. and Santa Cruz o se pueden preparar a través de métodos convencionales de generación de anticuerpos, bien conocidos para una persona experta.

40

45 Métodos preferidos de análisis de proteínas son ELISA, técnicas de espectrometría de masas, inmunohistoquímica y transferencia western, más preferiblemente ELISA, transferencia western e inmunohistoquímica, de manera más particularmente preferida transferencia western e inmunohistoquímica. En la transferencia western, también conocida como inmunotransferencia, se pueden utilizar anticuerpos marcados para evaluar las concentraciones de proteína, en donde la intensidad de la señal procedente del marcador detectable corresponde a la cantidad de  
50 proteína, y se puede cuantificar, por ejemplo, mediante densitometría.

La inmunohistoquímica utiliza de nuevo anticuerpos marcados para detectar la presencia y cantidad relativa del biomarcador. Se puede utilizar para evaluar el porcentaje de células para las cuales el biomarcador está presente. También se puede utilizar para evaluar la localización o la cantidad relativa del biomarcador en células individuales, esto último se ve como una función de la intensidad de tinción.

- 5 ELISA significa ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas, ya que utiliza una enzima enlazada a un anticuerpo o antígeno para la detección de una proteína específica. El ELISA se realiza típicamente como sigue (aunque existen otras variaciones en la metodología): un sustrato sólido tal como una placa de 96 pocillos se recubre con un anticuerpo primario, que reconoce el biomarcador. El biomarcador unido es reconocido a continuación por un anticuerpo secundario específico para el biomarcador. Esto puede estar unido directamente a una enzima o se puede utilizar un tercer anticuerpo anti-inmunoglobulina que se une a una enzima. Se añade un sustrato y la enzima cataliza una reacción, produciendo un color específico. Mediante la medición de la densidad óptica de este color, se puede determinar la presencia y cantidad del biomarcador.

#### Usos de biomarcador

- 15 El biomarcador puede ser utilizado para predecir la resistencia inherente de la enfermedad en un sujeto al compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente.

- 20 El biomarcador puede ser utilizado para seleccionar sujetos que padecen o están predispuestos a padecer una enfermedad, preferiblemente cáncer, para el tratamiento con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente. Las concentraciones de un biomarcador de este tipo se pueden utilizar para identificar a los sujetos susceptibles a responder o a no responder al tratamiento con dichos agentes. La estratificación de los sujetos se puede hacer con el fin de evitar regímenes de tratamiento innecesarios. En particular, el biomarcador se puede utilizar para identificar a sujetos de los que una muestra o muestras no exhiben una mayor concentración de estatmina, con relación a una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándares, después de lo cual esos sujetos pueden entonces ser seleccionados para el tratamiento con el compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente.

- 30 El biomarcador también se puede utilizar para ayudar en la determinación de los regímenes de tratamiento, en relación con cantidades y programas de dosificación. Adicionalmente, el biomarcador puede ser utilizado para ayudar en la selección de una combinación de fármacos a ser administrados a un sujeto, incluyendo un compuesto o compuestos de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos, y otro agente o agentes quimioterapéuticos (citotóxicos). Además, el biomarcador puede ser utilizado para ayudar en la determinación de estrategias de terapia en un sujeto, incluyendo si un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo se han de administrar en combinación con una terapia dirigida, terapia endocrina, radioterapia, inmunoterapia o intervención quirúrgica, o una combinación de estos.

- 35 La estatmina también se puede utilizar en combinación con otros biomarcadores para predecir la respuesta a un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo y para determinar los regímenes de tratamiento. Además, se puede utilizar en combinación con pruebas de quimio-sensibilidad para predecir la resistencia y para determinar los regímenes de tratamiento. Pruebas de quimio-sensibilidad consisten en aplicar directamente un compuesto de fórmula general I de células tomadas del sujeto, por ejemplo, de un sujeto con tumores malignos hematológicos o tumores sólidos accesibles, por ejemplo, cánceres de mama, de cabeza y cuello o melanomas, para determinar la respuesta de las células al compuesto.

#### Método de tratamiento

- 45 En un método de tratamiento y en estatmina para uso en un método de tratamiento, la concentración de estatmina se establece primero en relación con una concentración estándar o conjunto de concentraciones estándares y luego se administra un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, si la concentración de estatmina en dicha muestra no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares. El compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse en una composición farmacéutica, como es bien conocido por una persona experta en la técnica. Composiciones y dosificaciones adecuadas se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/103994 A1, páginas 35-39. Las composiciones para administración enteral, tal como administración nasal, bucal, rectal o, especialmente, oral, y para la administración parenteral tal como administración intravenosa, intramuscular o

subcutánea a animales homeotermos, especialmente seres humanos, son especialmente preferidas. Más particularmente, se prefieren las composiciones para administración intravenosa.

Las composiciones comprenden el ingrediente activo y un soporte farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo de una composición incluye, pero no se limita a lo siguientes: 5000 cápsulas de gelatina blanda, comprendiendo cada una como ingrediente activo 0.05 g de uno de los compuestos de fórmula general (I), se preparan como sigue: 250 g de ingrediente activo pulverizado se suspenden en 2 litros de Lauroglykol® (laurato de propilenglicol, Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia) y se muelen en un pulverizador húmedo para producir un tamaño de partícula de aproximadamente 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Porciones de 0,419 g de la mezcla se introducen luego en cápsulas de gelatina blanda utilizando una máquina de llenado de cápsulas.

En esta memoria también se describe un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, disminuyendo primero la concentración de estatmina en un sujeto que tiene una muestra con una mayor concentración de estatmina en comparación con una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándares, a continuación, tratando al sujeto con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable tal como se define anteriormente. La concentración de estatmina puede ser reducida por medios químicos o genéticos directos o indirectos. Ejemplos de tales métodos son el tratamiento con un fármaco que resulta en una expresión reducida de estatmina, la administración dirigida de construcciones virales, de plásmidos o de péptidos, o anticuerpo o ARNip o antisentido para regular a la baja la concentración de estatmina. Por ejemplo, ARNip se puede utilizar para reducir la concentración de estatmina expresada en una célula. El sujeto puede entonces ser tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo pueden administrarse solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Una terapia de combinación posible puede adoptar la forma de combinaciones fijas, o la administración de un compuesto de la invención y uno o más de otros agentes terapéuticos que se administran escalonada o independientemente uno de otro, o la administración combinada de combinaciones fijas y uno o más de otros agentes terapéuticos.

Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo puede, aparte de o además de, ser administrado especialmente para la terapia de tumores en combinación con quimioterapia (terapia citotóxica), terapia dirigida, terapia endocrina, radioterapia, inmunoterapia, intervención quirúrgica, o una combinación de estos. La terapia a largo plazo es igualmente posible como lo es la terapia adyuvante en el contexto de otras estrategias de tratamiento, tal como se describió anteriormente. Otros tratamientos posibles son terapia para mantener el estado del paciente después de la regresión del tumor, o incluso terapia quimio-preventiva, por ejemplo, en pacientes en riesgo.

#### Kit

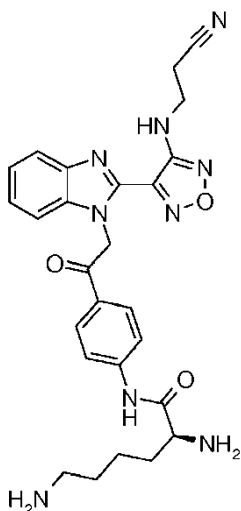
En un aspecto, la invención se refiere a un kit para predecir la respuesta, preferiblemente de una enfermedad en un sujeto, a un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para medir la concentración de estatmina en una muestra. Preferiblemente, los reactivos comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para estatmina y un reactivo detector.

El kit también comprende un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores estándares con los que se compara la concentración de estatmina en la muestra. En una realización preferida, el módulo de comparador está incluido en las instrucciones de uso del kit. En otra realización preferida, el módulo de comparador está en forma de un dispositivo de visualización, por ejemplo una tira de color o de material numéricamente codificado que está diseñado para ser colocado junto a la lectura de la medición de la muestra para indicar los niveles de resistencia. El valor estándar o un conjunto de valores estándares se puede determinar tal como se describe anteriormente.

Los reactivos son preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a estatmina. Estos pueden estar, por ejemplo, en forma de un anticuerpo primario específico que se une a estatmina y un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario, y que es en sí mismo marcado para la detección. El anticuerpo primario también puede marcarse para la detección directa. Los kits o dispositivos pueden contener también, opcionalmente, una disolución o disoluciones de lavado que permiten selectivamente la retención del biomarcador unido al reactivo de captura en comparación con otros biomarcadores después del lavado. Tales kits se

pueden utilizar en ELISA, transferencia western, citometría de flujo, inmunohistoquímica u otros métodos inmunoquímicos para detectar la concentración del biomarcador.

- En otra realización preferida, los reactivos también pueden ser los que son capaces de medir la concentración de ácidos nucleicos de estatmina en una muestra. Muestras adecuadas son muestras de tejidos o tumores, secciones de muestras de tejidos o tumores fijadas o embebidas en parafina o congeladas, células tumorales circulantes y muestras derivadas de sangre y fluidos corporales. Preferiblemente, los reactivos comprenden una sonda marcada o cebadores para la hibridación a ácido nucleico de estatmina en la muestra. Sistemas de detección adecuados, ya sea basados en técnicas de amplificación por PCR o detección de sondas marcadas, permiten la cuantificación de ácido nucleico de estatmina en la muestra. Esto se puede hacer i) in-situ en la propia muestra, preferiblemente en secciones de muestras embebidas en parafina o congeladas, ii) en extractos de muestras derivadas de tumores, tejidos o sangre, en que reactivos adecuados se enriquecen selectivamente en ácidos nucleicos. Los kits permiten la medición y cuantificación de i) la cantidad de sondas marcadas hibridadas a las muestra in-situ o ii) la cantidad de productos de amplificación basados en cebadores por métodos basados en propiedades físico-químicas específicas de las propias sondas o los informadores fijados a los cebadores.
- El kit de acuerdo con la invención se puede utilizar en el método de tratamiento tal como se define anteriormente. Comprende un compuesto de la siguiente fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable



En una realización particularmente preferida del kit la sal farmacéuticamente aceptable es una sal dihidrocloruro. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit de este tipo tal como se describió anteriormente.

- En la presente memoria descriptiva las palabras "comprenden" o "comprende" o "que comprende" han de entenderse como que implican la inclusión de un elemento indicado o grupo de elementos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o grupo de elementos.

### **Metodología experimental**

#### Tinción inmunofluorescente de células cultivadas

- Células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas A549 (NSCLC, número de referencia ATCC CCL-185), células de cáncer cervical HeLa (número de referencia ATCC CCL-2) y células de carcinoma de mama SKBR3 (ATCC número de referencia HTB-30) se sembraron a densidades de 50% en cubreobjetos de microscopio redondos y se cultivaron durante 24 horas en RPMI-1640 que contiene FCS al 10% (al que también se alude como FBS) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO. El medio de cultivo celular se reemplazó por medio que contiene el o los compuestos diluidos (paclitaxel, vinblastina, colchicina y nocodazol se adquirieron de Sigma-Aldrich) o vehículo. Después del tratamiento durante los tiempos indicados en la Breve Descripción de las Figuras, los cubreobjetos se lavaron y las células se fijaron en metanol/acetona (1:1) durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron en tampón de bloqueo (BSA al 0,5% y TX -100 al 0,1% en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas luego con anti-tubulina alfa (Sigma, 1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Después de varias etapas de

5 lavado, las células se incubaron con IgG anti-ratón de cabra AlexaFluor-488 (Molecular Probes, 1:3000) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de varias etapas de lavado con tampón de bloqueo. Las muestras fueron montadas después con el agente anti-decoloración ProLong Gold (Molecular Probes), sellado con esmalte de uñas y examinado con un microscopio Leica de inmunofluorescencia. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD enfriada y procesadas por el software ImageJ.

#### Ensayo del Brote de Colonias:

10 Se prepararon suspensiones de células individuales de xenoinjertos tumorales derivados de pacientes (mantenidos en ratones inmunodeficientes). Para los ensayos del brote de colonias, las células se extendieron en agar blando en placas de 24 pocillos de acuerdo con el ensayo introducido por Hamburger y Salmon (bioensayo primario de células madre tumorales humana, Science, 1977, 197: 461-463).  $2 \times 10^4$  -  $6 \times 10^4$  células en 0,2 mL de medio que contiene 0,4% de agar se extendieron sobre una capa inferior de 0,75% de agar. Los compuestos de ensayo se aplicaron en 0,2 mL de medio de cultivo. Cada una de las placas de 24 pocillos contenía controles sin tratar y muestras por triplicado. Los cultivos se incubaron a 37°C y 7,5% de CO<sub>2</sub> durante 5 - 28 días. 24 horas antes del análisis, las colonias vitales se tiñeron con una disolución de sal de tetrazolio metabolizable (Alley MC et al, Life Sci. 1982, 31:3071-3078) y se contaron con un sistema de análisis de imágenes automático (Omnicon 3600, Biosys GmbH).

15 Los efectos de los fármacos relativos se expresaron por la relación del número medio de colonias en los pocillos tratados y los pocillos control. Los valores CI<sub>70</sub> fueron determinados mediante la representación de las concentraciones de compuestos frente a los recuentos de colonias relativos.

#### Extracción de Proteínas

20 Extracción del tumor: Los tumores se extrajeron en tampón de lisis enfriado en hielo que contenía HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, β-glicerofosfato 25 mM, NaF 25 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 0,1%, pirofosfato 15 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, molibdato de sodio 10 mM, leupeptina (10 µg/mL), aprotinina (10 µg/mL) y PMSF 1 mM (1 mL de volumen de extracción por 45 mg de tumor). Después de la homogeneización por Polytron, los lisados se ajustaron a NP40 al 1% y se incubaron en hielo durante 20 min. Los lisados se clarificaron por centrifugación y se congelaron a -80°C.

25 Extracción de la línea celular tumoral: Se lavaron las células con PBS enfriado en hielo que contenía PMSF 1 mM y con tampón de lisis enfriado en hielo (véase más arriba) sin NP40. Las células se extrajeron en el mismo tampón de lisis que contenía NP40 al 1%. Después de la homogeneización, los lisados se clarificaron por centrifugación y se congelaron a -80°C.

#### 30 Inmunotransferencia/Transferencia Western

La inmunotransferencia se realizó utilizando 20 g de proteína total por pista. La concentración de proteína se determinó con el ensayo de proteínas BCA (Pierce). La proteína se separó en un gel de SDS al 12,5% y se transfirió a una membrana de PVDF utilizando la transferencia semi-seca (90 min, 50 mA/gel). Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunotransferencia eran como sigue:

35 Ac. estatmina N° 1: (disponible de Epitomics, número de referencia 1972-1) origen: conejo, monoclonal, dilución 1:10.000, condiciones del tampón: BSA al 3% en PBS/Tween al 0,1%

Ac. estatmina N° 2: (disponible de Abcam, número de referencia ab47468) origen: conejo, monoclonal, dilución 1:1000, condiciones del tampón: BSA al 3% en PBS/Tween al 0,1%

40 Actina: (disponible de Chemicon, número de referencia MAB1501) origen: ratón, monoclonal, dilución 1:5000, condiciones del tampón: leche al 5% o BSA al 3% en PBS/Tween al 0,1%

45 Los anticuerpos secundarios utilizados para la inmunotransferencia eran anti-conejo de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa (disponibles de Jackson ImmunoResearch Laboratories INC: número de referencia 111-035-144 JIR y 115-035-146 JIR), dilución 1:5000, condiciones del tampón: 0,5% de leche en PBS/Tween al 0,1%. Las bandas marcadas fueron reveladas utilizando un sistema de formación de imágenes de alto rendimiento Raytest Stella 3200.

#### Inmunohistoquímica

La fijación de xenoinjertos de tumores derivados del paciente (mantenido en ratones inmunodeficientes) se realizó en formalina neutra tamponada al 10% que contenía formaldehído al 4% durante 20 - 28 horas a temperatura ambiente. Muestras fijadas se mantuvieron en una disolución de etanol al 70% durante un máximo de una semana antes de la deshidratación e inclusión en parafina de acuerdo con un procedimiento estándar, utilizando las condiciones enumeradas a continuación:

5

Tratamiento Secuencial	tiempo (horas)
EtOH al 70%	1
EtOH al 80%	2
EtOH al 99%	1
Isopropanol al 100%	0,5
Isopropanol al 100%	1
Xilol	0,5
Xilol	1
Xilol	1
Parafina	1
Parafina	2
Parafina	2

10

Secciones de parafina de aproximadamente 2 µm se cortaron y se procesaron utilizando el aparato de inmunotinción automatizado Benchmark XT® (Roche) ejecutando las etapas de procesamiento estándares. La visualización de la tinción de anticuerpos específicos se realizó con DAB (3,3-diaminobencidina) como sustrato cromogénico a una concentración de 5 mg/ml. Para la tinción se utilizaron las siguientes condiciones de anticuerpos primarios y de procesamiento:

15

Anticuerpo	Procesamiento
Anti-Estatmina (todas las isoformas), Cell Signaling Technology, Inc., n° 3352, policlonal de conejo	Acondicionamiento celular 1 tampón de Roche durante 30 minutos, incubación de anticuerpos a 37°C durante 32 minutos, a una dilución de 1:50000

20 Análisis ELISA de suero

Se preparó suero de ratón mediante la toma de sangre de ratones narcotizados con isoflurano en un tubo Microtainer SST (BD Transduction Laboratories, número de referencia 365968) y luego se procesó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esto incluyó un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugación a 6000-15000g durante 1,5 minutos. Se preparó suero humano mediante la toma de sangre de voluntarios humanos sanos en un tubo S-Monovette (Sarstedt, referencia 02.1063), seguido de centrifugación a 1250g durante 20 minutos. Los sobrenadantes del suero se almacenaron a -80°C. Pocillos de la placa ELISA (Nunc, Maxisorp) se revistieron con anticuerpos monoclonales de conejo de estatmina (Epitomics, número de referencia 1972-1, 1:1000) en tampón carbonato pH 9,6 durante la noche a 4°C. Después de bloquear los pocillos de la placa ELISA con PBS/BSA al 1%, se añadieron muestras de suero pre-diluidas en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. La estatmina se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón de estatmina (disponible de Santa Cruz, número de referencia 55531, dilución 1:100) seguido de un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con HRP (Jackson Immuno Research, 1:5000). El desarrollo del color utilizando "sustrato de peroxidasa SureBlue TMB Microwell" (TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; KPL) se detuvo después de 5-10 minutos con disolución de parada de TMB (KPL). Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices).

25

30

35 La concentración de proteína estatmina se calculó después de la sustracción de los controles negativos de suero adecuados, a partir de una curva patrón derivada de estatmina humana recombinante (Calbiochem, número de referencia 569390), utilizando el software GraphPad Prism.

Para los experimentos, suero humano fue 'mezclado' con estatmina, se utilizó estatmina recombinante humana (Calbiochem, número de referencia 569390). Para el ensayo de suero derivado de ratones portadores de tumores,

los tumores se hicieron crecer subcutáneamente en ratones inmunodeficientes hasta un tamaño de 400 - 800 mm<sup>3</sup>. Los ratones se sacrificaron y el suero se preparó tal como se define anteriormente.

#### PCR en Tiempo real Cuantitativa

5 Células de cáncer de cuello uterino, HeLa, A549 NSCLC y H460 NSCLC (número de referencia ATCC HTB-177) fueron cultivadas en placas de 10 cm hasta que alcanzaron una confluencia del 80%, seguido de tripsinización, granulación y resuspensión en 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen). El ARN total se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit de 1 etapa TaqMan RNA-a-Ct (Applied Biosystems, número de referencia 4392938) y ensayos de expresión de genes (Applied Biosystems) con 100 ng de ARN por reacción utilizando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000. Se utilizaron los siguientes ensayos de expresión de genes: Ensayo ID HS01027515\_gH para la cuantificación de estatmina o ensayo ID HS99999901\_s1 para la cuantificación de ARN 18S. Todas las muestras se analizaron por triplicado. El análisis de los datos se realizó utilizando el software SDS (Applied Biosystems). Los niveles de expresión de estatmina se normalizaron a ARN 18S.

#### Ejemplos detallados

15 Ejemplo 1: Un Fenotipo Mitótico Distinto Inducido por compuestos de fórmula general I

El tratamiento con el compuesto A (BAL27862) o con el compuesto B o el compuesto C inducía un fenotipo de microtúbulos altamente reproducible y distinto en todas las líneas celulares tumorales ensayadas (mostradas para el compuesto A en A549, células HeLa y SKBR3 en la Figura 1 y para el compuesto B y el compuesto C en células A549 en la Figura 2). En células en división, se produjo una fragmentación aparente del huso mitótico, lo que resulta en la formación de estructuras a modo de puntos (Figura 1). Se demostró que este fenotipo era distinta del observado con agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos tales como el estabilizador de microtúbulos paclitaxel y los desestabilizadores de microtúbulos vinblastina y colchicina (Figura 3) y nocodazol (Figura 4).

25 Ejemplo 2: BAL27862 Supera el Fenotipo de Microtúbulos Inducido por Fármacos Convencionales que fijan como objetivo Microtúbulos de una Manera Dominante

Con el fin de mostrar la singularidad de su actividad sobre los microtúbulos, BAL27862 fue sometido a ensayo en combinación con vinblastina, colchicina y paclitaxel (Figura 5) y nocodazol (Figura 6) utilizando células A549. El tratamiento con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol por sí solo inducía los fenotipos de los microtúbulos mitóticos característicos de estos agentes. Sin embargo, el tratamiento de combinación con BAL27862 durante las últimas 4 horas dio lugar a la interrupción de las estructuras de microtúbulos; creando un fenotipo compatible con el tratamiento de BAL27862 solo, a pesar de la presencia continua de vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol. En contraposición, el tratamiento primero con BAL27862 y posteriormente durante 4 horas en combinación con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol no tuvo impacto en el fenotipo de microtúbulos observado que era consistente con el tratamiento con BAL27862.

35 Estos datos demuestran que los compuestos de fórmula I afectan a la biología de los microtúbulos consistentemente, pero de una manera diferente que los agentes convencionales de fijación como objetivo de microtúbulos.

#### Ejemplos detallados de acuerdo con la invención

40 Ejemplo 3: Asociación de altos niveles de expresión de estatmina con células tumorales derivadas de pacientes resistentes al tratamiento con BAL27862.

Sobre la base de ensayos del brote de colonias, utilizando células tumorales derivadas de tumores derivados de pacientes mantenidos como xenoinjertos en ratones, células tumorales sensibles a BAL27862 o relativamente resistentes se identificaron a partir melanoma y cáncer gástrico y de pulmón (véase la Tabla 1). Las concentraciones a las que se observó un 70% de inhibición del crecimiento *frente a* los controles (CI<sub>70</sub>) se muestran en la Tabla 1. En esta tabla, las células tumorales sensibles a BAL27862 eran las que tenían valores CI<sub>70</sub> en el intervalo nanomolar bajo, mientras que las células tumorales resistentes a BAL27862 se definen por valores CI<sub>70</sub> > 600 nanomolares. Datos de paclitaxel y vinblastina, utilizando el mismo ensayo *ex vivo*, estaban disponible para 6 de los 7 modelos

tumorales. De estos 6 modelos, todos eran resistentes al tratamiento con paclitaxel, mientras que 5 eran sensibles al tratamiento con vinblastina.

Tabla 1

Tipo de cáncer	Nombre	Respuesta a BAL27862	CI <sub>70</sub> BAL27862 [microM]	Respuesta a paclitaxel	Respuesta a vinblastina
Gástrico	GXF 251	sensible	0,485	resistente	resistente
Gástrico	GXF 97	resistente	> 3,5	resistente	sensible
Pulmón	LXFE211	sensible	0,021	resistente	sensible
Pulmón	LXFE397	resistente	> 3,5	desconocida	desconocida
Melanoma	MEXF1341	sensible	0,025	resistente	sensible
Melanoma	MEXF276	resistente modelo 1	> 3,5	resistente	sensible
Melanoma	MEXF989	resistente modelo 2	> 3,5	resistente	resistente

5 El análisis de inmunotransferencia se realizó después con el fin de medir las concentraciones de estatmina en los mismos tumores mantenidos como xenoinjertos, utilizando dos anticuerpos (mostrados en la Figura 7 con el anticuerpo obtenido de Abcam). Las concentraciones de actina se incluyeron en la inmunotransferencia como control de carga.

El análisis de las concentraciones de estatmina indica que la expresión de la proteína estatmina varió drásticamente a lo largo de todos los tumores medidos (Figura 7).

10 Basado en el ensayo del brote de colonias y los mismos criterios de CI<sub>70</sub>, no hubo asociación entre resistencia a paclitaxel o vinblastina y altos niveles de expresión de estatmina. Esta falta de correlación se puede ver, por ejemplo, con el modelo gástrico. Aunque GXF 251 y GXF 97 eran ambos resistentes a paclitaxel, para GXF 251 las concentraciones de estatmina eran virtualmente indetectables, mientras que para GXF 97 los niveles eran comparativamente más altos. La misma falta de asociación era cierta para el alcaloide de la vinca, vinblastina, en el  
15 modelos gástricos, ya que estos dos tumores fueron sensibles a la vinblastina. Por lo tanto, las concentraciones de estatmina demostraron ser inadecuadas como un biomarcador fiable de la resistencia a los agentes de microtúbulos convencionales paclitaxel y vinblastina en modelos de tumores derivados del paciente.

20 Sorprendentemente, por el contrario, cuando los datos de resistencia a BAL27862, según se define por el ensayo del brote de colonias, se comparan con la concentración de estatmina, la expresión de estatmina demostró ser más alta sólo en los tumores resistentes y no en los tumores sensibles derivados del mismo histotipo de tumor. Niveles de expresión incrementados eran por lo tanto consistentemente indicativos de resistencia a BAL27862. Por lo tanto, las concentraciones de estatmina demuestran ser un biomarcador de la resistencia para el compuesto de acuerdo con la invención, BAL27862.

Ejemplo 4: Análisis inmunohistoquímico de xenoinjertos de tumores gástricos

25 El análisis inmunohistoquímico se realizó en los xenoinjertos de tumores gástricos (Figura 8), revelando una alta expresión de estatmina en el modelo de tumor GXF 97. Una vez más se observó una clara correlación entre los altos niveles de expresión de estatmina y la resistencia a BAL27862 (el modelo de tumor GXF 97 era resistente a BAL27862, mientras que el modelo de tumor GXF 251 era sensible a BAL27862; tal como se define mediante el ensayo del brote de colonias). Por lo tanto, los niveles de expresión de estatmina demuestran de nuevo ser un  
30 biomarcador de la resistencia para el compuesto de acuerdo con la invención, BAL27862.

Ejemplo 5: Detección de estatmina en suero

Suero preparado a partir de sangre de voluntarios humanos sanos se mezcló con cantidades conocidas de estatmina recombinante, seguido de análisis de ELISA en una dilución de 1:25 y 1:100. Sobre la base de una curva



estándar producida al mismo tiempo (Figura 9), las concentraciones de estatmina se calcularon tal como se presenta en la Figura 10. Los datos demuestran que, aunque existe una subestimación general de la concentración de estatmina mezclada, se requiere una dilución 1:25 para resolver concentraciones inferiores de estatmina <300 ng/ml, mientras que se requiere una dilución de 1:100 para resolver altas concentraciones > 300 ng/ml. Sorprendentemente, cuando el suero se preparó a partir de ratones que llevan los tumores listados en la Tabla 1 (se utilizaron 2 ratones por cada tipo de tumor), y se analizaron a una dilución de 1:25, sólo los ratones portadores de tumores derivados de células resistentes tenían evidencia de concentraciones de estatmina en suero elevadas (Tabla 2).

Tabla 2

Tipo de cáncer	Nombre	Sensibilidad o resistencia a BAL27862	ratón	Conc. de estatmina en suero
Gástrico	GXF 251	sensible	1	0
			2	0
Gástrico	GXF 97	resistente	1	8
			2	0
Pulmón	LXFE 211	sensible	1	0
			2	0
Pulmón	LXFE 397	resistente	1	3
			2	0
Melanoma	MEXF 1341	sensible	1	0
			2	0
Melanoma	MEXF 276	modelo resistente 1	1	33
			2	0
Melanoma	MEXF 989	modelo resistente 2	1	0
			2	0

10 Ejemplo 6: Niveles de expresión de ARN de estatmina frente a niveles de expresión de proteínas

Con el fin de demostrar que los niveles de expresión de ARN de estatmina reflejan los niveles de expresión de proteínas y, por lo tanto, que los niveles de expresión de ARN se pueden utilizar en la predicción de resistencia a BAL27862, los niveles de expresión de estatmina se midieron en los niveles tanto de ARN como de proteínas de la siguiente manera. Extractos de proteínas de células enteras se prepararon a partir de las líneas celulares HeLa, H460 y A549 y se analizaron por inmunotransferencia para la expresión de proteínas estatmina (Figura 11B). Muestras de ARN se prepararon a partir del mismo pasaje de células, y se realizó una RT-PCR cuantitativa.(Figura 11A). La comparación de los datos de inmunotransferencia (Figura 11B) y los datos de RT-PCR (Figura 11A), indicó que había una buena correlación entre los niveles de proteína y de expresión de ARN para la estatmina en estas líneas.

20 Lista de abreviaturas

A549	línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana
Anexina V	proteína de unión a fosfatidilserina
BCA	ácido bicinconínico
Bcl-2	linfoma de células B de proteína 2
25 BRCA1	proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1
BrdU	bromodesoxiuridina
BSA	albúmina de suero bovino
CA-125	antígeno de cáncer 125
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
30 CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CREST	síndrome de esclerodermia limitada
DAB	3,3-diaminobencidina
DMSO	dimetilsulfóxido
ADN	ácido desoxirribonucleico
35 dUTP	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético

## ES 2 619 805 T3

	ELISA	ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas
	ErbB-2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
	EtOH	Etanol
	FACS	exploración/clasificación de células activadas por fluorescencia
5	FCS/FBS	suero de ternera fetal / bovino fetal
	G2/M	transición de G2 a la fase mitótica del ciclo celular
	GXF251	tumor gástrico derivado de paciente
	GXF97	tumor gástrico derivado de paciente
	HeLa	línea celular de cáncer de células escamosas humana
10	HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico
	Hoe33342	trihidrocloreto de 2'-(4'-etoxifenil)-5-(4-metil-piperazin-1-il)-2,5'-bis-1H- bencimidazol trihidrato
	HRPH460	línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano
	IgG	inmunoglobulina G
	ih	inmunohistoquímica
15	LXFE 211	tumor pulmonar derivado de pacientes
	LXFE 397	tumor pulmonar derivado de pacientes
	MALDI	espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por
	matriz	
	MALDI-TOF	espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por
20	matriz-tiempo-de-vuelo	
	MEXF 1341	melanoma derivado de paciente
	MEXF 276	melanoma derivado de paciente
	MEXF 969	melanoma derivado de paciente
	ARNm	ácido ribonucleico mensajero
25	MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
	NaCl	cloruro sódico
	NaF	fluoruro de sodio
	NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
	NSCLC	cáncer de pulmón de células no pequeñas
30	NP40	Nonidet P40
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	P-gp	glicoproteína P
	PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
35	PSA	antígeno específico de la próstata
	PVDF	poli(fluoruro de vinilideno)
	RANO	evaluación de la respuesta para gliomas de alto grado
	READS	amplificación por enzimas de restricción de ADNcs digeridos
	RECIST	criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos
40	ARN	ácido ribonucleico
	RPMI-1640	medio de cultivo celular utilizado para el cultivo de células eucarióticas y líneas celulares transformada y no transformadas
	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
	SAGE	análisis en serie de la expresión génica
45	SELDI	desorción/ionización por láser potenciada en superficie
	SELDI-TOF	espectrometría de masas por desorción/ionización por láser potenciada en superficie- tiempo de vuelo
	SDS	dodecilsulfato de sodio
	SEQ. ID NO.	número de identificación de la secuencia
50	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
	SKBR3	línea celular de carcinoma mamario humano
	TMP	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
	TUNEL	ensayo de marcaje de extremo de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal
55	Tween-20	detergente, monolaurato de sorbitán polioxietileno
	TX-100	Triton-X100
	YO-PRO	colorante de ácidos nucleicos de cianina monomérica, fluorescente

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Basilea Pharmaceutica AG

<120> Uso de estatmina como un biomarcador de la respuesta de fármacos

5 <130> P40414EP00

<160> 6

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 149

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Ser Asp Ile Gln Val Lys Glu Leu Glu Lys Arg Ala Ser  
1 5 10 15

Gly Gln Ala Phe Glu Leu Ile Leu Ser Pro Arg Ser Lys Glu Ser Val  
20 25 30

Pro Glu Phe Pro Leu Ser Pro Pro Lys Lys Lys Asp Leu Ser Leu Glu  
35 40 45

Glu Ile Gln Lys Lys Leu Glu Ala Ala Glu Glu Arg Arg Lys Ser His  
50 55 60

Glu Ala Glu Val Leu Lys Gln Leu Ala Glu Lys Arg Glu His Glu Lys  
65 70 75 80

Glu Val Leu Gln Lys Ala Ile Glu Glu Asn Asn Asn Phe Ser Lys Met  
85 90 95

Ala Glu Glu Lys Leu Thr His Lys Met Glu Ala Asn Lys Glu Asn Arg  
100 105 110

Glu Ala Gln Met Ala Ala Lys Leu Glu Arg Leu Arg Glu Lys Asp Lys  
115 120 125

His Ile Glu Glu Val Arg Lys Asn Lys Glu Ser Lys Asp Pro Ala Asp  
130 135 140

Glu Thr Glu Ala Asp  
145

15

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 619 805 T3

Met Ala Ser Ser Asp Ile Gln Val Lys Glu Leu Glu Lys Arg Ala Ser  
 1 5 10 15

Gly Gln Ala Phe Glu Leu Ile Leu Ser Pro Arg Ser Lys Glu Ser Val  
 20 25 30

Pro Glu Phe Pro Leu Ser Pro Pro Lys Lys Lys Asp Leu Ser Leu Glu  
 35 40 45

Glu Ile Gln Lys Lys Leu Glu Ala Ala Glu Glu Arg Arg Lys Ser His  
 50 55 60

Glu Ala Glu Val Leu Lys Gln Leu Ala Glu Lys Arg Glu His Glu Lys  
 65 70 75 80

Glu Val Leu Gln Lys Ala Ile Glu Glu Asn Asn Asn Phe Ser Lys Met  
 85 90 95

Ala Glu Glu Lys Leu Thr His Lys Met Glu Ala Asn Lys Glu Asn Arg  
 100 105 110

Glu Ala Gln Met Ala Ala Lys Leu Glu Arg Leu Arg Glu Lys Met Tyr  
 115 120 125

Phe Trp Thr His Gly Pro Gly Ala His Pro Ala Gln Ile Ser Ala Glu  
 130 135 140

Gln Ser Cys Leu His Ser Val Pro Ala Leu Cys Pro Ala Leu Gly Leu  
 145 150 155 160

Gln Ser Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Leu Ser His His His  
 165 170

<210> 3  
 <211> 1542  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

gctctcggcc aatgcggagc cccgcgcgga ggtcacgtgc ctctgtttgg cgcttttgtg 60  
 cgcgcccggg tctgtttgtg ctcagagtgt ggtcaggcgg ctcggactga gcaggacttt 120  
 ccttatccca gttgattgtg cagaatacac tgcctgtcgc ttgtcttcta ttcacatgg 180  
 cttcttctga tatccagtg aaagaactgg agaagcgtgc ctcaggccag gcttttgagc 240  
 10 tgattctcag ccctcgggtca aaagaatctg ttccagaatt cccctttcc cctccaaaga 300

ES 2 619 805 T3

agaaggatct ttcctggag gaaattcaga agaaattaga agctgcagaa gaaagacgca 360  
 agtcccatga agctgaggtc ttgaagcagc tggctgagaa acgagagcac gagaaagaag 420  
 tgcttcagaa ggcaatagaa gagaacaaca acttcagtaa aatggcagaa gagaaactga 480  
 cccacaaaat ggaagctaataa aagagaacc gagaggcaca aatggctgcc aaactggaac 540  
 gtttgcgaga gaaggataag cacattgaag aagtgcggaa gaacaaagaa tccaaagacc 600  
 ctgctgacga gactgaagct gactaatttg ttctgagaac tgactttctc cccatcccct 660  
 tcctaaatat ccaaagactg tactggccag tgtcatttta tttttccct cctgacaaat 720  
 atttagaag ctaatgtagg actgtatagg tagatccaga tccagactgt aagatgttgt 780  
 tttaggggct aaaggggaga aactgaaagt gttttactct ttttctaaag tgttggtctt 840  
 tctaagttag ctattttctt tgttgcattc tttctacttc agtacacttg gtgtactggg 900  
 ttaatggcta gtactgtatt ggctctgtga aaacatattt gtgaaaagag tatgtagtgg 960  
 cttcttttga actgttagat gctgaatata tgttactttt tcaatcccaa ttctgtccca 1020  
 atcttaccag atgctactgg acttgaatgg ttaataaaac tgcacagtgc tgttggtggc 1080  
 agtgacttct tttgagttag gtttaataat caagccatag agcccctcct gggtgatact 1140  
 tgttccagat ggggcctttg gggctggtag aaatacccaa cgcacaaatg accgcacggt 1200  
 ctctgccccg tttcttgccc cagtgtggtt tgcattgtct ccttccaca tgactgcttt 1260  
 gtttgatgc ctgagcccag gtcagctggt actttcttct agatgtttat ttgcaaaaa 1320  
 ccattttttg ttctgtgtcc cttttaaag gcagattaaa agcacaagcg tgtttctaga 1380  
 gaacagttga gagagaatct caagattcta cttggtggtt tgcttgctct acgttacagg 1440  
 tggggcatgt cctcatcctt tctgcccata aaagctatga cacgagaatc agaatattaa 1500  
 taaaacttta tgtactgctg tagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1542

<210> 4  
 <211> 1518  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

aggggcactg ctctgtccga gtgctgccct tggggcgagg cgggcatgtg gctctacaag 60  
 gtggagtcca ggcggccaaa gtttgaaaag gactttcctt atcccagttg attgtgcaga 120  
 atacaactgcc tgtcgcttgt cttctattca ccatggcttc ttctgatata caggtgaaaag 180  
 aactggagaa gcgtgcctca ggccaggctt ttgagctgat tctcagccct cggtaaaaag 240  
 aatctgttcc agaattcccc ctttcccctc caaagaagaa ggatctttcc ctggaggaaa 300  
 ttcagaagaa attagaagct gcagaagaaa gacgcaagtc ccatgaagct gaggtcttga 360  
 agcagctggc tgagaaacga gagcacgaga aagaagtgct tcagaaggca atagaagaga 420

ES 2 619 805 T3

acaacaactt cagtaaaatg gcagaagaga aactgaccca caaaatggaa gctaataaag 480  
 agaaccgaga ggacaaaatg gctgccaac tggaacgttt gcgagagaag gataagcaca 540  
 ttgaagaagt gcggaagaac aaagaatcca aagaccctgc tgacgagact gaagctgact 600  
 aatttgttct gagaactgac tttctccca tcccctcct aaatatcaa agactgtact 660  
 ggccagtgc atttatattt tccctcctg acaaatattt tagaagctaa ttaggactg 720  
 tataggtaga tccagatcca gactgtaaga tgtgtttta ggggctaaag gggagaaact 780  
 gaaagtgttt tactctttt ctaaagtgtt ggtctttcta atgtagctat tttcttgtt 840  
 gcatctttc tacttcagta cacttggtgt actgggttaa tggctagtagt tgtattggt 900  
 ctgtgaaaac atatttgtga aaagagtatg tagtggcttc ttttgaactg ttagatgctg 960  
 aatatctgtt cacttttcaa tcccaattct gtccaatct taccagatgc tactggactt 1020  
 gaatggtaa taaaactgca cagtgtgtt ggtggcagt acttctttt agttaggtaa 1080  
 ataaatcaag ccatagagcc cctcctggt gatacttgtt ccagatggg cctttggggc 1140  
 tggtagaat acccaacgca caaatgaccg cacgttctct gcccgttctc ttgcccag 1200  
 gtggtttgca ttgtctcctt ccacaatgac tgctttgtt ggatgcctca gccaggtca 1260  
 gctgttactt tctttcagat gtttatttgc aaacaacat ttttgttct gtgtccctt 1320  
 taaaaggcag attaaaagca caagcgtgtt tctagagaac agttgagaga gaatctcaag 1380  
 attctacttg gtggtttgct tgctctacgt tacaggtggg gcatgtcctc atcctttcct 1440  
 gccataaaag ctatgacacg agaatcagaa tattaataaa actttatgta ctgctgtagc 1500  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1518

5 <210> 5  
 <211> 1730  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5  
 atcaccgggc gtccgctccg ggggtccctc gaggagacaa tagggggcgt gggccctcgt 60  
 ttacctccct ccctccctcc ctccctcgcg ggccccgcg ggttcccat tgtctgaagg 120  
 gacggggcgg tgccccagg accagcggct ttaggaccaa actgogggca gccagggccg 180  
 cgacctccc tgcgaccgct ccctggcgac cgcagctggt gattgagggg cggcgtccc 240  
 gggccccacg agggttcttc tgtcttcgcg gccggacgog cggacagcgt ggggtggcggc 300  
 aggactttcc ttatccagat tgattgtgca gaatacactg cctgtcgtt gtcttctatt 360  
 caccatggct tcttctgata tccaggtgaa agaactggag aagcgtgcct caggccaggc 420  
 ttttgagctg attctcagcc ctcggtcaaa agaactgtt ccagaattcc ccctttcccc 480  
 tccaaagaag aagatctttt ccctggagga aattcagaag aattagaag ctgcagaaga 540

ES 2 619 805 T3

aagacgcaag tcccatgaag ctgaggtcct gaagcagctg gctgagaaac gagagcacga 600  
 gaaagaagtg cttcagaagc caatagaaga gaacaacaac ttcagtataa tggcagaaga 660  
 gaaactgacc cacaaaatgg aagctaataa agagaaccga gaggcacaaa tggctgccaa 720  
 actggaacgt ttgcgagaga aggataagca cattgaagaa gtgcggaaga acaaagaatc 780  
 caaagacctt gctgacgaga ctgaagctga ctaatttgtt ctgagaactg actttctccc 840  
 catccccttc ctaaatatcc aaagactgta ctggccagtg tcattttatt tttccctccc 900  
 tgacaaatat tttagaagct aatgtaggac tgtataggtg gatccagatc cagactgtaa 960  
 gatgttgttt taggggctaa aggggagaaa ctgaaagtgt tttactcttt ttctaagtg 1020  
 ttggtctttc taatgtagct atttttcttg ttgcatcttt tctacttcag tacacttggc 1080  
 gtactgggtt aatggctagt actgtattgg ctctgtgaaa acatatttgt gaaaagagta 1140  
 tgtagtggct tcttttgaac tgttagatgc tgaatatctg ttcacttttc aatcccaatt 1200  
 ctgtcccaat cttaccagat gctactggac ttgaatggtt aataaaaactg cacagtgctg 1260  
 ttggtggcag tgacttcttt tgagttaggt taataaatca agccatagag cccctcctgg 1320  
 ttgatacttg ttccagatgg ggcctttggg gctggtagaa ataccacaacg cacaaatgac 1380  
 cgcacgttct ctgcccgtt tcttgccca gtgtggtttg cattgtctcc ttccacaatg 1440  
 actgctttgt ttggatgcct cagcccaggt cagctgttac tttctttcag atgtttattt 1500  
 gcaacaacc attttttgtt ctgtgtccct tttaaaaggc agattaaaag cacaagcgtg 1560  
 tttctagaga acagttgaga gagaatctca agattctact tgggtggtttg cttgctctac 1620  
 gttacaggtg gggcatgtcc tcatcctttc ctgccataaa agctatgaca cgagaatcag 1680  
 aatattaata aaactttatg tactgctgta gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1730

<210> 6  
 <211> 2265  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

gctctcggcc aatgcggagc cccgcgcgga ggtcacgtgc ctctgtttgg cgcttttgtg 60  
 cgcgcccggg tctgttggtg ctcagagtgt ggtcaggcgg ctcggactga gcaggacttt 120  
 ccttatccca gttgattgtg cagaatacac tgccctgcgc ttgtcttcta ttcaccatgg 180  
 cttcttctga tatccaggtg aaagaactgg agaagcgtgc ctcaggccag gcttttgagc 240  
 tgattctcag ccctcgggtca aaagaatctg ttccagaatt ccccctttcc cctccaaaga 300  
 agaaggatct ttccctggag gaaattcaga agaaattaga agctgcagaa gaaagacgca 360  
 agtcccatga agctgaggtc ttgaagcagc tggctgagaa acgagagcac gagaaagaag 420  
 tgcttcagaa ggcaatagaa gagaacaaca acttcagtaa aatggcagaa gagaaactga 480

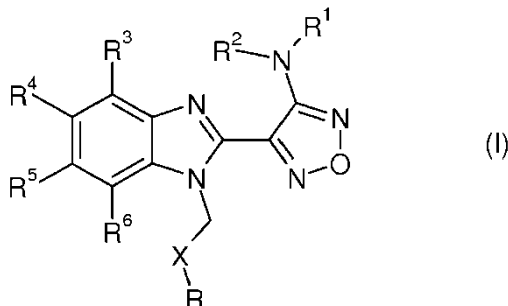
ES 2 619 805 T3

cccacaaaat ggaagctaataaagagaacc gagaggcaca aatggctgcc aaactggaac 540  
 gtttgcgaga gaagatgtacttctggactc acgggctg ggccccacca gcacagatct 600  
 ctgctgagca atcttgtctc cactctgttc ctgcccttg cccagccctg ggcctccaat 660  
 ctgcattgat tacctggtct gatctctctc accatcacta ggtacttaataaatatttgc 720  
 tgttgatgat agcaatgaccttgagactga tgaacagtct ggccaagagg atccttgatg 780  
 tggaagatag aaaaagcctt tggggtcagg cagacttga ttctaatacc agccagttct 840  
 gcttctgtg tctgagcctc agtttactca tctgtgaaga ggaggtagca agaatgaaaa 900  
 tgcctgcctt gtggtttgtt gtaaggacag aactgcca cgtagaggc ccagcagctc 960  
 acagaccagt tgctctgaga gcagaccact cttgccttga tggtagggaa ctatttttgt 1020  
 gcgtggcaag tgggacctta ggaaggaagg caactgtgag gcttctgaga aggaccctac 1080  
 acaaggaggt ttcctccag ggcaggtgaa tggagagggt ggcaagcc tacgggaagg 1140  
 ggtcacagg atcagctaga gagtgccacc acccttcctg ggaatgcag gcaaggtcc 1200  
 ctggtgggag ttttctggg aagccaaaga agcgcaca aaagacagaa tcaacatttg 1260  
 ggtacctttg gtaccagag gcagcaatgc caactacaac cacttgaa gaagaagacc 1320  
 ttctccgat agattctctg atctcttct cctcatgac accagccctg ggaaccagc 1380  
 atggtgggga aataatgaag ctggaataca accacttaca gacttcacaa cctcctcctg 1440  
 tagatacaa agggatttta ggatcacatt ttatttctca cctgagcaag aaaagctaca 1500  
 ggagcatctc aagcagagg caggagtctc cagaggagt caagggctc tggcaagaaa 1560  
 aatcaagggt ctgtgttcaa gaactggctc ccttggatg tgtattacga agccatgtg 1620  
 tgctggatgc tgatgaaatt gctgccaat gcctgtgcag ccttggcaag gccctttatt 1680  
 tctctgggtc tccatttctc tctctcttt ttttttttt ttttttttga ggcagagtct 1740  
 cactctgtcg cccaggtg agggcagtgg cgtgatctcg gctcactgca agccccacct 1800  
 tctgagttca cccatttcta ctgcctcagc ctcccagta gctgggacta caggogcca 1860  
 ccaccagcc cggcttattt tttgtattt tagtagagac ggggtttcac cgcattagcc 1920  
 aagatggtct cgtctcctg acctcgtgat tcaccacct cagcctcca aagtgtggg 1980  
 attacaggca tgagccactg ccccggcct ggtctccgt ttctctagct tgaaatgac 2040  
 tgttctaaaa gagccctgcc gactttggc agtctgtaag aagacctgag ttcttctctc 2100  
 agttccaagc aggaaaattg aacataacct gagccagag cctgcaacaa actctgggca 2160  
 gcctcaggaa gtcaggcagt gaagtcgaa aatgatctc ttctgtatag ggagaaaata 2220  
 aaagttaaaa aatttgtaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaaa aaaaa 2265



## REIVINDICACIONES

1. Uso de estatmina como un biomarcador para predecir la respuesta a un compuesto, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula general I,



5 en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxialquilo inferior, aciloxialquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxialcoxi inferior, fenilalcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxialcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxialcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxo; y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxialcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxialcoxi inferior;

15 R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxialcoxi inferior;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxo;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los derivados farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o una amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

o en donde

R representa fenilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxialquilo inferior, aciloxialquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxialcoxi inferior, fenilalcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxialcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxialcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxo;

y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxialcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa oxígeno;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxialcoxi inferior;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> juntos representan metilendioxo;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los derivados farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono,

y en donde la respuesta es de una enfermedad en un sujeto, y el biomarcador estatmina se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo animal, preferiblemente tomadas del cuerpo humano.

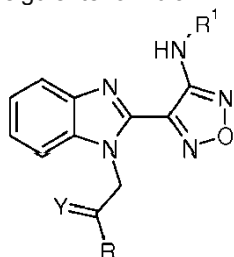
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en el compuesto de fórmula general I, R representa fenilo o piridinilo;  
 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo inferior, alcoxi inferior, amino, acetilamino, halógeno y nitro;  
 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con amino o halógeno;

- 10 X representa un grupo C=O;  
 R<sup>1</sup> representa hidrógeno o ciano-alquilo inferior;  
 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos según se define en la reivindicación 1,

- 15 y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula



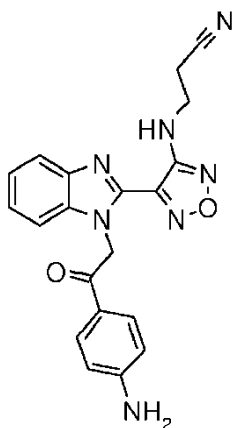
en donde R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

R	Y	R1
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

20

o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen en la reivindicación 1.

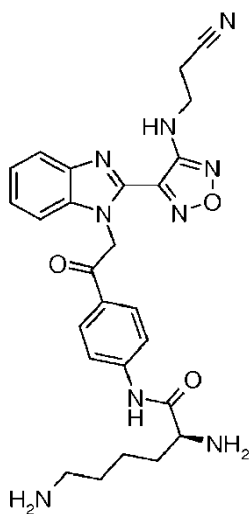
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es



o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen en la reivindicación 1.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el derivado farmacéuticamente aceptable es una amida formada a partir de un grupo amino presente dentro del grupo R del compuesto de fórmula general I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y el grupo carboxi de glicina, alanina o lisina.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto es



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente una sal hidrocloreuro del mismo, lo más preferiblemente una sal dihidrocloreuro del mismo.

7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para predecir la resistencia de una enfermedad en un sujeto a dicho compuesto.

8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enfermedad es una enfermedad neoplásica o un enfermedad autoinmune.

15 9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la enfermedad es un cáncer.

10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer gástrico,

cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores malignos hematológicos, melanoma y sarcomas.

5 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y melanoma.

12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de pulmón y melanoma.

10 13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde una concentración elevada de estatmina en la muestra del sujeto con relación a un valor estándar o conjunto de valores estándares predice resistencia.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde concentraciones más altas de estatmina en una muestra o muestras

i) con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándares de sujetos con el mismo histotipo del tumor; o

15 ii) con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándares a partir de tejidos normales; son predictivas de resistencia.

20 15. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el biomarcador se utiliza para seleccionar sujetos que padecen o están predispuestos a padecer una enfermedad, preferiblemente cáncer, para el tratamiento con un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la muestra se deriva de tejido tumoral, tejido normal, células tumorales circulantes, líneas celulares, plasma, sangre entera o suero, preferiblemente en donde se deriva de tejido tumoral.

17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la muestra se deriva de suero.

25 18. Un método para predecir en un sujeto que padece cáncer la respuesta de ese cáncer a un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:

30 a) medir una concentración ex vivo de estatmina en una muestra pre-obtenida del tejido tumoral o células tumorales circulantes del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración; y

b) comparar el valor o los valores de la etapa a) con un valor estándar o un conjunto de valores estándares de los sujetos con el mismo tipo de cáncer,

35 en donde una concentración de estatmina superior en la muestra en relación con el valor estándar o el conjunto de valores estándares es predictiva de la resistencia del cáncer del sujeto al compuesto de fórmula (I), y preferiblemente en donde el cáncer es un cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12.

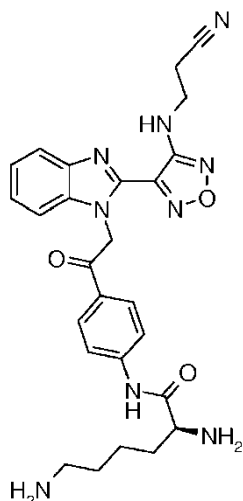
40 19. Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune en un sujeto humano que padece dicha enfermedad, caracterizado por que el sujeto humano tiene una concentración de estatmina, medida ex vivo en una muestra de un sujeto humano que no es mayor que un valor estándar o conjunto de valores estándares de sujetos con el mismo histotipo de tumor o de células, tejido o fluido corporal normales, en donde una concentración elevada de estatmina en la muestra obtenida del sujeto con relación al valor estándar o conjunto de valores estándares es predictiva de resistencia al compuesto de fórmula I.

20. El compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 19, para uso en el tratamiento del cáncer, preferiblemente un cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12.

5 21. Un kit para predecir la respuesta a un compuesto de fórmula I general o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende reactivos necesarios para medir una concentración de estatmina en una muestra tomada de un sujeto con un cáncer, que  
 10 comprende un compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el derivado farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en una sal, solvato, éster o amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto;  
 y que comprende, además, un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores  
 15 estándares de una concentración de estatmina tomada de muestras de tejido tumoral o células tumorales circulantes de sujetos con un cáncer del mismo histotipo con el que se compara la concentración de estatmina, en donde una concentración elevada de estatmina en la muestra obtenida del sujeto con relación al valor estándar o conjunto de valores estándares es predictiva de resistencia al compuesto de fórmula (I).

15 22. El kit de acuerdo con la reivindicación 21, en donde los reactivos comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para estatmina y un reactivo detector, preferiblemente, en donde el reactivo de captura es un anticuerpo.

23. El kit de acuerdo con la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en donde el compuesto es un compuesto de la siguiente fórmula



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal dihidrocloruro del mismo.

Figura 1

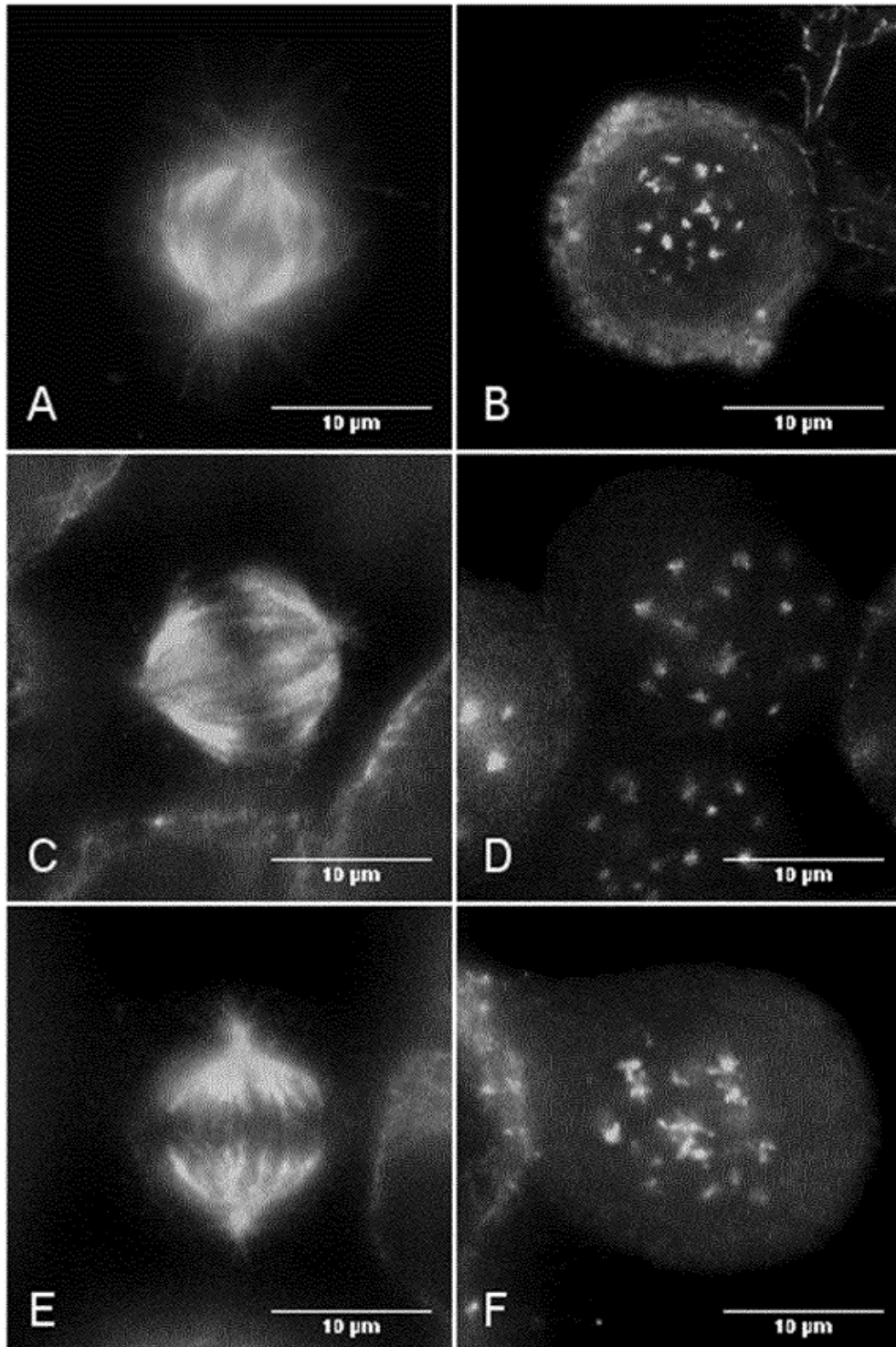


Figura 2

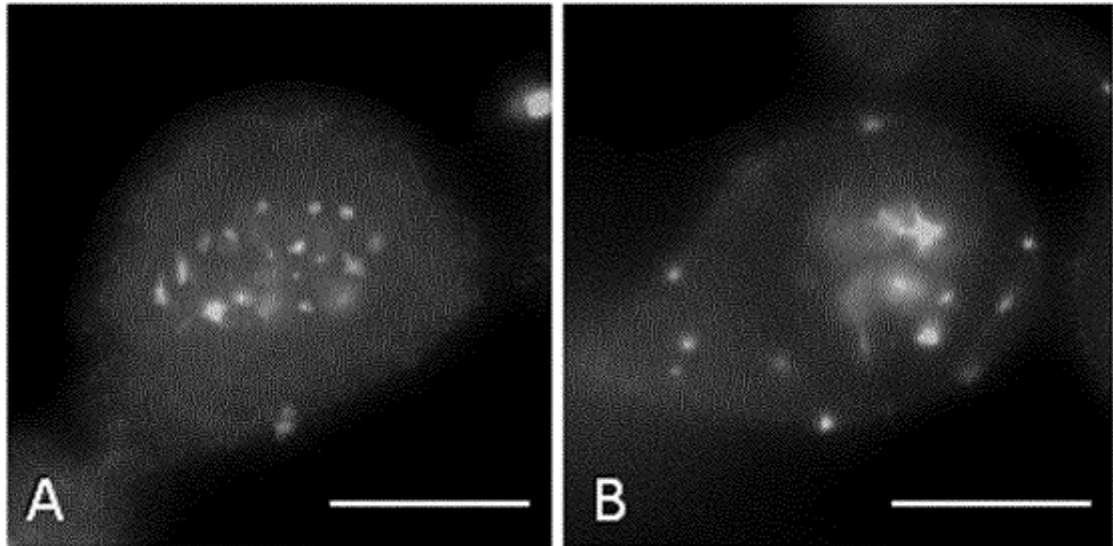
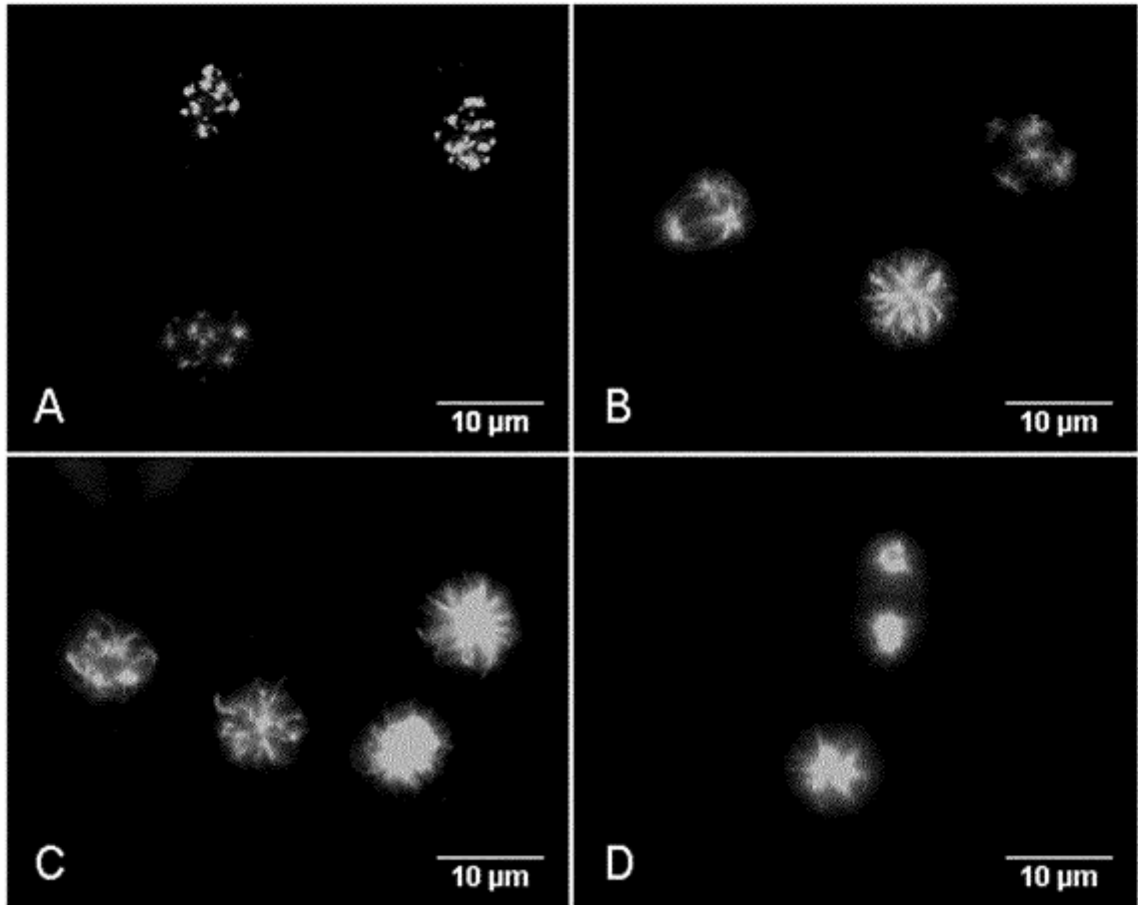


Figura 3





**Figura 4**

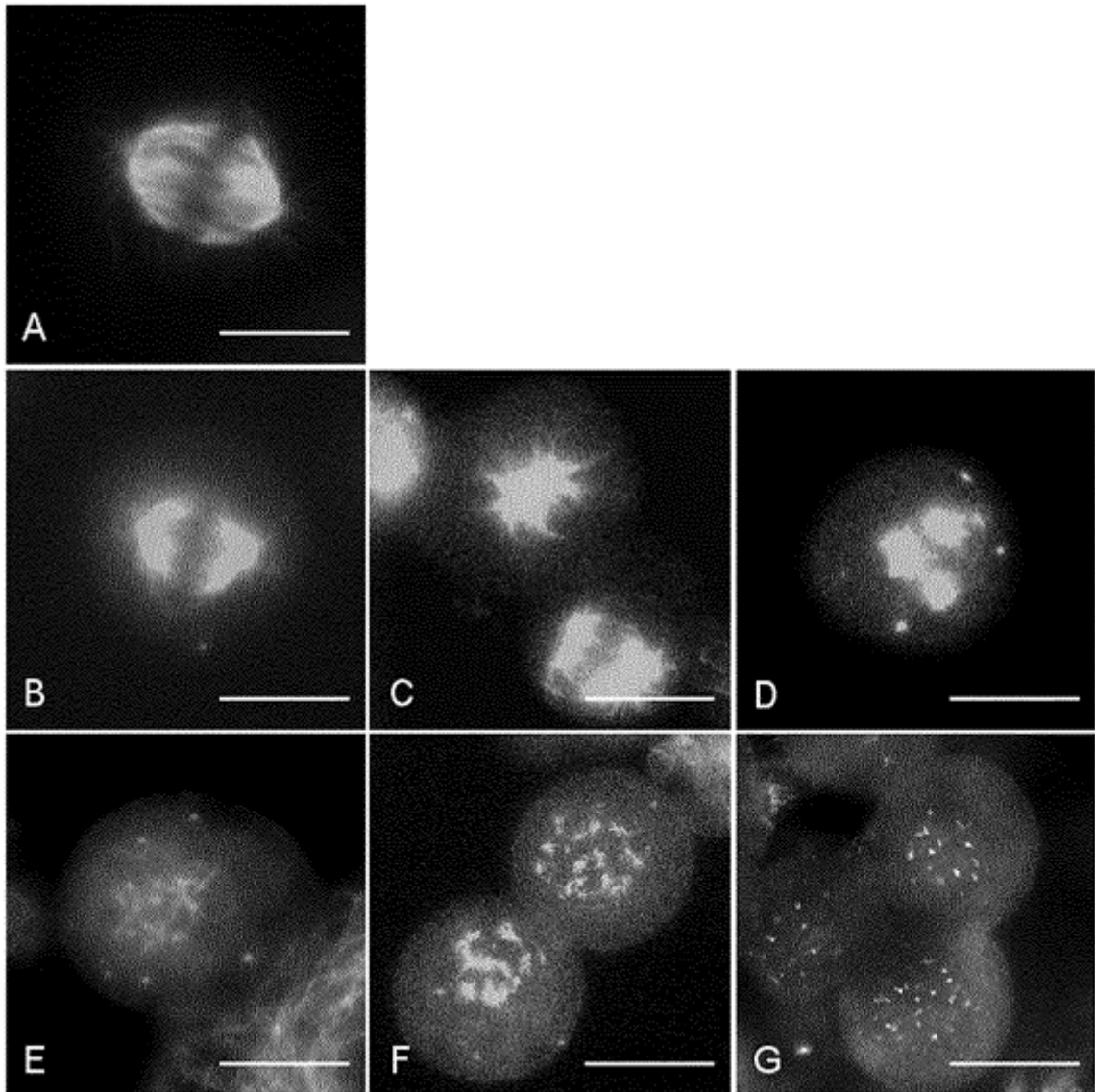


Figura 5

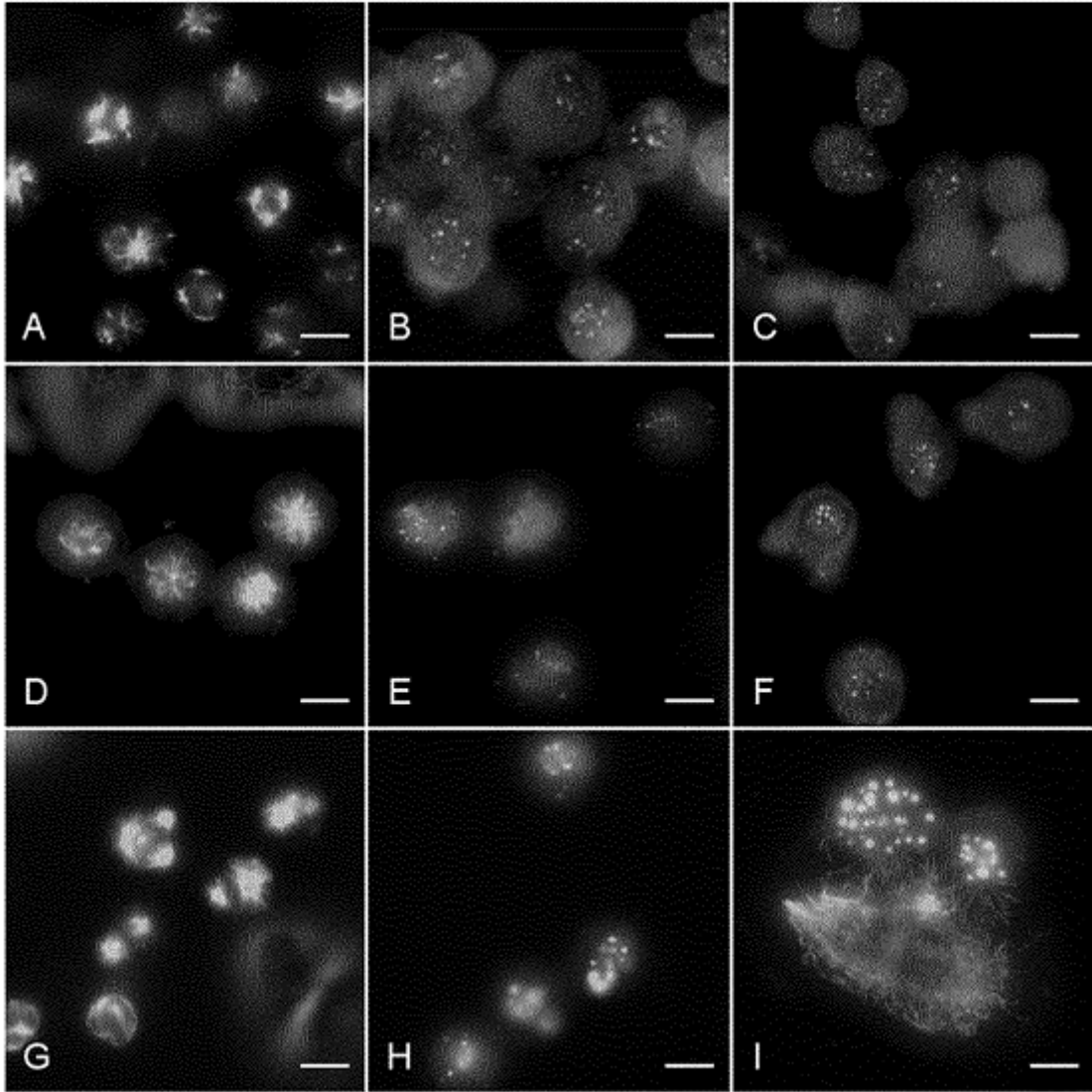


Figura 6

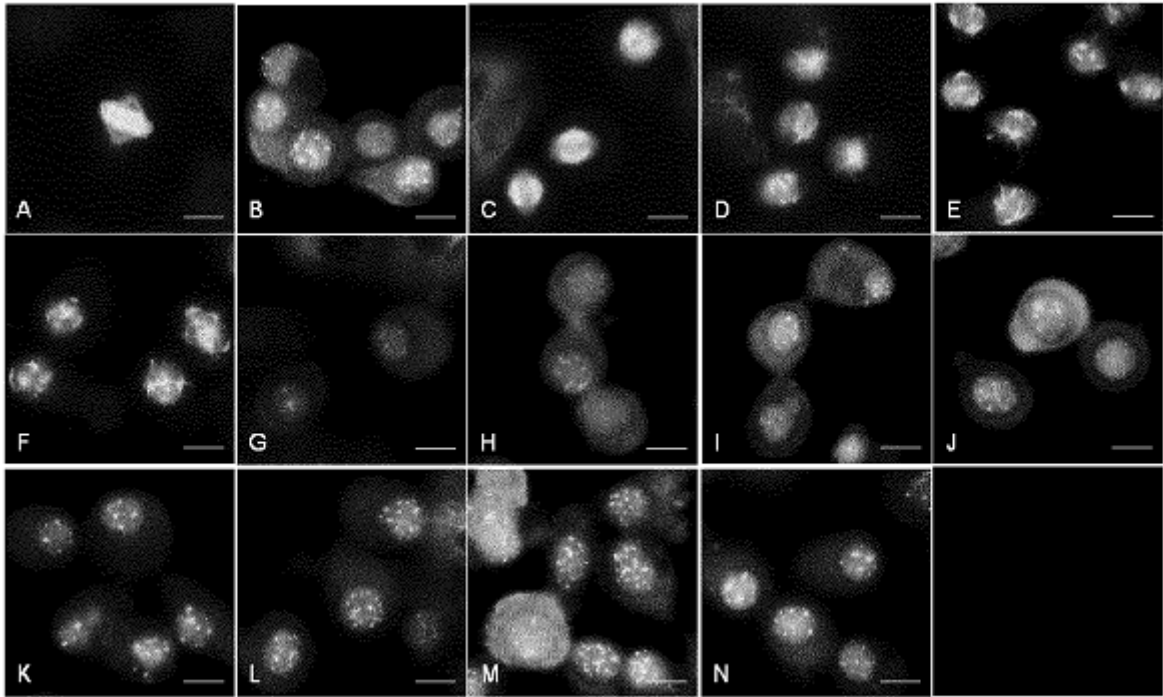
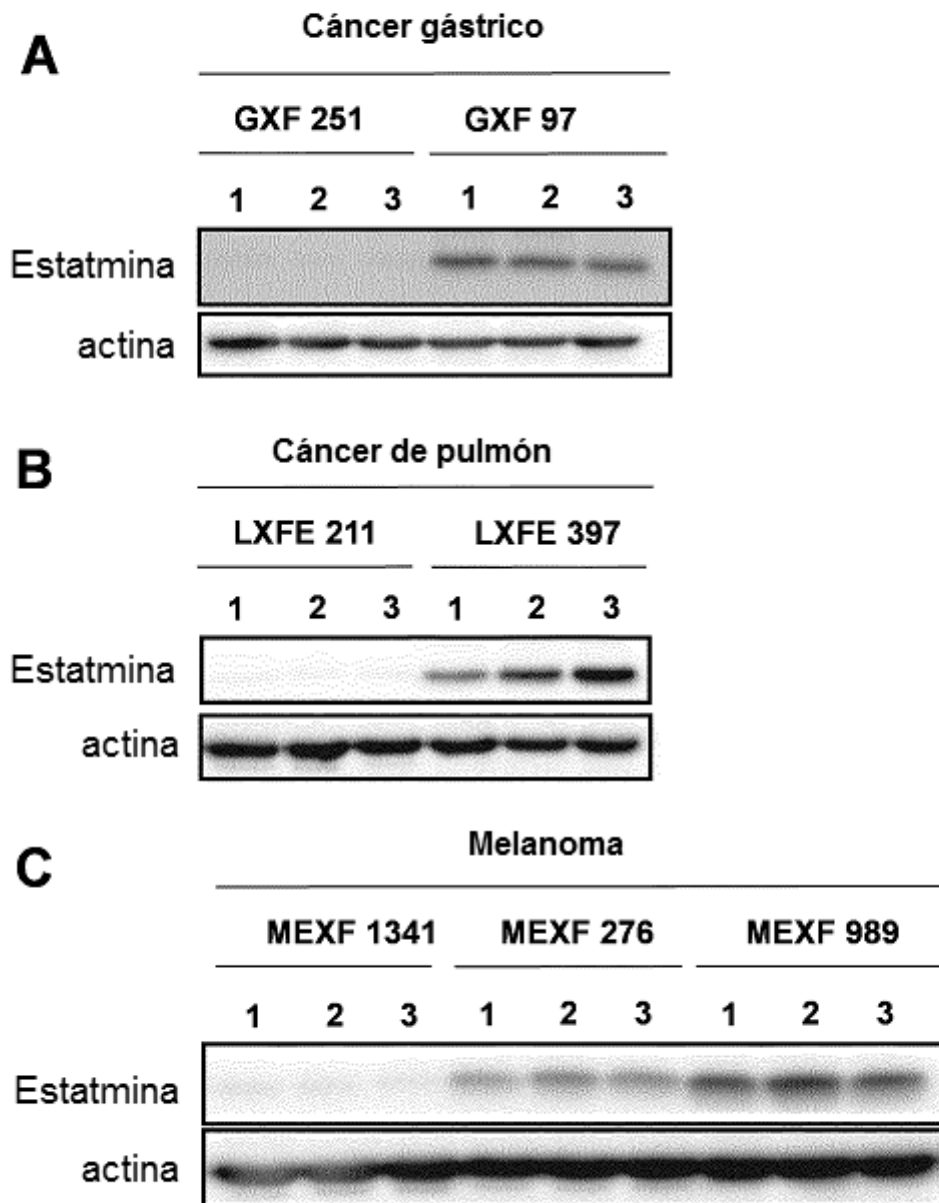


Figura 7



**Figura 8**

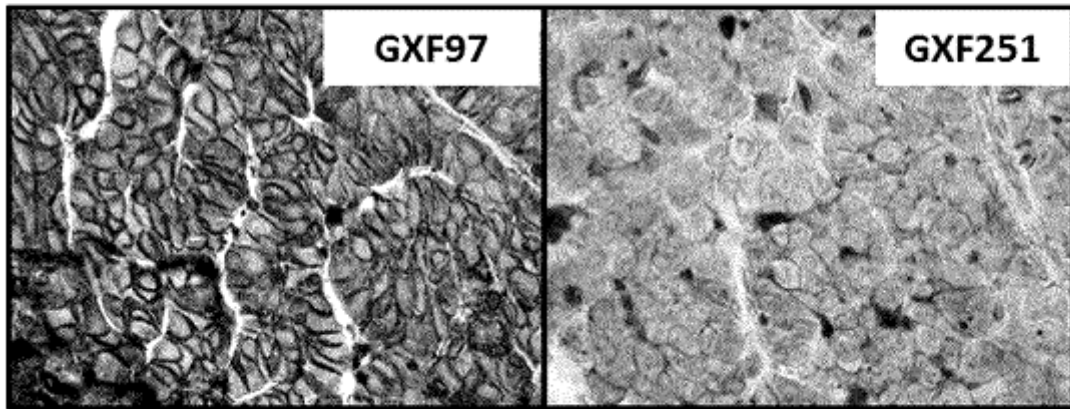


Figura 9

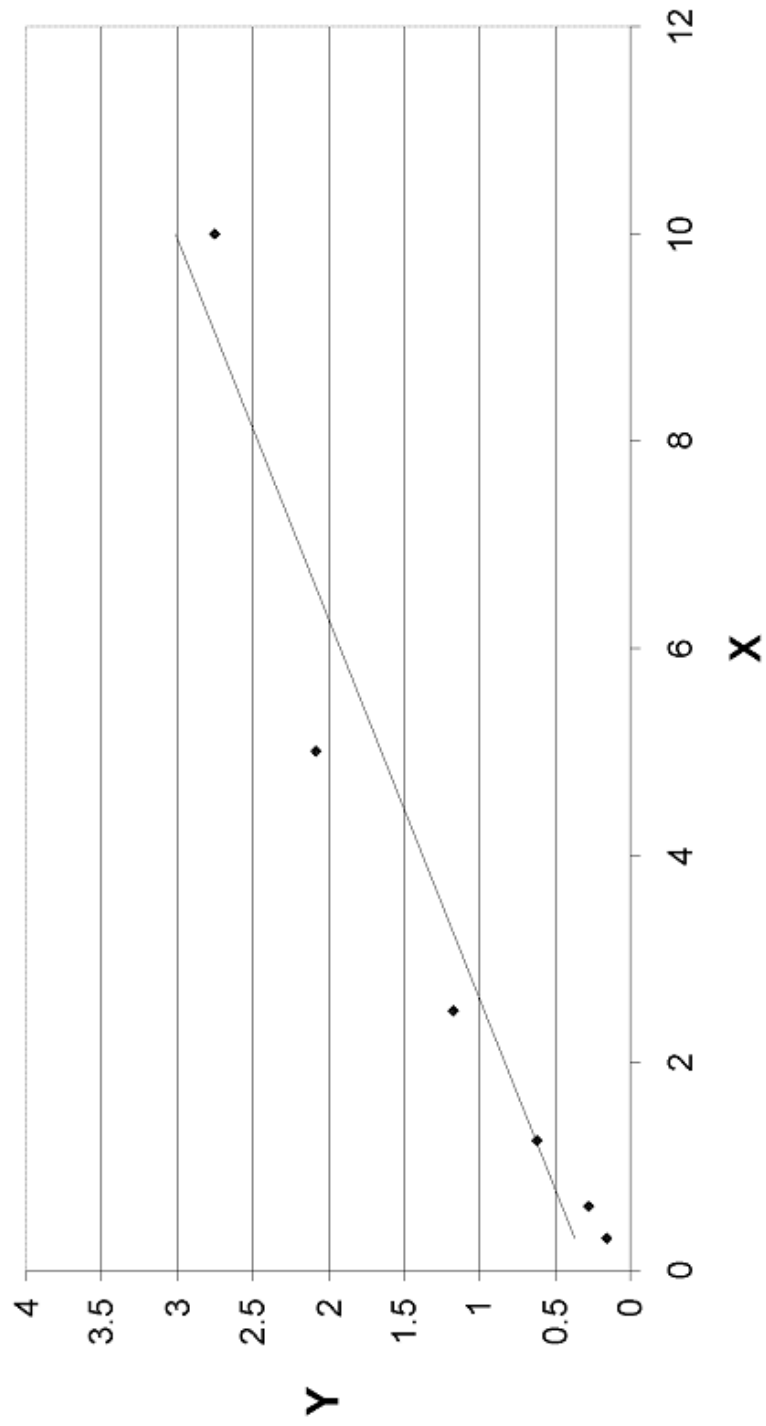


Figura 10

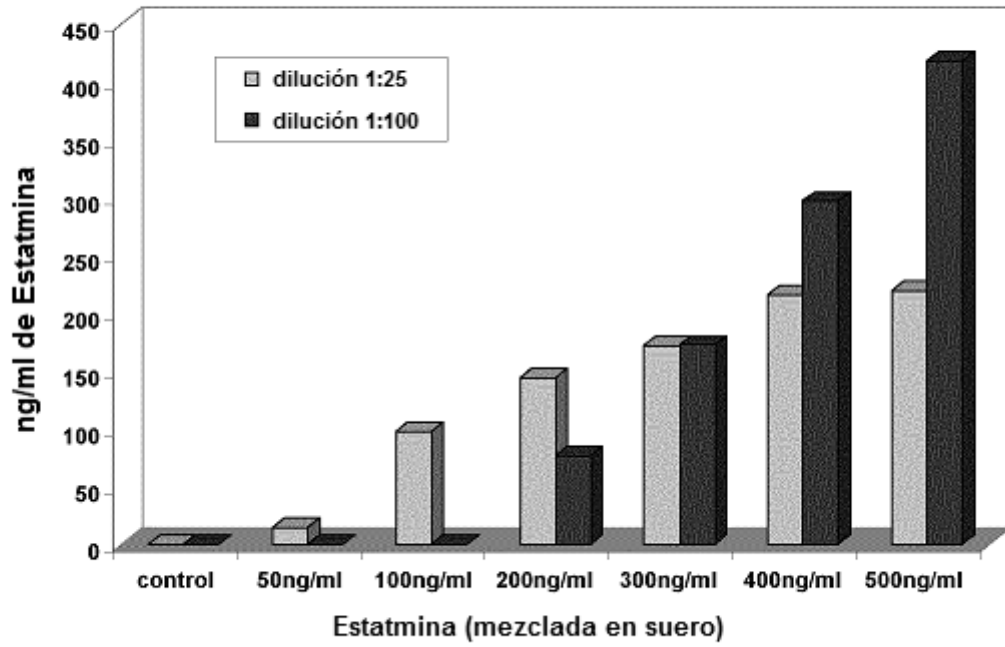
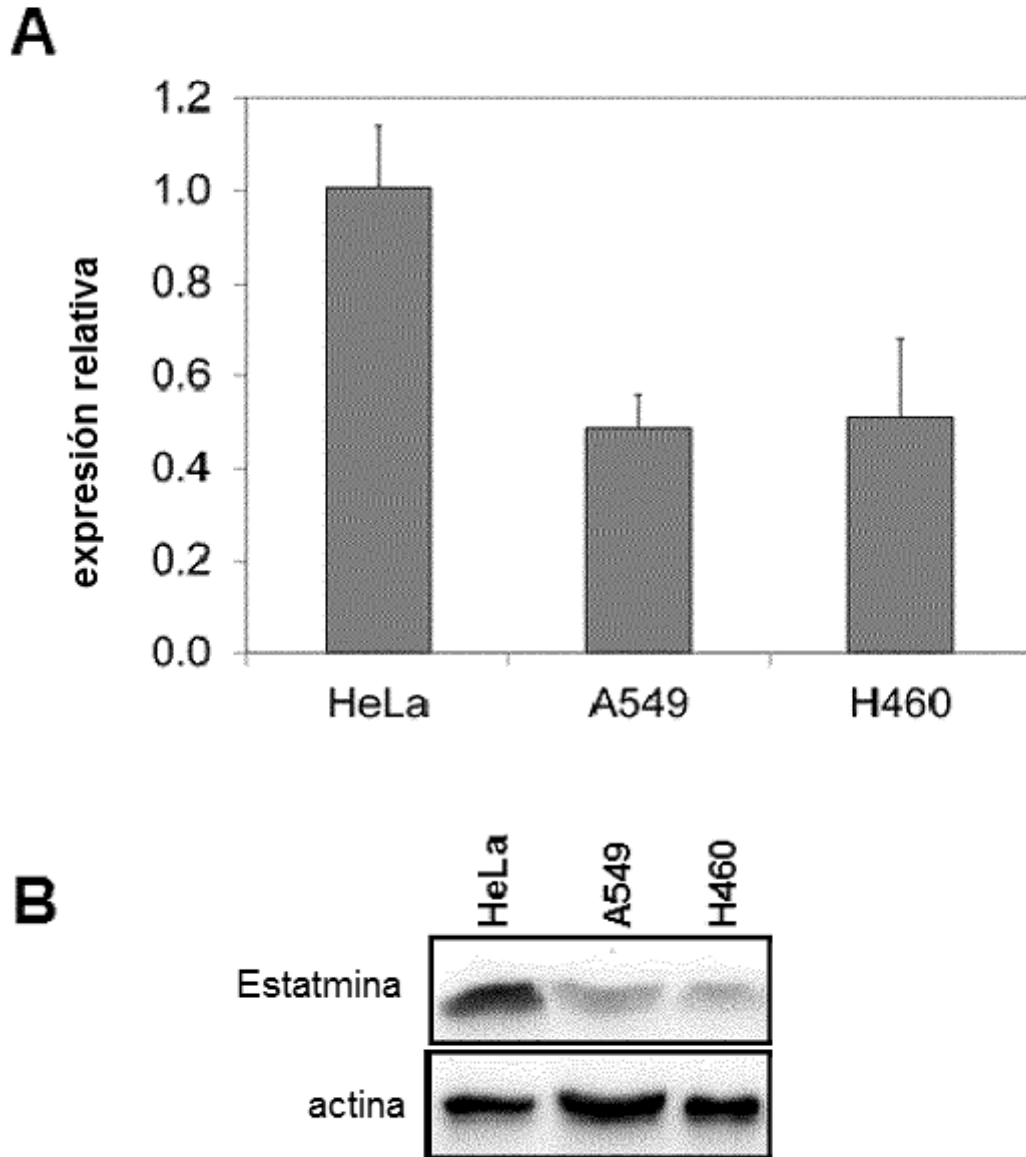


Figura 11





**Fig. 12A**

isoforma a de estatmina [Homo sapiens] (Secuencia ID N° 1)

```
1 massdiqvke lekrasgqaf elilsprske svpefplspp kkkdlsleei qkkleaaeer  
61 rksheaevlk qlaekrehek evlqkaieen nnfskmaeek lthkmeanke nreaqmaakl  
121 erlrekdkhi eevrknesk dpadetead
```

**Fig. 12B**

isoforma b de estatmina [Homo sapiens] (Secuencia ID N° 2)

```
1 massdiqvke lekrasgqaf elilsprske svpefplspp kkkdlsleei qkkleaaeer  
61 rksheaevlk qlaekrehek evlqkaieen nnfskmaeek lthkmeanke nreaqmaakl  
121 erlrekmyfw thgpgahpaq isaeqsclhs vpalcpalgl qsalitwsdl shhh
```

**Figura 13**

estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 3 (SEQ ID N° 3)

```

1 gctctcggcc aatgcgggagc cccgcgcgga ggtcacgtgc ctctgtttgg cgcttttgtg
61 cgcgccccggg tctgttggtg ctcagagtgt ggtcaggcgg ctcggaactga gcaggacttt
121 ccttatccca gttgattgtg cagaatacac tgctgtgcgc ttgtctteta ttcaccatgg
181 cttcttctga tatccagggtg aaagaactgg agaagcgtgc ctcaggccag gcttttgagc
241 tgattctcag ccctcgggtca aaagaatctg ttccagaatt cccctttcc cctccaaaga
301 agaaggatct ttccctggag gaaattcaga agaaattaga agctgcagaa gaaagacgca
361 agtcccatga agctgaggtc ttgaagcagc tggtcgagaa acgagagcac gagaaagaag
421 tgcttcagaa ggcaatagaa gagaacaaca acttcagtaa aatggcagaa gagaaactga
481 cccacaaaat ggaagctaataa agagagaacc gagaggcaca aatggctgcc aaactggaac
541 gtttgcgaga gaaggataag cacattgaag aagtgcggaa gaacaaagaa tccaaagacc
601 ctgctgacga gactgaagct gactaatttg ttctgagaac tgactttctc cccatcccct
661 tcttaaatat ccaaagactg tactggccag tgtcatttta ttttttccct cctgacaaat
721 attttagaag ctaatgtagg actgtatagg tagatccaga tccagactgt aagatgttgt
781 tttaggggct aaaggggaga aactgaaagt gttttactct ttttctaaag tgttggtctt
841 tctaattgtag ctatttttct tgttgcatct tttctacttc agtacacttg gtgtactggg
901 ttaatggcta gtactgtatt ggctctgtga aaacatattt gtgaaaagag tatgtagtgg
961 cttcttttga actgttagat gctgaatata tgttcacttt tcaatcccaa ttctgtccca
1021 atcttaccag atgctactgg acttgaatgg ttaataaaaac tgcacagtgc tgttggtggc
1081 agtgacttct tttgagttag gtttaataaat caagccatag agcccctcct ggttgatact
1141 tgttccagat ggggcctttg gggctggtag aaatacccaa cgcacaaatg accgcacggt
1201 ctctgccccg tttcttgccc cagtgtggtt tgcattgtct ccttccaaa tgactgcttt
1261 gtttgatgc ctcagcccag gtcagctggt actttctttc agatgtttat ttgcaaaaa
1321 ccattttttg ttctgtgtcc cttttaaaag gcagattaaa agcacaagcg tgtttctaga
1381 gaacagttga gagagaatct caagattcta cttgggtggtt tgcttgctct acgttacagg
1441 tggggcatgt cctcatcctt tctgcccata aaagctatga cacgagaatc agaatattaa
1501 taaaacttta tgtactgctg tagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

**Figura 14**

estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 2, (SEQ ID N° 4)

```

1 aggggcactg ctctgtccga gtgctgccct tggggcgagg cgggcatgtg gctctacaag
61 gtggagtcca ggcggccaaa gtttgaaag gactttcctt atcccagttg attgtgcaga
121 atacaactgcc tgtcgcttgt cttctattca ccatggcttc ttctgatata caggtgaaag
181 aactggagaa gcgtgcctca ggccaggctt ttgagctgat tctcagccct cggtcaaaag
241 aatctgttcc agaattcccc ctttcccctc caaagaagaa ggatctttcc ctggaggaaa
301 ttcagaagaa attagaagct gcagaagaaa gacgcaagtc ccatgaagct gaggtcttga
361 agcagctggc tgagaaacga gagcacgaga aagaagtgtc tcagaaggca atagaagaga
421 acaacaactt cagtaaaatg gcagaagaga aactgaccca caaaatggaa gctaataaag
481 agaaccgaga ggcacaaatg gctgccaaac tggaacgttt gcgagagaag gataagcaca
541 ttgaagaagt gcggaagaac aaagaatcca aagaccctgc tgacgagact gaagctgact
601 aatctgttct gagaactgac tttctcccca tccccttctt aaatatccaa agactgtact
661 ggccagtgtc attttatattt ttccctcctg acaaatattt tagaagctaa tgtaggactg
721 tataggtaga tccagatcca gactgtaaga tgttgtttta ggggctaaag gggagaaact
781 gaaagtgttt tactcttttt ctaaagtgtt ggtctttcta atgtagctat tttcttggtt
841 gcatcttttc tacttcagta cacttggtgt actgggttaa tggctagtag tgtattggct
901 ctgtgaaaac atatctgtga aaagagtatg tagtggcttc ttttgaactg ttagatgctg
961 aatatctgtt cacttttcaa tccaattct gtccaatct taccagatgc tactggactt
1021 gaatgggttaa taaaactgca cagtgtgtt ggtggcagtg acttcttttg agttaggtta
1081 ataaatcaag ccatagagcc cctcctgggt gatacttgtt ccagatgggg cctttggggc
1141 tggtagaat acccaacgca caaatgaccg cacgttctct gcccogtttc ttgccccagt
1201 gtggtttgca ttgtctcctt ccacaatgac tgctttgttt ggatgcctca gcccaggtea
1261 gctgttactt tctttcagat gtttatattg aaacaacat tttttgttct gtgtcccttt
1321 taaaaggcag attaaaagca caagcgtgtt tctagagaac agttgagaga gaatctcaag
1381 attctacttg gtggtttgct tgctctacgt tacaggtggg gcatgtcctc atcctttcct
1441 gccataaaag ctatgacacg agaatcagaa tattaataaa actttatgta ctgctgtagc
1501 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

**Figura 15**

estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 1, (SEQ ID, Nº 5)

```

1 atcacccgggc gtcgcctcog ggggtgccgtc gaggagacaa tagggggcgt gggccctcgt
61 ttacctccct cctccctcc cttccctgog ggccccgcog ggttccccat tgtctgaagg
121 gacggggcgg tgccccagg accagcggct ttaggaccaa actgcgggca gccagggccg
181 cgacctccc tgcgaccgtc cctggcgac cgcagctggt gattgagggg cggcgtccc
241 gggccccacg agggttcttc tgtcttcgog gccggacgog cggacagcgt ggggtggcggc
301 aggactttcc ttatcccagt tgattgtgca gaatacactg cctgtcgtt gtcttctatt
361 caccatggct tcttctgata tccaggtgaa agaactggag aagcgtgcct caggccaggc
421 ttttgagctg attctcagcc ctccgtcaaa agaactctgt ccagaattcc cctttcccc
481 tccaaagaag aaggatcttt cctggagga aattcagaag aaattagaag ctgcagaaga
541 aagacgcaag tccatgaag ctgaggtctt gaagcagctg gctgagaaac gagagcacga
601 gaaagaagtg cttcagaagg caatagaaga gaacaacaac ttcagtaaaa tggcagaaga
661 gaaactgacc cacaaaatgg aagctaataa agagaaccga gaggcacaaa tggctgccaa
721 actggaacgt ttgcgagaga aggataagca cattgaagaa gtgcggaaga acaagaatc
781 caaagaccct gctgacgaga ctgaagctga ctaatttggt ctgagaactg actttctccc
841 catccccctt ctaaatatcc aaagactgta ctggccagtg tcattttatt tttccctcc
901 tgacaaatat tttagaagct aatgtaggac tgtataggta gatccagatc cagactgtaa
961 gatgttgttt taggggctaa aggggagaaa ctgaaagtgt tttactcttt ttctaaagt
1021 ttggtctttc taatgtagct atttttcttg ttgcatcttt tctacttcag tacacttggg
1081 gtactgggtt aatggctagt actgtattgg ctctgtgaaa acatatttgt gaaaagagta
1141 tgtagtggct tcttttgaac tgtagatgc tgaatatctg ttcacttttc aatcccaatt
1201 ctgtcccaat cttaccagat gctactggac ttgaatgggt aataaaactg cacagtgctg
1261 ttggtggcag tgacttcttt tgagttaggt taataaatca agccatagag cccctcctgg
1321 ttgatacttg ttcagatgg ggcctttggg gctggtagaa ataccacacg cacaaatgac
1381 cgcacgttct ctgccccgtt tcttgcocca gtgtggtttg cattgtctcc ttcacaatg
1441 actgctttgt ttggatgcct cagcccaggt cagctgttac tttctttcag atgtttattt
1501 gcaaacaacc attttttgggt ctgtgtccct tttaaaaggc agattaaaag cacaagcgtg
1561 tttctagaga acagttgaga gagaatctca agattctact tgggtggtttg cttgctctac
1621 gttacagggt gggcatgtcc tcatccttcc ctgccataaa agctatgaca cgagaatcag
1681 aatattaata aaactttatg tactgctgta gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

Figura 16

estatmina de Homo sapiens, variante de transcrito 4, (SEQ ID N° 6)

```

1 gctctcggcc aatgcggagc cccgcgcgga ggtcacgtgc ctctgtttgg cgcttttgtg
61 cgcgcccggg tctgttggtg ctccagagtgt ggtcaggcgg ctccgactga gcaggacttt
121 ccttatccca gttgattgtg cagaatacac tgccctgtcgc ttgtcttcta ttcaccatgg
181 cttcttctga tatccaggtg aaagaactgg agaagcgtgc ctccaggccag gcttttgagc
241 tgattctcag cccctcggta aaagaatctg ttccagaatt cccctttcc cctccaaaga
301 agaaggatct tccctggag gaaattcaga agaaattaga agctgcagaa gaaagacgca
361 agtcccatga agctgaggtc ttgaagcagc tggctgagaa acgagagcac gagaaagaag
421 tgcttcagaa ggcaatagaa gagaacaaca acttcagtaa aatggcagaa gagaaactga
481 cccacaaaat ggaagctaataaagagaacc gagaggcaca aatggctgcc aaactggaac
541 gtttgcgaga gaagatgtac ttctggactc acgggcctgg ggcccccca gcacagatct
601 ctgctgagca atcttgtctc cactctgttc ctgccccttg cccagccctg ggccctccat
661 ctgcattgat tacctggctc gatctctctc accatcacta ggtacttaataaatatcttgc
721 tgttgatgat agcaatgacc ttgagactga tgaacagtct ggccaagagg atccttgatg
781 tggaagatag aaaaagcctt tggggtcagg cagacttggga ttctaatacc agccagtctc
841 gcttgctgtg tctgagcctc agtttactca tctgtgaaga ggaggtagca agaatgaaaa
901 tgcctgcctt gtggtttgtt gtaaggacag aactgcca cgtagagggc ccagcagctc
961 acagaccagt tgctctgaga gcagaccact cttgcccctga tggtagggaa ctatctttgt
1021 gcgtggcaag tgggacctta ggaaggaagg caactgtgag gcttctgaga aggacctac
1081 acaaggaggt tccctcccag ggcaggtgaa tggagagggg ggcaagcc tacgggaagg
1141 ggtcacaggg atcagctaga gagtgccacc acccttccctg gggaatgcag ggcaaggctc
1201 ctggtgggag ttttccctggg aagccaaaga agcgcaccaac aaagacagaa tcaacatttg
1261 ggtacctttg gtaccagag gcagcaatgc caactacaac cactcggaa gaagaagacc
1321 ttctccgcat agattctctg atctcttctc ccttcatggc accagccctg gggaaccagc
1381 atggtgggga aataatgaag ctggaataca accacttaca gacttcaca cctcctcctg
1441 tagataccaa agggatttta ggatcacatt ttatctctca cctgagcaag aaaagctaca
1501 ggagcatctc aagcagaggg caggagtctc cagaggagtt caaggggctc tggcaagaaa
1561 aatcaagggg ctgtgttcaa gaactggctc ccttgggtgat tgtattacga agcccatgtg
1621 tgctggatgc tgatgaaatt gctgccaaat gcctgtgcag ccttggcaag gccctttatt
1681 tctctgggtc tccatttctc tctctctttt tttttttttt ttttttttga ggcagagtct
1741 cactctgtcg cccaggtctg agggcagtgg cgtgatctcg gctcactgca agccccacct
1801 tctgagttca cgcatttcta ctgcccagc ctcccagta gctgggacta caggcgcaca
1861 ccaccacgcc cggcttattt tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac cgcattagcc
1921 aagatggctc cgatctcctg acctcgtgat tcaaccacct cagcctcca aagtgtctgg
1981 attacaggca tgagccactg cgcgccgctt gggctctcgt ttctctagct gtgaaatgac
2041 tgttctaaaa gagccctgcc ggactttggc agtctgtaag aagacctgag ttctctctc
2101 agttccaagc aggaaaattg aacataccct gagcccagag cctgcaacaa actctgggca
2161 gcctcaggaa gtcaggcagt gaagtcggaa aatgatctc ttctgtatag ggagaaaata
2221 aaagtttaaa aatttgtaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaaa aaaaa

```